

网络药理学及体内外实验探讨补骨脂素治疗绝经后骨质疏松症的作用机制

曲敬蓉¹, 王玉龙¹, 王 波¹, 祝连荣², 董 丽^{1*}

1. 山东第二医科大学附属诸城市人民医院 临床药学科, 山东 潍坊 262200

2. 诸城市疾病预防控制中心, 山东 潍坊 262200

摘要: **目的** 基于网络药理学及体内外实验探讨补骨脂素治疗绝经后骨质疏松症的作用机制。**方法** 通过 SwissTargetPrediction、PharmMapper、Super-PRED、GEO、DAVID 数据库筛选补骨脂素、绝经后骨质疏松症的作用靶点。采用基因集富集分析 (GSEA) 方法评估基因集功能富集特征。采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件对潜在靶点与补骨脂素进行分子对接。细胞实验培养人骨髓间充质干细胞 (BMSCs), 进行相关基因的过表达、沉默, 进行碱性磷酸酶 (ALP)/Bodipy 染色及活性检测。通过 ELISA 方法检测成骨分化标志物骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 和成脂分化标志物过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 的蛋白表达水平。动物实验通过卵巢切除术构建小鼠绝经后骨质疏松症模型, 进行骨苏木素-伊红 (HE) 染色、micro-CT 检测。通过标准曲线计算 BMP2、PPAR γ 相对表达量。**结果** 通过网络药理学数据库分析, 发现补骨脂素治疗绝经后骨质疏松症的 7 个潜在靶基因, 包括肌球蛋白 V A (MYO5A)、赖氨酸特异性去甲基化酶 5C (KDM5C)、组织蛋白酶 D (CTSD)、丝裂原激活蛋白激酶激酶 2 (MAP2K2)、免疫球蛋白重链常数 γ 1 (IGHG1)、肾素结合蛋白 (RENBP)、 α -生育酚转运蛋白基因 (TTPA)。细胞实验结果显示, 补骨脂素明显抑制了沉默 TTPA 造成的 BMSCs 成骨/成脂分化失衡 ($P<0.05$ 、 0.01)。相对于 p38 MAPK-IN-1 抑制剂组, TTPA 过表达 (OE-TTPA) 组使 BMP2 蛋白表达升高, 而 PPAR γ 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。动物实验结果显示, 补骨脂素组骨小梁数目及厚度明显增加, 股骨头内空洞减少, 小鼠股骨密度明显升高。与模型组比较, 补骨脂素组骨密度 (BMD) 和骨体积分数 (BV/TV) 明显升高 ($P<0.01$); 小鼠股骨成骨相关蛋白 BMP2 含量显著升高, 成脂相关蛋白 PPAR γ 含量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 补骨脂素靶向 TTPA 介导的 p38 MAPK 信号通路, 调控 BMSCs 成骨/成脂分化平衡及绝经后骨质疏松症发生。

关键词: 补骨脂素; 绝经后骨质疏松症; 网络药理学; α -生育酚转运蛋白基因; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

中图分类号: R285.5; R287.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)10-2445-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.10.005

Mechanism of psoralen in treatment of postmenopausal osteoporosis based on network pharmacology combined with *in vivo* and *in vitro* experiments

QU Jingrong¹, WANG Yulong¹, WANG Bo¹, ZHU Lianrong², DONG Li¹

1. Department of Clinical Pharmacy, Zhucheng People's Hospital Affiliated to Shandong Second Medical University, Weifang 262200, China

2. Zhucheng Center for Disease Control and Prevention, Weifang 262200, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of psoralen in treatment of postmenopausal osteoporosis based on network pharmacology and *in vivo* and *in vitro* experiments. **Methods** The targets of psoralen and postmenopausal osteoporosis were screened through the databases of SwissTargetPrediction, PharmMapper, Super-PRED, GEO and DAVID. The functional enrichment characteristics of gene sets were evaluated by using the GSEA method. Molecular docking of potential targets with psoralen was performed using AutoDock Vina 1.1.2 software. BMSCs were cultured in cell experiments. Overexpression and silencing of related genes were carried out, and ALP/Bodipy staining and activity detection were performed. The protein expression levels of osteogenic differentiation marker BMP2 and adipogenic differentiation marker PPAR γ were detected by ELISA method. Animal experiments were conducted to establish a mouse model of postmenopausal osteoporosis through oophorectomy, and bone HE staining and micro-

收稿日期: 2025-08-04

基金项目: 潍坊市卫生健康委员会中医药科研项目 (WFZY2023-2-002)

作者简介: 曲敬蓉, 硕士, 主管药师, 主要从事内分泌药理学研究。E-mail: 17865698202@163.com

*通信作者: 董 丽, 副主任药师。E-mail: 17616817120@163.com

CT detection were performed. The relative expression levels of BMP2 and PPAR γ were calculated through the standard curve. **Results** Through the analysis of the network pharmacology database, seven potential target genes of psoralen in treatment of postmenopausal osteoporosis were discovered, including *MYO5A*, *KDM5C*, *CTSD*, *MAP2K2*, *IGHG1*, *RENBP*, and *TTPA*. The results of cell experiments showed that psoralen significantly inhibited the osteogenic/adipogenic differentiation imbalance of BMSCs caused by silencing *TTPA* ($P < 0.05$, 0.01). Compared with the p38 MAPK-IN-1 inhibitor group, the *TTPA* overexpression (OE-*TTPA*) group increased the expression of BMP2 protein, while significantly decreased the expression of PPAR γ protein ($P < 0.01$). The results of animal experiments showed that the number and thickness of trabeculae in the psoralen group significantly increased, the internal cavities of the femoral head decreased, and the femoral density of mice significantly increased. Compared with the model group, the BMD and BV/TV in the psoralen group were significantly increased ($P < 0.01$); The content of osteogenesis-related protein BMP2 in the femur of mice was significantly increased, while the content of adipogenesis-related protein PPAR γ was decreased ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusions** Psoralen targets the *TTPA*-mediated p38 MAPK signaling pathway to regulate the osteogenic/adipogenic differentiation balance of BMSCs and the occurrence of postmenopausal osteoporosis.

