

基于网络药理学探讨藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的作用机制研究

付智慧¹, 张晓川¹, 周霖^{2,3*}, 边猛¹, 赵灵灵¹

1. 郑州大学第一附属医院 中医部, 河南 郑州 450052

2. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

3. 河南省精准医学临床质谱工程研究中心, 河南 郑州 450052

摘要: 目的 采用网络药理学研究藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的有效活性成分及主要作用机制。方法 采用 TCMSP、Uniport、DrugBank 数据库检索藤黄健骨胶囊的主要化学成分及作用靶点; 基于 DisGeNET、DrugBank、OMIM 及 Genecards 数据库获取骨性关节炎的相关靶点; 将藤黄健骨胶囊与骨性关节炎的靶点取交集, 获取藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的直接靶点; 利用 STRING 数据库得到蛋白相互作用 (PPI) 网络; 使用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析; 采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络、“药物-活性成分-靶点”网络和“活性成分-重要靶点-关键通路”网络, 并进行相关网络分析。**结果** 初步筛选藤黄健骨胶囊 69 个成分和 257 个靶点; 骨性关节炎 2 655 个靶点, 药物-疾病交集靶点 143 个; 经过 PPI、GO 和 KEGG 富集及相关网络分析, 最终得到药物的主要药效成分有槲皮素、木犀草素、山柰酚、 β -谷甾醇、芒柄花黄素、甘草查尔酮 A、淫羊藿苷元等; 关键靶点为 PTGS2、TNF、PTGS1、PIK3CG、VEGFA、AKT1、ADRB2、MAPK1、ESR1、MMP2、IL-6、TGFB1 等; 映射的靶标通路为 PI3K-Akt 信号通路、NF- κ B 信号通路、MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路、破骨细胞分化、FoxO 信号通路、HIF-1 信号通路、NOD 样受体信号通路、雌激素信号通路等; 涉及的生物过程主要有凋亡过程的负调控、炎症反应、对缺氧的反应、对雌二醇的反应、细胞对缺氧的反应、ERK1 和 ERK2 级联的正调控、一氧化氮生物合成过程的正调控等。**结论** 藤黄健骨胶囊主要通过抑制炎症反应、抑制软骨细胞凋亡、调节骨代谢、保护软骨机制及调节软骨下骨代谢平衡途径发挥治疗骨性关节炎作用。

关键词: 藤黄健骨胶囊; 骨性关节炎; 网络药理学; 作用机制; 蛋白相互作用网络; 槲皮素; 木犀草素; 芒柄花黄素

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)08-1567-010

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.08.003

Mechanism of Tenghuang Jiangu Capsules in treatment of osteoarthritis based on network pharmacology

FU Zhi-hui¹, ZHANG Xiao-chuan¹, ZHOU Lin^{2,3}, BIAN Meng¹, ZHAO Ling-ling¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

3. Henan Precision Medicine Clinical Mass Spectrometry Engineering Research Center, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To study the active ingredients and main mechanism of Tenghuang Jiangu Capsules in treatment of osteoarthritis based on network pharmacology. **Methods** Using TCMSP, Uniport, DrugBank databases, the chemical constituents and targets of Tenghuang Jiangu Capsules were screened. Using DisGeNET, and DrugBank, OMIM, and GeneCards databases, the targets of osteoarthritis were retrieved. The intersection of the target of Tenghuang Jiangu Capsules and osteoarthritis was taken to obtain the direct target of the treatment of osteoarthritis with Tenghuang Jiangu Capsules. Protein interaction (PPI) relationship was obtained by using String database. GO analysis and KEGG enrichment analysis were conducted by using the database of DAVID. Cytoscape 3.7.2 software were used to construct and analyse the networks of Protein-protein interaction, “medicine-active components-targets” and “active components-important targets-critical pathways”. **Results** Tenghuang Jiangu Capsules had 69 components and 257 targets. There were 2 655 targets for osteoarthritis and 143 drug-disease intersection targets. Through PPI, GO, KEGG, and related network

收稿日期: 2021-03-16

基金项目: 河南省科技发展计划项目 (202102310191); 河南省高等学校重点科研项目计划 (19A320070, 21A360026)

作者简介: 付智慧, 女, 主管药师, 研究方向为中药制药。E-mail: 395344143@qq.com

*通信作者: 周霖, 男, 主管药师, 研究方向为中药药理。E-mail: fcczhoul@zhu.edu.cn

analysis, the main pharmacodynamic components of the drug were obtained, including quercetin, luteolin, kaempferol, β -sitosterol, formononetin, licorice chalcone A, icariin, etc. The key targets were PTGS2, TNF, PTGS1, PIK3CG, VEGFA, AKT1, ADRB2, MAPK1, ESR1, MMP2, IL-6, TGFB1, etc. The key pathways were PI3K-Akt signaling pathway, NF- κ B signaling pathway, MAPK signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, osteoclast differentiation, FoxO signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, NOD receptor signaling pathway, estrogen signaling pathway, etc. The biological processes involved mainly include negative regulation of apoptosis, inflammation, response to hypoxia, response to estradiol, cell response to hypoxia, positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade, positive regulation of nitric oxide biosynthesis, etc. **Conclusion** Tenghuang Jiangu Capsules mainly plays a role in treating osteoarthritis by inhibiting inflammatory reaction, inhibiting chondrocyte apoptosis, regulating bone metabolism, protecting cartilage mechanism and regulating subchondral bone metabolism balance.

