

基于网络药理学和分子对接探讨活络效灵丹治疗骨关节炎的作用机制

李沿鑫¹, 王爱国², 陆贵琪¹, 贾易臻¹, 赵允², 陆军^{2*}

1. 天津中医药大学 研究生院, 天津 301617

2. 天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120

摘要:目的 基于网络药理学和分子对接探讨活络效灵丹治疗骨关节炎的作用机制。方法 利用 TCMSP 数据分析平台和文献检索获取活络效灵丹的活性成分, 筛选出口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (DL) ≥ 0.18 的成分作为潜在活性成分。通过 Uniprot 数据库预测潜在活性成分对应的基因。查询 GeneCards、OMIM、TTD、DrugBank、Pharmgkb 等数据库获得骨关节炎的相关靶点且进行去重合并。应用 Cytoscape 3.8.2 软件建立可视化网络图, 根据度值选定核心药物潜在活性成分。借助 String 数据库分析获取药物与疾病的蛋白相互作用 (PPI) 网络, 凭借 Cytoscape3.8.2 软件对该网络采取拓扑学分析, 对潜在靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。使用 SYBYL-X2.0 软件进行分子对接验证。结果 活络效灵丹有效活性成分共 120 种、作用靶点 201 个, 骨关节炎相关靶点 1 675 个; 经 PPI 网络及拓扑结构分析得到 184 个节点和 282 条边; 木犀草素、槲皮素等为活络效灵丹的主要活性成分。在生物学进程中, 靶点主要通过细胞对化学应激的反应等路径发挥作用; 在分子功能上, 靶点主要影响核受体活性等方面。分子对接结果显示, MAPK1、MAPK14、RELA、JUN 作为靶点可与木犀草素、槲皮素等稳定对接。结论 活络效灵丹可能通过调控多个靶点及相关信号通路, 影响细胞凋亡、软骨基质降解、抑制关节炎及骨损伤, 从而延缓骨关节炎的发展进程。

关键词: 活络效灵丹; 骨关节炎; 网络药理学; 分子对接; 木犀草素; 槲皮素

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)04-0708-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.04.006

Mechanism of Huoluo Xiaoling Pills in treatment of osteoarthritis based on network pharmacology and molecular docking

LI Yan-xin¹, WANG Ai-guo², LU Ben-qi¹, JIA Yi-zhen¹, ZHAO Yun², LU Jun²

1. Graduate school of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China

Abstract: Objective Based on network pharmacology and molecular docking, to study the mechanism of Huoluo Xiaoling Pills in treatment of osteoarthritis. **Methods** The active ingredients of Huoluo Xiaoling Pills were obtained from TCMSP database and literature. The compounds were selected by oral bioavailability (OB) value $\geq 30\%$ and drug-like property (DL) value ≥ 0.18 as potential active ingredients. The genes corresponding to the potential active ingredients were predicted through the Uniprot database. The related targets of osteoarthritis were obtained by querying GeneCards, OMIM, TTD, DrugBank, Pharmgkb and other databases and deduplicated. Cytoscape 3.8.2 software was used to establish a visual network diagram and select the core drug active ingredients according to the degree value. The PPI interaction network of drugs and diseases was obtained with the help of String database analysis, and the network was topologically analyzed by Cytoscape 3.8.2 software. GO enrichment analysis and KEGG enrichment analysis were performed on potential targets. SYBYL-X2.0 software was used for molecular docking verification. **Results** There are 120 active ingredients, and 201 action targets in Huoluo Xiaoling Pills, and 1 675 osteoarthritis related targets. 184 nodes and 282 edges were obtained by PPI interaction network and topological structure analysis. Luteolin, quercetin, etc. are the mainly active ingredients of Huoluo Xiaoling Pills. In the biological process, the target mainly involved through the cell's response to chemical stress and other

收稿日期: 2021-12-06

基金项目: 天津市中医药重点领域科研项目 (2017007); 天津市教委科研项目 (2018KJ029); 天津市中医药研究院附属医院科研基金资助项目 (2020004)

作者简介: 李沿鑫, 男, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治各类骨病。E-mail: liyanxin20210901@163.com

*通信作者: 陆军, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为中西医结合防治各类骨病。E-mail: junlu0419@163.com

pathways. In terms of molecular function, the target mainly affects nuclear receptor activity and other aspects. The results of molecular docking showed that MAPK1, MAPK14, RELA, and JUN can be stably docked with luteolin and quercetin as targets. **Conclusion** Huoluo Xiaoling Pills may affect cell apoptosis, cartilage matrix degradation, inhibit arthritis and bone damage by regulating multiple targets and related signal pathways, thereby delaying the development of osteoarthritis.

Key words: Huoluo Xiaoling Pills; Osteoarthritis; network pharmacology; molecular docking; luteolin; quercetin

骨关节炎作为渐进性退变疾病,病变常在颈、手、腰、膝和髌等部位,临床上多见关节屈伸困难、活动受限、疼痛等症状,其主要病理改变为关节软骨耗损与修复不良^[1]。据统计,随着年龄的增长,骨关节炎患病率不断升高,其致残率在 354 种最易致残的疾病中位居前列^[2]。我国骨关节炎患病率迅速攀升,发病年龄却持续走低,尤其是 40 岁及以上人群已逐渐成为骨关节炎主要发病人群,患病率为 38.46%,其中男性患病率低于女性患病率,城市患病率低于农村患病率^[3]。现代医学在治疗上以镇痛药、关节腔内药物注射、关节修复或置换等多见,中医学将其归为“痹证”,中药复方内治为其临床主要治疗方法之一。

经典名方活络效灵丹载于《医学衷中参西录》,由近代医家张锡纯创制,该方配伍得当收效甚好,在临床上备受美誉,由当归、丹参、乳香、没药 4 味药物组成,具有活血止痛之功^[4]。现代药理学实验表明,活络效灵丹对于骨关节炎导致的关节软骨损害可起到缓解作用,能抑制关节腔内血管翳的形成,增强机体的抗氧化能力,具有抗炎作用^[5]。网络药理学采用生物信息学技术,通过网络拓扑分析方法识别潜在机制和关键靶点^[6],能用于确定中药成分的协同作用,了解中药配方的组合原则^[7]。通过借助计算机网络,分子对接技术可用于研究药物关键分子与靶点之间的相互作用情况,能够预测药物配体和蛋白质受体的对接模式和结合亲和力^[8]。