Key words: psoralen; postmenopausal osteoporosis; network pharmacology; *TTPA*; PPAR γ

骨质疏松症是一种以骨量低下、骨微结构破坏为特征的全身性骨骼疾病,具有高死亡率、发病率和致残率,可发生于各年龄段人群,其中以绝经后女性和老年群体最为高发^[1]。绝经后骨质疏松症的发生与卵巢功能衰退导致的雌激素缺乏密切相关,该病理过程伴随活性氧(ROS)过度累积引发的氧化应激损伤及细胞凋亡级联反应^[2]。当前临床治疗方案主要包括雌激素替代疗法、维生素 D 衍生物、双膦酸盐及甲状旁腺激素类似物等。然而,这些疗法普遍面临临床应用瓶颈,如雌激素替代疗法存在乳腺癌和子宫内膜癌风险^[3]、双膦酸盐可能引发颌骨坏死等^[4]。因此,开发兼具高效性与安全性的新型抗骨质疏松药物具有重要临床意义。

植物雌激素作为一类天然非甾体化合物,通过结构模拟或功能调控与雌激素受体(ER)结合,激活下游信号通路,在规避雌激素替代疗法潜在风险的同时展现出类似雌激素的骨保护效应^[5]。补骨脂作为传统中药,其促骨折愈合及关节保护作用已被临床实践充分验证^[6-7]。补骨脂素作为其主要活性成分之一,属于呋喃香豆素类植物雌激素。近年来研究发现,补骨脂素不仅具有良好的雌激素样活性,还可通过调控成骨细胞与破骨细胞的动态平衡,抑制骨吸收并促进骨形成,在多种骨质疏松模型中展现出明确的骨保护潜力^[8]。

网络药理学作为系统生物学与生物信息学交叉融合的前沿学科,通过构建“疾病-靶点-药物”相互作用网络,能够从整体层面解析多成分药物的协同作用机制^[9]。该方法突破了传统单靶点药物研究的局限性,为中药复方及天然产物的药效物质基础研究提供了创新技术路径。

本研究旨在通过网络药理学方法筛选补骨脂素治疗绝经后骨质疏松症的潜在作用靶点,构建“成分-靶点-通路”调控网络,结合分子生物学技术验证关键靶点的表达变化。利用卵巢切除(OVX)小鼠模型及人骨髓间充质干细胞(BMSCs)诱导分化模型,从体内外水平阐明补骨脂素发挥骨保护效应的作用机制。该研究将为补骨脂素作为新型抗骨质疏松药物的开发提供理论依据。

1 材料

雌性 C57BL/6J 小鼠,8 周龄,平均体质量(20 ± 2)g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供(动物生产许可证 SCXK 2018-0007)。实验小鼠饲养于配备通风系统的动物实验室,室内环境定期进行紫外线消杀处理。饮水、鼠笼及垫料均实施严格的消毒流程。实验室温度控制在(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度维持在 50%~60%,动物可自由摄取经处理的饮用水,且饲养环境执行 12 h 昼夜交替的光照制度。本研究经山东第二医科大学实验动物伦理委员会批准(WFM-J-1856)。

人骨髓间充质干细胞系(BMSCs)购自武汉普诺赛生物科技有限公司(货号 CP-H166)。

补骨脂素(质量分数 99%,货号 P8399)、多聚甲醛(货号 P6148)、L-抗坏血酸(货号 A4544)、地塞米松磷酸钠(货号 D8893)、碱性磷酸酶检测试剂盒(货号 MAK447)均购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司;DMEM/F12 培养基(货号 11330032)、胎牛血清(FBS,货号 10099141)、青霉素-链霉素双抗溶液(货号 15140122)、Bodipy 493/503 荧光染料(货号 D3922)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;TransZol Up[®] RNA 提取试

剂(货号 ET101-01-V2)、TransScript® cDNA 合成试剂盒(货号 AT301-02)、TransStart® Green qPCR SuperMix(货号 AQ111-01)均购自北京全式金生物技术有限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(货号 G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;小鼠骨形态发生蛋白 2 (BMP2) ELISA 检测试剂盒、小鼠过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) ELISA 检测试剂盒均购自上海康朗生物科技有限公司。

SpectraMax M5 微孔板读板机[美谷分子仪器(上海)有限公司];LightCycler® 480 II 实时荧光定量 PCR 仪[罗氏诊断产品(上海)有限公司];Mastercycler® pro S 梯度 PCR 仪[艾本德(上海)国际贸易有限公司];RM2235 手动轮转式石蜡切片机[徕卡显微系统(上海)有限公司];NanoDrop One 微量紫外可见分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];5424R 高速冷冻离心机[艾本德(上海)国际贸易有限公司]。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 补骨脂素抗绝经后骨质疏松症靶点的筛选 采用 SwissTargetPrediction (<http://www.swiss-targetprediction.ch/>)^[10]、PharmMapper (<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>)^[11]、SuperPRED (<https://prediction.charite.de/>)^[12]数据库进行补骨脂素潜在靶点预测,所得进行冗余数据剔除后作为补骨脂素候选靶点集合。绝经后骨质疏松症相关靶点通过 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2t/>)获取,以“postmenopausal osteoporosis”为关键词检索数据集并进行表达差异分析。

