

基于网络药理学和分子对接探讨护骨胶囊治疗骨质疏松症的作用机制

周俏苑¹, 陈洪¹, 刘海全^{1*}, 黄桂琼¹, 秦佳佳²

1. 广州中医药大学惠州医院(惠州市中医医院), 广东 惠州 516000

2. 暨南大学, 广东 广州 510000

摘要: **目的** 基于网络药理学和分子对接技术探讨护骨胶囊治疗骨质疏松症潜在的活性成分和作用机制。**方法** 利用 TCMSP 数据库结合《中国药典》2020 版筛选候选活性成分, 并通过文献检索进行补充和删减得到最终成分, 并通过 Swiss Target Prediction 数据库预测和筛选出活性成分的潜在的作用靶点。通过权威数据库 (Genecard、Drugbank、TTD) 检索骨质疏松症相关靶点, 通过 Cytoscape 3.9.0 软件建立中药-成分-靶点网络模型进行网络分析, 并将交集靶点导入至 String 在线数据库进行蛋白相互作用 (PPI) 网络构建并进行分析。利用 David 数据库进行基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。利用 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接。**结果** 共筛选出护骨胶囊 59 个活性成分、78 个交集靶点。PPI 网络分析表明, 肿瘤坏死因子 (TNF)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、酪氨酸蛋白激酶 3 (MAPK3)、雌激素受体 α (ESR1) 等可能是护骨胶囊治疗骨质疏松症的关键靶点。GO 和 KEGG 富集分析表明护骨胶囊主要通过细胞外空间、质膜、宿主细胞核等细胞组分参与细胞生存、生长、分裂等众多生物学过程, 继而与蛋白质特异性结合, 发挥调节核受体活性、过渡金属离子结合、类固醇结合等分子功能, 涉及糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物 (AGE)-晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路、松弛素信号通路、雌激素信号通路等。分子对接结果表明, 地黄苦苣元、大黄素甲醚、甲基异茜草素、阿魏酸和大豆苷元核心成分与 TNF、VEGFA、SRC、MAPK3、ESR1 核心靶点均具有良好的结合能力。**结论** 护骨胶囊中的地黄苦苣元、大黄素甲醚、甲基异茜草素、阿魏酸和大豆苷元等可能是治疗骨质疏松症的物质基础, 能够作用于 TNF、VEGFA、SRC、MAPK3、ESR1 等多个靶点, 通过调节糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、松弛素信号通路、雌激素信号通路等参与骨骼重塑、抑制破骨细胞的形成与分化、促进骨形成和抗炎作用, 进而发挥治疗骨质疏松症的作用。

关键词: 护骨胶囊; 骨质疏松症; 网络药理学; 分子对接; 作用机制; 地黄苦苣元; 大黄素甲醚; 甲基异茜草素

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)10-2427-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.10.007

Mechanism of action of Hugu Capsules in treatment of osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking

ZHOU Qiao-yuan¹, CHEN Hong¹, LIU Hai-quan¹, HUANG Gui-qiong¹, QIN Jia-jia²

1. Huizhou Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Huizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine), Huizhou 516000, China

2. Ji'nan University, Guangzhou 510000, China

Abstract: Objective To explore the potential active ingredients and mechanism of Hugu Capsules in treating osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The candidate active ingredients were screened using TCMSP database in combination with the 2020 edition of Chinese Pharmacopoeia, and the final ingredients were obtained through supplement and deletion through literature search, and the potential targets of active ingredients were predicted and screened through the Swiss Target Prediction database. The targets related to osteoporosis were searched through authoritative databases (Genecard, Drugbank, TTD), and the TCM - component - target network model was established by Cytoscape 3.9.0 software for network analysis. The

收稿日期: 2023-08-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82174147); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2021A1515011271, 2023A515011686); 广东省中医药局科研项目 (20213019); 第七批全国名老中医药专家学术经验继承项目[国中医药人教函 (2022) 76 号]

作者简介: 周俏苑, 研究方向为中医内科学。E-mail: zqy18260889303@163.com

***通信作者:** 刘海全, 博士, 主任中医师, 研究方向为中医药防治骨关节疾病与骨质疏松。E-mail: liuhaiq1977@163.com

intersection targets were imported into the String online database for protein interaction (PPI) network construction and analysis. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using the David database. Molecular docking was performed using AutoDockTools 1.5.6 software. **Results** A total of 59 active components and 78 intersection targets of Hugu Capsules were screened out. PPI network analysis showed that TNF, VEGFA, SRC, MAPK3, and ESR1 may be the key targets of Hugu Capsules in treatment of osteoporosis. GO and KEGG enrichment analysis showed that Hugu Capsules mainly participated in many biological processes such as cell survival, growth and division through extracellular space, plasma membrane, host nucleus and other cell components, and then specifically bound to proteins to regulate nuclear receptor activity, transition metal ion binding, steroid binding and other molecular functions, involving AGE-RAGE signaling pathway, relaxin signaling pathway and estrogen signaling pathway in diabetic complications. The results of molecular docking showed that the core components such as rehmannia aglycone, physcion, methyl isosalizarin, ferulic acid, and daidzein had good binding ability to core targets such as TNF, VEGFA, SRC, MAPK3, and ESR1. **Conclusion** Rehmanniogenin, physcion, methylisosalizarin, ferulic acid, and daidzein in Hugu Capsules may be the material basis for the treatment of osteoporosis, which can act on multiple targets such as TNF, VEGFA, SRC, MAPK3, and ESR1, and participate in bone remodeling, inhibit the formation and differentiation of osteoclasts, promote bone formation and anti-inflammatory effects by regulating AGE-RAGE signaling pathway, relaxin signaling pathway and estrogen signaling pathway in diabetic complications, and then play a role in treatment of osteoporosis.

