

本文引用: 谭雅文, 原茵, 吴紫璇, 郭亚萍, 王瑾源, 彭雁飞, 郑 纺. 矮地茶治疗骨质疏松症的网络药理学分析及实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(8): 1468-1477.

矮地茶治疗骨质疏松症的网络药理学分析及实验研究

谭雅文, 原茵, 吴紫璇, 郭亚萍, 王瑾源, 彭雁飞, 郑 纺*

天津中医药大学中西医结合学院, 天津 301617

[摘要] **目的** 基于网络药理学及体外实验探究矮地茶治疗骨质疏松症(osteoporosis, OP)的作用机制。**方法** 使用 TCMSp、GeneCards 数据库筛选矮地茶治疗骨质疏松症的有效成分及关键靶点(疾病靶点与药物活性成分靶点的交集);使用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“中药-活性成分-交集靶点-疾病”网络;使用 STRING 数据库构建关键靶点蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络;通过 DAVID 数据库对关键靶点进行 GO 分析和 KEGG 信号通路富集分析。体外实验使用矮地茶醇提物干预成骨诱导的 ST-2 细胞,通过碱性磷酸酶染色(alkaline phosphatase, ALP)、RT-qPCR、Western blot 等检测其对成骨分化的影响并验证网络药理学信号通路预测结果。**结果** 共获得槲皮苷、山柰酚、射干醇 A、丹皮酚、肉桂醛等 193 个矮地茶主要活性成分;预测出 82 个矮地茶与 OP 的关键靶点,这些关键靶点主要参与调控雌激素信号通路、凋亡、Wnt/ β -catenin 信号通路等。体外实验显示,矮地茶能有效提高 ST-2 细胞成骨转录因子表达($P<0.05$),同时上调 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 β -catenin 的表达($P<0.05$),并下调通路抑制因子 Sfrp1 的 mRNA 水平($P<0.05$)。**结论** 矮地茶可通过多靶点、多通路治疗 OP,主要与 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

[关键词] 骨质疏松症;矮地茶;成骨分化;网络药理学;Wnt/ β -catenin 信号通路

[中图分类号]R274.9

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.08.020

Network pharmacological analysis and experimental study of Aidicha (Ardisiae Japonicae Herba) in treating osteoporosis

TAN Yawen, YUAN Yin, WU Zixuan, GUO Yaping, WANG Jinyuan, PENG Yanfei, ZHENG Fang*

School of Integrated Chinese and Western Medicine, Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of action of Aidicha (Ardisiae Japonicae Herba) in treating osteoporosis (OP) based on network pharmacology and in vitro experiments. **Methods** TCMSp and GeneCards databases were used to screen active ingredients and key targets (intersection of disease targets and drug active ingredient targets) for Aidicha (Ardisiae Japonicae Herba) treating OP; Cytoscape 3.7.1 software was applied to constructing "herb-active ingredient-intersection target-disease" network; STRING database was used to construct the key target protein-protein interaction (PPI) network. GO analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis of the key targets were performed by DAVID database. In vitro experiments were performed using Aidicha (Ardisiae Japonicae Herba) alcohol extracts to intervene in osteogenic-induced ST-2 cells. Alkaline phosphatase (ALP) staining, RT-qPCR, and Western blot were applied to detecting their effects on osteogenic differentiation and validating the prediction made by network pharmacological signaling pathway analysis. **Results** A total of 193 major active ingredients of Aidicha

[收稿日期]2023-04-21

[基金项目]国家自然科学基金青年项目(81703828);天津市自然科学基金面上项目(17JCYBJC26500);天津中医药大学中西医结合学院研究生创新基金(ZXYCXLX202117)。

[第一作者]谭雅文,女,硕士研究生,研究方向:骨脂代谢。

[通信作者]*郑 纺,女,博士,教授,E-mail:zhengfang_1979@163.com。

(*Ardisiae Japonicae Herba*), including quercetin, kaempferol, belamcandol A, paeonol, and cinnamaldehyde, were obtained; 82 key targets (intersection targets) of *Aidicha* (*Ardisiae Japonicae Herba*) and OP were predicted, and they were mainly regulating estrogen signaling pathway, apoptosis, Wnt/ β -catenin signaling pathway, etc. In vitro experiments showed that *Aidicha* (*Ardisiae Japonicae Herba*) effectively increased the expressions of osteogenic transcription factors in ST-2 cells ($P<0.05$). Meanwhile, it up-regulated the expression of β -catenin, a key protein of Wnt/ β -catenin signaling pathway ($P<0.05$), but down-regulated the mRNA level of Sfrp1, a pathway suppressor ($P<0.05$). **Conclusion** *Aidicha* (*Ardisiae Japonicae Herba*) can treat OP through multiple targets and pathways, mainly related to Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[**Keywords**] osteoporosis; *Aidicha* (*Ardisiae Japonicae Herba*); osteogenic differentiation; network pharmacology; Wnt/ β -catenin signaling pathway

骨质疏松症(osteoporosis, OP)为代谢性骨病^[1],多发于中老年人及绝经后妇女。最新数据显示,OP在中国50岁以上人群中男女性患病率分别为13.5%、29%^[2]。及早发现骨丢失现象并加以治疗具有重要的社会意义。OP的发生与骨重建失衡关系密切,理想的OP治疗药物应能恢复骨形成与骨吸收平衡,然而目前临床上大多治疗药物只能抑制骨吸收,限制了在OP治疗中的临床应用。因此,从根本上治疗OP,寻找能够增强成骨细胞活性、促进骨形成的安全药物至关重要。