所有数据库均限定“homo sapiens”为目标物种,利用 DAVID 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/conversion.jsp>)将靶点名称统一转换为基因名,通过交集分析,确立补骨脂素抗绝经后骨质疏松症的潜在作用靶点。

2.1.2 目标基因的基因集富集分析(GSEA) 鉴于转录组测序数据中目标基因的表达倍数变化(FC)普遍较小,传统京都基因与基因组百科全书(KEGG)、基因本体(GO)富集分析效能受限,故采用 GSEA 方法评估基因集功能富集特征,通过计算富集分数(ES)并结合多重假设检验评估 ES 的显著性,控制 FDR<0.25、 $P<0.05$,筛选具有显著富集的生物学过程和信号通路^[13]。

2.1.3 潜在靶点与补骨脂素的分子对接验证 在

RCSB 蛋白质数据库 (<https://www.rcsb.org/>)^[14]检索靶蛋白的三维结构,优先选择 X 射线衍射解析、分辨率<3 Å (1 Å=0.1 nm)且经前期对接验证的晶体结构。使用 PyMOL 2.5 软件去除配体、水分子及冗余链,优化蛋白质模型。从 ZINC 数据库 (<http://zinc.docking.org/>)^[15]获取补骨脂素的三维化学结构,采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件^[16]进行分子对接,计算结合自由能并分析相互作用模式。

通过均方根偏差(RMSD)评估对接方法可靠性:将原配体重新对接至原始蛋白,计算最佳构象与晶体结构的 RMSD,当 RMSD<2.5 Å 时认定模型可靠,确保对接结果的有效性。

2.2 体外实验验证

2.2.1 BMSCs 培养 人 BMSCs 培养于含 10%胎牛血清(FBS)、1%青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中维持对数生长期,实验使用 3~9 代细胞。成骨诱导培养基添加 10 mmol/L β -甘油磷酸钠、200 μ mol/L 抗坏血酸、10 nmol/L 地塞米松磷酸钠,每 2 天换液 1 次^[17]。

为探究补骨脂素的作用,实验组在成骨诱导培养基中额外加入不同浓度(10、20 μ mol/L)的补骨脂素^[18]。

2.2.2 碱性磷酸酶(ALP)/Bodipy 染色及活性检测 BMSCs 以 2×10^4 个/孔接种于六孔板,贴壁后更换为含补骨脂素(10、20 μ mol/L)的成骨分化诱导培养基。培养 3 周后,4%多聚甲醛固定 30 min,采用 ALP 染色试剂盒染色,光学显微镜下观察并拍照。ALP 活性检测按照试剂盒说明书操作,于 405 nm 波长处测定吸光度(A)值,以蛋白浓度标准化后计算相对活性。对于 Bodipy 染色,在含补骨脂素(10、20 μ mol/L)的成脂分化诱导培养基诱导 2 周后进行染色,无水乙醇溶解细胞上附着染料后于 400 nm 处检测荧光强度进行相对定量。

2.2.3 RNA 提取与 qPCR 分析 采用 TransZol Up® 试剂提取人骨组织样本总 RNA,经 NanoDrop One 检测纯度($A_{260}/A_{280}=1.8\sim 2.0$)后,使用 EasyScript® cDNA 合成试剂盒反转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 反应在 Bio-Rad CFX96 系统上进行,以 TransStart® Green qPCR SuperMix 为反应体系,扩增条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 30 s,共 40 个循环。特异性引物序列见表 1,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	正向 (5'-3')	反向 (5'-3')
MYO5A	CAGAGTCCGCTTTATTGATTCCA	ATCACCCATGTTCTGACCACT
KDM5C	GGGTCCGACGATTTCTCTACC	ATGCCCCGATTTCTCTGCGATG
CTSD	TGCTCAAGAACTACATGGACGC	CGAAGACGACTGTGAAGCACT
MAP2K2	CCAAGGTCGGCGAACTCAAA	TCTCAAGGTGGATCAGCTTCC
IGHG1	GTTTTTCGTCGTTGCCCTTTTAAG	ACCCACTGAATGAGAATCCAGAG
RENBP	AAGGTGCAGCGAACCATCTTC	AGTGGACGATCTGATCCATCAT
TTPA	TGGCCTGGCGGTTACTAAAAA	CCCAGTGTGCGATTCTGTAAAT
GAPDH	CTGGGCTACACTGAGCACC	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG

2.2.4 RNA 干扰 (RNAi) 实验 针对目的基因 (*MYO5A*、*KDM5C*、*CTSD*、*MAP2K2*、*IGHG1*、*RENBP*、*TTPA*) 设计并合成特异性小干扰 RNA (siRNA)。同时设立转染非特异性阴性对照 siRNA (si-NC) 组及空白对照组 (仅使用转染试剂)。