Key words: Hugu Capsules; osteoporosis; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action; rehmanniogenin; physcion; methylisosalizarin

骨质疏松症是一种骨骼系统疾病，其特征是骨量低和骨微结构改变，致骨折风险增加。经典理论认为，骨质疏松症本质上是由雌激素缺乏/衰老（原发性骨质疏松症）或继发于疾病/药物（继发性骨质疏松症）引起的骨重塑障碍^[1]。骨质疏松症已被定义为 21 世纪的无声疾病，由于其严重性、慢性和进展性而成为一种公共卫生风险，主要影响绝经后妇女和老年人^[2]。调查发现，我国 65 岁以上人群中，骨质疏松症患病率为 32.0%，其中女性为 51.6%，男性为 10.7%^[3]。骨质疏松症在临床上主要表现为腰背部疼痛或全身骨痛，甚至脊柱变形及骨折。骨质疏松症在中医学上总属于“骨痿”或“骨痹”或“腰痛”等范畴，其病机根本为肝脾肾三脏虚损，因虚致瘀，进而导致骨骼失养^[4]。临床上治疗总以补肾活血为主^[5]。

护骨胶囊是在“肾主骨生髓”和“补肾生髓”的理论基础上，由淫羊藿、制何首乌、熟地黄、龟甲、巴戟天、杜仲、续断、骨碎补、当归和山药组合而成，主要具有补肾益精、养血活血的功效^[6]。临床研究表明，护骨胶囊可有效缓解症状、改善骨代谢、提高骨密度等，且安全性良好^[7-9]。护骨胶囊适用于骨质疏松症患者，但护骨胶囊治疗骨质疏松症的活性物质及作用机制尚不明确。因此，本研究结合网络药理学和分子对接技术探究护骨胶囊治疗骨质疏松症的物质基础和分子机制，旨在为进一步研究护骨胶囊治疗骨质疏松症的实验研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 护骨胶囊化学成分收集

本研究在中药系统药理学分析平台 TCMSP 数据库检索护骨胶囊处方中的各个单味药的活性成分，筛选标准：生物利用度（OB） $\geq 30\%$ ，类药性指数（DL） ≥ 0.18 ，相对分子质量（MW） < 500 ，氢键供体数目（Hdon） ≤ 5 ，氢键受体数目（Hacc） ≤ 10 和脂水分配系数（lgP） ≤ 5 。由于存在某些中药有效成分不满足筛选条件在本数据库容易被剔除和其他非特征性且无效成分被纳入候选的客观因素，故结合《中国药典》2020 版进行筛选候选活性成分，最后通过文献检索和综合考虑对筛选出的单味药活性成分进行补充和剔除。

1.2 护骨胶囊化学成分潜在靶点预测

根据筛选出来的化合物在 PubChem 数据库中查找其 Canonical SMILES 结构，将其上传至 Swis Target Prediction、PharmMapper 等数据库获取靶点信息，并通过 UniProt 数据库为靶基因注释及确认，合并去重后得到护骨胶囊化学成分靶点。

1.3 骨质疏松症相关靶点筛选

以“osteoporosis”为关键词，在 Drugbank、TTD、Genecards、DisGeNET 等数据库收集骨质疏松症相关靶点，取其交集作为骨质疏松症疾病靶点。

1.4 护骨胶囊治疗骨质疏松症相关靶点及关联网络构建

将收集的护骨胶囊化学成分潜在靶点和骨质疏松症疾病靶点上传至在线做图软件 Venny 2.1.0

获取其交集靶点作为护骨胶囊治疗骨质疏松症的潜在靶点。将护骨胶囊化学成分和护骨胶囊治疗骨质疏松症的交集靶点导入 Cytoscape 3.9.0 软件, 构建成成分靶点网络图。并进行网络拓扑分析, 筛选主要化学成分。在网络中, 以节点度 (degree) 和介值中心度 (betweenness centrality) 来反映节点的重要程度, 节点代表化合物信息, 边代表活性成分-靶点的相互作用。

1.5 蛋白相互作用 (PPI) 网络图的构建

将潜在靶点导入 String 数据库获取蛋白互作信息, 将信息导入 Cytoscape 3.9.0 软件绘制 PPI 网络图; 运用其插件 “NetworkAnalyzer” 对 PPI 网络图进行分析, 并将节点 (node) 大小和颜色设置用于反映 degree 值的大小。

1.6 基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

将潜在靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 和

KEGG 富集分析, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 分析潜在靶点聚类于护骨胶囊治疗骨质疏松症相关的生物学过程或信号通路, 将富集结果可视化处理。

1.7 分子对接

从 PubChem 数据库获取活性成分的 SDF 格式, 再导入 Chemdraw 3D 软件进行结构优化, 得到活性成分分子结构 mol2 格式。从 PDB 数据库下载目标靶点基因 PDB 格式的 3D 分子结构。利用 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接, 最后将分子对接结果导入 Pymol 软件进行可视化分析。

2 结果

2.1 护骨胶囊化学成分

通过 TCMSP 数据库和文献检索筛选护骨胶囊有效成分, 共收集了 59 个化学成分, 其中淫羊藿 12 个、制何首乌 5 个、熟地黄 5 个、龟甲 5 个、巴戟天 6 个、杜仲 6 个、续断 5 个、骨碎补 5 个、当归 5 个、山药 5 个, 见表 1。

