

本文引用:王志洲,邹德宝,石威,姜红江.基于网络药理学和实验验证探讨淫羊藿苷经 MAPK 信号通路防治激素性股骨头坏死的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2022,42(10): 1749-1756.

基于网络药理学和实验验证探讨淫羊藿苷经 MAPK 信号通路防治激素性股骨头坏死的作用机制

王志洲¹, 邹德宝², 石威^{1,2}, 姜红江^{1,2*}

(1.安徽中医药大学,安徽合肥 230000;2.山东省文登整骨医院,山东威海 264400)

[摘要] **目的** 通过网络药理学结合药理实验验证探析淫羊藿苷 (icariin, ICA) 通过 MAPK 信号通路防治激素性股骨头坏死 (steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH) 的作用机制。**方法** 基于 PharmMapper 数据库预测 ICA 的潜在靶点并借助 UniProt 数据库进行蛋白质标准化;从 OMIM、GeneCards、DisGeNET 数据库获取 SANFH 的靶点,借助 STRING 平台对 ICA-SANFH 共同靶点构建 PPI 网络图并运用 Cytoscape 软件进一步挖掘出更为重要的靶点;利用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 分析,并使用 Cytoscape 软件构建“靶点-通路”图。24 只 SPF 级雌性 SD 大鼠随机均分为空白组、模型组及 ICA 组,通过激素联合脂多糖构建 SANFH 模型,连续灌胃 8 周。Micro-CT 定量分析股骨头骨参数,Western blot 检测 p-ERK1、p-p38、p-JNK 蛋白的表达。**结果** 得到 ICA 靶点 226 个, SANFH 相关靶点 677 个,核心靶点 ALB、AKT1、MAPK9、IGF1、EGFR 等通过癌症、MAPK、PI3K-Akt 等信号通路参与调控 SANFH。药理实验验证结果显示:与空白组相比,模型组大鼠 BMD、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp、p-ERK1、p-p38、p-JNK 蛋白差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,ICA 组大鼠 BMD、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp、p-ERK1、p-p38、p-JNK 蛋白差异具有统计学意义($P<0.05$)。

结论 本次研究证实了 ICA 经 MAPK 信号通路治疗 SANFH 的作用机制,具有一定的应用价值。

[关键词] 网络药理学;药理实验;淫羊藿苷;激素性股骨头坏死;MAPK 通路;作用机制

[中图分类号] R224

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.10.026

Investigating the mechanism of icariin to prevent and treat steroid-induced avascular necrosis of the femoral head through MAPK signaling pathways based on network pharmacology and experimental verification

WANG Zhizhou¹, ZOU Debao², SHI Wei^{1,2}, JIANG Hongjiang^{1,2*}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230000, China;

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

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of icariin (ICA) in preventing and treating steroid-induced avascular necrosis of the femoral head through MAPK signaling pathways based on network pharmacology and experimental verification. **Methods** Potential targets of ICA were predicted based on PharmMapper database and protein standardization was carried out by UniProt database. The targets of SANFH were obtained from OMIM, GeneCards and DisGeNET databases. The protein-protein interaction (PPI) network map of ICA-SANFH common targets was constructed with STRING platform, and more important targets were further mined by Cytoscape 3.9.1 software. DAVID database functioned to perform gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis, and Cytoscape software worked to draw the "target-pathway" maps. Besides, 24 SPF female SD rats were randomly divided into the blank group, model group and ICA group. The SANFH model with hormone and

[收稿日期] 2022-06-17

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0798);威海市组织工程与再生医学重点实验室研究项目;威海市第四批中医重点专科建设项目(骨关节科)(威海办[2019]87号)。

[第一作者] 王志洲,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,主任医师,教授,硕士研究生导师, E-mail: boneman@163.com。

lipopolysaccharide was constructed and received the gavage for 8 weeks. We obtained the femoral head bone parameters by Micro-CT quantitative analysis, and detected the expressions of p-ERK1, P-p38, P-JNK proteins by the western-blot. **Results** We obtained 226 ICA targets and 677 SANFH-related targets, among which, ALB, AKT1, MAPK9, IGF1, EGFR and other core targets were involved in the regulation of SANFH through cancer, MAPK, PI3K-Akt and other signaling pathways. From the pharmacological experiment, we found significant difference in BMD, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, p-ERK1, p-p38, p-JNK proteins between the blank group and model group ($P<0.05$). Moreover, there existed significant difference in BMD, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, p-ERK1, p-p38 and p-JNK proteins between the model group and ICA group ($P<0.05$). **Conclusion** The mechanism of ICA in the treatment of SANFH through MAPK signaling pathway was verified, which could be applied in practice.