转染前 24 h, 消化处于对数生长期的 BMSCs 并计数, 以 5×10^4 个细胞/孔的密度接种于 35 mm 培养皿中, 使用含 10% FBS 的无抗生素完全培养基培养, 使其在转染时细胞融合度达到 70%~80%。取 1.0~2.0 μg siRNA 溶于 100 μL 无血清 Opti-MEM 培养基中, 轻轻混匀。取 2~5 μL LipofectamineTM 2000 转染试剂于另一无菌离心管中, 加入 100 μL 无血清 Opti-MEM 培养基, 室温静置 5 min。将稀释后的 siRNA 与 LipofectamineTM2000 稀释液轻轻混合, 室温孵育 20 min 以形成 siRNA-脂质体复合物。孵育期间, 用无血清培养基轻柔洗涤细胞 2 次, 随后每皿加入 0.8 mL 无血清培养基。将制备好的复

合物逐滴加入培养皿中, 轻轻摇动混匀。将细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。转染 6 h 后更换为完全成骨诱导培养基以去除转染复合物并减轻细胞毒性。转染 72 h 后收集细胞, 提取总 RNA 或蛋白验证基因沉默效率, 见表 2。

通过对这 7 个基因进行沉默并初步评估其对 BMSCs 成骨/成脂分化的影响, 发现 *TTPA* 基因的沉默对分化平衡的表型改变最为显著。因此, 主要报告了 *TTPA* 的深入研究数据。

2.2.5 激动剂与抑制剂处理 为探究 p38 MAPK 信号通路在 *TTPA* 调控 BMSCs 分化平衡中的作用, 部分 BMSCs 在成骨/成脂诱导的同时, 分别使用 p38 MAPK 通路激动剂 Diprovocim (1 nmol/L) 或抑制剂 p38 MAPK-IN-1 (100 nmol/L) 进行处理。处理结束后, 收集细胞裂解液, 通过 ELISA 方法检测成骨分化标志物 BMP2 和成脂分化标志物 PPAR γ 的蛋白表达水平。

表 2 基因沉默的 siRNA 序列

Table 2 siRNA sequences used for gene silencing

基因	RNA 寡核苷酸序列 (5'-3')	RNA 寡核苷酸序列 (3'-5')
MYO5A	AAUGGUUAAAGACAAUUGGCUG	GCCAAUUGUCUUAACCAUUGA
KDM5C	UGCAAAUGCCCGAUUUCUCUG	GAGAAAUCGGGCAUUUGCAAG
CTSD	UCAAACACAGUGUAGUAGCGG	GCUACUACACUGUGUUUGACC
MAP2K2	AUGGACUGCAGGAGGGAUCCC	GAUCCCUCCUGCAGUCCAUGC
IGHG1	UCUUCAAAAAUCCUCGUGCC	CACGAGGGAUUUUUGAAGAAA
RENBP	UCUAGGAAGCCAGACAGAGUU	CUCUGUCUGGCUUCCUAGAGG
TTPA	AGAUCGAAAUCCCGGGCGCGC	GCGCCCGGAUUUCGAUCUGG

2.3 体内实验验证

2.3.1 OVX 诱导绝经后骨质疏松症小鼠模型构建与药物干预 C57BL/6 小鼠经戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔麻醉后, 实施 OVX 或假手术 (仅暴露卵巢未切除)。

造模成功的依据: 小鼠处死取材后, 通过 Micro-CT 扫描和骨组织形态学分析 (HE 染色) 确认模型组小鼠出现了显著的骨小梁丢失、结构稀疏等骨质

疏松表型。同时, 作为 OVX 手术有效的辅助性参考, 观察到 OVX 组小鼠的体质量显著高于假手术组, 这与雌激素缺乏导致的代谢变化相符。

术后 1 周, 将存活小鼠随机分为模型 (OVX) 组 [ig 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液]、假手术组 (ig 0.5% CMC-Na 溶液)、补骨脂素 (10、20 mg/kg) 组 (分别 ig 10、20 mg/kg 溶于 0.5% CMC-Na 的补骨脂素) [19], 每组 8 只小鼠, 各组

均连续 ig 8 周，每周记录小鼠的体质量。于末次给药后处死小鼠，采集血清和股骨样本，分别用于生化指标检测、骨密度（BMD）分析以及组织病理学观察。

2.3.2 组织切片的组织形态学分析 小鼠股骨经 4% 多聚甲醛固定 48 h，梯度乙醇脱水后，包埋于甲基丙烯酸甲酯（MMA）中，使用硬组织切片机切成 5 μm 厚切片。切片经 HE 染色后，在 Leica DM2500 正置显微镜下观察骨小梁形态，采集 200 倍视野图像进行组织形态学分析。

2.3.3 微计算机断层扫描（micro-CT）骨密度分析 取小鼠股骨，使用高分辨率 micro-CT 扫描仪进行扫描，参数设置：电压 70 kV、电流 400 μA 、层厚 20 μm 。以股骨远端生长板上 1~1.5 mm 处为感兴趣区域（ROI），通过 Inveon Research Workplace 软件定量分析骨微结构参数及三维重建图像。

2.3.4 ELISA 实验 检测样本为细胞裂解液或小鼠骨组织样本经 1 $\times$ PBS 缓冲液按 1:100 稀释，参照 ELISA 试剂盒说明书操作。依次加入标准品（0、15.6、31.2、62.5、125、250、500 pg/mL）、待测样本及生物素化抗体，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后洗板，加入 HRP 标记亲和素，显色 15 min 后终止反应，于 450 nm 波长处测定吸光度（A）值，通过标准曲线计算 BMP2、PPAR γ 相对表达量。

2.4 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 GraphPad Prism 8.0 进行分析。两组间数据比较行 Student's *t* 检验，多组间数据差异采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。