表 1 护骨胶囊活性成分信息

Table 1 Information of active ingredients of Hugu Capsules

编号	有效成分	结构式	OB/%	DL	MW	Hdon	Hacc	LgP	来源
HGJN01	β -anhydroicaritin	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	45.41	0.44	368.41	3	6	3.88	淫羊藿
HGJN02	yinyanghuo A	C ₂₅ H ₂₄ O ₆	56.96	0.77	420.49	3	6	4.20	淫羊藿
HGJN03	yinyanghuo C	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	45.67	0.50	336.36	2	5	3.39	淫羊藿
HGJN04	yinyanghuo E	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	51.63	0.55	352.36	3	6	3.12	淫羊藿
HGJN05	epimedin A	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	5.06	0.31	822.89	10	19	-0.71	淫羊藿
HGJN06	epimedin B	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	8.65	0.34	792.86	9	18	-0.20	淫羊藿
HGJN07	epimedin C	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	16.29	0.34	790.89	8	17	0.75	淫羊藿
HGJN08	icariside I	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	21.88	0.85	530.57	6	11	1.97	淫羊藿
HGJN09	baohuoside I	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	3.70	0.84	514.57	5	10	2.68	淫羊藿
HGJN10	baohuoside II	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	4.75	0.82	500.54	6	10	2.42	淫羊藿
HGJN11	magnoflorine	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	0.48	0.55	342.45	2	4	3.12	淫羊藿
HGJN12	icariin	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	41.58	0.61	676.73	8	15	0.77	淫羊藿
HGJN13	emodin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	24.40	0.24	270.25	3	5	2.49	制何首乌
HGJN14	physcion	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	22.29	0.27	284.28	2	5	2.74	制何首乌
HGJN15	5-hydroxymethylfurfural	C ₆ H ₆ O ₃	45.07	0.02	126.12	1	3	0.67	制何首乌
HGJN16	gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	31.69	0.04	170.13	4	5	0.63	制何首乌
HGJN17	daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	19.44	0.19	254.25	2	4	2.33	制何首乌
HGJN18	rehmapirogenin	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	—	—	184.23	2	3	1.37	熟地黄
HGJN19	acteoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	2.94	0.62	624.65	9	15	0.38	熟地黄
HGJN20	echinacoside	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	3.14	0.38	786.81	12	20	-1.36	熟地黄
HGJN21	catalpol	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	5.07	0.44	362.37	6	10	-3.77	熟地黄
HGJN22	geniposide	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	14.64	0.44	388.41	5	10	-2.25	熟地黄
HGJN23	aspterric acid	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	—	—	266.33	1	4	2.43	龟甲
HGJN24	leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	72.92	0.01	131.20	3	3	0.63	龟甲
HGJN25	valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	53.33	0.01	117.17	3	3	0.24	龟甲
HGJN26	hydroxyproline	C ₅ H ₉ NO ₃	—	—	131.15	3	4	-1.15	龟甲
HGJN27	L-proline	C ₅ H ₉ NO ₂	77.57	0.01	115.15	2	3	-0.06	龟甲
HGJN28	americanin A	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	46.71	0.35	328.34	3	6	2.30	巴戟天
HGJN29	ohioensin-A	C ₂₃ H ₁₆ O ₅	38.13	0.76	372.39	3	5	3.57	巴戟天
HGJN30	nystose	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	3.95	0.57	666.66	14	21	-7.90	巴戟天
HGJN31	monotropein	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	2.53	0.44	390.38	7	11	-3.41	巴戟天
HGJN32	2-hydroxy-1-methoxyan thraquinone	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	8.70	0.21	254.24	1	4	2.53	巴戟天

续表 1

编号	有效成分	结构式	OB/%	DL	MW	Hdon	Hacc	LgP	来源
HGJN33	rubadin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	25.02	0.21	254.25	2	4	2.76	巴戟天
HGJN34	erythraline	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	49.18	0.55	297.38	0	4	2.06	杜仲
HGJN35	medioresinol	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	87.19	0.62	388.45	2	7	2.12	杜仲
HGJN36	pinoresinol diglucoside	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₆	14.93	0.34	682.74	8	16	-1.68	杜仲
HGJN37	pinoresinol	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	4.25	0.52	358.42	2	6	2.13	杜仲
HGJN38	hyperoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	6.94	0.77	464.41	8	12	-0.59	杜仲
HGJN39	chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	11.93	0.33	354.34	6	9	-0.42	杜仲
HGJN40	cauloside A	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	43.32	0.81	444.72	3	4	4.92	续断
HGJN41	asperosaponin VI	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	1.67	0.07	929.23	11	18	0.44	续断
HGJN42	loganic acid	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	4.92	0.40	376.40	6	10	-2.33	续断
HGJN43	sylvestroside I	C ₃₃ H ₄₈ O ₁₉	—	—	748.72	9	19	-1.97	续断
HGJN44	loganin	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	5.90	0.44	390.43	5	10	-2.08	续断
HGJN45	naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	59.29	0.21	272.27	3	5	2.30	骨碎补
HGJN46	luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	36.16	0.25	286.25	4	6	2.07	骨碎补
HGJN47	naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	6.92	0.78	580.59	8	14	-0.46	骨碎补
HGJN48	neoeriocitrin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	3.93	0.73	596.59	9	15	-0.73	骨碎补
HGJN49	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	41.88	0.24	286.25	4	6	1.77	骨碎补
HGJN50	ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	39.56	0.06	194.20	2	4	1.62	当归
HGJN51	ligustilide	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	23.50	0.07	190.26	0	2	2.94	当归
HGJN52	3-butylidenephthalide	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	42.44	0.07	188.24	0	2	3.00	当归
HGJN53	3-N-butyl-4,5-dihydrophthalide	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	—	—	192.25	0	2	2.71	当归
HGJN54	levistilide A	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	2.15	0.82	380.52	0	4	4.97	当归
HGJN55	piperlonguminine	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	30.71	0.18	273.36	1	4	2.93	山药
HGJN56	kadsurenone	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	54.72	0.38	356.45	0	5	2.80	山药
HGJN57	diosgenin	C ₂₇ H ₄₂ O ₃	80.88	0.81	414.69	1	3	4.63	山药
HGJN58	batatasin I	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	23.70	0.27	284.33	1	4	3.33	山药
HGJN59	allantoin	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	106.68	0.03	158.14	5	7	-1.76	山药