矮地茶(*ardisiae japonicae herba*, AJH)为我国西南地区少数民族常用药,具有化痰利湿、活血化瘀之功效。目前,临床上多用其治疗风湿痹痛、跌打损伤、脱力劳伤等外伤疾病。OP在中医学中属于“骨痿”范畴,常因肝肾亏虚,外感诱生湿热痰瘀致病。研究发现,AJH中槲皮素、山柰酚、肉桂醛、杨梅素等中药单体可能是其治疗骨代谢疾病的主要有效成分,槲皮素及其衍生物可能通过抗氧化、抗炎、促进成骨细胞、抑制破骨细胞及其雌激素样作用部分逆转骨质减少^[3];槲皮素通过调节自噬和凋亡提高骨细胞总数、预防骨质疏松^[4];山柰酚通过减少miR-10a-3p和提高CXCL12促进BMSC成骨分化和改善OP^[5];肉桂醛抑制破骨细胞生成,促进成骨细胞生成^[6];杨梅素通过激活Wnt/ β -catenin增强BMSC的成骨分化^[7]。然而AJH治疗OP的具体作用机制尚不明确。因此,本研究拟通过网络药理学预测AJH治疗OP的潜在作用靶点及通路,通过体外实验观察AJH对ST-2细胞成骨分化的影响并验证预测结果,以期为揭示AJH治疗OP的作用机制提供参考。

1 材料

1.1 数据库及软件

所用数据库包括:中药系统药理学数据库与分

析平台(TCMSP):<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>, GeneCards:<https://www.genecards.org>、韦恩 Venny 2.1.0:<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>、String 蛋白质相互作用分析平台:<https://string-db.org>、DAVID 6.8 GO功能和KEGG通路富集分析平台:<https://david.ncifcrf.gov>;所用软件包括:Cytoscape 3.7.1、R×64 3.6.3、PERL。

1.2 细胞

小鼠骨髓基质细胞系ST-2(批号:ZY-900),购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.3 主要仪器

JJQ5型荧光定量PCR仪(美国伯乐BIO-RAD公司);K5500型超微量紫外分光光度仪(北京凯奥科技发展有限公司);Varioskan Flash型多功能读板机(赛默飞世尔科技公司)。

1.4 药品与试剂

AJH醇提物由天津中医药大学中医药研究院制备;DMEM(批号:SH30022.01B)、 α -MEM培养基(批号:SH30265.01B)、胰蛋白酶(批号:25200056)均购自美国Gibco公司;二甲基亚砜(DMSO,批号:D8418)购自德国Sigma-Aldrich公司;CCK-8(批号:LF696)均购自北京博奥拓达科技有限公司;总RNA提取试剂盒(HP Total RNA Kit,批号:R6812-02)购自美国Omega公司;逆转录试剂盒(批号:K1622)购自美国赛默飞世尔科技公司;Ultra SYBR Mixture试剂盒(批号:CW0957MM)购自康为世纪生物科技有限公司。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 药物活性成分及其靶点、疾病靶点收集 以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 作为活性成分的筛

选标准,通过TCMSP数据库检索AJH的活性成分及其靶点。使用GeneCards数据库检索关键词"Osteoporosis"得到OP相关靶点。

2.1.2 “中药-活性成分-交集靶点-疾病”网络构建 将AJH活性成分的作用靶点与OP靶点导入Venny2.1平台中,获得交集靶点即AJH治疗OP的关键靶点,绘制韦恩图;利用Cytoscape3.7.1软件构建“中药-活性成分-交集靶点-疾病”可视化网络并进行拓扑分析。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI) 将交集靶点导入STRING平台,设定物种为“Homo sapiens”,构建PPI可视化网络并导出图片与tsv统计文件,利用R软件通过度值预测核心靶点,并分析靶点之间的互作关系。

2.1.4 GO功能与KEGG信号通路富集分析 将交集靶点导入DAVID数据库,进行GO功能富集分析与KEGG信号通路富集分析,设定阈值为 $P \leq 0.05$ 。GO富集分析包括生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)及细胞组成(cellular component, CC)。使用R软件将富集结果可视化处理为条形图与气泡图,分析AJH治疗OP的潜在作用机制。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 将小鼠骨髓基质细胞系ST-2用DMEM完全培养基(含10% FBS、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素)在37℃、5% CO₂条件下培养。每隔1天换液,待细胞汇合至70%~80%融合度时进行传代。

2.2.2 CCK-8法检测ST-2细胞的增殖 将细胞接种至96孔板中,24 h后进行分组:空白对照组(Control组)、DMSO组和10、20、50、100、150、200 μg/mL AJH组。各组分别干预0、24、48、72 h后,根据CCK-8试剂盒说明书步骤,在每孔培养基中加入10% CCK-8溶液,37℃孵育1 h。使用酶标仪检测各组在450 nm处的光密度(OD)值。

2.2.3 ALP染色观察ST-2细胞成骨分化 培养ST-2细胞,待细胞生长至70%~80%融合度时均换为含成骨诱导剂(1.0 μmol/L地塞米松+10 mmol/L β-甘油磷酸钠+50 μmol/L维生素C)的α-MEM完全培养基,给药组加入10 μg/mL AJH干预细胞,每3天换液1次,培养至14 d。按照ALP显色试剂盒说明书进行染色。

2.2.4 RT-qPCR法检测成骨转录因子和β-catenin、

Sfrp1的mRNA表达 将ST-2细胞分别接种至六孔板中,1 d后进行分组干预:空白对照组(Control组)、成骨诱导组、成骨诱导+10 μg/mL或20 μg/mL AJH组。干预细胞5 d后弃去培养基,使用β-巯基乙醇裂解细胞,按照总RNA提取试剂盒说明书步骤提取细胞总RNA,检测RNA含量与纯度;按照cDNA第一链合成试剂盒说明书步骤逆转录获得cDNA,逆转录条件:25℃ 10 min,37℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。以cDNA为模板,β-actin作为内参基因,按照Ultra SYBR Mixture试剂盒说明书步骤采用RT-qPCR法检测目的基因的表达,反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火1 min,共38个循环。扩增反应后进行熔解曲线分析,排除非特异性扩增。目的基因相对表达量采用2^{-ΔΔCt}法计算。引物序列见表1。