Key words: Tenghuang Jiangu Capsules; osteoarthritis; network pharmacology; mechanism; PPI; quercetin; luteolin; formononetin

骨性关节炎是一种进行性退行性关节疾病,累及全身各大关节,症状多表现为关节疼痛、肿胀、僵硬、活动受限与功能下降等,是最常见的慢性关节疾病,是人类主要的致残原因之一。骨性关节炎属中医学中的“骨痹”“痹症”“膝痹”等范畴,其病因病机较为复杂,一般认为是本虚标实,以风寒湿以及血瘀、气滞、痰凝为标,以肝脾肾气血亏虚为本,为多种因素综合导致^[1-3]。藤黄健骨胶囊由莱菔子、骨碎补、肉苁蓉、鸡血藤、熟地黄、鹿衔草、淫羊藿组成,具有活血、补肾、止痛的功效,临床上可用来治疗骨性关节炎^[4-6],与常规治疗相比,效果显著。目前,藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的作用机制尚不清楚。网络药理学因其系统性和整体性的研究特点,为中药以及中药复方机制阐明、活性成份的筛选提供了有效的策略,可以快速发现中药主要作用通路及作用靶点,这对于中药研究具有重要意义^[7-8]。因此,本研究采用网络药理学的方法,对藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的作用机制进行研究,通过构建“药物-活性成分-靶点”和“活性成分-重要靶点-关键通路”网络,系统探究药物、活性成分、靶点、通路、疾病的关联机制,明确藤黄健骨胶囊治疗骨质疏松症的主要药效成分、重要靶点和关键通路,为藤黄健骨胶囊的临床应用、质量标准提升以及进一步的药理验证作用研究提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 数据库及软件

中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/index.php>); Uniport 数据库(<https://www.uniprot.org/>); DisGeNET 数据库(<http://www.disgenet.org/>); OMIM 数据库(<http://www.omim.org>); Genecards (<http://www.genecards.org>); Omicshare 云平台(<http://www.omicshare.com>);

STRING 数据库(<https://string-db.org/>); DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>); Cytoscape 3.7.2 软件; Drug Bank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)。

1.2 藤黄健骨胶囊活性成分及作用靶点的获取

通过 TCMSP 数据库检索藤黄健骨胶囊各药物的化学成分,并以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.18 为限定条件对成分进行初步筛选;并通过查找相关文献补充 TCMSP 数据库未收录的成分,得到药物的主要活性成分及作用靶点。

1.3 藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的潜在靶点预测

在 DisGeNET 数据库、DrugBank 数据库、OMIM 数据库、Genecards 数据库输入“osteoarthritis”,检索、汇总、去重后获得骨性关节炎的靶点。使用 OmicShare 云平台中的维恩图软件,将药物预测的靶点与疾病的靶点进行映射,获得藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的潜在作用靶点。

1.4 “药物-活性成分-靶点”网络构建

将中药材、活性成分及“1.3”项下所得的骨性关节炎潜在作用靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件,构建“药物-活性成分-靶点”网络图,分析网络拓扑性质,采用 Network Analyzer 插件进行数据处理。

1.5 蛋白相互作用 PPI 网络构建

将 1.3 项下潜在靶点导入 STRING 数据库,勾选 multiple proteins,物种选择 Homo Sapiens,构建 PPI 网络图。

1.6 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

为了进一步了解藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的潜在靶点基因的功能以及在信号通路中的作用,将其导入 DAVID 数据库,设置 $P < 0.05$,物种定义为 Homo Sapiens,将所有靶基因名称校正为其官方名称(official gene symbol),进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路富集分析,GO 富集分析只选取生物过程(biological processes, BP)进行分析。

2 结果

2.1 藤黄健骨胶囊的活性成分及作用靶点

通过 TCMSP 数据库, 检索藤黄健骨胶囊中的 7 味药物, 共得到 508 个成分。以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件, 得到骨碎补有效成分 18 个, 鸡血藤 24 个, 莱菔子 3 个, 鹿衔草 9 个, 肉苁蓉 6 个, 熟地黄 2

个, 淫羊藿 23 个, 见表 1。删除重复共有成分, 共计 69 个活性成分。通过 TCMSP 数据库、UniProt 数据库、DrugBank 数据库, 检索到骨碎补活性成分的潜在靶点 282 个, 鸡血藤 395 个、莱菔子 4 个、鹿衔草 274 个、肉苁蓉 212 个、熟地黄 31 个、淫羊藿 490 个。去除重复靶点, 共得到 257 个潜在作用靶点。

表 1 藤黄健骨胶囊活性成分信息

Table 1 Information of active compounds from Tenghuang Jiangu Capsules

编号	活性成分	OB/%	DL	来源
MOL001040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	42.36	0.21	骨碎补
MOL001978	aureusidin	53.42	0.24	骨碎补
MOL002914	eriodictiol(flavanone)	41.35	0.24	骨碎补
MOL000449	stigmaterol	43.83	0.76	骨碎补、鸡血藤、 熟地黄
MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75	骨碎补、鸡血藤、 鹿衔草、肉苁蓉
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	骨碎补、鹿衔草、 淫羊藿
MOL004328	naringenin	59.29	0.21	骨碎补
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	骨碎补、鸡血藤
MOL005190	eriodictyol	71.79	0.24	骨碎补
MOL000569	digallate	61.85	0.26	骨碎补、鹿衔草
MOL000006	luteolin	36.16	0.25	骨碎补、鸡血藤、 淫羊藿
MOL009061	22-stigmasten-3-one	39.25	0.76	骨碎补
MOL009063	cyclolaudenol acetate	41.66	0.79	骨碎补
MOL009075	cycloartenone	40.57	0.79	骨碎补
MOL009076	cyclolaudenol	39.05	0.79	骨碎补
MOL009078	davallioside A _{qt}	62.65	0.51	骨碎补
MOL009087	marioside _{qt}	70.79	0.19	骨碎补
MOL009091	xanthogalenol	41.08	0.32	骨碎补
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	鸡血藤
MOL000033	(24S)-24-propylcholesta-5-ene-3 β -ol	36.23	0.78	鸡血藤
MOL000392	formononetin	69.67	0.21	鸡血藤
MOL000417	calycosin	47.75	0.24	鸡血藤
MOL000461	3,7-dihydroxy-6-methoxy-dihydroflavonol	43.80	0.26	鸡血藤
MOL000468	8-O-methylreyusi	70.32	0.27	鸡血藤
MOL000469	3-hydroxystigmast-5-en-7-one	40.93	0.78	鸡血藤
MOL000470	8-C- α -L-arabinosylluteolin	35.54	0.66	鸡血藤
MOL000471	aloe-emodin	83.38	0.24	鸡血藤
MOL000483	n-cis-feruloyltyramine	118.35	0.26	鸡血藤
MOL000490	petunidin	30.05	0.31	鸡血藤
MOL000491	augelicin	37.5	0.66	鸡血藤