2.2 护骨胶囊活性成分潜在靶点预测

将筛选出的活性成分的 SMILE 格式文件导入到 Swiss Target Prediction 等数据库进行潜在靶点预测, 共得到 529 个潜在靶点。

2.3 骨质疏松症相关靶标

通过检索 GeneCard、DrugBank、OMIM 等数据库共获得与骨质疏松症相关的疾病靶点共 1 609 个, 与 2.2 项下预测的潜在靶点构建韦恩图, 最终获得护骨胶囊可能治疗骨质疏松症的相关靶点共 78 个, 见图 1。

2.4 护骨胶囊活性成分网络构建和分析

将交集靶点及其对应的成分信息导入 Cytoscape

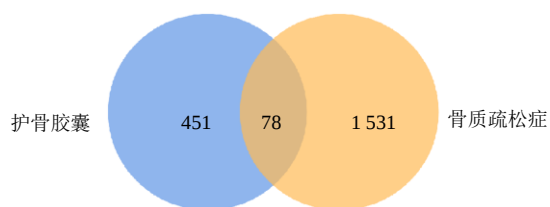


图 1 护骨胶囊潜在靶点与骨质疏松症靶标韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of Hugu Capsules potential targets and osteoporosis targets

3.9.0 软件, 构建“中药-成分-靶点”网络图(图 2), 同时进行网络拓扑分析, 筛选主要化学成分, 选择 degree 排名前 12 位的活性成分作为核心化学成分, 见表 2。

2.5 基于 String 和 Cytoscape 软件的 PPI 网络构建和分析

将 78 个交集靶点上传至 String 数据库, 运行得到 PPI 数据。将结果导入到 Cytoscape 3.9.0 软件绘制靶点互作网络, 通过 Cytoscape 3.9.0 软件中的 Network Analyzer 功能进行网络拓扑学分析, 绘制核心靶点 PPI 网络图, 见图 3。颜色深浅和大小表示该节点在网络中的重要程度。选取排名前 5 位靶点作为核心靶点, 即肿瘤坏死因子(TNF)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、非受体酪氨酸激酶(SRC)、酪氨酸蛋白激酶 3 (MAPK3)、雌激素受体 α (ESR1), 其中 TNF 可能是治疗骨质疏松症关键靶点, 见表 3。

2.6 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析

2.6.1 GO 功能富集分析 采用 DAVID 数据库对交集靶点进行 GO 富集分析。研究结果显示, 置信度 $P < 0.05$ 的生物学过程(BP)有 917 条, 分子功

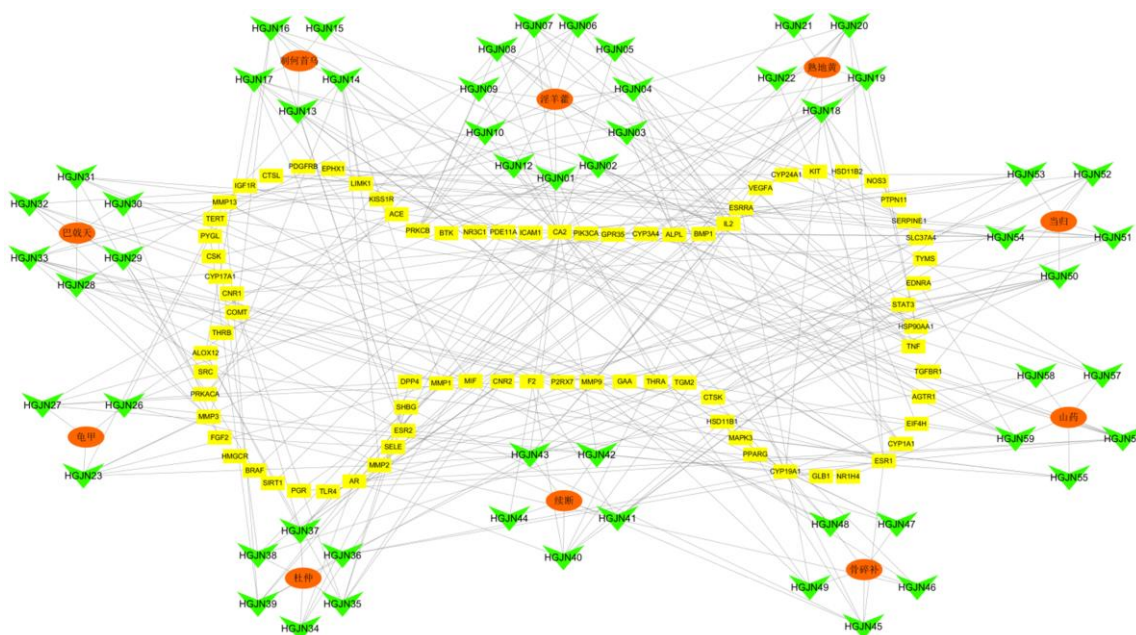


图 2 中药 - 成分 - 靶点网络图

Fig. 2 Traditional Chinese medicine - component - target network diagram

表 2 护骨胶囊主要活性成分

编号	有效成分	degree	介值中心度
HGJN18	rehmapicrogenin	11	0.064 207 67
HGJN14	physcion	9	0.022 551 11
HGJN33	rubiadin	9	0.028 262 67
HGJN50	ferulic acid	9	0.063 650 53
HGJN17	daidzein	8	0.046 405 19
HGJN20	echinacoside	8	0.034 075 82
HGJN37	pinorexinol	8	0.039 540 30
HGJN51	ligustilide	8	0.052 532 99
HGJN56	kadsurenone	8	0.054 533 32
HGJN59	allantoin	8	0.058 691 38
HGJN03	yinyanghuo C	7	0.036 228 12
HGJN08	icaraside I	7	0.034 227 40