2.2.5 Western blot检测成骨转录因子和β-catenin的蛋白表达 成骨诱导剂与10 μg/mL AJH干预ST-2细胞5 d后,使用RIPA蛋白裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白并使用BCA蛋白定量法检测其浓度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,将蛋白转移至PVDF膜上。TBST漂洗后,于5%脱脂牛奶中室温封闭2 h。封闭结束后用TBST漂洗,加入Runx2、Osterix、β-catenin、β-actin一抗(稀释比例1:1000),4℃孵育过夜。TBST漂洗,二抗(稀释比例1:10000)孵育2 h。ECL显影、成像。以β-actin为内参进行统计。

2.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件分析,计量资料结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和重复测量资料方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 AJH活性成分及作用靶点

通过TCMSP数据库筛选得到AJH活性成分193个,结果见表2。通过活性成分筛选并去重后得到AJH潜在作用靶点116个。

3.2 “中药-活性成分-交集靶点-疾病”网络分析

通过GeneCards数据库得到OP的靶点4 613个,取疾病靶点与药物活性成分靶点的交集,并绘制韦恩图。详见图1。

基于AJH活性成分与OP靶点的相互作用,采用Cytoscape软件构建“中药-活性成分-交集靶点-疾病”网络,结果见图2。图中节点分别代表药

表1 荧光定量PCR扩增基因引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')	引物长度/bp
Runx2	正向: CCGTGGCCTCAAGGTTGT	40
	反向: TTCATAACAGCGGAGGCATTT	
Osterix	正向: CCCTTCTCAAGCACCAATGG	43
	反向: AAGGGTGGGTAGTCATTTGCATA	
ALPL	正向: TGACCTTCTCTCCTCCATCC	40
	反向: CTTCTGGGAGTCTCATCCT	
β-catenin	正向: GACCACAAGCAGAGTGCT	37
	反向: TGTCAGGTGAAGTCCTAAA	
Sfp1	正向: TGGTTGGTGGGTTAGCA	36
	反向: GAGCATCTGTTACAGGA	
β-actin	正向: CCTCTATGCCAACACAGTGC	40
	反向: CCTGCTGCTGATCCACATC	

物、疾病、交集靶点、活性成分等,线代表两节点之间存在互作关系。结果显示 AJH 中的槲皮苷、山柰酚、射干醇 A、丹皮酚、肉桂醛等多种活性成分能调控 PTGS1、NR3C1、AR 等多个靶点,体现了 AJH 具有多靶点、多成分协同调控 OP 的特点。

3.3 PPI 网络分析

PPI 网络结果显示共有 82 个节点、801 条边构成,平均度值为 19.5,见图 3。使用 R 软件统计预测出的 AJH 治疗 OP 的关键蛋白,见图 4。PPI 结果显示,IL-6、ESR1、CASP3、HSP90AA1、PPARG、HIF1A、EGFR、MYC、FOS、CCND1 度值较高,可能是在 AJH 治疗 OP 中发挥重要作用的核心靶点。

表2 AJH 有效活性成分(仅列 DL 排名前 20 名活性成分)

活性成分 ID	成分名称	口服生物利用度/%	类药性
MOL009280	3,5,7-trihydroxy-2-[4-hydroxy-3-methoxy-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-tetrahydropyranyl]oxy]phenyl]-4-chromenone	20.961 39	0.827 74
MOL004673	kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-7-O-α-L-rhamnopyranoside	8.161 50	0.787 52
MOL010963	5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3,7-bis[[2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-tetrahydropyran-2-yl]oxy]chromone	8.161 50	0.786 53
MOL010958	[(2S,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl]3,4,5-trihydroxybenzoate	3.013 67	0.773 75
MOL002007	5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chromen-4-one	5.084 58	0.767 02
MOL010959	4,4,6b,8a,11,12,12b,14b-octamethyl-1,2,3,4,4a,5,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14,14a,14b-icosahdropicen-3-ol	9.381 95	0.762 36
MOL000508	(4R,4aS,6aS,6aS,6bR,8aR,12aR,14aS,14bS)-4,4a,6a,6b,8a,11,11,14a-octamethyl-2,4,5,6,6a,7,8,9,10,12,12a,13,14,14b-tetradecahydro-1H-picen-3-one	29.162 18	0.758 97
MOL001663	(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10R,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-4a-carboxylic acid	32.028 01	0.757 13
MOL000263	olean-12-en-28-oic acid	29.020 84	0.755 99
MOL000463	(3S,4R,4aS,6aS,6aS,6bR,8aR,12aR,14aS,14bS)-4,4a,6a,6b,8a,11,11,14a-octamethyl-1,2,3,4,5,6,6a,7,8,9,10,12,12a,13,14,14b-hexadecahydro-3-ol	27.335 69	0.755 24
MOL005748	[(3S,4aR,6aS,6bS,8aR,11R,12S,12aR,14aR,14bR)-4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-octamethyl-2,3,4a,5,7,8,9,10,11,12,12a,13,14,14a-tetradecahydro-1H-picen-3-yl] acetate	9.527 83	0.738 48
MOL011014	ardisiamamilloside C_qt	14.252 79	0.738 10
MOL000701	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxychromen-4-one	4.037 65	0.736 49
MOL010938	ardisicrenoside G_qt	8.770 73	0.723 02
MOL004175	(1R,2R,4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10S,11R,12aR,14bS)-1,10,11-trihydroxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-4a-carboxylic acid	17.318 49	0.712 10
MOL005855	2α,3β,19-Trihydroxyurs-12-en-28-oic acid	11.404 07	0.712 09
MOL010962	3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-7-yl-6-deoxy-α-L-mannopyranoside	17.734 54	0.696 17
MOL010961	kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranoside	5.309 55	0.696 16
MOL010972	2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-4a-carboxylic acid	3.013 12	0.683 18
MOL000111	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[[2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy]methyl]tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy]-4H-chromen-4-one	3.201 53	0.683 00