[**Keywords**] network pharmacology; pharmacological experiment; icariin; steroid-induced avascular necrosis of the femoral head; MAPK pathway; mechanism of action

激素性股骨头坏死(steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH)是由于长期或大剂量服用激素使血管胶原纤维和弹性纤维功能障碍,股骨头内微小动脉栓塞引起股骨头发生局部或完全性的缺血,从而导致股骨头坏死,是骨科临床最常见的疑难疾病,其主要表现为髋部疼痛和髋关节内旋功能障碍^[1-2]。流行病学调查显示,该病常见于30~50岁的中青年男性人群,超一半以上的患者发病累及双侧^[3],已占据非创伤性股骨头坏死总发病的近60%^[4],且近年来发病率呈逐年升高的趋势,每年新增约15~20万病例^[5-6]。股骨头坏死范围广,且进展不可逆,致残率极高,已经严重危害患者的生命健康以及降低患者的生活质量^[7]。现今,对于SANFH的治疗通常使用降脂、抗凝药,其毒副作用大且疗效不明显,所以需要迫切寻求更有效的防治方法。中医药具有几千年的历史文明,其治疗股骨头坏死源来已久,具备完善的理论、丰富的临床经验和独特的优势,可作为防治股骨头坏死的首选方法。淫羊藿苷(icariin, ICA)是中药淫羊藿的一种提取成分,有补肾、抗衰老的作用^[8-9]。现代药理研究证实,ICA具备优良的促进成骨的功效,但其治疗SANFH的作用机制尚不明确,此次实验基于网络药理学和动物实验验证的方法进一步探讨ICA防治SANFH的机制,以为后续研究提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

8周龄SPF级雄性SD大鼠共24只,体质量270~310g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,许可证号:SCXK(鲁)20190003。动物饲养于山东省文登整骨医院骨伤组织工程实验室(三级),笼温控制在 (20 ± 2) ℃,相对湿度45%~55%。本次实验动物研究通过山东省文登整骨医院医学伦理委员会批准(伦理审批编号:LL2022011501)。

1.2 实验仪器

电子天平(型号:A2013,上海民桥精密科学仪器有限公司);双通道流量计(型号:MS-2,上海玉研科学仪器有限公司);Micro-CT(型号:NMC-100,昆山平生医疗科技有限公司);-80℃冰箱(型号:DW-86L338J,青岛海尔生物医疗股份有限公司);Western blot系统(型号:VE-586,上海天能科技有限公司);高速离心机(型号:Micro21R,赛默飞世尔科技公司)。

1.3 实验药物与试剂

ICA(批号:115H021,北京索莱宝科技有限公司);脂多糖(批号:012021210430,北京碧云天生物技术有限公司);甲泼尼龙(批号:20110408,国药集团容生制药有限公司);青霉素钠(批号:43201105,山东鲁抗医药股份有限公司);苯巴比妥钠(批号:2103071,天津金耀生物科技有限公司);异氟烷(批号:202106,北京科月华诚科技有限公司);牛血清白蛋白、5%脱脂奶粉、RIPA裂解液、PMSF、一抗/二抗稀释液、PVDF膜、TBST溶液、特超敏ECL试剂盒、p-ERK1抗体、p-p38抗体、p-JNK抗体、GAPDH抗体(北京碧云天生物技术有限公司,批号分别为ST025、P0216、P0013C、ST505、P0023AP0023D、FFP26、P0231、P0018AS、AF1891、AF5884、AF5860、AF0006)。

2 方法

2.1 ICA潜在靶点预测

通过TCMSP数据库^[10]查询ICA的ADME属性值和CAS号,从PubChem数据库^[11]获得ICA 2D结构用于PharmMapper数据库^[12]潜在靶点的预测,根据Norm Fit^[12]进行潜在靶点筛选,完成后利用UniProt数据库对蛋白质靶点进行标准化。

2.2 SANFH相关靶点获取

以“steroid-induced avascular necrosis of the femoral head”为主题词,检索OMIM数据库^[13]、GeneCards数据库^[14]、DisGeNET数据库^[15]中SANFH的相

关靶点,合并3个数据库靶点,去重后得到 SANFH 的相关靶点。

2.3 PPI网络构建

为明确 ICA 潜在靶点与 SANFH 相关靶点之间的关系,将两者靶点导入 Venny 平台制作韦恩图。然后将共同靶点输入 STRING 数据库^[16]构建 PPI 网络模型,最小相互作用值设置为“medium confidence (0.400)”,隐藏网络中断开连接的节点,得到 PPI 网络,并通过 Cytoscape 3.9.1^[17]对 PPI 网络进一步分析,并构建 ICA-SANFH 靶点的可视化网络图。

2.4 ICA 防治 SANFH 相关靶点 GO、KEGG 富集分析

将 ICA 防治 SANFH 的共同靶点录入 DAVID 数据库,根据 count 值选用排名前 10 位、前 20 位数据导入微生物云平台绘制 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 ICA 防治 SANFH 所涉及 KEGG 通路的相关靶点,运用 Cytoscape 3.9.1 构建“靶点-信号通路”网络图。