本研究拟通过网络药理学筛选出活络效灵丹潜在作用靶点和信号通路,并得出活络效灵丹中核心活性化合物,进而发现药物与机体的相互关联,揭示其作用机制。同时,为提高结果的可靠性运用分子对接技术进行验证,可为活络效灵丹治疗骨关节炎的作用机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 软件与数据库

研究涉及相关软件及数据库见表 1。

1.2 方法

1.2.1 活络效灵丹化学成分及靶点的筛选 依次以“当归”“丹参”“乳香”“没药”为关键词,借助

表 1 软件与数据库

Table 1 Softwares and databases

名称	网址	版本
TCMSP 数据分析平台	https://www.tcm-sp-e.com/	—
Uniprot 数据库	https://www.uniprot.org/	—
GeneCards 数据库	https://www.genecards.org/	—
Omim 数据库	https://omim.org/	—
TTD 数据库	http://db.idrblab.net/ttd/	—
DrugBank 数据库	https://www.drugbank.com/	—
Pharmgkb 数据库	https://www.pharmgkb.org/	—
PubChem 数据库	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	—
RCSB pdb 数据库	https://www.rcsb.org/	—
String 数据库	https://string-db.org/	—
R 语言	—	Ver 4.1.1
Cytoscape 软件	—	Ver 3.8.2
SYBYL-X 软件	—	Ver 2.0

TCMSP 数据分析平台及“中国知网”“万方”平台中已发表的文献检索活络效灵丹中潜在活性成分。将口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 作为筛选条件,通过 TCMSP 数据分析平台得到当归、丹参、乳香、没药 4 味药物符合要求的化学成分作为潜在活性成分,与之对应的基因经 Uniprot 数据库检索得到。

1.2.2 疾病靶点的筛选 借助 GeneCards、Omim、TTD、DrugBank、Pharmgkb 等数据库检索骨关节炎靶点,同时进行合并去重,得到骨关节炎的治疗靶点并绘制 5 个数据库交集靶点的 Venn 图。

1.2.3 靶点相互作用网络的构建 将活络效灵丹中 4 味药物的潜在活性成分同疾病作用的靶点结合,导入到 Cytoscape 3.8.2 软件中,进而形成活络效灵丹治疗骨关节炎的可视化网络图,依托 Network Analyzer 插件进行数据处理。通过建立活络效灵丹潜在活性成分与骨关节炎交集靶点的 Venn 图,从而探寻药物作用靶点与骨关节炎差异表达靶点之间的关系。应用 String 数据库对上述交集靶点进行网络分析,选择人源靶点并将最小相互作用阈值设置为“high confidence” (>0.9),去除游离

点后, 得出蛋白交互作用 (PPI) 网络图。所得结果经过 Cytoscape 3.8.2 软件作可视化处理, 并通过 Cytoscape-CytoNCA 进行拓扑分析, 获得核心靶点基因网络和数据。

1.2.4 靶点的通路分析 借助 R 语言软件 Cluster Profiler, 对筛选到的活络效灵丹作用靶点进行基因本体 (GO) 富集分析, 以探寻活络效灵丹治疗骨关节炎的生物功能; 利用京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析发现其主要信号通路, 设置 $P < 0.05$ 为筛选条件并将所得结果升序排列。同时借助 R 语言将 GO 富集分析与 KEGG 富集分析获取的条目进行可视化处理, 绘制得出相关数据的图表。

1.2.5 分子对接验证 为进一步验证活络效灵丹中核心化合物与骨关节炎靶点蛋白的结合情况, 通过 PubChem 平台获取活络效灵丹主要化合物的小分子二维结构, 利用 RSCB PDB 数据库获取与之对

应的 3D 晶体结构的 PDB 格式文件。依靠 SYBYL-X2.0 软件中 Surflex-Dock (SFXC) 模块完成分子对接验证, 将活络效灵丹中潜在活性成分作为配体, 骨关节炎靶点蛋白作为受体。Total score 值与匹配情况呈正比关系, 潜在活性成分与靶点结合情况越好, 则 Total score 值越大^[9]。

2 结果

2.1 活络效灵丹的活性成分及作用靶点

本研究通过检索 TCMSP 数据分析平台及“中国知网”“万方”平台中相关文献补充整理, 收集活络效灵丹的化合物基本信息和对应靶点蛋白, 合并重复的化合物且去除缺少靶点蛋白预测信息的化合物, 得到符合条件的有效活性化学成分共计 120 个, 来源于当归 2 个, 丹参 65 个, 乳香 8 个, 没药 45 个, 见表 2。利用 Uniprot 数据库获得靶点对应的基因, 经过汇总去重后, 共获取到 201 个靶点。

表 2 有效活性成分
Table 2 Active ingredients

Mol ID	活性成分	OB/%	DL	药物来源
MOL000358	beta-sitosterol	36.913 905 83	0.751 23	当归
MOL000449	stigmaterol	43.829 851 58	0.756 65	当归
MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	38.745 386 72	0.357 91	丹参
MOL001659	poriferasterol	43.829 851 58	0.755 96	丹参
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.913 905 83	0.750 34	丹参
MOL001942	isoimperatorin	45.464 246 74	0.225 24	丹参
MOL002222	sugiol	36.113 534 86	0.276 48	丹参
MOL002651	dehydrotanshinone II _A	43.762 285 99	0.400 19	丹参
MOL002776	baicalin	40.123 609 96	0.752 64	丹参
MOL000569	digallate	61.848 618 03	0.256 35	丹参
MOL000006	luteolin	36.162 629 34	0.245 52	丹参
MOL006824	α -amyrin	39.512 089 78	0.762 21	丹参
MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	33.765 252 36	0.285 85	丹参
MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	40.860 154 08	0.228 97	丹参
MOL007045	3 α -hydroxytanshinone II a	44.929 335 97	0.442 72	丹参
MOL007048	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	48.243 632 44	0.312 29	丹参
MOL007049	4-methylenemiltirone	34.348 675 89	0.227 26	丹参
MOL007050	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde	62.784 147 26	0.396 28	丹参
MOL007051	6-O-syringyl-8-O-acetyl shanzhiside methyl ester	46.690 658 60	0.711 45	丹参
MOL007058	formyltanshinone	73.444 622 00	0.417 36	丹参
MOL007059	3-beta-hydroxymethylenetanshinone	32.161 033 76	0.408 94	丹参
MOL007061	methylenetanshinone	37.073 193 68	0.360 17	丹参
MOL007063	przewalskin A	37.106 500 66	0.649 01	丹参
MOL007064	przewalskin B	110.324 000 10	0.438 09	丹参
MOL007068	przewaquinone B	62.240 059 62	0.413 74	丹参
MOL007069	przewaquinone C	55.741 673 10	0.404 08	丹参
MOL007070	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	41.310 457 06	0.453 00	丹参
MOL007071	przewaquinone F	40.307 883 99	0.459 25	丹参
MOL007077	sclareol	43.670 684 58	0.205 80	丹参