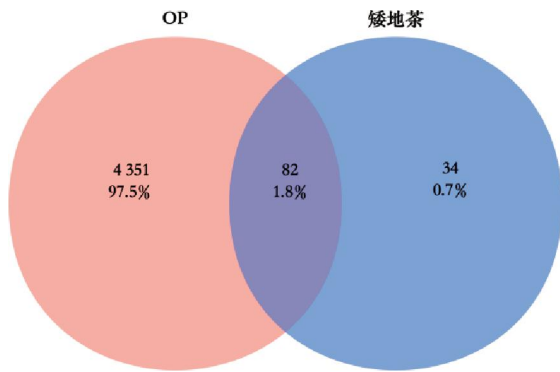


图 1 药物-疾病靶点韦恩图

3.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

GO 富集分析得到条目共 1 358 个, 其中 BP 条目 1 248 个、CC 条目 25 个、MF 条目 85 个。可视化结果见图 5。GO 功能分析结果预测, 关键靶点主要涉及类固醇激素的反应、对酮的反应、活性氧代谢过程的调控等。KEGG 富集分析结果见图 6, 关键靶点可富集得到 114 个信号通路主要包括雌激素信号通路、凋亡、Wnt/ β -catenin 信号通路等, 提示 AJH 可通过多种信号通路对 OP 发挥治疗作用。