2.5 实验分组、造模与灌胃方法

24 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分成空白组 ($n=8$)、模型组 ($n=8$)、ICA 组 ($n=8$)。取模型组、ICA 组共 16 只大鼠造模,造模方法参照文献^[18]并进行适当改进。造模组按 $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 确定每只大鼠注射 LPS 剂量。第 3 天开始,造模大鼠臀肌交替注射甲泼尼龙 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连续 10 d。在注射甲泼尼龙后予腹腔注射青霉素钠 $80 \text{ U}\cdot\text{d}^{-1}$ 以预防感染。造模成功后普食饲养 7 d,空白组、模型组均使用生理盐水 5 mL 灌胃,ICA 组按照实验动物用药换算法计算给药剂量,将 ICA 用生理盐水配成 5 mL 药液进行灌胃,连续 8 周。所有实验动物在相同条件下喂养,用悬吊法饮水使其下肢直立行走。8 周后腹腔注射苯巴比妥钠处死实验动物,在清洁条件下剖开双侧股骨头,剔除周围软组织后置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.6 Micro-CT 定量分析股骨头骨参数

在灌胃 8 周后,腹腔注射相应浓度的苯巴比妥钠深度麻醉所有实验动物,在清洁条件下剖开双侧股骨头,使用 Micro-CT 对大鼠股骨头进行扫描定量,分析骨小梁参数如骨矿物质密度 (bone mineral density, BMD)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁数量 (trabecular number, Tb.N) 和骨小梁分离度 (trabecular spacing, Tb.Sp) 4 个指标。

2.7 Western blot 检测相关蛋白的表达

将大鼠股骨头剪碎,与 RIPA 裂解液、PMSF 进

行混合后加入到离心管中,充分研磨并碾碎,再使用组织匀浆机充分裂解,结束后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min,取上清装至离心管中以待检测。使用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定蛋白含量。取适量上清,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min,转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h。加入一抗 (p-ERK1 按 1:2000 稀释、p-p38 按 1:1000 稀释、p-JNK 按 1:1000 稀释、GAPDH 按 1:5000 稀释), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。洗膜后加入二抗,室温孵育 2 h。TBST 溶液洗 3 遍,使用 ECL 试剂盒进行显影。以 GAPDH 为内参,计算各蛋白相对表达量。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件对本次实验所有数据进行统计分析,计量资料使用“ $\bar{x}\pm s$ ”的形式表示,符合正态分布且方差齐的数据采用单因素方差分析。取显著性水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ICA 靶点的筛选

通过 TC MSP 数据库查询到 ICA 的 CAS 号为 489-32-7,OB 值为 41.58%,DL 值为 0.61,符合筛选原则^[19]。PharmMapper 数据库初步提取前 300 位的靶点,对根据 Norm Fit ≥ 0.5 筛选得到的靶点进行标准化,去重后得到预测靶点 226 个,排名前 50 位的预测靶点见表 1。

3.2 SANFH 相关靶点的获取

从 OMIM、GeneCards、DisGeNET 数据库中分别获得 SANFH 相关靶点 84 个、571 个、74 个,合并 3 个数据库的相关靶点后除去重复值,最终得到 677 个 SANFH 相关靶点。

3.3 PPI 网络的构建

将筛选出来的 ICA 靶点与 SANFH 靶点取交集,并通过 Venny 平台制作韦恩图,得到 ICA-SANFH 共同靶点 53 个,见图 1。进而将共同靶点输入 STRING 平台,得到 ICA-SANFH 靶点 PPI 网络,排除 1 个游离的靶点蛋白 (无相互作用蛋白),见图 2。为了进一步筛选出有较多交互关系的靶点,利用 Cytoscape 平台,根据 Degree > 30 筛选出更为重要的共同靶点聚类,见图 3。

3.4 GO、KEGG 富集分析

将 53 个共同靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 富集分析,根据 count 值分别选取排名前 10 位的靶点运用微生物平台对结果进行可视化,见图 4。由结果可见 ICA 参与的重要生物进程包含凋亡过程的