续表 1

编号	活性成分	OB/%	DL	来源
MOL000493	campesterol	37.58	0.71	鸡血藤
MOL000497	licochalcone a	40.79	0.29	鸡血藤
MOL000500	vestitol	74.66	0.21	鸡血藤
MOL000501	consume close grain	68.12	0.27	鸡血藤
MOL000502	cajinin	68.80	0.27	鸡血藤
MOL000503	medicagol	57.49	0.60	鸡血藤
MOL000506	lupinidine	61.89	0.21	鸡血藤
MOL000507	psi-baptigenin	70.12	0.31	鸡血藤
MOL010672	icosa-8,11,14-trienoic acid methyl ester	44.81	0.23	莱菔子
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	莱菔子、鹿衔草、 熟地黄、淫羊藿
MOL003975	icosa-11,14,17-trienoic acid methyl ester	44.81	0.23	莱菔子
MOL000552	5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	31.71	0.35	鹿衔草
MOL000553	(-)-chimonanthine	38.00	0.66	鹿衔草
MOL000554	gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	30.25	0.67	鹿衔草
MOL000073	ent-epicatechin	48.96	0.24	鹿衔草
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	鹿衔草、肉苁蓉、 淫羊藿
MOL005320	arachidonate	45.57	0.20	肉苁蓉
MOL005384	suchilactone	57.52	0.56	肉苁蓉
MOL007563	yangambin	57.53	0.81	肉苁蓉
MOL008871	marckine	37.05	0.69	肉苁蓉
MOL001510	24-epicampesterol	37.58	0.71	淫羊藿
MOL001645	linoleyl acetate	42.10	0.20	淫羊藿
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	淫羊藿
MOL001792	DFV	32.76	0.18	淫羊藿
MOL003044	chryseriol	35.85	0.27	淫羊藿
MOL003542	8-isopentenyl-kaempferol	38.04	0.39	淫羊藿
MOL004367	olivil	62.23	0.41	淫羊藿
MOL004373	anhydroicaritin	45.41	0.44	淫羊藿
MOL004380	C-homoerythrinan, 1,6-didehydro-3,15,16-trimethoxy-, (3.beta.)-	39.14	0.49	淫羊藿
MOL004382	yinyanghuo A	56.96	0.77	淫羊藿
MOL004384	yinyanghuo C	45.67	0.5	淫羊藿
MOL004386	yinyanghuo E	51.63	0.55	淫羊藿
MOL004388	6-hydroxy-11,12-dimethoxy-2,2-dimethyl-1,8-dioxo-2,3,4,8-tetra- hydro-1H-isochromeno[3,4-h]isoquinolin-2-ium	60.64	0.66	淫羊藿
MOL004391	8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenyl-chromone	48.54	0.25	淫羊藿
MOL004394	anhydroicaritin-3-O-alpha-L-rhamnoside	41.58	0.61	淫羊藿
MOL004396	1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-1,3-diol	52.31	0.22	淫羊藿
MOL004425	icariin	41.58	0.61	淫羊藿
MOL004427	icariside A7	31.91	0.86	淫羊藿
MOL000622	magnograndiolide	63.71	0.19	淫羊藿

2.2 藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的潜在靶点

通过 DisGeNET 数据库、DrugBank 数据库、OMIM 数据库、Genecards 数据库输入“osteoarthritis”，检索、筛查并整合后共得到骨性关节炎作用靶点 2 655 个。使用 OmicShare 云平台中的维恩图软件，将藤黄健骨胶囊预测的靶点与骨性关节炎的靶点进行映射，获得藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的潜在作用靶点 143 个（图 1）。这 143 个作用靶点反过来又对应藤黄健骨胶囊中的 50 个化学成分，其中鸡血藤 20 个，淫羊藿 17 个，骨碎补 13 个，鹿衔草 6 个，肉苁蓉 6 个，熟地黄 1 个。

2.3 “药物-活性成分-靶点”网络模型及分析

采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“药物-活性成分-

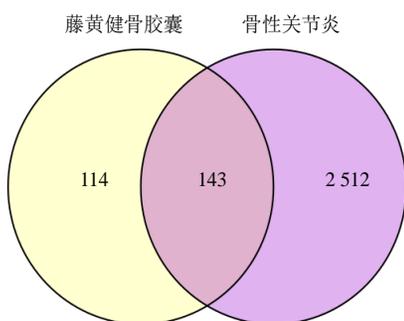


图 1 藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎潜在靶点维恩图
Fig. 1 Venn diagram of targets in Tenghuang Jiangu Capsules and osteoarthritis

靶点”网络模型（图 2）。该网络共有 193 个节点（包括 143 个靶点节点，50 个活性化合物节点），共有 1 020 条边（每条边代表活性化合物与靶点基因之间的相互作用关系）。由图可见藤黄健骨胶囊中各药物之间存在各种相互作用关系，同一化合物分子可以作用于不同的靶点，不同的化合物分子也可作用于同一靶点，形成复杂的网络，也充分体现了藤黄健骨胶囊作为中药复方制剂的多成分、多靶点的治疗机制。