表 3 主要核心靶点蛋白

序号	靶点	degree	介值中心度
1	TNF	48	0.096 263 99
2	VEGFA	46	0.081 634 58
3	SRC	44	0.068 459 68
4	MAPK3	39	0.043 149 68
5	ESR1	37	0.048 894 89

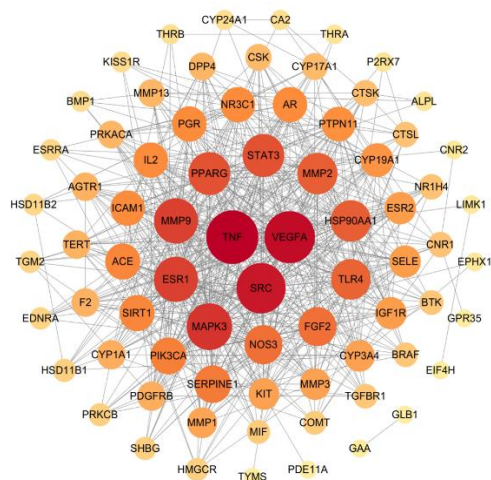


图 3 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram

能 (MF) 有 98 条, 细胞组成 (CC) 相关路径 33 条。护骨胶囊可能通过参与众多过程治疗骨质疏松症, 主要包含对有机物的响应、对含氧化合物的响应和对化学的响应等; MF 涉及核受体活性和过渡金属离子结合、类固醇结合等多个过程; CC 包括细胞外空间、质膜和宿主细胞核等。分别选取前 10 条富集结果进行可视化分析 (图 4)。

2.6.2 KEGG 通路分析 KEGG 通路富集到 $P < 0.05$ 相关通路共 159 条, 选择排名前 20 条信号通路进行可视化分析。主要富集通路有糖尿病并发症中的晚期糖基化终末化产物 (AGE)-晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路、松弛素信号通路、雌激素信号通路、Rap1 信号通路、低氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、MAPK 信号通路、癌症途径、流体剪切力与动脉粥样硬化等, 表明护骨胶囊可能通过多个通路治疗骨质疏松症。以上结果选取前 20 条信号通路, 绘制气泡图, 见图 5。

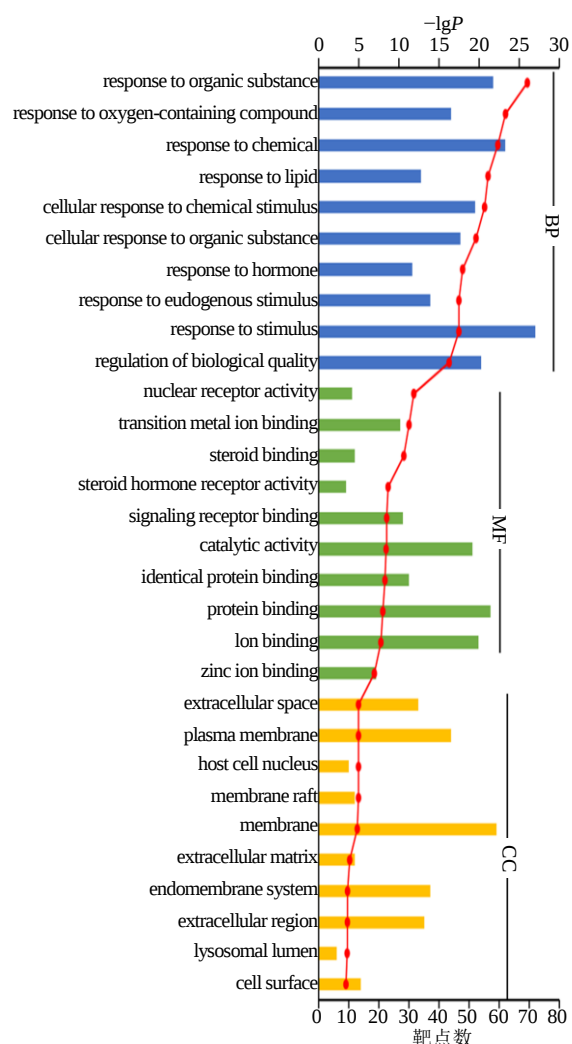


图 4 交集靶点 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of intersection targets

2.7 分子对接验证

将排名前 5 位的核心靶点 TNF、VEGFA、SRC、MAPK3、ESR1 与排名前 5 位的活性成分地黄苦苷元、大黄素甲醚、甲基异茜草素、阿魏酸、大豆苷元进行分子对接，并记录两者亲和力数值，亲和力数值小于 -5 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.4 \text{ J}$)，认为小分子与蛋白的结合能力较强，结果见热图 (图 6)。其中大黄素甲醚与 MAPK3 结合能最低，为 -7.16 kcal/mol ，两者之间存在氢键作用力及疏水作用力。以 Physcion 和 MAPK3 对接为例，借助 Pymol 软件进行可视化分析 (图 7)。