续表 2

Mol ID	活性成分	OB/%	DL	药物来源
MOL007079	tanshinaldehyde	52.474 704 30	0.451 96	丹参
MOL007081	danshenol B	57.950 875 30	0.557 64	丹参
MOL007082	danshenol A	56.965 248 99	0.521 72	丹参
MOL007085	salvilenone	30.383 653 87	0.376 39	丹参
MOL007088	cryptotanshinone	52.341 962 26	0.395 55	丹参
MOL007093	dan-shexinkum D	38.883 021 01	0.554 53	丹参
MOL007094	danshenspiroketallactone	50.431 281 03	0.306 70	丹参
MOL007098	deoxyneocryptotanshinone	49.400 347 05	0.285 55	丹参
MOL007100	dihydrotanshinolactone	38.684 768 30	0.322 27	丹参
MOL007101	dihydrotanshinone I	45.043 279 19	0.360 15	丹参
MOL007105	epidanshenspiroketallactone	68.273 159 29	0.305 49	丹参
MOL007107	C09092	36.069 489 86	0.247 40	丹参
MOL007108	isocryptotanshinone	54.981 932 46	0.394 49	丹参
MOL007111	isotanshinone II	49.916 025 74	0.396 74	丹参
MOL007115	manool	45.044 316 36	0.202 08	丹参
MOL007118	microstegiol	39.612 294 57	0.277 34	丹参
MOL007119	miltionone I	49.684 394 33	0.321 25	丹参
MOL007120	miltionone II	71.029 703 21	0.437 11	丹参
MOL007121	miltipolone	36.556 112 06	0.368 03	丹参
MOL007122	miltirone	38.756 986 35	0.254 18	丹参
MOL007123	miltirone II	44.951 066 48	0.235 37	丹参
MOL007124	neocryptotanshinone ii	39.462 991 14	0.231 57	丹参
MOL007125	neocryptotanshinone	52.487 997 01	0.323 06	丹参
MOL007127	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	34.720 822 13	0.366 34	丹参
MOL007130	prolithospermic acid	64.370 962 07	0.310 17	丹参
MOL007132	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl]oxy-propionic acid	109.380 524 10	0.351 19	丹参
MOL007140	(Z)-3-[2-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)vinyl]-3,4-dihydroxy-phenyl]acrylic acid	88.536 021 01	0.258 69	丹参
MOL007141	salvianolic acid G	45.564 855 78	0.606 02	丹参
MOL007142	salvianolic acid J	43.376 049 91	0.724 97	丹参
MOL007143	salvilenone I	32.434 708 56	0.228 95	丹参
MOL007145	salviolone	31.724 150 39	0.235 68	丹参
MOL007149	NSC 122421	34.492 923 09	0.276 45	丹参
MOL007150	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-quinone	75.385 878 47	0.455 10	丹参
MOL007151	tanshindiol B	42.665 810 49	0.453 03	丹参
MOL007152	przewaquinone E	42.854 852 04	0.453 01	丹参
MOL007154	tanshinone IIa	49.887 300 04	0.397 81	丹参
MOL007155	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	65.258 937 71	0.448 71	丹参
MOL007156	tanshinone VI	45.637 306 02	0.295 49	丹参
MOL001215	tirucallol	42.119 188 97	0.750 03	乳香
MOL001241	O-acetyl- α -boswellic acid	42.729 715 38	0.696 30	乳香
MOL001243	3 α -hydroxy-olean-12-en-24-oic-acid	39.324 209 40	0.753 30	乳香
MOL001255	boswellic acid	39.547 587 90	0.751 86	乳香
MOL001263	3-oxo-tirucallic,acid	42.857 812 45	0.805 03	乳香
MOL001265	acetyl- α -boswellic,acid	42.729 715 38	0.695 09	乳香
MOL001272	incensole	45.588 993 07	0.219 61	乳香
MOL001295	phyllocladene	33.396 426 60	0.272 16	乳香
MOL001001	quercetin-3-O- β -D-glucuronide	30.655 612 66	0.736 45	没药
MOL001002	ellagic acid	43.064 558 58	0.434 17	没药
MOL001004	pelargonidin	37.988 312 33	0.212 04	没药
MOL001006	poriferasta-7,22E-dien-3 β -ol	42.979 365 52	0.755 55	没药