通过 Cytoscape 3.7.2 软件中的“Network analyze”功能对网络进行拓扑属性分析，发现度值排名前 20 的活性成分物有 8 个，度值由高到底分别是 MOL000098-槲皮素，MOL000006-木犀草素、MOL000422-山柰酚、MOL000358-β-谷甾醇、MOL000497-甘草查尔酮 A、MOL004328-柚皮素、MOL000392-芒柄花黄素、MOL000471-芦荟大黄素，分别能与 303、132、114、68、23、22、21、15 个靶点蛋白发生作用。度值排名前 20 的靶点有 12 个，分别是 PTGS2、PTGS1、HSP90AA1、PPARG、AR、ADRB2、PIK3CG、DPP4、ESR1、CDK2、F10、CASP3，分别能与 62、49、48、30、29、23、23、22、21、15、15、15 个活性化合物发生作用。以上化合物及靶点很可能是藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的核心化合物及核心靶点。

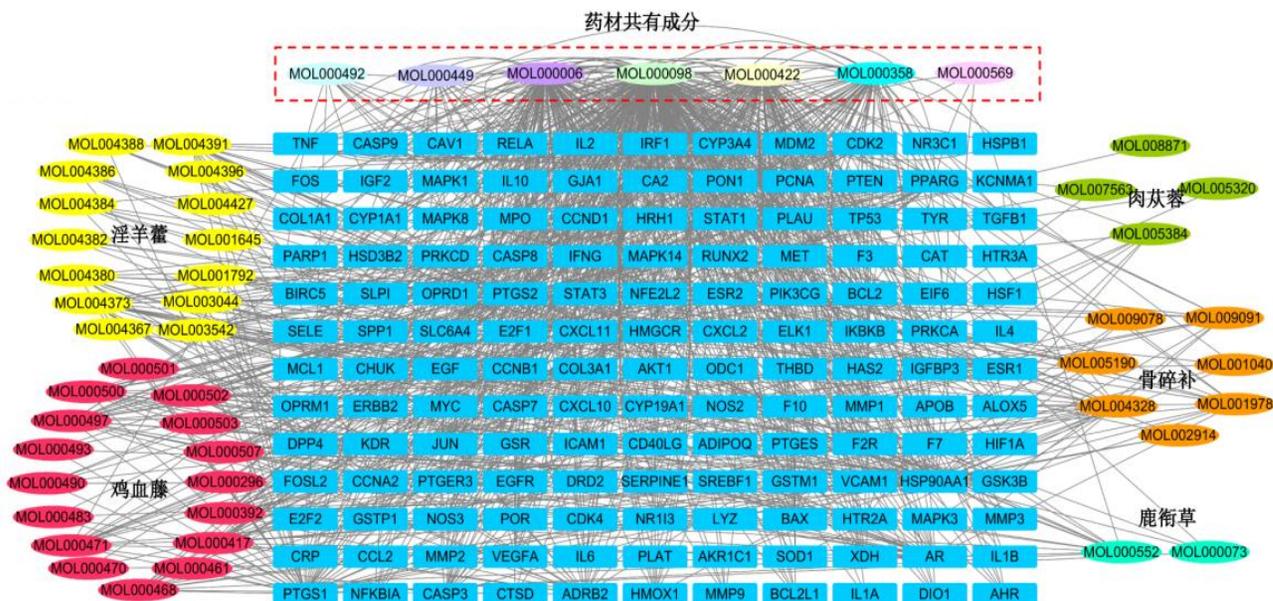


图 2 “药物-活性成分-靶点”网络模型
Fig. 2 Network model of medicines-active compounds-targets

2.4 PPI 网络

将藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的 143 个作用靶点导入 STRING 数据库, 得到蛋白相互作用关系,

保存其 TSV 格式文件, 将文件中的 node1、node2、combined score 信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 绘制 PPI 网络图 (图 3), 并进行 Network analyze 分析。