3 结果

3.1 补骨脂素治疗绝经后骨质疏松症的潜在基因靶点获取

通过公共在线数据库 SwissTargetPrediction、PharmMapper、Super-PRED 分别获取了补骨脂素 100、281、121 个的潜在作用靶点，在对 3 个数据库获取靶点进行基因名转换、去重，合并所有结果，用于后续分析。借助 GEO 数据库检索并获取了绝经后骨质疏松症相关转录组测序数据集（GSE35955、GSE35956、GSE35958），在对 3 个数据集进行标准化处理及去除批次效应处理后，进行差异基因的筛选，获取了与绝经后骨质疏松症发病相关的潜在基因，见图 1。

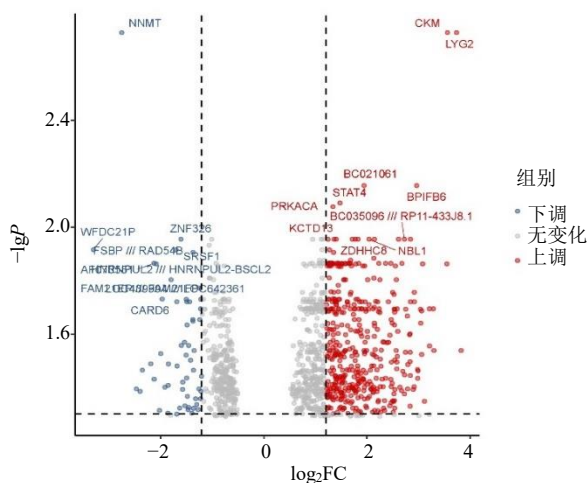


图 1 绝经后骨质疏松症基因表达火山图

Fig. 1 Volcano map of gene expression in postmenopausal osteoporosis

对补骨脂素和绝经后骨质疏松症发病相关的潜在靶点取交集，获取到了 7 个交集基因：肌球蛋白 V A（MYO5A）、赖氨酸特异性去甲基化酶 5C（KDM5C）、组织蛋白酶 D（CTSD）、丝裂原激活蛋白激酶 2（MAP2K2）、免疫球蛋白重链常数 $\gamma 1$ （IGHG1）、肾素结合蛋白（RENBP）、 α -生育酚转运蛋白基因（TTPA），即为补骨脂素发挥抗绝经后骨质疏松症作用时可能作用的靶点，见图 2。

3.2 补骨脂素抗绝经后骨质疏松症潜在靶基因的单基因 GSEA 富集分析

为了探究补骨脂素发挥抗绝经后骨质疏松症作用时调控的相关信号通路，对上述 7 个靶基因进行了单基因富集分析，见图 3。结果显示，这些潜在靶基因主要涉及脂类物质代谢、p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 MAPK）通路、Wnt 通路及性激素相关通路等，其中 TTPA 基因同时参与了上述信号通路。以上信息提示补骨脂素发挥抗绝经后骨质疏松症的机制可能是通过 p38 MAPK、Wnt 等信号通路