续表 2

Mol ID	活性成分	OB/%	DL	药物来源
MOL001009	guggulsterol-VI	54.717 972 90	0.430 55	没药
MOL001013	mansumbinoic acid	48.100 545 32	0.322 13	没药
MOL001019	(7S,8R,9S,10R,13S,14S,17Z)-17-ethylidene-7-hydroxy-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,16-dione	35.748 679 15	0.475 88	没药
MOL001021	7 β ,15 β -dihydroxypregn-4-ene-3,16-dione	43.106 225 85	0.511 40	没药
MOL001022	11 α -hydroxypregna-4,17(20)-trans-diene-3,16-dione	36.615 081 07	0.470 61	没药
MOL001026	myrrhanol C	39.960 415 93	0.582 20	没药
MOL001027	myrrhanone A	40.250 381 40	0.625 19	没药
MOL001028	(8R)-3-oxo-8-hydroxy-polypoda-13E,17E,21-triene	44.834 259 38	0.588 98	没药
MOL001029	myrrhanones B	34.385 076 90	0.674 43	没药
MOL001031	epimansumbinol	61.805 909 27	0.398 24	没药
MOL001033	diayangambin	63.839 576 89	0.809 18	没药
MOL001040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	42.363 321 14	0.211 41	没药
MOL001045	(13E,17E,21E)-8-hydroxypolypodo-13,17,21-trien-3-one	44.338 398 26	0.576 12	没药
MOL001046	(13E,17E,21E)-polypodo-13,17,21-triene-3,18-diol	39.960 415 93	0.578 24	没药
MOL001049	16-hydroperoxymansumbin-13(17)-en-3 β -ol	41.052 536 89	0.494 05	没药
MOL001052	mansumbin-13(17)-en-3,16-dione	41.781 112 53	0.448 06	没药
MOL001061	(16S, 20R)-dihydroxydammar-24-en-3-one	37.339 629 12	0.776 90	没药
MOL001062	15 α -hydroxymansumbinone	37.506 798 91	0.437 28	没药
MOL001063	28-acetoxy-15 α -hydroxymansumbinone	41.854 292 01	0.670 10	没药
MOL001069	3 β -acetoxy-16 β ,20(R)-dihydroxydammar-24-ene	38.717 740 08	0.810 79	没药
MOL001088	1 α -acetoxy-9,19-cyclolanost-24-en-3 β -ol	44.403 785 90	0.779 87	没药
MOL001092	[(3R,5R,8R,9R,10R,13R,14R,17S)-17-[(2S,5S)-5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methyloxolan-2-yl]-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9,11, 12,13,15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl] acetate	33.065 112 14	0.802 23	没药
MOL001093	cabraleone	36.207 621 78	0.819 03	没药
MOL001095	isofouquierone	40.946 803 09	0.779 60	没药
MOL001126	[(5aS,8aR,9R)-8-oxo-9-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5,5a,6,9-tetrahydroiso-benzofurano[6,5-f][1,3]benzodioxol-8a-yl] acetate	44.075 779 32	0.902 83	没药
MOL001131	phellamurin_qt	56.596 555 43	0.392 83	没药
MOL001138	(3R,20S)-3,20-dihydroxydammar-24-ene	37.494 710 09	0.748 77	没药
MOL001145	(20S)-3 β -acetoxy-12 β ,16 β ,25-tetrahydroxydammar-23-ene	34.888 315 41	0.816 29	没药
MOL001146	(20S)-3 β ,12 β ,16 β ,25-pentahydroxydammar-23-ene	37.941 980 81	0.745 97	没药
MOL001147	(20R)-3 β -acetoxy-16 β -dihydroxydammar-24-ene	40.364 539 30	0.820 63	没药
MOL001148	3 β -hydroxydammar-24-ene	40.274 485 40	0.823 38	没药
MOL001156	3-methoxyfuranoguaia-9-en-8-one	35.147 140 70	0.183 82	没药
MOL001164	[(5S,6R,8R,9Z)-8-methoxy-3,6,10-trimethyl-4-oxo-6,7,8,11-tetrahydro-5H-cyclodeca[b]furan-5-yl] acetate	34.757 617 53	0.249 31	没药
MOL001175	guggulsterone	42.449 247 90	0.435 48	没药
MOL000358	beta-sitosterol	36.913 905 83	0.751 23	没药
MOL000449	stigmaterol	43.829 851 58	0.756 65	没药
MOL000490	petunidin	30.045 539 04	0.307 12	没药
MOL000979	2-methoxyfuranoguaia-9-ene-8-one	66.177 445 65	0.183 59	没药
MOL000098	quercetin	46.433 348 12	0.275 25	没药
MOL000988	4,17(20)-(cis)-pregnadiene-3,16-dione	51.417 386 73	0.478 26	没药
MOL000996	guggulsterol IV	33.592 320 10	0.737 37	没药

2.2 骨关节炎疾病靶点收集结果

骨关节炎治疗靶点在 GeneCards、OMIM、TTD、DrugBank、Pharmgkb 5 个数据库中,以“Osteoarthritis”为检索词得到,经去除重复靶点后,合并获得骨关节炎相关靶点共计 1 675 个。将活络效灵丹潜在活性成分的靶点与骨关节炎治疗靶点

匹配取交集,最终获得与活络效灵丹治疗骨关节炎相关的靶点 106 个,见图 1。

2.3 成分-靶点网络结果

运用 Cytoscape 3.8.2 软件,构建活络效灵丹治疗骨关节炎的可视化网络图,当归、丹参、乳香、没药 4 味药物主要成分通过调控 106 个靶点治疗骨

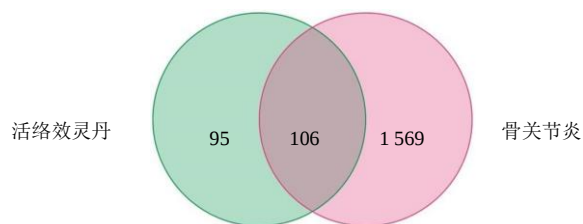


图 1 药物 - 疾病交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of drug - disease intersection targets

关节炎, 如图 2。度值排名前 5 位的为槲皮素 (quercetin)、木犀草素 (luteolin)、丹参酮 II_A (tanshinone II_A)、丹参新醌 D (dan-shenxinkun D)、二氢丹参内酯 (dihydrotanshinlactone), 分别能与 82、32、24、14、14 个靶点连接, 上述靶点蛋白可能与活络效灵丹治疗骨关节炎关系密切。该可视化网络中共包含 184 个节点和 282 条边, 平均节点度值为 3.06。