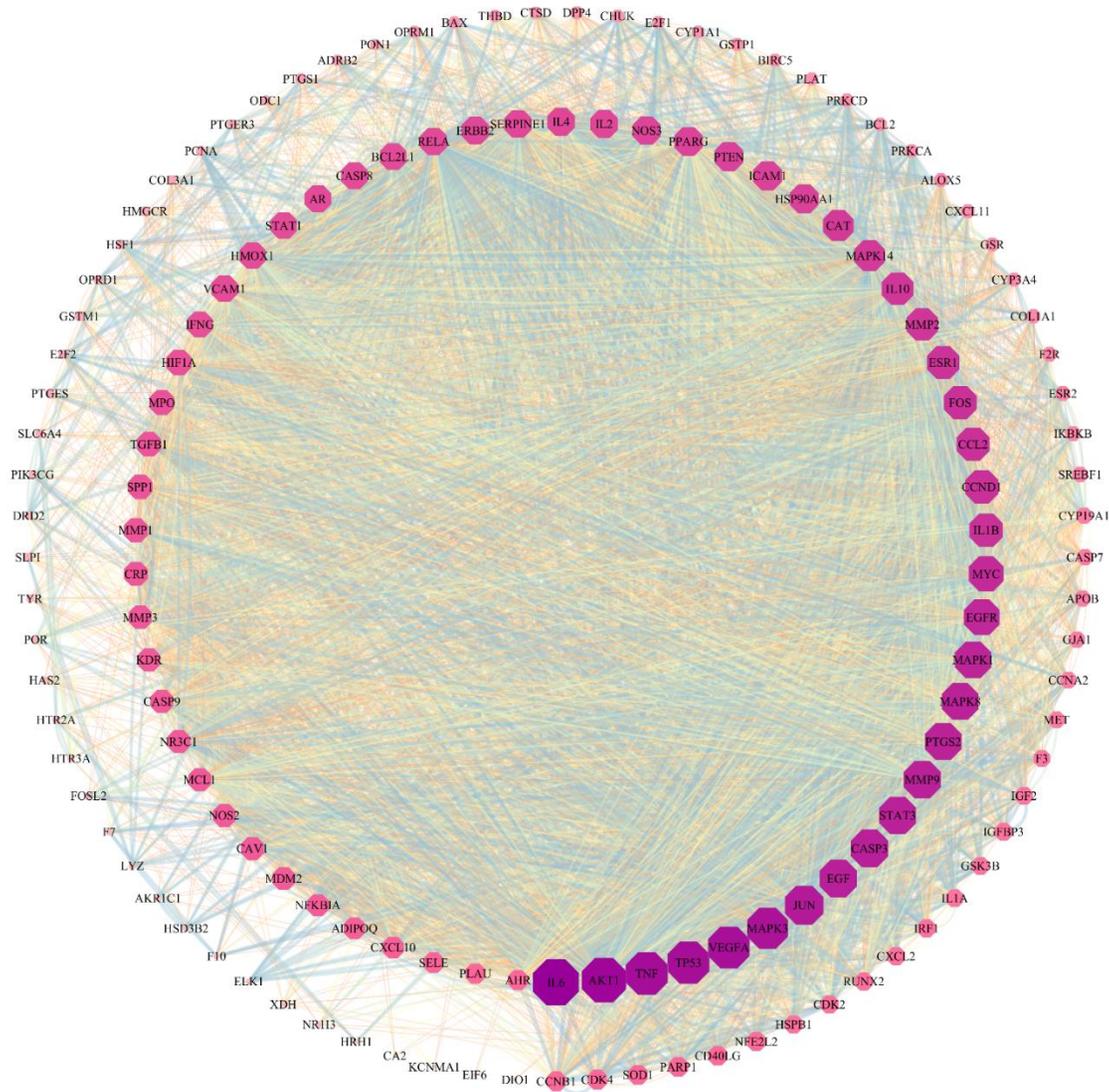


图 3 藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network for the treatment of osteoarthritis with Tenghuang Jiangu Capsules

分析结果显示: 网络中共包含 143 个节点 (节点代表靶点), 2 986 条边 (边代表靶点之间的相互作用), 网络中节点平均度值是 41.8 (度值表示连接到 1 个节点的线条数, 线条越多表示关联度越大, 故可以评估网络中每个节点的重要性); 图中节点越大、颜色越深, 则表明度值越大。大于平均度值的靶点有 69 个 (居于图 3 中间圆形的节点), 分别为 IL1B、IL-6、AKT1、TNF、TP53、VEGFA、MAPK3、JUN、EGF、CASP3、STAT3、MMP9、PTGS2、MAPK8、MAPK1、EGFR、MYC、

CCND1、CCL2、FOS、ESR1、MMP2、IL10、CAT、MAPK14、ICAM1、HSP90AA1、PTEN、PPARG、NOS3、IL2、IL4、SERPINE1、ERBB2、RELA、AR、BCL2L1、CASP8、HMOX1、VCAM1、STAT1、IFNG、HIF1A、MPO、SPP1、TGFB1、MMP1、CRP、MMP3、NR3C1、NOS2、CAV1、KDR、CASP9、MCL1MDM2、NFKBIA、ADIPOQ、CXCL10、SELE、AHR、PLAU。

2.5 GO 功能富集和 KEGG 通路分析

将以上得到的作用靶点导入 DAVID 数据库,

共得到 GO 富集的生物过程 517 个, 查阅文献发现, 与骨性关节炎相关的条目有 20 条, 绘制成条形图 (图 4), P 值由高到低分别是: 凋亡过程的负调控、炎症反应、对缺氧的反应、对雌二醇的反应、细胞对缺氧的反应、ERK1 和 ERK2 级联的正调控、一氧化氮生物合成过程的正调控、血管收缩的正调

控、血管生成的正调控、血管内皮细胞迁移的正调控、NF- κ B 转录因子活性的正调控、血小板激活、MAP 激酶活性的正调控、免疫反应、I- κ B 激酶/NF- κ B 信号通路的正调控、对维生素 D 的反应、MAPK 级联、MAPK 级联的正向调节、血管扩张的正调控、凝血。