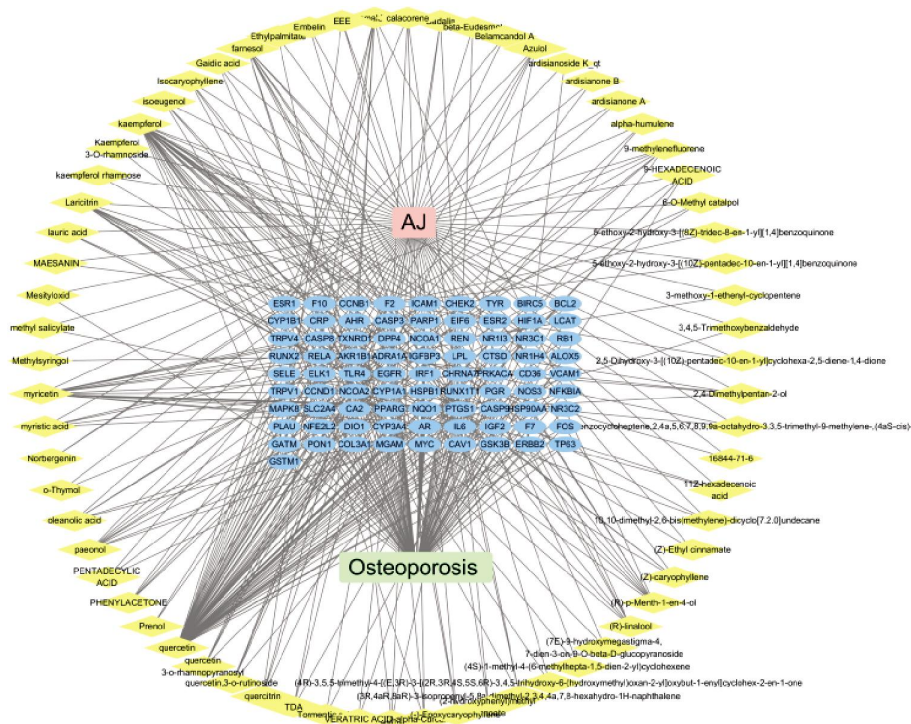


图 2 “中药-活性成分-交集靶点-疾病”网络图

注: 粉色节点为药物名称; 绿色节点为疾病名称; 黄色节点为药物活性成分; 蓝色节点为交集靶点。

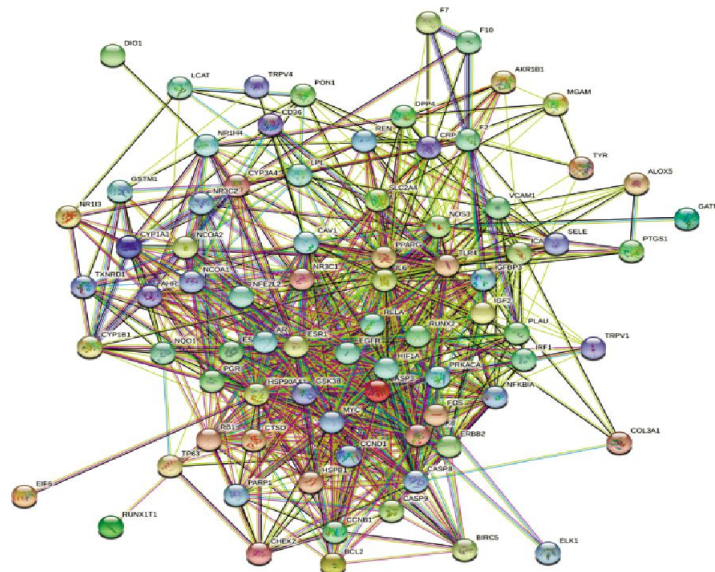


图 3 AJH-OP 交集靶点互作网络图

注: 节点为交集靶点蛋白, 边为蛋白之间的互作关系。

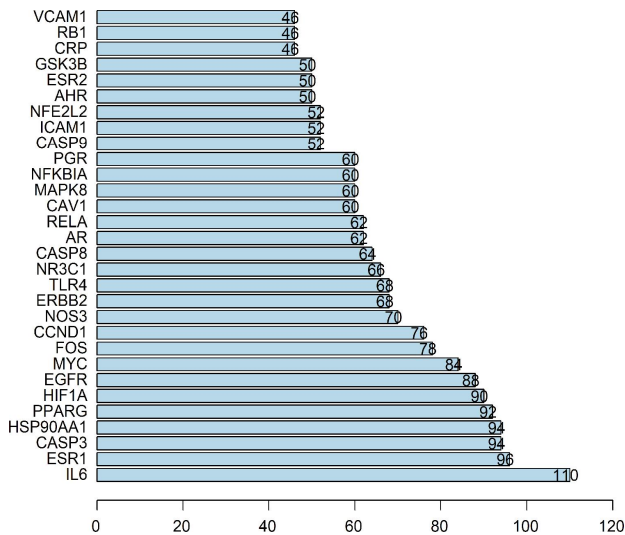


图4 AJH-OP 关键蛋白统计图

3.5 AJH 对 ST-2 细胞增殖能力的影响

CCK-8 结果显示 ST-2 细胞在不同浓度 AJH 干预 0、24、48、72 h 后,与 Control 组相比,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AJH 组、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AJH 组的 OD 值无统计学意义($P > 0.05$),见图 7。结果表明 10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AJH 对 ST-2 细胞增殖的影响没有差异,因而选取 10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AJH 进行后续实验。

3.6 AJH 对 ST-2 细胞成骨分化的影响

ALP 染色结果显示,与成骨诱导组相比,AJH 组 ALP 染色颜色明显加深,提示 AJH 能够促进 ST-2 细胞向成骨方向分化。详见图 8。

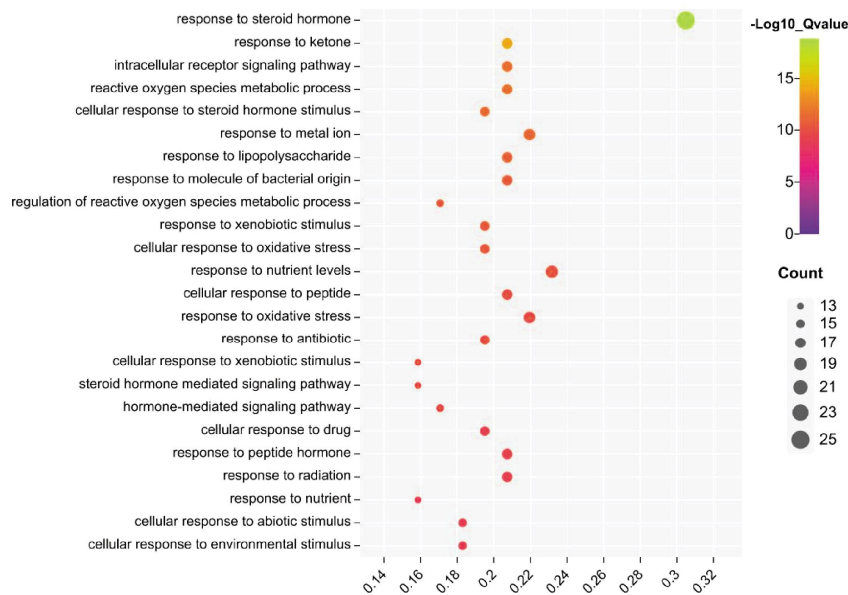


图5 GO 功能富集结果

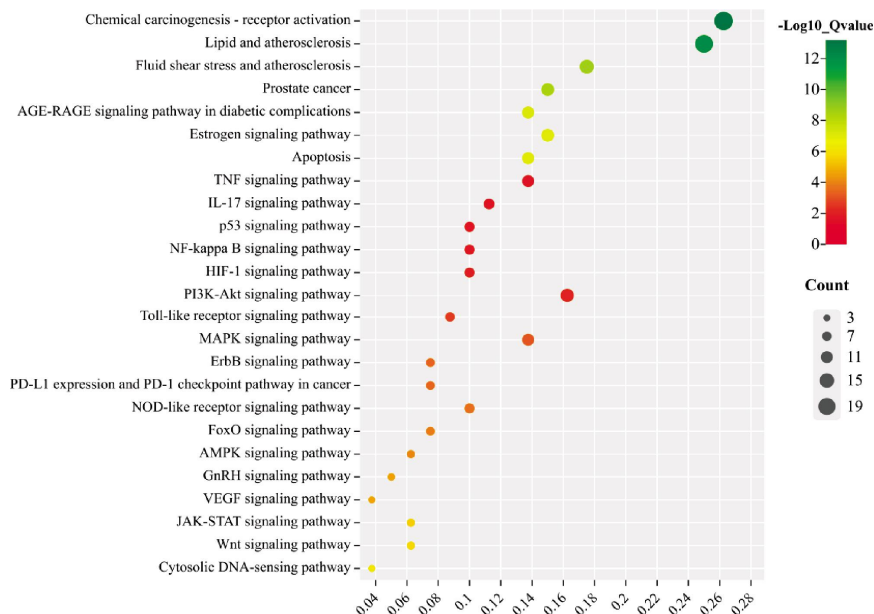


图6 KEGG 功能富集结果

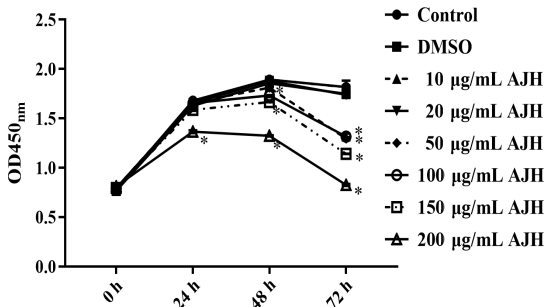


图 7 AJH 对 ST-2 细胞增殖的影响 (n=3)