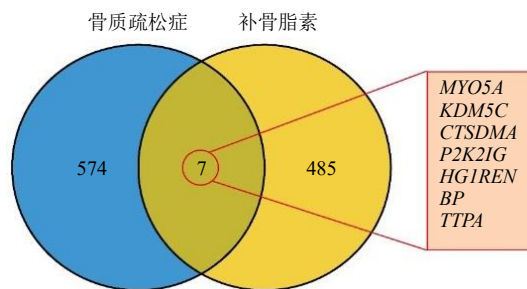


图 2 补骨脂素和绝经后骨质疏松症相关的枢纽基因

Fig. 2 Psoralen and the hub genes related to postmenopausal osteoporosis

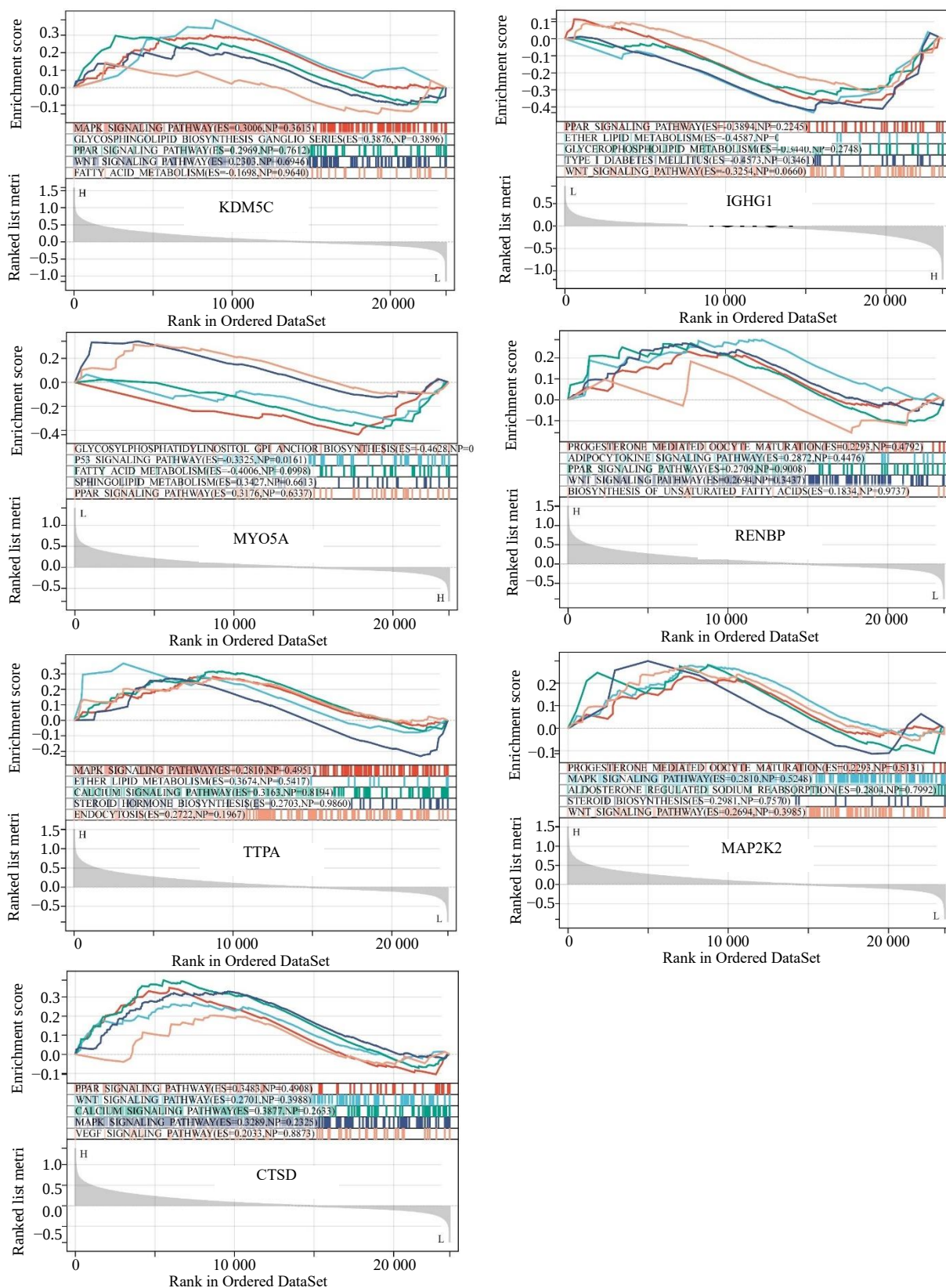


图 3 补骨脂素抗绝经后骨质疏松症潜在靶基因的 GSEA 富集分析

Fig. 3 Single-gene GSEA enrichment analysis of potential target genes of psoralen against postmenopausal osteoporosis

来调控雌激素缺乏造成的骨组织中 BMSCs 的成脂分化/成骨分化间平衡。

3.3 分子对接验证补骨脂素与靶蛋白结合

将 7 个靶蛋白分别与补骨脂素进行了分子对接模拟, 分子与蛋白结合能和结合模式见图 4。其中, 补骨脂素与 *TTPA* 蛋白之间的结合能相较于其他靶

蛋白更低, 且氨基酸残基之间存在多个氢键相互作用点, 这进一步证明了补骨脂素与 *TTPA* 蛋白之间存在相互作用的可能性。

3.4 靶基因与骨稳态关系实验验证

为了确定 7 个靶基因是否与骨稳态存在相关性, 借助 qPCR 实验检测了靶基因在正常人骨组织

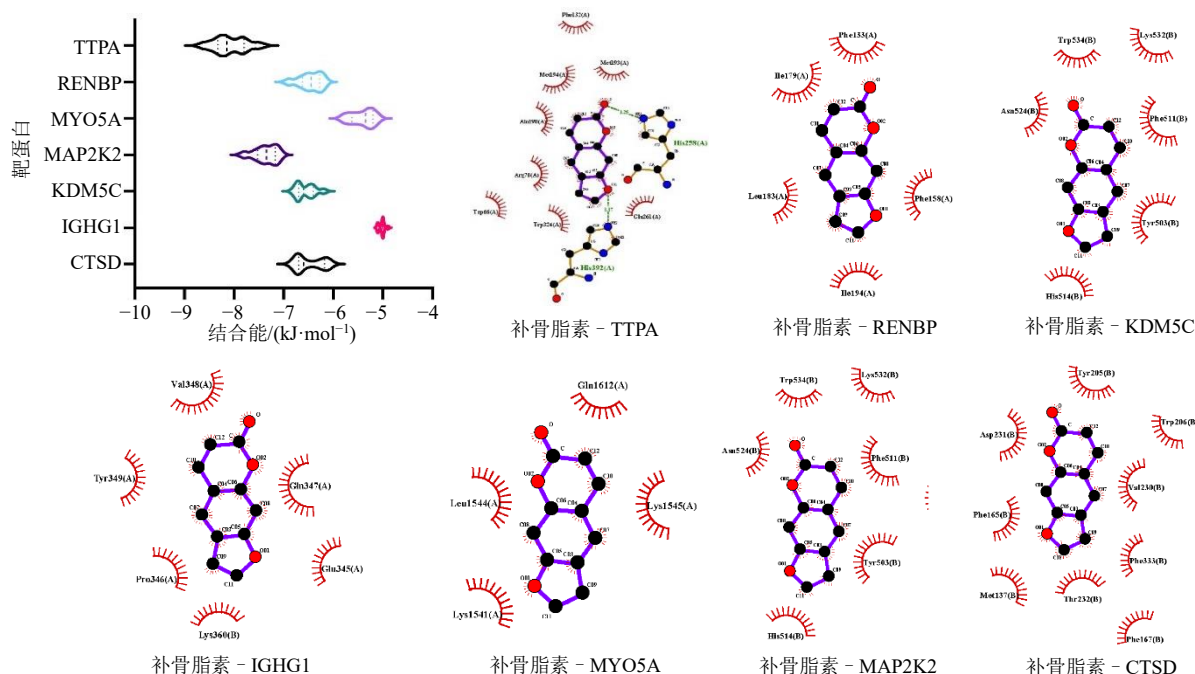


图 4 补骨脂素与靶蛋白结合的分子对接验证

Fig. 4 Molecular docking verification of the binding of psoralen to the target protein