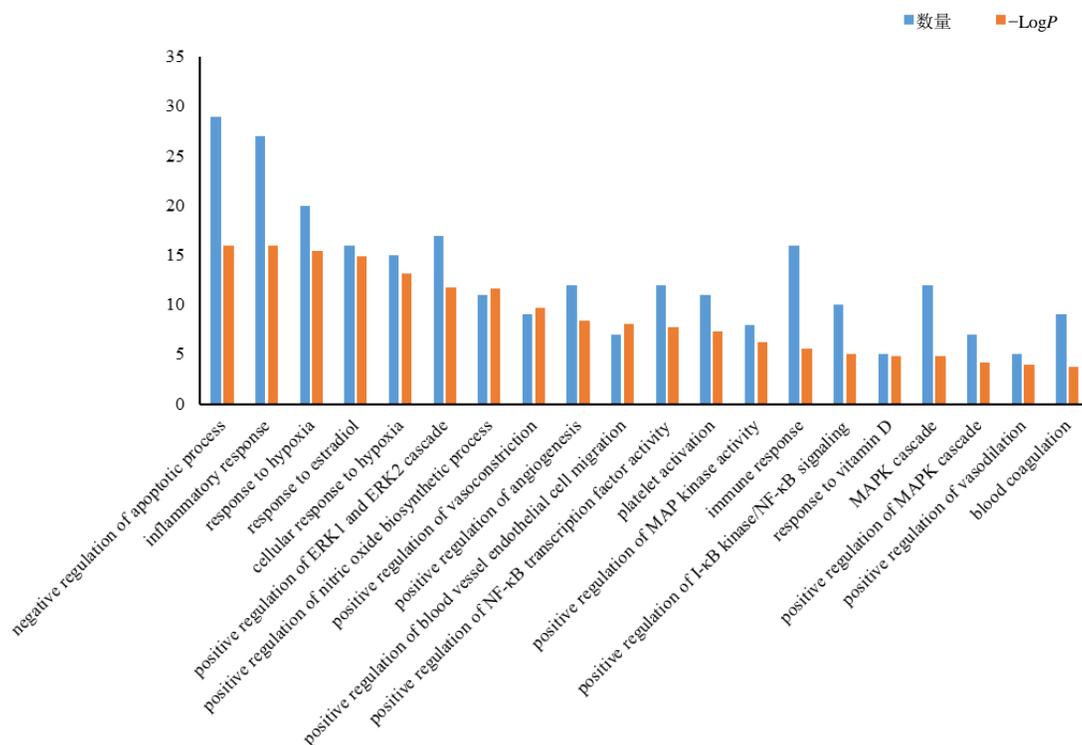


图 4 GO 分析生物学过程

Fig. 4 GO analysis of biological process

KEGG 通路分析共得到信号通路 109 条, 查阅文献发现, 与骨性关节炎相关的通路有 18 条, 绘制成气泡图 (图 5), P 值由高到低分别是: TNF、PI3K-Akt、toll 样受体、HIF-1、NOD 样受体信号通路、破骨细胞分化、FoxO、雌激素、MAPK、VEGF、NF- κ B、ErbB、Jak-STAT、mTOR、血小板激活、钙信号通路、AMPK、TGF- β 信号通路。

2.6 “活性成分-重要靶点-关键通路”网络模型及分析

基于 KEGG 通路分析结果, 整理出活性成分、重要靶点和关键通路相关信息, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建“活性成分-重要靶点-关键通路”网络模型, 如图 6 所示, 并进行 Network analyze 分析。该网络共有 155 个节点, 1 018 条边, 平均值是 13.1。图中节点越大表明度值越大。

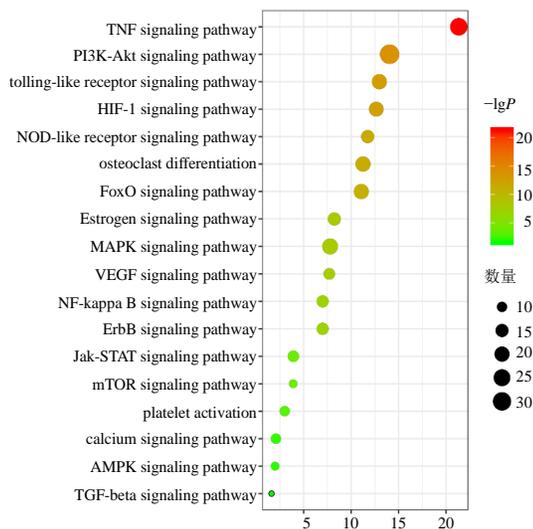


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis

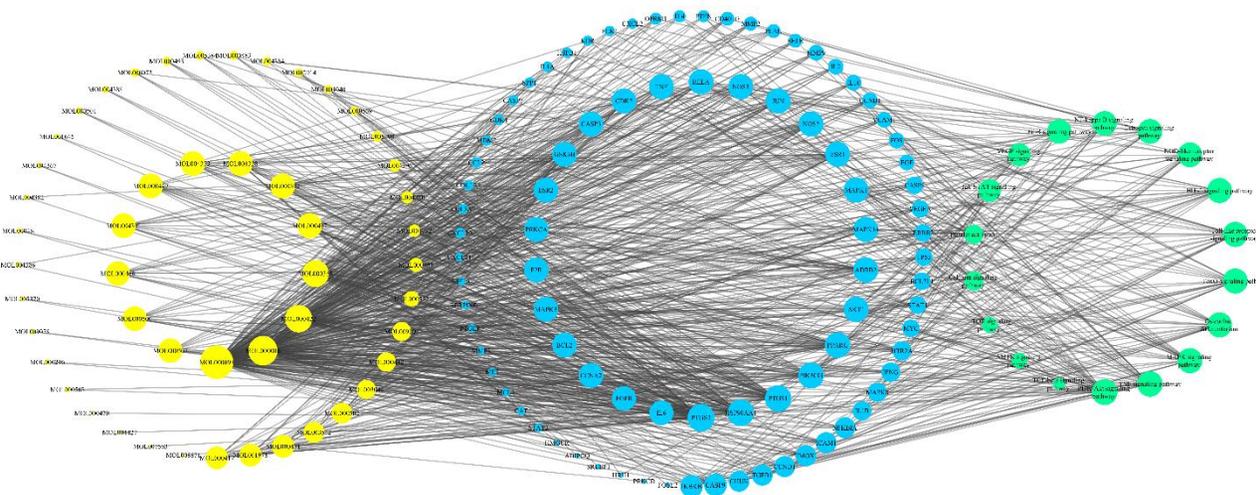


图 6 “活性成分 - 重要靶点 - 关键通路”网络

Fig. 6 Network of active components-important targets-critical pathways

大于平均度值的活性成分有 10 个，分别是槲皮素、木犀草素、山柰酚、β-谷甾醇、甘草查尔酮 A、芒柄花黄素、柚皮素、豆甾醇、淫羊藿苷元、8-异戊烯基黄酮；大于平均度值的靶点有 24 个，分别是 PTGS2、HSP90AA1、PTGS1、PIK3CG、PPARG、AKT1、ADRB2、MAPK1、ESR1、MAPK14、NOS2、JUN、RELA、NOS3、TNF、CASP3、CDK2、GSK3B、BCL2、PRKCA、F2R、ESR2、MAPK3、CCNA2；大于平均度值的信号通路有 9 条，分别是 PI3K-Akt 信号通路、NF-κB 信号通路、MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路、破骨细胞分化、FoxO 信号通路、HIF-1 信号通路、NOD 样受体信号通路、雌激素信号通路。