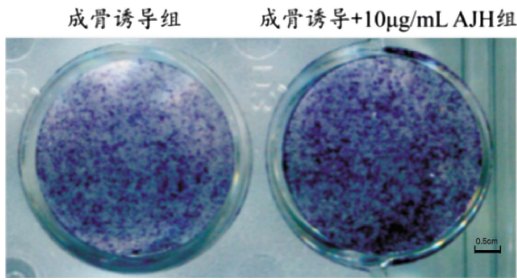


图 8 AJH 促进 ST-2 成骨分化

3.7 AJH 对 ST-2 细胞成骨转录因子 mRNA 表达的影响

与 Control 组相比,成骨诱导组 Runx2、Osterix、ALPL 的 mRNA 表达显著提高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),表明成骨诱导能够有效促进成骨转录因子表达;与成骨诱导组相比,10 µg/mL AJH 组 Runx2、Osterix、ALPL 的 mRNA 表达显著提高,差异有统计

学意义 ($P<0.05$)。详见图 9。

3.8 AJH 对 ST-2 细胞成骨转录因子蛋白表达影响

与 Control 组相比,成骨诱导组 Runx2 蛋白表达显著提高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与成骨诱导组相比,10 µg/mL AJH 组 Osx、Runx2 蛋白表达显著提高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。详见图 10。

3.9 AJH 对 ST-2 细胞 β-catenin 与 Sfrp1 表达的影响

与 Control 组相比,成骨诱导组 β-catenin 的 mRNA 及蛋白表达水平显著提高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与成骨诱导组相比,10 µg/mL AJH 组 β-catenin 的 mRNA 及蛋白表达水平显著提高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。此外,与成骨诱导组相比,10 µg/mL AJH 组 Wnt/β-catenin 信号通路抑制因子 Sfrp1 的 mRNA 表达显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。详见图 11。

4 讨论

OP 是一种以骨量减少、骨微细结构破坏,导致骨脆性增加及骨折危险性增高为特征的全身性代谢性骨病^[8]。OP 的治疗与骨重建关系密切。骨形成与骨吸收是骨重建相偶联的两个过程,成骨细胞和破骨细胞分别是其效应细胞。骨形成和骨吸收的动态平

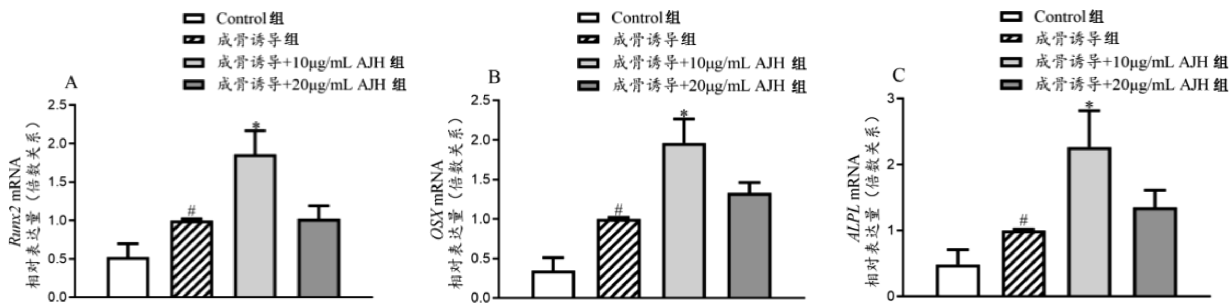


图 9 AJH 对成骨转录因子 mRNA 表达的影响 (n=3)

注:A~C 为 RT-qPCR 检测 Runx2、Osx、ALPL 的 mRNA 的相对表达量;与 Control 组比较, # $P<0.05$;与成骨诱导组比较, * $P<0.05$ 。

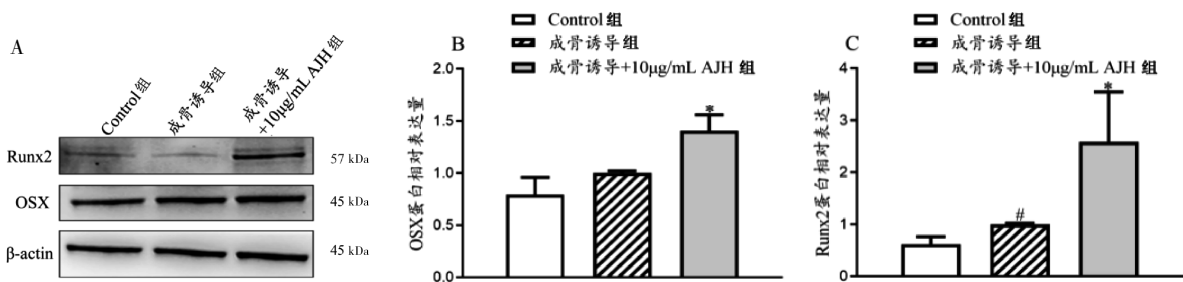


图 10 AJH 对 Osterix、Runx2 蛋白表达的影响 (n=3)

注:A.Western blot 检测 ST-2 细胞 Osterix、Runx2 蛋白图;B~C.OSx、Runx2 蛋白相对表达量;与 Control 组比较, # $P<0.05$;与成骨诱导组比较, * $P<0.05$ 。