3 讨论

本研究基于网络药理学研究策略^[10]，对护骨胶囊治疗骨质疏松症的潜在活性成分、靶点和作用机制进行探究，最后借助分子对接对小分子和蛋白

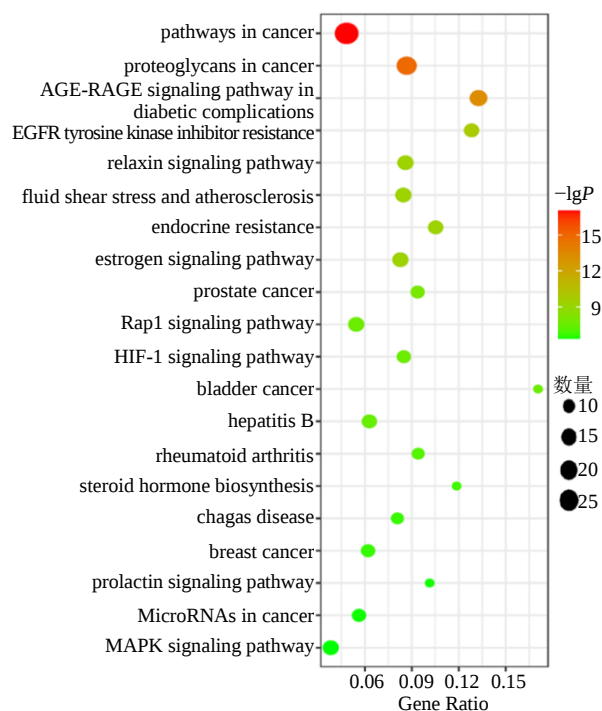


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of KEGG pathway

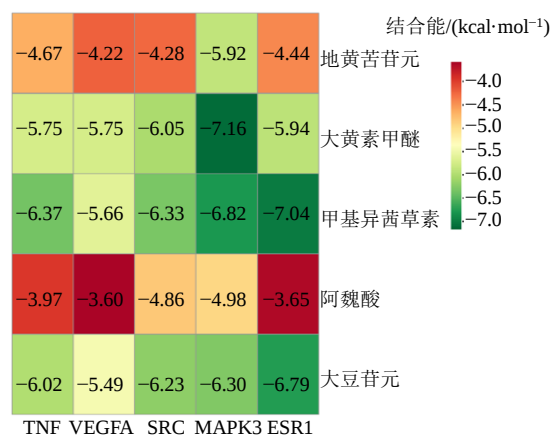


图 6 分子对接结果热图

Fig. 6 Heat map of molecular docking results

质之间的相互作用进行验证。本研究通过 TCMSP 数据库结合《中国药典》2020 版及文献检索收集的护骨胶囊化学成分，进一步构建“成分-交集靶点”网络，网络拓扑分析发现地黄苦苷元、大黄素甲醚、甲基异茜草素、阿魏酸、大豆苷元、松果菊苷等核心化合物可能是护骨胶囊治疗骨质疏松症的核心成分。Liu 等^[11]研究证实了地黄苦苷元具有抗炎作用。Hou 等^[12]研究发现阿魏酸可通过激活糖皮质激素诱导的骨质疏松症新生鼠体内的沉默调节蛋白 1 (SIRT1) 和核因子- κ B (NF- κ B) 来预防骨质疏松症。在动物模型和培养细胞中，已观察到大豆苷元具有

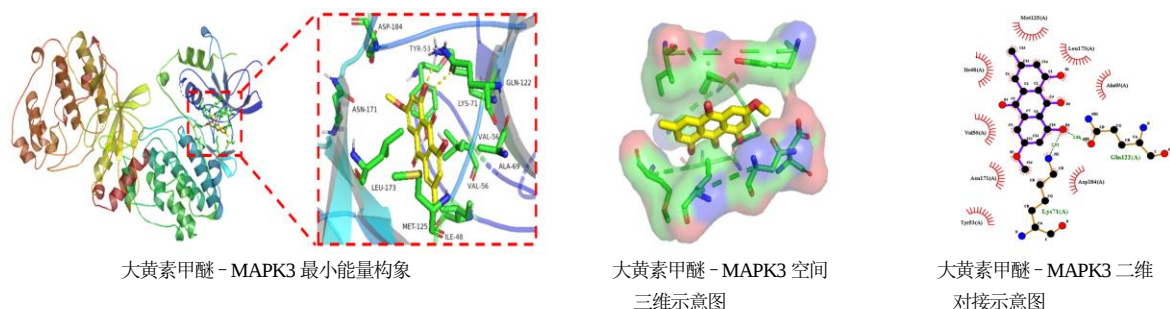


图 7 大黄素甲醚 - MAPK3 对接图

Fig. 7 Physcion - MAPK3 interconnection diagram

促进骨形成和防止骨吸收的雌激素样作用^[13]。大黄素甲醚属于蒽醌类化合物，具有抗炎、抗氧化、抗癌和抗诱变等作用^[14-15]。Jiang 等^[16]研究发现松果菊苷在体外通过阻止活化 T-细胞核因子 1 (NFATc1) 易位、下调其表达和影响磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (Akt) / 原癌基因 c-Fos 通路来抑制破骨细胞分化、F-肌动蛋白带形成、骨吸收功能和破骨细胞特异性基因表达，松果菊苷还通过抑制破骨细胞活性减轻体内假体周围感染 (PJI) 诱导的骨溶解并维持骨量。动物实验研究发现，甲基异茜草素可抑制破骨细胞的形成与分化并降低破骨细胞的吸收^[17]。胡倩影等^[18]通过动物实验证实了杜仲中的松脂素可通过促进成骨细胞的增殖与分化，以达抗骨质疏松的作用。雌二醇 (E_2) 是通过促进成骨细胞增殖和分化来治疗骨质疏松症的一线药物，而松脂素对成骨细胞的增殖和分化具有与 E_2 类似作用^[19]。现代药理学研究发现，藁本内酯具有抗炎、镇痛、抗氧化等作用，对骨质疏松、骨关节炎、心脑血管等疾病也有治疗作用^[20]。实验证明，藁本内酯可通过抑制破骨细胞的形成与分化，从而达到骨保护作用^[21]；藁本内酯显著抑制一氧化氮 (NO)、前列腺素 E_2 (PGE_2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的产生，并通过阻断 MAPKs/I κ B 激酶 (IKK) 和下游转录因子 AP-1 和 NF- κ B 的激活从而表现出抗炎活性^[22]。楼桢^[23]通过实验研究发现，海风藤酮可直接抑制 Rank1 所诱导的破骨细胞的形成。尿囊素可促进 MAPK 磷酸化、增加葡萄糖的摄取等过程，达到预防骨骼肌功能障碍的作用^[24]。综上所述，护骨胶囊通过抗炎、抑制破骨细胞的形成与分化与促进成骨细胞的增殖与分化，达到治疗骨质疏松症的潜在治疗作用。