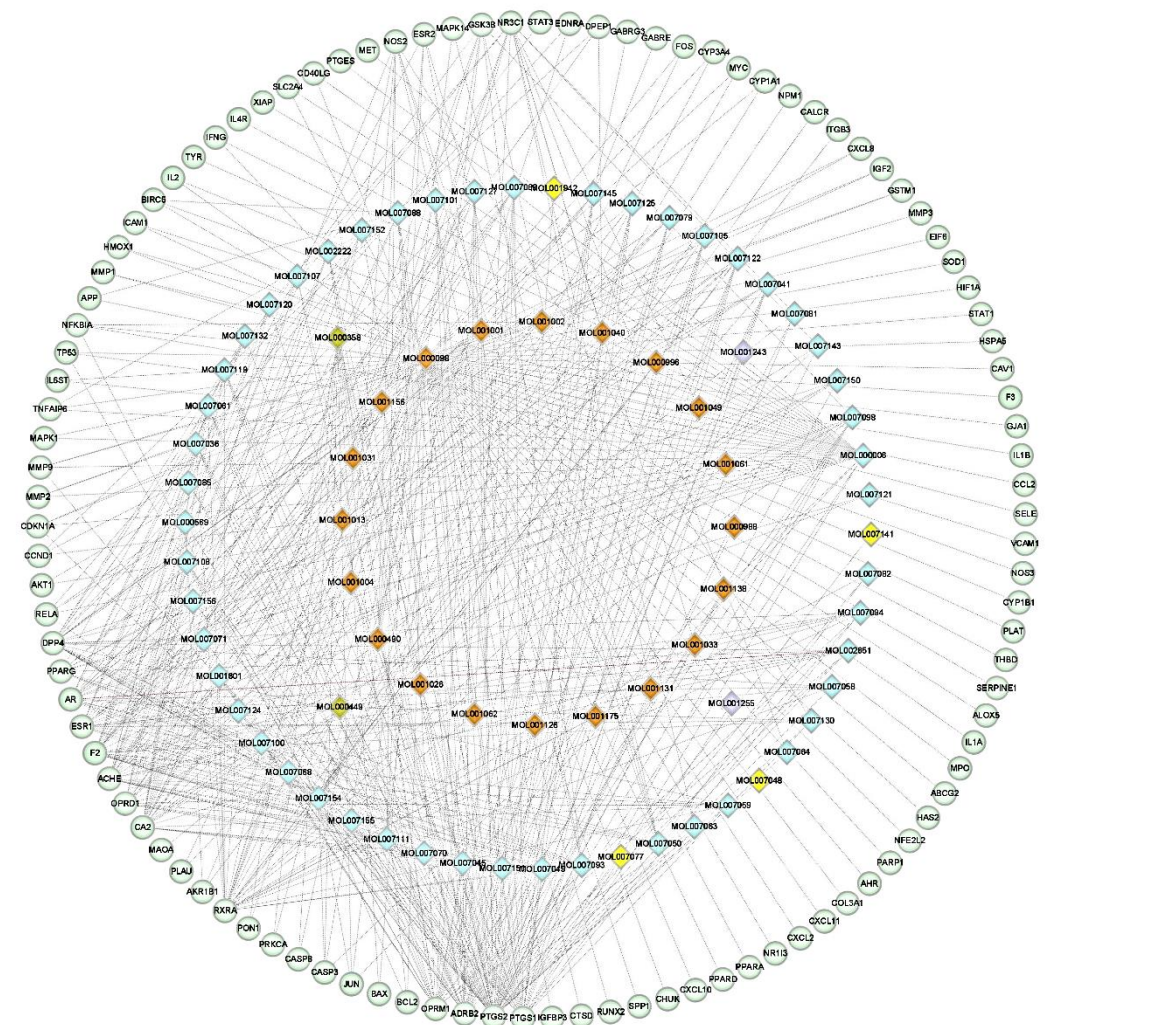


图 2 成分 - 靶点网络图

Fig. 2 Ingredients - targets network diagram

2.4 PPI 网络与蛋白模块

借助 String 数据库得到活络效灵丹治疗骨关节炎对应靶点的 PPI 网络图, 含 106 个节点和 345 条边, 度 (degree) 均值为 6.51, 见图 3。利用 Cytoscape 3.8.2 软件处理所得数据, 并通过插件 Cyto NCA 计算上述筛选节点的度自由性 (DC)、接近中心性

(CC)、介数中心性 (BC)、网络中心性 (NC)、特征向量中心性 (EC)、局部平均连接性 (LAC)、子图中心性 (SC)、信息中心性 (IC) 8 个指标数值, 以节点各参数均大于每次筛选后其中位值为条件, 运用 R 语言进行 3 次筛选, 得到核心网络见图 4, 度值排名前 12 的核心靶点蛋白见表 3。

图3 活络效灵丹治疗骨关节炎靶点的PPI图

Fig. 3 PPI network of the target of Huoluo Xiaoling Pills in treatment of osteoarthritis

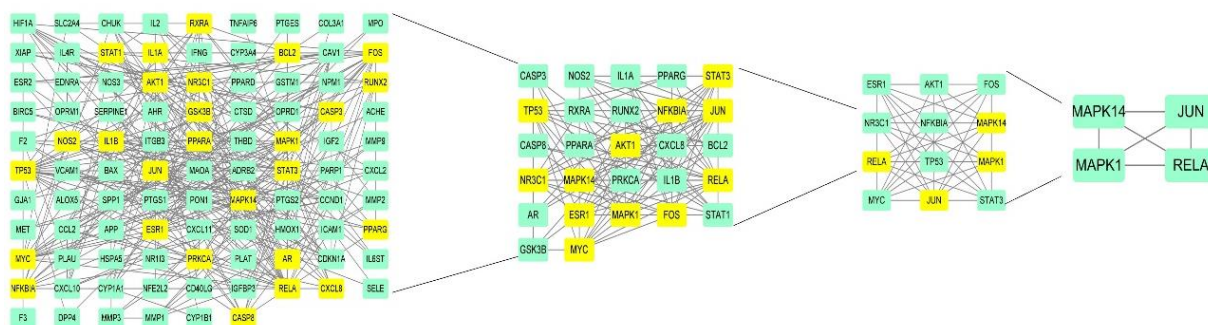


图 4 核心 PPI 网络

Fig. 4 Core PPI network after screening

表3 核心靶点的度值排名

Table 3 Ranking of core targets by degree value

序号	靶点	度值
1	MAPK14	16
2	AKT1	14
3	NR3C1	12
4	MYC	14
5	JUN	19
6	ESR1	12
7	MAPK1	18
8	RELA	18
9	FOS	12
10	TP53	15
11	NFKBIA	10
12	STAT3	15

2.5 GO 与 KEGG 富集分析结果

通过对活络效灵丹潜在活性成分靶点与骨关节炎交集靶点蛋白采取 GO 富集分析, 设置 $P < 0.05$, 利用 R 语言筛选得出 2 210 个 GO 条目, 涉及生物学进程 (BP) 共 1 996 条, 细胞组分 (CC) 53 条, 分子功能 (MF) 161 条, 以 P 值的大小为升序条件, 进而选取前 10 个条目做可视化处理, 如图 5 所示。结果显示, 靶点基因生物学进程主要集中在对辐射的反应、细胞对化学应激的反应等方面, 均与炎症的形成与发展有着密切的联系。在细胞组分上, 对膜筏、核膜腔等方面起关键作用。在分子功能方面, 对 DNA 结合转录因子结合、核受体活性等具有显著影响。