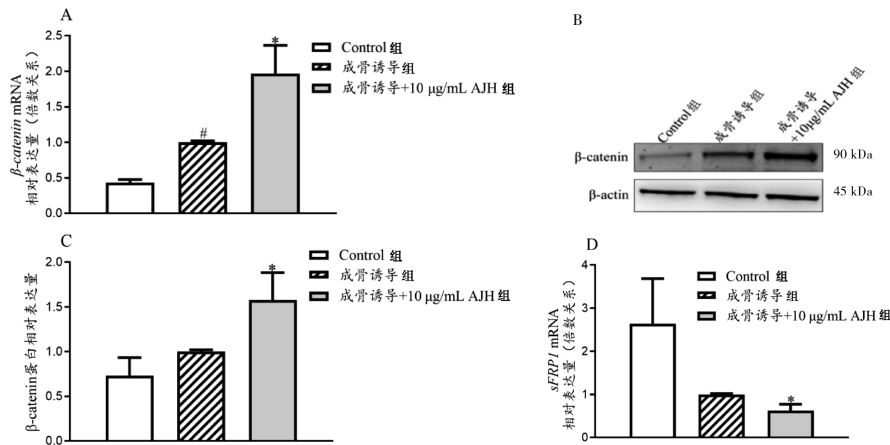


图 11 AJH 对 β -catenin 与 Sfrp1 表达的影响($n=3$)

注: A. RT-qPCR 检测 ST-2 细胞 β -catenin 的 mRNA 相对表达量; B. Western blot 检测 ST-2 细胞 β -catenin 蛋白图; C. β -catenin 蛋白相对表达量; D. RT-qPCR 检测 ST-2 细胞 sFRP1 的 mRNA 相对表达量;与 Control 组比较, $^{\#}P<0.05$;与成骨诱导组比较, $*P<0.05$ 。

衡一旦被打破,将会引起包括 OP 和佩吉特病等^[9-10]在内的多种骨代谢疾病。目前,临床上存在的 OP 治疗药物大多不能从根本上逆转已出现的骨量减少和骨微细结构破坏,即使是少数能够促进骨形成的药物如雌激素,也因有增加乳腺癌发生的风险,限制了其在 OP 治疗中临床应用^[11]。中医药在治疗脂代谢疾病方面具有多靶点、多通路、药物安全性高等优点,因此,寻找治疗 OP 的有效中药具有重要意义。

中药 AJH,始载于《图经本草》,其性平、味辛、微苦,归肺、肝经。2020 年版《中华人民共和国药典》^[12]记载 AJH 具有化痰利湿、活血化瘀之功效,其归经与功效与 OP 病因病机联系紧密。OP 在中医学中属于“骨痿”范畴,常为虚实夹杂、本虚标实之候,与肝、肾密切相关^[13]。因外感致病者,湿热邪毒耗伤阴津,久则损耗肝肾阴血,是为虚实夹杂;因内伤致病者,多因津液、气血、精髓的亏虚而生。“肾主骨,生髓”,肾精亏虚亏损则导致筋骨失养、骨萎失用,久则兼现湿热痰瘀,是为本虚标实。因此,AJH 从药效上分析其有治疗 OP 潜能。

本文通过网络药理学筛选 AJH-OP 的交集靶点,进行 PPI 分析可知,ESR1、CASP3、HSP90AA1、PPARG、HIF1A、EGFR、MYC、FOS、CCND1 等可能为主要有效靶点,提示 AJH 可能通过调节激素、代谢、凋亡等治疗脂代谢疾病。GO 功能分析证实五苓散作用于脂代谢疾病的靶点主要参与对酮的反应、

类固醇激素的反应、活性氧代谢过程;KEGG 富集分析主要涉及凋亡、雌激素信号通路、Wnt/ β -catenin 信号通路等疾病通路。Wnt/ β -catenin 信号通路是成骨细胞分化的分子开关,该通路在骨质疏松的发生发展和成骨细胞分化调控中的重要作用越来越受到关注。动物实验发现^[14],作为 Wnt 配体的共同受体 LRP5^[15]的增加能够促进成骨细胞的数量增多,而 LRP6 受体缺失的小鼠骨密度较正常小鼠低。同时细胞实验表明,Wnt 蛋白能够改变膜受体构象,调节 Wnt 信号传递,从而影响成骨细胞的发育^[16]。丹参素等中药单体成分也可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进成骨细胞分化^[17]。鉴于 Wnt/ β -catenin 信号通路在骨重建和成骨细胞分化中的重要作用,因此从 Wnt/ β -catenin 信号通路的视角揭示防治 OP 药物的作用机制,能够为骨代谢相关疾病的治疗提供新思路。

骨具有复杂的生理作用,其中骨髓是维持骨生理功能、保证骨发育及内分泌调节的重要成分。骨髓中存在的许多成熟细胞类型都来源于 BMSC, BMSC 是一种多潜能干细胞,可分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞^[18]。生理状态下,多种信号分子控制着 BMSC 的定向分化^[19],随着骨髓间充质干细胞的分化,细胞代谢和形态等发生变化,进一步影响骨形成。在病理状态下,骨髓间充质干细胞分化失衡,骨形成减少^[20-21],导致骨生长缺陷和骨代谢紊乱,是

OP、骨折等疾病的主要内源性因素。目前,研究 BMSC 成骨分化是治疗 OP 等骨相关疾病的重要策略。在动物模型及临床试验中,BMSC 已被证实可修复多种退行性疾病的受损组织^[22-23]。同时,BMSC 具有归巢能力,可以迁移到损伤部位,分泌有助于组织再生的趋化因子、细胞因子和生长因子^[24]。OP 治疗需要维持骨稳态与促进骨形成,多种信号分子参与了骨稳态维持及骨形成过程。Runx2 是参与调节成骨细胞分化的一种特异性转录因子^[25]。Runx2 与 Osx 启动子中的 DNA 元件结合,激活间充质细胞中 Osx 启动子,调节骨和软骨形成。Osx 也称转录因子 SP7,属于 Sp/KLF 因子^[26]。实验证实 Osx 缺失小鼠,间充质干细胞不能沉积骨基质,骨膜中的细胞无法分化为成骨细胞^[27],已形成的骨骼中 Osx 失活会导致成骨细胞功能缺陷,进而导致骨小梁生成减少^[28]。ALPL 是成骨分化晚期及骨形成的重要标志物。它可作为上游基因,影响 Wnt 蛋白家族的分泌,从而影响间充质干细胞的成骨分化^[29]。