样本和骨质疏松症患者骨组织样本中的表达差异[经诸城市人民医院伦理委员会批准(审批号 2024-EC-33)]。如图 5A 所示, *CTSD*、*IGHG1*、*MYO5A* 基因在绝经后骨质疏松症患者骨组织中显著高表达, 而 *TTPA* 基因在绝经后骨质疏松症患者骨组织中低表达。借助 RNAi 技术, 在人 BMSCs 中进行了 7 个靶基因的沉默, 并检测靶基因功能丧失对 BMSCs 成骨/成脂分化活性的影响。如图 5B 所示, *TTPA* 基因的沉默最为显著地改变了 BMSCs 的分化倾向, 即靶向 *TTPA* 基因的 siRNA 显著抑制 BMSCs 成骨分化活性, 并促进了其成脂分化活性。

3.5 补骨脂素靶向 *TTPA* 介导的 p38 MAPK 信号通路调控 BMSCs 成骨/成脂分化平衡

如图 6 所示, *TTPA* 基因的沉默抑制了 BMSCs 成骨分化所需的 ALP 活性 ($P < 0.01$); 而借助 Bodipy 标记脂滴并定量分析显示, *TTPA* 基因的沉默增加了 BMSCs 成脂分化活性 ($P < 0.01$)。补骨脂素处理后, 明显抑制了沉默 *TTPA* 造成的 BMSCs

成骨/成脂分化失衡 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

检测成骨相关蛋白 BMP2 和成脂相关蛋白 PPAR γ 发现, 与对照组相比, 沉默 *TTPA* 造成的 BMSCs 成骨分化减弱/成脂分化增强可以被 p38 MAPK 通路激动剂 Diprovocim 逆转, 即 BMP2 蛋白表达显著升高, PPAR γ 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 见图 7。

与对照组相比, 使用 p38 MAPK-IN-1 处理后显著减弱了 BMSCs 的成骨分化能力, 并增强了其成脂分化能力。而过表达 *TTPA* (OE-*TTPA*) 可在一定程度上逆转 p38 MAPK 抑制剂造成的影响, 即相对于 p38 MAPK-IN-1 抑制剂组, OE-*TTPA* 组使 BMP2 蛋白表达升高, 而 PPAR γ 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 见图 8。说明 *TTPA* 对 BMSCs 成骨/成脂分化平衡的影响是通过 p38 MAPK 通路介导的。