KEGG 富集分析显示,靶点基因富集了 157 条相关通路,结果显示靶点基因主要涉及脂质与动脉粥样硬化、化学致癌 - 受体激活、乙型肝炎、Th17

细胞分化、丙型肝炎等，见图6。

2.6 分子对接结果

通常将 Total score 值>5.0 作为标准, 判定对接分子与靶点结合活性是否较强。运用 Cyto NCA 计算并结合 R 语言筛选中位值, 经过 3 次筛选出得到 4 个靶点, 分别为 JUN、MAPK1、MAPK14、RELA, 将与之对应的化合物进行对接得出分值。对接 Total score 结果如图 7 所示, 20 个对接结果表明分子与靶点之间均具有结合活性, 有 3 个提示有较优的 (Total score>5.0) 对接活性, 其中槲皮素 (quercetin) 与核心靶点蛋白结合情况较好, 见图 8。因 MAPK1 结合情况最佳, 故其可能为活络效灵丹治疗骨关节炎的靶点之一。

3 讨论

骨关节炎在中医学上属于“痹证”“骨痛”的范

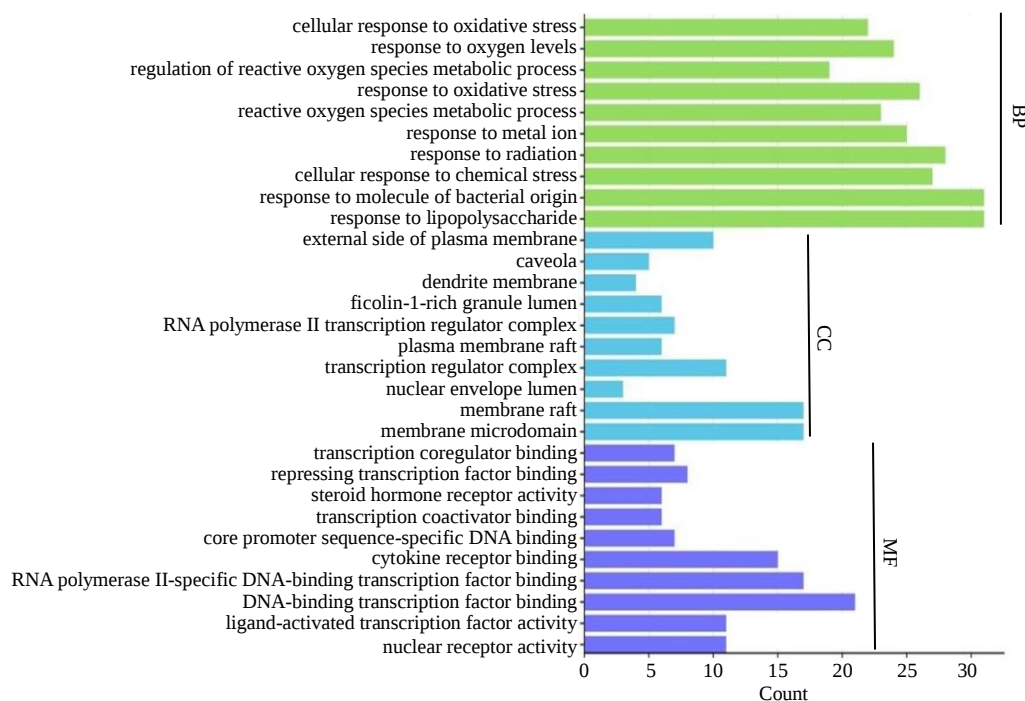


图 5 GO 通路富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of GO pathway

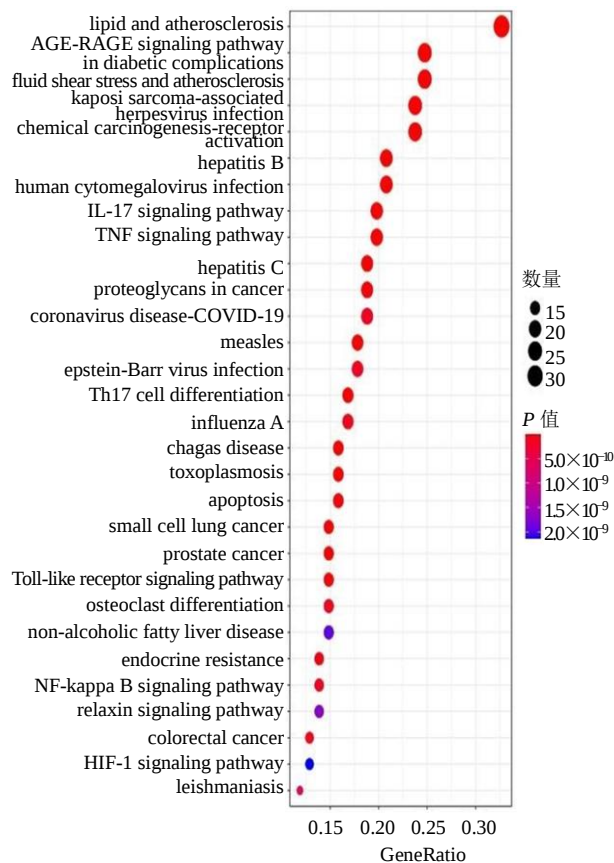


图 6 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 Enrichment analysis of KEGG pathway

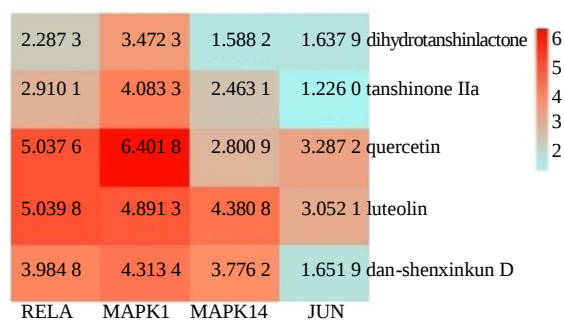


图 7 活性成分-靶点对接能得分热图

Fig. 7 Ingredient - target docking energy score heat map

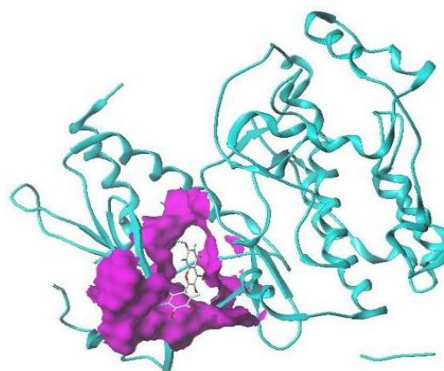


图 8 槲皮素与核心靶点基因 MAPK1 对接图

Fig. 8 Molecular docking diagram of quercetin and MAPK1

畴。《素问·痹论》^[10]即有“风寒湿三气杂至，合而为痹也”的论述。本病是机体正气不足，感受风湿等邪气而致经络闭阻不畅、气血运行失常，常发生于肢体、经络、肌肉、关节等部位，可见麻木、重着、疼痛、屈伸不利等症状，或见关节变形、活动障碍，甚者侵袭脏腑的疾病^[11]。临床上虽与肝、脾、肾相关，但瘀血阻滞为该病主要病理因素。活络效灵丹一方中，当归、丹参能活血通经兼以养血，可除瘀滞；配伍乳香、没药以行气消肿定痛，治风湿痹痛。四药合方，共奏活血通络、化瘀止痛之效，对于骨关节炎具有较好的治疗作用。