PPI 网络分析表明，TNF、VEGFA、SRC、MAPK3、ESR1 可能是护骨胶囊治疗骨质疏松症的

关键靶点。TNF- α 调节成骨细胞和破骨细胞的分化功能是通过肿瘤坏死因子表面受体 1 (TNFR1) 和表面受体 2 (TNFR2) 实现的。动物实验研究证实，TNF- α 信号会促进正常小鼠和 TNFR1 缺失小鼠细胞的骨形成，而 TNFR2 只有在骨损伤时调节 TNF- α 在骨折愈合中的再生效应^[25]。研究报道，来自早期成骨细胞 (Osx+) 的 VEGFA 在骨损伤时对于骨膜快速血管生成和骨折修复过程中的编织骨形成至关重要^[26]。实验研究发现，SRC SH2 选择性结合化合物可降低破骨细胞吸收活性^[27]。MAPK3 可通过影响 PI3K/Akt 通路治疗骨质疏松^[28]。ESR1 与绝经后妇女骨质疏松关系密切^[29-30]；同时，B 细胞中一种新的 ESR1 和 MAPK3 网络被认为是绝经后骨质疏松症的病因^[31]。ESR1 和 MAPK3 均参与雌激素受体信号和细胞外信号调节激酶 (ERK) /MAPK 信号通路。

GO 和 KEGG 富集分析表明，护骨胶囊主要通过细胞外空间、质膜、宿主细胞核等 CC 参与细胞生存、生长、分裂等众多 BP，继而与蛋白质特异性结合，发挥调节核受体活性、过渡金属离子结合、类固醇结合等 MF，涉及糖尿病并发症中的糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、松弛素信号通路、雌激素信号通路、Rap1 信号通路、HIF-1 信号通路、MAPK 信号通路等，表明护骨胶囊可能通过多个通路作用于多个靶点发挥治疗骨质疏松症的作用。Cheng 等^[32]研究发现，胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂促进肥胖 2 型糖尿病大鼠成骨细胞生成并抑制骨吸收，作用机制可能部分是由 AGEs/RAGE/活性氧 (ROS) 通路通过与 GLP-1 受体相互作用介导的。松弛素是一种肽激素，通过激活胶原酶来改变软骨和肌腱的特性，还参与骨骼重塑和受伤韧带和骨骼肌的愈合^[33]。雌激素是女性和男性骨代谢的主要激素调节剂，对骨细胞、破骨细

胞和成骨细胞的直接作用分别导致骨重塑抑制、骨吸收减少和骨形成维持,还调节破骨细胞的成骨细胞/骨细胞和T细胞调节^[34]。微小RNA(miRNA)广泛调节骨的正常生物学功能以及骨折愈合和骨质疏松的进展^[35]。其中,miRNA-182在调节细胞的凋亡、生长和分化中发挥重要作用,Pan等^[36]研究表明,下调的miR-182-5p通过上调腺苷酸环化酶异构体6的Rap1/MAPK信号通路激活,促进骨质疏松症大鼠成骨细胞的增殖与分化,这可能是治疗骨质疏松症的新靶标。缺氧刺激可调节骨的形成、维持和修复^[37],缺氧也是调节血管生成-成骨耦合过程的主要驱动力,HIF-1 α 为HIF-1的活性亚基,研究表明,缺氧可以通过HIF-1 α 途径上调VEGF,从而改善血管生成以及成骨细胞的分化和活性;HIF-1 α 的过度表达显著增加了成骨细胞中的2种促血管生成因子白细胞介素(IL)-6和IL-8的水平,可促进人成骨细胞的增殖^[38]。

分子对接结果表明,地黄苦苣元、大黄素甲醚、甲基异茜草素、阿魏酸、大豆苣元核心成分与TNF、VEGFA、SRC、MAPK3、ESR1核心靶点均具有良好的结合能力,结合能表明它们是护骨胶囊治疗骨质疏松症的关键活性成分。