表 1 ICA 的预测靶点

Pharma Model	Norm Fit	Gene	Pharma Model	Norm Fit	Gene	Pharma Model	Norm Fit	Gene
1md3_v	0.990 4	GSTP1	1lyw_v	0.937 2	CTSD	1yb1_v	0.887 5	HSD17B11
2hck_v	0.978 3	HCK	2afu_v	0.927 6	QPCT	2ovm_v	0.885 5	PGR
2pin_v	0.977 0	THRB	2exm_v	0.925 6	CDK2	1m9z_v	0.885 2	TGFBR2
1ogs_v	0.975 7	GBA	1l6l_v	0.922 2	APOA2	1jd0_v	0.884 2	CA12
1pmv_v	0.973 8	MAPK10	1zgy_v	0.918 9	PPARG	1vec_v	0.880 4	DDX6
1z68_v	0.971 2	FAP	2ohs_v	0.918 4	BACE1	1no9_v	0.880 1	F2
1f86_v	0.969 8	TTR	1p49_v	0.915 5	STS	2vwu_v	0.879 1	EPHB4
2c3i_v	0.967 3	PIM1	1w8m_v	0.913	PPIA	1m4u_v	0.872 6	BMP7
1g1q_v	0.959 4	SELP	1xn0_v	0.910 5	PDE4B	2pg2_v	0.839 9	KIF11
2brg_v	0.958 9	CHEK1	1rs0_v	0.909 8	CFB	1qkm_v	0.836 4	ESR2
1xlu_v	0.955 7	BCHE	2oji_v	0.907	MAPK1	1h1p_v	0.835 9	CCNA2
1shj_v	0.950 1	CASP7	1uki_v	0.906 8	MAPK8	1klt_v	0.832 7	CMA1
1bzm_v	0.949 9	CA1	1fh0_v	0.902 4	CTSV	1mkd_v	0.829 6	PDE4D
1v3q_v	0.949 8	PNP	1smd_v	0.900 3	AMY1	1bm6_v	0.821 6	MMP3
1okl_v	0.943 1	CA2	3fzk_v	0.899 8	HSPA8	3eqm_v	0.796 4	CYP19A1
1cb0_v	0.939 9	MTAP	1d7i_v	0.897 9	FKBP1A	1k59_v	0.789 2	ANG
1ya8_v	0.938 7	CES1	3cjf_v	0.892 4	KDR			

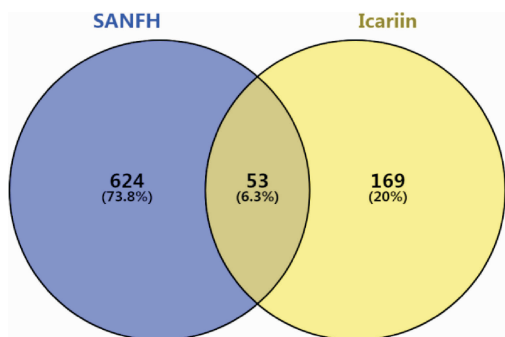


图 1 ICA-SANFH 靶点韦恩图

负调节、细胞增殖的正向调控和信号转导等,在细胞组分中主要作用于细胞外隙、细胞质和胞质溶胶等,调节SANFH的功能主要富集于蛋白结合、相同的蛋白结合和ATP结合等。根据count值选用KEGG通路结果中排名前20位的通路绘制成气泡图,见图5。KEGG富集通路提示ICA可以通过癌症、MAPK、PI3K-Akt等信号通路和MAPK8、MAPK10、MAPK14、AKT1、EGFR等主要靶点参与调控SANFH。为了更

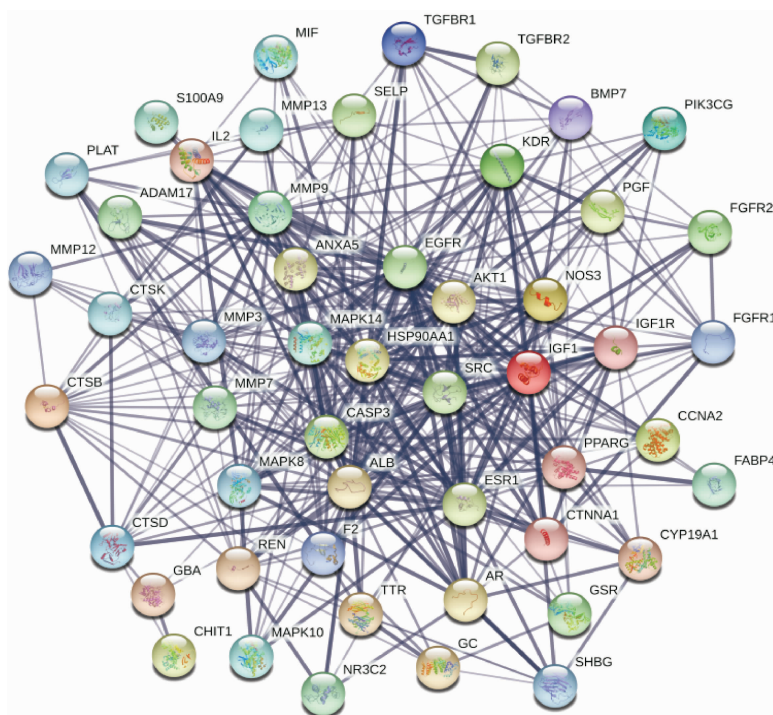


图 2 ICA-SANFH 靶点 PPI 网络图

注:根据相互作用的 score 值对靶点颜色进行映射;节点之间的连线表示两个蛋白之间的相互作用,作用越大线条越粗。

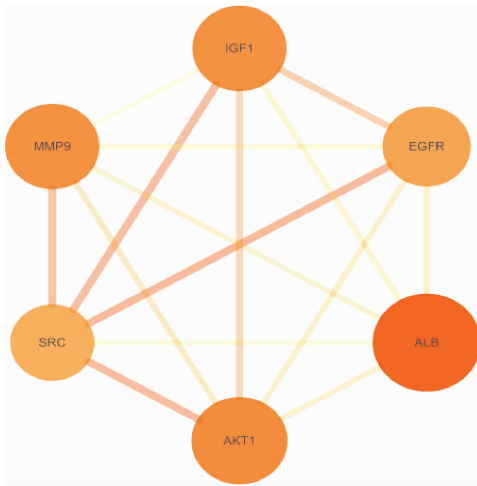


图 3 共同靶点聚类

加直观地显示 ICA 治疗 SANFH 的 KEGG 通路所涉及的相关靶点,使用 Cytoscape 软件构建的“靶点-信号通路”网络图共有 56 个节点,213 条边,见图 6。从图中可知,每条通路可能富集到多个靶点基因,而一个靶点基因同时又出现在多条 KEGG 通路中。