3 讨论

骨关节炎是以退行性病理改变为基础的疾 病，临床患者主要特征为膝关节肿痛、积液、弹响、行走疼痛等症状，明显影响关节活动，从而降低患者的生活质量。根据传统中医药理论，骨性关节炎属于“骨痹”“骨痛”“痹症”等范畴，以气血瘀滞、脾肾亏虚为病机，治疗时应以活血通络、祛瘀除湿及益气养血为主，需强调标本兼治^[9]。藤黄健骨胶囊既可补肾，又可活血止痛，全方配伍，临床疗效显著。但目前对藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的研究主要集中在临床观察及少量成分研究方面，对于药理作用机制研究却未见报道。

基于中药多成分、多靶点的特殊性，为更加全面研究藤黄健骨胶囊治疗骨性关节炎的作用机制，

本研究通过网络药理学方法，系统构建藤黄健骨胶囊的“药物-活性成分-靶点”网络及“关键成分-重要靶标-映射通路”网络，并进行深入挖掘分析。最终经筛选得到药物的关键成分有槲皮素、木犀草素、山柰酚、β-谷甾醇、芒柄花黄素、淫羊藿苷元、甘草查尔酮 A；关键靶点为 PTGS2、TNF、PTGS1、PIK3CG、VEGFA、AKT1、ADRB2、MAPK1、ESR1、MMP2、IL6、TGFB1 等；映射的靶标通路为 PI3K-Akt 信号通路、NF-κB 信号通路、MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路、破骨细胞分化、FoxO 信号通路、HIF-1 信号通路、NOD 样受体信号通路、雌激素信号通路等；涉及的生物过程主要有凋亡过程的负调控、炎症反应、血管扩张的正调控、血小板激活、血管生成的正调控、NF-κB 转录因子活性的正调控、对雌二醇的反应、ERK1 和 ERK2 级联的正调控、一氧化氮生物合成过程的正调控、血管内皮细胞迁移的正调控、MAP 激酶活性的正调控等 20 余种。

骨关节炎的病理变化主要有以下几点：（1）软骨细胞出现凋亡，（2）软骨基质遭到破坏，（3）软骨下骨骨化、骨赘形成，（4）滑膜产生炎症反应。有研究报道，本研究筛选出的藤黄健骨胶囊关键成分槲皮素可通过降低炎症因子 TNF-α 及 IL-1β，从而保护关节软骨的作用，治疗骨性关节炎的效果^[10]；木犀草素可能通过结合 MMP1 和 MMP3，下调其表达量，最终缓解骨性关节炎的炎症反应^[11]；山柰酚能有效缓解关节炎症状，抑制滑膜炎，保护关节软

骨及骨质免受破坏,从而起到治疗的作用^[12];β-谷甾醇可通过 IL-6、TNF、PTGS2 等靶点作用于 IL-17 信号通路, TNF 信号通路和 NF-κB 信号通路, 发挥治疗骨关节炎的作用^[13]; 芒柄花黄素与雌二醇具有相似的空间结构, 且同样具有雌激素活性, 被称为异黄酮植物雌激素, 具有明显的抗炎作用, 从而起到治疗骨关节炎的效果^[14]; 淫羊藿苷元可促进软骨细胞增殖, 并抑制软骨细胞凋亡; 减少骨关节炎中炎症细胞因子的活性, 诱导间充质干细胞成软骨分化和迁移, 从而修复软骨缺损的病变^[15]。甘草查尔酮 A 可抑制 MMPs 以及 ADAMTSs 等促进骨关节炎的细胞因子, 能够对骨关节炎形成过程进行负调控, 同时促进 II 型骨胶原的积累, 保护软骨基质, 最终治疗骨关节炎^[16]。除以上主要成分以外, 还有其它多个成分均从不同方面、不同层次, 通过相互配合、相互作用的途径综合发挥抗骨关节炎作用。

本研究发现, 藤黄健骨胶囊有效成分作用于的关键靶点主要映射在 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、NF-κB 信号通路等炎症信号通路。以上通路主要涉及到炎症性信号通路, 炎症是骨关节炎的重要独立危险因素, 以往研究表明, 骨关节炎的发生、发展与炎症和炎症细胞因子高度相关。其中 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) 信号通路可被各种细胞外信号、物理刺激及炎症细胞因子 (IL-1、IL-6、TGF) 激活, 将信号传递到细胞核内, 从而控制相关基因表达以及影响转录因子的活性, 最终引起细胞反应, 该通路目前被认为是最经典的调节骨关节炎信号通路。该信号通路在被干扰时会加速炎症反应, 从而引起的软骨基质降解酶大量外释, 加重软骨的退变。因此, 它在软骨退行性变和骨关节炎进展中起着重要作用^[17]。研究表明, PI3K/Akt 途径是一条经典的抗凋亡通路, 其下游的 Bad、Caspase 和 NF-κB 通路均是抗骨关节炎软骨凋亡的重要通路^[18]。该信号通路是调控软骨细胞增殖、凋亡以及基质重塑等最关键的通路之一^[19]。PI3K/Akt 信号通路在软骨细胞凋亡过程中发挥着关键作用, 在骨关节炎早期即可通过各种方式被激活, 从而诱发关节炎的发生^[20]。NF-κB 信号通路可通过调节 iNOS、COX-2、NO、PGE₂ 和 MMPs 等分解代谢因子的产生, 进而加速软骨炎症的发生及关节软骨细胞的凋亡^[21]。此外, 其它信号通路如 Toll 样受体及其介导的信号通路全程参与了骨关节炎的发生、发展过程, 在组织修复及关节结构破坏上起到至关重要的