3.1 药物活性成分

通过活络效灵丹治疗骨关节炎的可视化网络图，获得药物中主要发挥作用的潜在活性成分，为槲皮素、木犀草素、丹参酮 II_A、丹参新醌 D、二氢丹参内酯等。其中槲皮素度值远大于其他活性成分。Li 等^[12]基于大鼠模型发现，槲皮素可通过抑制与 IRAK1/NLRP3 炎症途径相关的炎症体对骨关节炎发挥治疗作用，从而减轻关节软骨的变性和侵蚀。因基质金属蛋白酶 (MMPs) 与关节软骨细胞作用关系密切，随着 MMPs 的异常升高，关节软骨细胞凋亡加快，而分泌型组织金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs) 异常表达又与 MMPs 的激活呈负相关^[13]。研究表明^[14-15]，槲皮素和丹参酮 II_A 都能调节 MMP-13 表达，故通过增加金属蛋白酶组织抑制剂 TIMP-1 表达，可减弱氧化应激反应，缓解软骨细胞外基质降解，从而改善骨关节炎退行性病变。木犀草素能通过逆转 IL-1 β 诱导的 II 型胶原降解，对于骨关节炎的治疗起抗炎和抗代谢作用^[16]。经过文献检索，由于丹参新醌 D、二氢丹参内酯等部分关键成分的研究较少，暂无研究揭示其明确的药理作用机制，需要进一步的实验证实，但也为进一步的研究提供了方向。除以上主要成分以外，还有多个成分从不同方面、不同层次，通过相互作用的途径综合作用发挥抗骨关节炎的作用。

3.2 关键作用靶点

借助 String 数据库得到 PPI 网络图，经过 Cytoscape 3.82 软件可视化处理，并利用插件 CytoNCA 计算筛选得到 MAPK1、MAPK14、RELA、JUN 等关键靶点。MAPK 靶点对于细胞生长和分化具有一定调节作用，能够推进间充质细胞分化为成骨细胞的进程，抑制软骨细胞的分化^[17]。NF- κ B 作为核转录因子，在细胞的炎症反应、免疫应答等过

程中都起关键性作用^[18]。而 RELA 作为 NF- κ B 家族成员在骨骼生长和骨关节炎的发展中，能抑制软骨细胞凋亡^[19]。JUN 基因属于原癌基因之一，Jun 基因的表达下调，可缓解神经病理性疼痛^[20]。经研究发现^[21]，在软骨细胞中，MMPs 被 IL-1 β 激活后，可加重软骨细胞凋亡破坏。因此通过调节 JUN 基因抑制 IL-1 β 的表达，能抑制 MMPs 的分泌，达到治疗骨关节炎的目的。

3.3 通路分析

GO 富集分析显示，活络效灵丹治疗骨关节炎主要通过对配体激活的转录因子活性、核受体活性等多方面起效而达到治疗目的。核受体 (NRs) 是一类配体依赖和独立的转录因子，可参与细胞内信号的转录过程^[22]。基于大鼠骨关节炎模型研究发现，维生素 D 可显著增加软骨细胞的细胞活性，主要因为人关节软骨表层细胞 (VDR) 的表达与 MMPs 水平密切相关，特别是 MMP-3 和 MMP-9 等，而 MMP-3 对于破骨细胞骨吸收起关键作用^[23]。据统计，类固醇通过拮抗促炎因子 TNF- α ，可促进间充质干细胞分化为成骨细胞^[24-25]，由此类固醇对治疗骨关节炎有较好的消炎作用。雌激素受体 E_{α} 的表达受雌激素的调节与抑制，从而缓解骨关节炎的发展进程，以达到修复骨损伤病变的目的。

KEGG 富集分析结果显示，靶点基因主要涉及脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路等。通常认为，动脉粥样硬化与骨关节炎为 2 种独立的慢性疾病，过量的氧化型低密度脂蛋白异常表达也主要影响动脉粥样硬化的发展进程。然而 Hashimoto 等^[26]通过实验发现，氧化型低密度脂蛋白与 LOX-1 的结合，可通过诱导成骨相关基因如 Col X 和 Runx2 的表达，调节 MMP-13 的分泌，由此参与到体内软骨细胞的凋亡过程中。研究表明^[27]，高水平的糖基化终末产物 (AGEs) 累积在组织和循环中具有一定的致病性，其中糖基化终末产物受体 (RAGE) 研究最为充分，该受体是细胞对 AGEs 负荷反应的主要上游调节因子^[28]。RAGE 在组织发育、体内平衡和修复过程起着关键作用，RAGE 激活可刺激 NF- κ B、AP-1 等信号通路诱导细胞因子转录，并通过调节自噬和凋亡影响细胞活力^[29]。除此之外，RAGE 表达的增加对骨细胞的分化、活性都有一定影响^[30]。AGEs 和 RAGE 相互作用可导致氧化应激反应产生，引发增殖、炎症等反应^[31]。IL-17

炎性细胞因子对于关节内炎症反应的发生、软骨破坏和骨侵蚀等都起着关键作用^[32]。此外, IL-17 炎性细胞因子可通过调节骨组织中 RANKL 配体, 减少成骨细胞的分化, 推进破骨细胞的分化, 参与到骨质破坏过程中^[33]。一方面, TNF- α 可参与细胞因子的诱导、白细胞的聚集、破骨细胞的活化与软骨的破坏等致病机制。另一方面, TNF- α 能影响软骨基质的恢复, 加速软骨的降解^[34]。推测骨关节炎的发生主要由于上述各信号通路之间相互影响、相互配合导致, 而活络效灵丹的各个药效成分正作用于富集在这些通路上的关键靶点, 从而可调节骨与软骨细胞分化过程中的炎症反应的发生, 进一步发挥治疗骨关节炎的作用。