综上所述,护骨胶囊中的地黄苦苣元、大黄素甲醚、甲基异茜草素、阿魏酸、大豆苣元、松果菊苷可能是治疗骨质疏松症的物质基础,能够作用于TNF、VEGFA、SRC、MAPK3等多个靶点,通过调节糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路、松弛素信号通路、雌激素信号通路、Rap1信号通路、HIF-1信号通路、MAPK信号通路等参与骨骼重塑、抑制破骨细胞的形成与分化、促进成骨细胞的增殖与分化和抗炎功能,发挥治疗骨质疏松症的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang W, Gao R, Rong X, et al. Immunoporosis: Role of immune system in the pathophysiology of different types of osteoporosis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 965258.
- [2] Aibar-Almazán A, Voltes-Martínez A, Castellote-Caballero Y, et al. Current Status of the Diagnosis and Management of Osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9465.
- [3] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会, 章振林. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2022) [J]. *中国全科医学*, 2023, 26(14): 1671-1691.
- [4] 绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019年版) [J]. *中医正骨*, 2020, 32(2): 1-13.
- [5] 杨志, 李琦. 中医治疗骨质疏松的研究进展 [J]. *保健医学研究与实践*, 2023, 20(2): 185-186.
- [6] 徐启良. 护骨胶囊对肾精亏虚型原发性骨质疏松症的临床疗效研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [7] 李婵娟, 龙芳. 护骨胶囊联合鲑鱼降钙素治疗老年骨质疏松的效果 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(3): 628-631.
- [8] 马海丽, 胡艳红, 李万森. 护骨胶囊联合骨化三醇治疗老年骨质疏松症的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(3): 533-536.
- [9] 杨俊兴, 贾育松, 顾树明, 等. 护骨胶囊治疗肾精亏虚证原发性骨质疏松症的随机对照临床试验 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(11): 1599-1605.
- [10] 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.
- [11] Liu C L, Cheng L, Ko C H, et al. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory components from the root of *Rehmannia glutinosa* and its underlying mechanism via inhibition of iNOS pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(3): 867-875.
- [12] Hou T, Zhang L, Yang X. Ferulic acid, a natural polyphenol, protects against osteoporosis by activating SIRT1 and NF- κ B in neonatal rats with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109205.
- [13] Sun J, Sun W J, Li Z Y, et al. Daidzein increases OPG/RANKL ratio and suppresses IL-6 in MG-63 osteoblast cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 32-40.
- [14] 赵盼盼, 佟继铭, 田沂凡, 等. 蒽醌类化合物药理作用研究进展 [J]. *承德医学院学报*, 2016, 33(2): 152-155.
- [15] 高淑红, 苏珍枝, 肖学凤. 制首乌化学成分及药理作用研究进展 [J]. *山西中医学院学报*, 2012, 13(2): 74-77.
- [16] Jiang T, Gu H, Wei J. Echinacoside inhibits osteoclast function by down-regulating PI3K/Akt/C-Fos to alleviate osteolysis caused by periprosthetic joint infection [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 930053.
- [17] 鲍蕾蕾, 秦路平, 卞俊, 等. 巴戟天甲基异茜草素对破骨细胞性骨吸收的影响 [J]. *解放军药学学报*, 2009, 25(6): 505-509.
- [18] 胡倩影, 尹瑞林, 王一飞, 等. 杜仲中松脂素二葡萄糖苷和松脂素对成骨细胞中OPG和RANKL表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(10): 181-186.
- [19] Jiang X, Chen W, Shen F, et al. Pinorensinol promotes MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation via the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway [J]. *Mol*

- Med Rep*, 2019, 20(3): 2143-2150.
- [20] 何树苗, 陈元堃, 曾奥, 等. 藜本内酯药理作用及机制研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(2): 152-156.
- [21] 崔杰. 藜本内酯抗骨吸收效应及其 GPER 相关机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [22] Su Y W, Chiou W F, Chao S H, *et al*. Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(9): 1166-1172.
- [23] 楼桢. 海风藤酮治疗乳腺癌骨转移的相关机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- [24] 尹倩薇, 涂沛楠, 谢保城. 尿囊素的药理作用机制研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(12): 2897-2901.
- [25] 郝健明, 练克俭. 调控炎症细胞因子对骨修复的影响 [J]. 医学综述, 2014, 20(18): 3301-3303.
- [26] Buettmann E G, McKenzie J A, Migotsky N, *et al*. VEGFA from early osteoblast lineage cells (Osterix⁺) is required in mice for fracture healing [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(9): 1690-1706.
- [27] Violette S M, Shakespeare W C, Bartlett C, *et al*. A Src SH2 selective binding compound inhibits osteoclast-mediated resorption [J]. *Chem Biol*, 2000, 7(3): 225-235.
- [28] Cui Z, Zhao X, Amevor F K, *et al*. Therapeutic application of quercetin in aging-related diseases: SIRT1 as a potential mechanism [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 943321.
- [29] Luo L, Xia W, Nie M, *et al*. Association of ESR1 and C6orf97 gene polymorphism with osteoporosis in postmenopausal women [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(5): 3235-3243.
- [30] Hidalgo-Bravo A, Parra-Torres A Y, Casas-Avila L, *et al*. Association of RMND1/CCDC170-ESR1 single nucleotide polymorphisms with hip fracture and osteoporosis in postmenopausal women [J]. *Climacteric*, 2019, 22(1): 97-104.
- [31] Xiao P, Chen Y, Jiang H, *et al*. In vivo genome-wide expression study on human circulating B cells suggests a novel ESR1 and MAPK3 network for postmenopausal osteoporosis [J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(5): 644-654.
- [32] Cheng Y, Liu P, Xiang Q, *et al*. Glucagon-like peptide-1 attenuates diabetes-associated osteoporosis in ZDF rat, possibly through the RAGE pathway [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2022, 23(1): 465.
- [33] Dehghan F, Haerian B S, Muniandy S, *et al*. The effect of relaxin on the musculoskeletal system [J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2014, 24(4): e220-e229.
- [34] Khosla S, Oursler M J, Monroe D G. Estrogen and the skeleton [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(11): 576-581.
- [35] Hu L, Xie X, Xue H, *et al*. MiR-1224-5p modulates osteogenesis by coordinating osteoblast/osteoclast differentiation via the Rap1 signaling target ADCY2 [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(7): 961-972.
- [36] Pan B L, Tong Z W, Li S D, *et al*. Decreased microRNA-182-5p helps alendronate promote osteoblast proliferation and differentiation in osteoporosis via the Rap1/MAPK pathway [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): BSR20180696.
- [37] Tseng W P, Yang S N, Lai C H, *et al*. Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(3): 810-818.
- [38] Niu X, Chen Y, Qi L, *et al*. Hypoxia regulates angiogenic-osteogenic coupling process via up-regulating IL-6 and IL-8 in human osteoblastic cells through hypoxia-inducible factor-1 α pathway [J]. *Cytokine*, 2019, 113: 117-127.

[责任编辑 高源]