3.5 Micro-CT 扫描骨参数结果

Micro-CT 扫描结果显示:空白组大鼠股骨头骨小梁结构致密有规则,未见坏死征象;模型组大鼠股骨头明显骨质疏松,骨小梁变细、断裂,骨小梁间隙明显增宽,提示有明显骨坏死征象;相比于模型组,ICA 组大鼠股骨头骨小梁结构增多,间隙有改善,稍

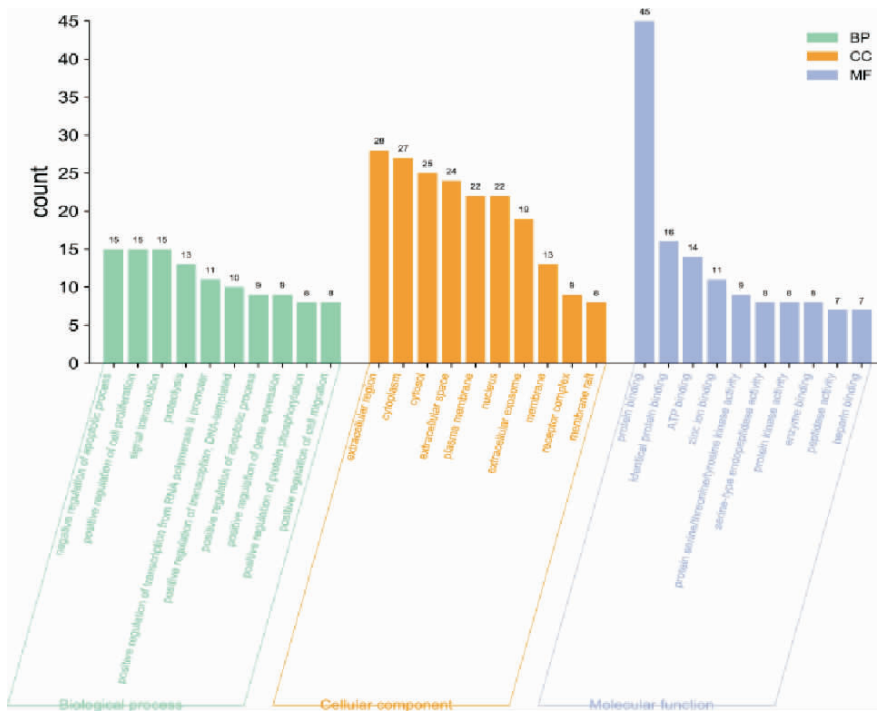


图 4 ICA 治疗 SANFH 靶点 GO 富集分析条形图

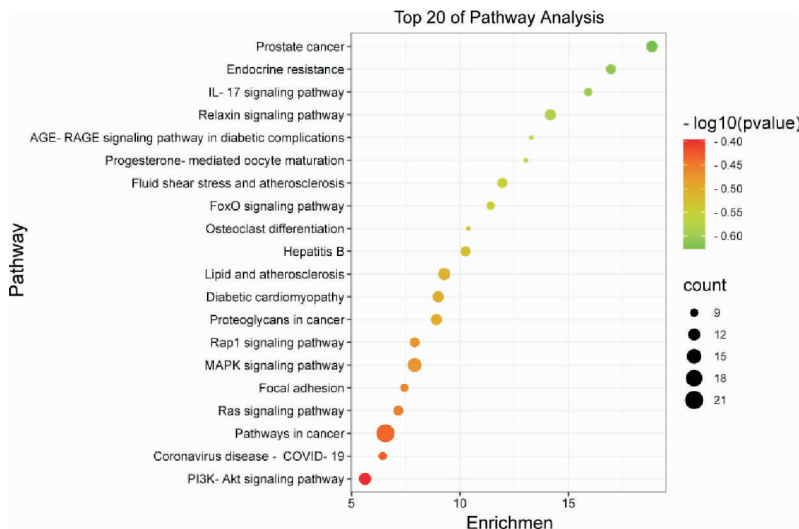


图 5 ICA 治疗 SANFH 靶点 KEGG 通路富集分析气泡图

注:气泡颜色从绿到红代表 $\log_{10}(P)$ 值由小到大,气泡面积代表该通路的基因计数,横轴代表该通路基因富集数。

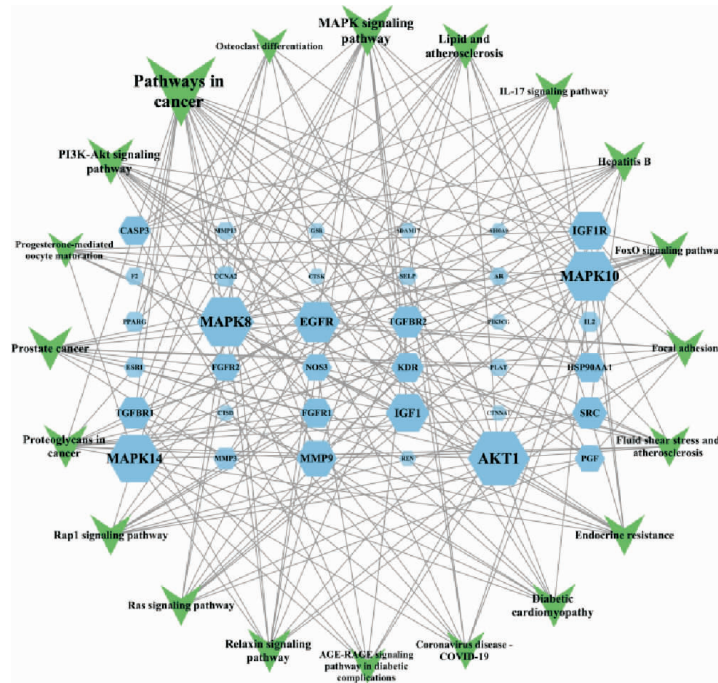


图 6 ICA 治疗 SANFH“靶点-信号通路”网络图

注：菱形为靶点，倒三角为通路，节点的面积代表 Degree 值大小，面积越大说明该节点越重要。

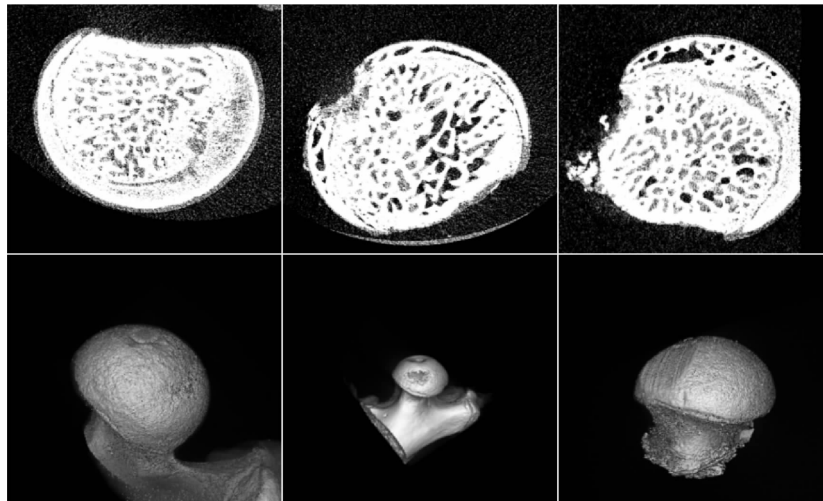


图 7 Micro-CT 扫描的大鼠股骨头征象

有骨小梁变细、断裂迹象，骨坏死范围明显减少，见图 7。Micro-CT 扫描结果显示：相比于空白组，模型组和 ICA 组的 BMD、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp 指标差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)；相比于模型组，ICA 组的 BMD、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp 指标差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 Micro-CT 骨参数比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