综上所述, 本研究将网络药理学与分子对接技术相结合, 筛选出活络效灵丹治疗骨关节炎的潜在靶点, 进一步明晰参与的生物学进程与靶点蛋白作用的信号通路, 同时对部分靶点蛋白进行分子对接验证。尽管本研究已进行参考文献补充相关靶点信息, 但其中涉及的数据仍需更新完善, 如有条件可进行实验进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 石晓明, 于占革. 骨关节炎发病机制的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(24): 11607-11610.
- [2] Jie W. High prevalence and burden of osteoarthritis in China [J]. *Lancet Rheumatol*, 2020, 2(3): e127-e128.
- [3] 张莹莹, 李旭东, 杨佳娟, 等. 中国 40 岁及以上人群骨关节炎患病率的 Meta 分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21(4): 407-414.
- [4] 张锡纯. 《重订医学衷中参西录(上)》[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 346.
- [5] 朱军璇, 王敏智, 刘彪, 等. 活络效灵丹加减方治疗骨性关节炎的药效研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(4): 389-391.
- [6] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [7] 包君丽, 李伟, 彭坤明, 等. 基于网络药理学和分子对接方法探讨雷公藤对狼疮性肾炎的效毒作用机制[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(9): 1765-1773.
- [8] 张雨恬, 伍振峰, 黄艺, 等. 基于网络药理学与分子对接技术的鲜竹沥治疗“咳、喘、痰”机制及其质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7538-7549.
- [9] 郑春歌, 黄新安, 沈小玲, 等. 基于分子对接的孕甾烷酯类化合物的寻靶研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(4): 491-498.
- [10] 田代华(整理). 黄帝内经素问 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 85.
- [11] 周仲瑛. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 481.
- [12] Li W, Wang Y, Tang Y, et al. Quercetin alleviates osteoarthritis progression in rats by suppressing inflammation and apoptosis via inhibition of IRAK1/NLRP3 signaling [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 3393-3403.
- [13] Takahashi I, Onodera K, Bae J W, et al. Age-related changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats [J]. *J Mol Histol*, 2005, 36(5): 355-366.
- [14] Wei B, Zhang Y, Tang L X, et al. Protective effects of quercetin against inflammation and oxidative stress in a rabbit model of knee osteoarthritis [J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80(3): 360-367.
- [15] Jia P T, Zhang X L, Zuo H N, et al. Articular cartilage degradation is prevented by tanshinone II_A through inhibiting apoptosis and the expression of inflammatory cytokines [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 6285-6289.
- [16] Fei J, Liang B, Jiang C, et al. Luteolin inhibits IL-1 β -induced inflammation in rat chondrocytes and attenuates osteoarthritis progression in a rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1586-1592.
- [17] Matsushita T, Chan Y Y, Kawanami A, et al. Extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 play essential roles in osteoblast differentiation and in supporting osteoclastogenesis [J]. *Mol Cellular Biol*, 2009, 29(21): 5843-5857.
- [18] Rashed F, Kamijyo S, Shimizu Y, et al. The effects of receptor activator of NF- κ B ligand-binding peptides on bone resorption and bone formation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 648084.
- [19] Kobayashi H, Hirata M, Saito T, et al. NF- κ B family member RELA/p65 in chondrocytes controls skeletal growth and osteoarthritis development by inhibiting chondrocyte apoptosis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21: S14.
- [20] Yan X T, Xu Y, Cheng X L, et al. SP1, MYC, CTNNB1, CREB1, JUN genes as potential therapy targets for neuropathic pain of brain [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 6688-6695.
- [21] Qiong J, Xia Z, Jing L, et al. Synovial mesenchymal stem cells effectively alleviate osteoarthritis through promoting the proliferation and differentiation of meniscus chondrocytes [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020,

- 24(4): 1645-1655.
- [22] Ramón-Vázquez A, de la Rosa J V, Tabraue C, *et al.* Bone marrow-derived macrophage immortalization of LXR nuclear receptor-deficient cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1951: 75-85.
- [23] Tetlow L C, Woolley D E. Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes *in vitro* [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001, 9(5): 423-431.
- [24] McCabe P S, Maricar N, Parkes M J, *et al.* The efficacy of intra-articular steroids in hip osteoarthritis: A systematic review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(9): 1509-1517.
- [25] Bellamy N, Campbell J, Robinson V, *et al.* Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005, 5(2): 85-86.
- [26] Hashimoto K, Oda Y, Nakamura F, *et al.* Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1-deficient mice show resistance to age-related knee osteoarthritis [J]. *Eur J Histochem*, 2017, 61(1): 2762.
- [27] Chen J H, Lin X, Bu C, *et al.* Role of advanced glycation end products in mobility and considerations in possible dietary and nutritional intervention strategies [J]. *Nutr Metab*, 2018, 15: 72.
- [28] Teissier T, Boulanger É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(3): 279-301.
- [29] Wang X, Sun X, Niu M, *et al.* RAGE silencing ameliorates neuroinflammation by inhibition of p38-NF- κ B signaling pathway in mouse model of Parkinson's disease [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 353.
- [30] Plotkin L I, Essex A L, Davis H M. RAGE signaling in skeletal biology [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2019, 17(1): 16-25.
- [31] Davis H M, Essex A L, Valdez S, *et al.* Short-term pharmacologic RAGE inhibition differentially affects bone and skeletal muscle in middle-aged mice [J]. *Bone*, 2019, 124: 89-102.
- [32] Liao J J, Huang M C, Goetzl E J. Cutting edge: Alternative signaling of Th17 cell development by sphingosine 1-phosphate [J]. *J Immunol*, 2007, 178(9): 5425-5428.
- [33] Ganesan R, Rasool M. Interleukin 17 regulates SHP-2 and IL-17RA/STAT-3 dependent Cyr61, IL-23 and GM-CSF expression and RANKL mediated osteoclastogenesis by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Mol Immunol*, 2017, 91: 134-144.
- [34] Zhao B. Intrinsic restriction of TNF-mediated inflammatory osteoclastogenesis and bone resorption [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 583561.

[责任编辑 高源]