作用^[22]。破骨细胞分化通路中, 破骨细胞大量形成与活化, 打破了软骨下骨的代谢平衡, 骨吸收大幅增加, 骨质被破坏, 骨重塑增加, 并形成恶性循环, 贯穿骨关节炎的整个发生、发展过程^[23]。各信号通路之间相互影响、相互配合, 从而诱发、导致骨关节炎的发生, 而藤黄健骨胶囊的各个药效成分就是作用在富集于这些通路上的关键靶点从而发挥治疗骨关节炎的作用。

综上所述, 藤黄健骨胶囊主要通过抑制 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、NF-κB 信号通路等各种关键信号通路, 抑制炎症反应, 抑制软骨细胞凋亡, 调节骨代谢, 保护软骨机制, 调节软骨下骨代谢平衡, 从而起到抗骨关节炎的作用。藤黄健骨胶囊的分子靶点治疗网络机制复杂, 本研究通过构建“药物-活性成分-靶点”网络及“关键成分-重要靶标-映射通路”网络, 经数据系统分析后, 筛选出核心活性成分及作用靶标, 并进行生物学信息分析, 预测藤黄健骨胶囊治疗骨关节炎的复杂机制, 为进一步的后续药理研究奠定了扎实的前期基础, 也为更高效探究中药治疗复杂疾病的作用机制提供了科学的思路 and 方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华中医药学会骨伤科分会膝痹病 (膝骨关节炎) 临床诊疗指南制定工作组. 中医骨伤科临床诊疗指南·膝痹病 (膝骨关节炎) [J]. 康复学报, 2019, 29(3): 1-7.
- [2] 陈卫衡, 刘献祥, 童培建, 等. 膝骨关节炎中医诊疗专家共识 (2015 年版) [J]. 中医正骨, 2015, 27(7): 4-5.
- [3] 徐志为, 韩杰, 余绍涌, 等. 膝骨性关节炎中医药治疗研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12): 205-208.
- [4] 司文腾, 陈宾, 周宇. 藤黄健骨胶囊联合玻璃酸钠治疗膝骨关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 525-528.
- [5] 李智豪, 贾晓鹏. 藤黄健骨胶囊联合常规疗法治疗骨性关节炎疗效观察 [J]. 新中医, 2018, 50(11): 116-118.
- [6] 曹辉, 周霖, 孙志, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合整合网络药理学的藤黄健骨胶囊化学成分识别及作用机制初步研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2408-2417.
- [7] 王露露, 李冰, 王圳伊, 等. 基于“整体观”系统生物学技术在中药研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2020, 51(19): 5053-5064.
- [8] 任艳, 邓燕君, 马焜彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. 中草药, 2020,

- 51(18): 4789-4797.
- [9] 张华龙. 补肾壮骨汤联合依托考昔片治疗膝关节骨性关节炎对膝关节功能和骨代谢指标的影响 [J]. 实用中医药杂志, 2020, 36(10): 1322-1323.
- [10] 茅华杰. 槲皮素对骨性关节炎的作用及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [11] 徐 强, 李海燕, 金 刚. 木犀草素抗骨性关节炎潜在靶点的筛选与鉴定 [J]. 浙江中医药大学学报, 2020, 44(4): 381-386.
- [12] 潘东梅. 山柰酚诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡和周期阻滞作用的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [13] 刘丹凯, 刘敏莹, 刘小宝, 等. 骨痹方治疗膝骨关节炎的网络药理学机制探讨 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(3): 306-314.
- [14] 施 洋, 候宝林, 吴胜利, 等. 植物雌激素的研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(11): 172-176.
- [15] 王晓博, 张君涛, 刘爱峰, 等. 淫羊藿苷促进骨关节炎软骨修复机制的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(5): 171-174.
- [16] 胡中南. 甘草查尔酮 A 对大鼠软骨细胞模拟 OA 过程的调控作用及机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [17] Wang J, Chen H, Cao P, *et al.* Inflammatory cytokines induce caveolin-1/ β -catenin signalling in rat nucleus pulposus cell apoptosis through the p38 MAPK pathway [J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(3): 362-372.
- [18] Ulici V, Hoenselaar K D, Gillespie J R, *et al.* The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation [J]. *BMC Dev Biol*, 2008, 8: 40.
- [19] Tong K M, Shieh D C, Chen C P, *et al.* Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human synovial fibroblasts [J]. *Cell Signal*, 2008, 20(8): 1478-1488.
- [20] Hsieh Y S, Yang S F, Lue K H, *et al.* Upregulation of urokinase-type plasminogen activator and inhibitor and gelatinase expression via 3mito-gen-activated protein kinases and PI3K pathways during the early development of osteoarthritis [J]. *J Rheumatol*, 2007, 34(4): 785-793.
- [21] Ji B, Guo W, MA H, *et al.* Isoliquiritigenin suppresses IL-1 β induced apoptosis and inflammation in chondrocyte-like ATDC5 cells by inhibiting NF- κ B and exerts chondroprotective effects on a mouse model of anterior cruciate ligament transection [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6): 1709-1718.
- [22] 王 欢, 王庆甫, 殷岳杉, 等. Toll 样受体在骨关节炎中的作用研究新进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(6): 1265-1268.
- [23] 肖 壮, 唐 涛, 朱成华, 等. 破骨细胞在骨关节炎中的增殖变化及意义 [J]. 重庆医学, 2017, 46(30): 4181-4184.

[责任编辑 高 源]