指标	空白组	模型组	ICA 组
BMD	0.909±0.029	0.674±0.044 [△]	0.741±0.035 ^{△△}
Tb.Th	0.649±0.035	0.377±0.033 [△]	0.512±0.033 ^{△△}
Tb.N	6.113±0.211	3.146±0.198 [△]	3.946±0.226 ^{△△}
Tb.Sp	0.055±0.005	0.146±0.015 [△]	0.105±0.006 ^{△△}

注：与空白组相比，[△] $P < 0.01$ ；与模型组相比，^{△△} $P < 0.01$ 。

3.6 Western blot 检测 p-ERK1、p-p38、p-JNK 蛋白表达结果

3 组大鼠骨组织内 p-ERK1、p-p38、p-JNK 蛋白表达情况见图 8。根据表 3 可知，相比于空白组，模型组 p-ERK1 蛋白明显降低 ($P < 0.05$)，p-p38、p-JNK 蛋白明显增加 ($P < 0.05$)；相比于模型组，ICA 组 p-ERK1 蛋白明显升高 ($P < 0.05$)，p-p38 蛋白降低 ($P < 0.05$)，p-JNK 蛋白明显降低 ($P < 0.05$)。

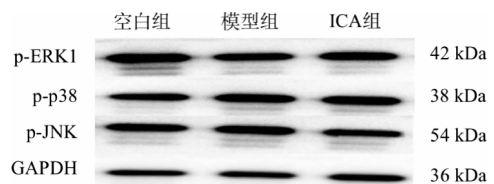


图 8 大鼠股骨头 p-ERK1、p-p38、p-JNK 蛋白的表达情况

表3 3组 p-ERK1、p-p38、p-JNK 蛋白表达比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