本研究结果显示,ALP 染色结果显示,AJH 干预后 ST-2 细胞 ALP 染色明显加深;Runx2、OSX、ALPL 基因表达结果显示,与成骨诱导组相比,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AJH 组成骨转录因子 mRNA 表达均显著提升;同时,AJH 可显著提高 Runx2、OSX 的蛋白表达水平。这一结果证实 AJH 能够促进 ST-2 细胞成骨分化。AJH 可显著提高 β -catenin 的 mRNA 及蛋白表达,同时下调 Sfrp1 mRNA 水平,这些结果表明,Wnt/ β -catenin 信号通路介导了 AJH 促进成骨分化的作用。

综上,本研究通过网络药理学与体外实验证实,AJH 具有多靶点、多通路治疗 OP 的作用,并且 Wnt/ β -catenin 可能是 AJH 治疗 OP 的重要通路。本研究为揭示传统中药治疗 OP 的机制提供了科学依据。

参考文献

[1] AUGELLO A, KURTH T B, DE BARI C. Mesenchymal stem cells: A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches[J]. *European Cells and Materials*, 2010, 20: 121-133.

[2] CHENG X G, ZHAO K P, ZHA X J, et al. Opportunistic

screening using low-dose CT and the prevalence of osteoporosis in China: A nationwide, multicenter study[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2021, 36(3): 427-435.

[3] HUANG Y Y, WANG Z H, DENG L H, et al. Oral administration of quercetin or its derivatives inhibit bone loss in animal model of osteoporosis.[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020(3): 1-21.

[4] VAKILI S, ZAL F, MOSTAFAVI-POUR Z, et al. Quercetin and vitamin E alleviate ovariectomy-induced osteoporosis by modulating autophagy and apoptosis in rat bone cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(5): 3495-3509.

[5] LIU H, YI X, TU S T, et al. Kaempferol promotes BMSC osteogenic differentiation and improves osteoporosis by downregulating miR-10a-3p and upregulating CXCL12[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2021, 520: 111074.

[6] WU Z Y, WENG S J, YAN D Y, et al. Administration of cinnamaldehyde promotes osteogenesis in ovariectomized rats and differentiation of osteoblast in vitro[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2018, 138(1): 63-70.

[7] YING X Z, CHEN X W, FENG Y Z, et al. Myricetin enhances osteogenic differentiation through the activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling in human bone marrow stromal cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 738: 22-30.

[8] SHAO H Y, WU R Z, CAO L, et al. Trelagliptin stimulates osteoblastic differentiation by increasing runt-related transcription factor 2 (RUNX2): A therapeutic implication in osteoporosis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 960-968.

[9] FENG X, MCDONALD J M. Disorders of bone remodeling[J]. *Annual Review of Pathology*, 2011, 6: 121-145.

[10] MATSUOKA K, PARK K A, ITO M, et al. Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2014, 29(7): 1522-1530.

[11] GREEN J, REEVES G K, FLOUD S, et al. Cohort profile: The million women study[J]. *International Journal of Epidemiology*, 2019, 48(1): 28-29e.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 475, 741, 648, 482.

[13] 李 焱, 窦群立, 杨 锋. “肾为封藏之本”理论与原发性骨质疏松症发病机制的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(9): 1369-1372.

[14] NISHIMURA E K, SUZUKI M, IGRAS V, et al. Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(2): 130-140.

- [15] REN Q, CHEN J C, LIU Y H. LRP5 and LRP6 in Wnt signaling: Similarity and divergence[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 670960.
- [16] AHMED A, JEVREMOVIC D, SUZUKI K, et al. Intratumoral expression of a fusogenic membrane glycoprotein enhances the efficacy of replicating adenovirus therapy[J]. *Gene Therapy*, 2003, 10(19): 1663-1671.
- [17] 闫小飞, 张富军, 杜小娟, 等. 丹参素通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进大鼠原代成骨细胞的分化[J]. *西北药学杂志*, 2018, 33(5): 607-611.
- [18] AUGELLO A, KURTH T B, DE BARI C. Mesenchymal stem cells: A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches[J]. *European Cells and Materials*, 2010, 20: 121-133.
- [19] ZHANG Y L, LIU L, PEYMANFAR Y, et al. Roles of microRNAs in osteogenesis or adipogenesis differentiation of bone marrow stromal progenitor cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 7210.
- [20] LI J A, LIU X Y, ZUO B, et al. The role of bone marrow microenvironment in governing the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis[J]. *Aging and Disease*, 2016, 7(4): 514.
- [21] KING S, KLINEBERG I, BRENNAN-SPERANZA T C. Adipose tissue dysfunction: Impact on bone and osseointegration[J]. *Calcified Tissue International*, 2022, 110(1): 32-40.
- [22] OH E J, LEE H W, KALIMUTHU S, et al. In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model[J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 279: 79-88.
- [23] KIM H K, LEE S G, LEE S W, et al. A subset of paracrine factors as efficient biomarkers for predicting vascular regenerative efficacy of mesenchymal stromal/stem cells[J]. *Stem Cells*, 2019, 37(1): 77-88.
- [24] FU X R, LIU G, HALIM A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 784.
- [25] KIM H J, KIM W J, RYOO H M. Post-translational regulations of transcriptional activity of RUNX2[J]. *Molecules and Cells*, 2020, 43(2): 160-167.
- [26] YOSHIDA C A, KOMORI H, MARUYAMA Z, et al. SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32364.
- [27] NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29.
- [28] CHAN W C W, TAN Z J, TO M K T, et al. Regulation and role of transcription factors in osteogenesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 5445.
- [29] 程李娟. 肝/肾/骨型碱性磷酸酶基因 ALPL 抑制卵巢癌的增殖[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.

(本文编辑 苏 维)