指标	空白组	模型组	ICA组
p-ERK1	0.959±0.037	0.563±0.04 [△]	0.699±0.034 ^{△△}
p-p38	0.848±0.037	1.086±0.088 [△]	0.98±0.045 [△]
p-JNK	0.824±0.018	1.159±0.07 [△]	0.99±0.068 ^{△△}

注:与空白组相比,[△] $P<0.01$;与模型组相比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

4 讨论

在中医学中,根据股骨头坏死的临床症状、发病特点,结合中医古籍论述,早期股骨头坏死归属于“骨痹”“痹证”,进一步缺血性坏死则归类为“骨痿”“骨蚀”的范畴^[20]。《素问·长刺节论篇》^[21]有骨痹的记载。《脾胃论》认为肾藏精,主骨,生髓,髓养骨,骨枯髓减,发为骨蚀。《素问》就有“肾主身之骨髓……发为骨痿之症”的记载。从发病形态、致病机制、临床症状上看,可认为股骨头坏死属于中医学中的“骨蚀”“骨痿”“骨痹”。其病机主要为肾虚和血瘀。治疗上以补肝肾、强筋骨、祛瘀生新为主。

由于ICA可能通过不同的靶点和信号通路对SANFH进行调节,因此借助网络药理学的手段加以预测分析。本次PPI网络分析结果得到的核心靶点有ALB、AKT1、MAPK9、IGF1、EGFR等,表明ICA防治SANFH具有多靶点的特征。SANFH的发病首先侵犯的是软骨,参与关节软骨细胞增殖、分化的信号通路对于治疗SANFH至关重要。KEGG通路富集分析结果显示,ICA治疗SANFH涉及的主要信号通路有癌症、MAPK、PI3K-Akt通路等。(1)癌症通路:包含了诸多通路如Wnt信号通路、Hedgehog信号通路、Notch信号通路等多个下游通路^[22],比较复杂。其中,Wnt蛋白是一组分泌型糖蛋白,是促进成骨细胞分化和活性的重要调节因子^[23]。(2)MAPK信号通路:该通路属于关节软骨损伤的重要信号传导通路^[24],能够影响成骨细胞的分化和凋亡^[25]。(3)PI3K-Akt信号通路:该通路属于调节自噬的经典通路,参与调节关节软骨细胞的平衡^[26],已被证实与血管修复再生、成骨细胞和破骨细胞分化密切相关^[27]。由此预测,ICA可通过ALB、AKT1、MAPK9、IGF1、EGFR等靶点作用于癌症、MAPK、PI3K-Akt等通路调控SANFH的发生。

为进一步研究网络药理学预测的科学意义,对MAPK通路的靶点进行验证,采用甲泼尼龙联合LPS的方式诱导SANFH大鼠模型,并予以ICA灌胃处理。动物药理实验结果显示:与空白组相比,模型组大鼠BMD、Tb.Th、Tb.N和Tb.Sp指标差异均具

有统计学意义($P<0.05$),p-ERK1蛋白表达显著降低($P<0.05$),p-p38蛋白和p-JNK蛋白显著升高($P<0.05$);与模型组相比,ICA组大鼠BMD、Tb.Th、Tb.N和Tb.Sp均具有统计学意义($P<0.05$),p-ERK1蛋白表达显著升高($P<0.05$),p-p38蛋白和p-JNK蛋白显著降低($P<0.05$)。既往研究发现,ICA具有改善骨代谢和增强骨密度与强度的作用^[28],同时ICA可作为细胞外因素刺激MAPK信号通路进行成骨分化^[29]。MAPK家族主要包括ERK、p38、JNK。WAN等^[30]研究证实ERK的激活或抑制可以调控成骨分化。在成骨分化过程中,调控p38相关通路有助于促进成骨细胞功能表达和体内骨矿化^[31]。JNK相关通路与ERK和p38通路存在相互作用和密切联系,是机体细胞代谢过程中重要的调节点,在成骨细胞分化中发挥着重要作用^[32]。YOON等^[33]研究发现JNK相关通路是软骨细胞代谢过程中重要的调控环节。结合实验结果说明,ICA能够提高骨密度,同时具有促进成骨细胞生成,从而对SANFH发挥治疗作用,证明了ICA对MAPK通路是存在作用的。

综上所述,本次研究采用网络药理学结合动物药理实验的方法证实了ICA经MAPK信号通路治疗SANFH的作用机制,具有一定的应用价值,且课题组将在后续研究中会使用不同浓度的ICA,深入研究其治疗SANFH的作用机制,从而更好地为药物的研发提供新思路。

参考文献

- [1] 中国医师协会骨科医师分会骨循环与骨坏死专业委员会,中华医学会骨科分会骨显微修复学组,国际骨循环学会中国区. 中国人股骨头坏死临床诊疗指南(2020)[J]. 中华骨科杂志, 2020, 40(20):1365-1376.
- [2] 赵德伟,胡永成. 成人股骨头坏死诊疗标准专家共识(2012年版)[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2012, 6(3):479-484.
- [3] 崔立强. 中国大陆地区股骨头坏死病因学调查及危险因素初步分析[D]. 北京:北京协和医学院, 2014.
- [4] PEI J P, FAN L H, NAN K, et al. Excessive activation of TLR4/NF- κ B interactively suppresses the canonical Wnt/ β -catenin pathway and induces SANFH in SD rats[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 11928.
- [5] LIU F, WANG W, YANG L, et al. An epidemiological study of etiology and clinical characteristics in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. Journal of Research in Medical Sciences, 2017, 22: 15.
- [6] 惠银银,刘又斌,王晶,等. 非创伤性股骨头坏死病因的研究进展[J]. 中医正骨, 2018, 30(2):33-36.
- [7] 吴兴净,张永涛,郭雄,等. miR-125a-3p和miR-17-5p在激素性股骨头坏死中的作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2015, 36

- (2):210–214.
- [8] ARAI R, TAKAHASHI D, INOUE M, et al. Efficacy of teriparatide in the treatment of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: A retrospective comparative study with alendronate [J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2017, 18(1): 24.
- [9] LI Z, WEI J, XIAO H, et al. Bone-strengthening supplement (BSP) promotes bone and cartilage repair, for the treatment of osteonecrosis of femoral head: An MRI-based study[J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(12): 7449–7455.
- [10] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *Journal of Cheminformatics*, 2014, 6: 13.
- [11] KIM S, CHEN J, CHENG T J, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 49(D1): D1388–D1395.
- [12] WANG X, SHEN Y H, WANG S W, et al. PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W356–W360.
- [13] 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*, 2015, 43: D789–D798.
- [14] SAFRAN M, DALAH I, ALEXANDER J, et al. GeneCards Version 3: The human gene integrator[J]. *Database*, 2010, 2010: baq020.
- [15] PIÑERO J, RAMÍREZ-ANGUITA J M, SAÜCH-PITARCH J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 48(D1): D845–D855.
- [16] 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*, 2019, 47(D1): D607–D613.
- [17] OTASEK D, MORRIS J H, BOUÇAS J, et al. Cytoscape Automation: Empowering workflow-based network analysis[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 185.
- [18] 吴承亮,毛强,刘慧,等.大鼠激素性股骨头坏死的基因组学研究[J].*中华外科杂志*,2011,49(10):927–933.
- [19] 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.
- [20] 王世鑫,韩杰,王大伟,等.中药内服法治疗股骨头缺血性坏死现状[J].*广西中医药*,2016,39(2):7–9.
- [21] 佚名.黄帝内经·素问[M].北京:中国医药科技出版社,2018.
- [22] 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.
- [23] KARNER C M, LONG F X. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(9): 1649–1657.
- [24] WEI Y L, JIN Z F, ZHANG H, et al. The transient receptor potential channel, vanilloid 5, induces chondrocyte apoptosis via Ca^{2+} CaMKII-dependent MAPK and Akt/mTOR pathways in a rat osteoarthritis model[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 51(5): 2309–2323.
- [25] 董政权,魏全.骨关节炎基因差异谱的生物信息学分析[J].*中国组织工程研究*,2019,23(3):335–340.
- [26] ZHONG J T, YU J, WANG H J, et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on the autophagy, apoptosis, and chemotherapy resistance of human breast cancer cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Tumour Biology*, 2017, 39(5): 7886–7892.
- [27] 宋世雷,陈跃平,章晓云. PI3K/AKT 信号通路调控股骨头坏死的相关机制[J].*中国组织工程研究*,2020,24(3):408–415.
- [28] 李建国,谢兴文,李鼎鹏,等.淫羊藿提取物淫羊藿苷在细胞水平防治骨质疏松症的研究概况[J].*中国骨质疏松杂志*,2019,25(1): 132–135.
- [29] 张云飞,安军伟,龚幼波,等.原发性骨质疏松症的中医药防治研究进展[J].*中国骨质疏松杂志*,2019,25(4):554–558.
- [30] WAN W T, CHENG B, ZHANG C, et al. Synergistic effect of matrix stiffness and inflammatory factors on osteogenic differentiation of MSC[J]. *Biophysical Journal*, 2019, 117(1): 129–142.
- [31] TORRE E. Molecular signaling mechanisms behind polyphenol-induced bone anabolism[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2017, 16(6): 1183–1226.
- [32] SONG N, WANG Z M, HE L J, et al. Estradiol-enhanced osteogenesis of rat bone marrow stromal cells is associated with the JNK pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(6): 8589–8594.
- [33] YOON H S, KIM H A. Prolongation of c-Jun N-terminal kinase is associated with cell death induced by tumor necrosis factor alpha in human chondrocytes[J]. *Journal of Korean Medical Science*, 2004, 19(4): 567–573.

(本文编辑 苏维)