3.6 补骨脂素治疗卵巢切除诱导的小鼠绝经后骨质疏松症

如图 9 所示, HE 染色结果显示, 模型组小鼠

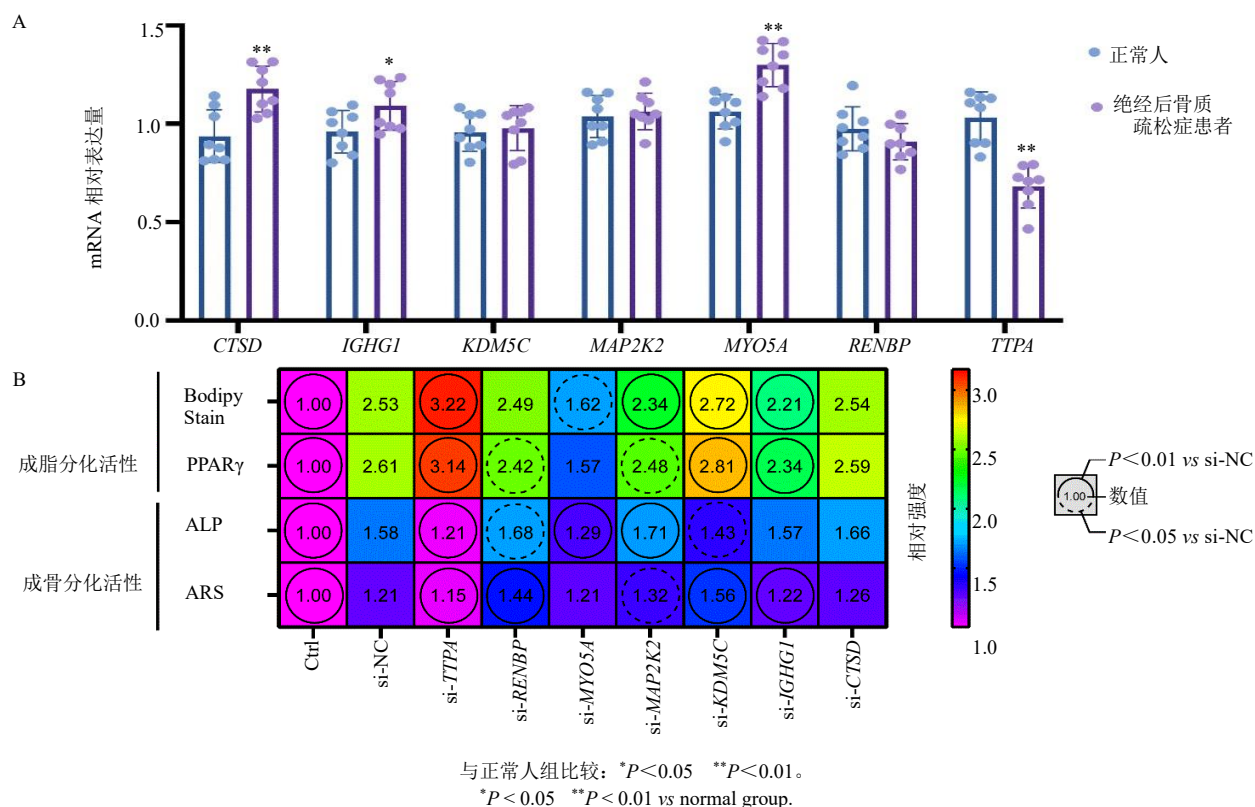


图 5 正常和绝经后骨质疏松症样本中靶基因相对表达量 (A)、BMSCs 成骨/成脂分化活性 (B)
Fig. 5 Relative expression levels of target genes in normal and postmenopausal osteoporosis samples (A), osteogenic/adipogenic differentiation activity of BMSCs (B)

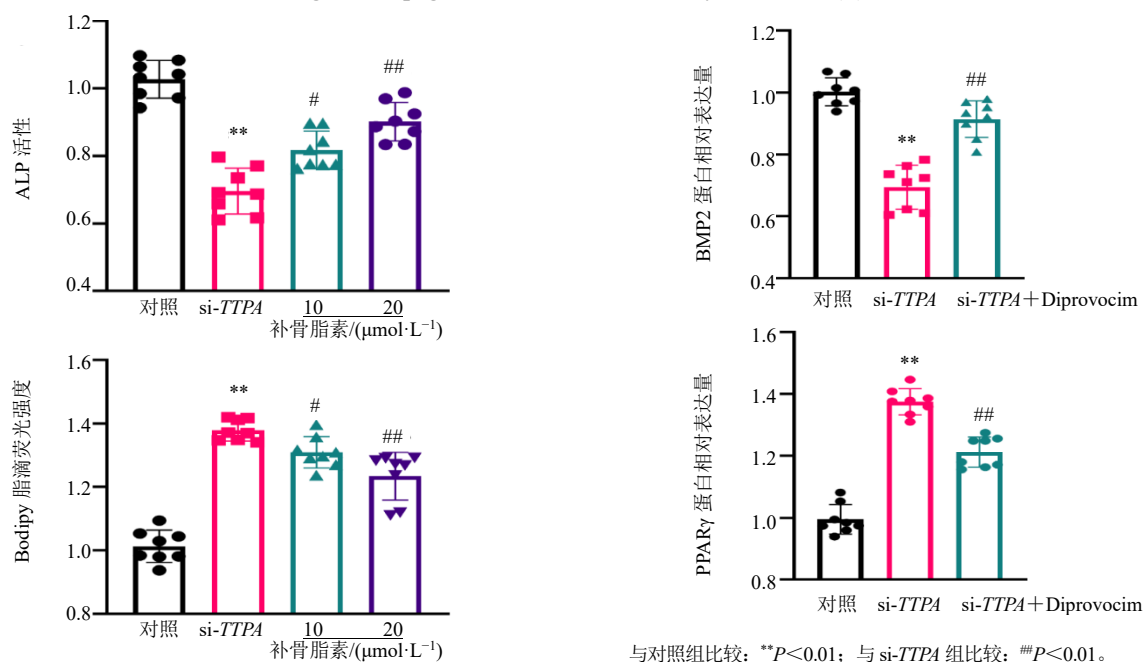


图 6 ALP 染色定量分析和 Bodipy 染色定量分析
($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 6 Quantitative analysis of ALP stain and quantitative analysis of bodipy stain ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 si-TTPA 组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs si-TTPA group.

图 7 Diprovocim 对沉默 TTPA BMSCs 细胞 BMP2 和 PPAR γ 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Fig. 7 Effect of Diprovocim on the relative expression levels of BMP2 and PPAR γ proteins in silenced TTPA BMSCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

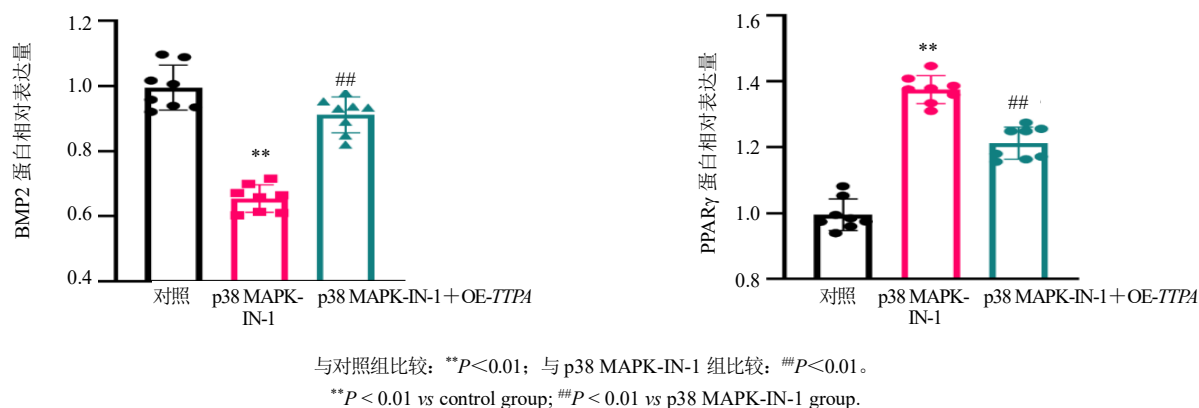


图 8 p38 MAPK-IN-1 对过表达 *TTP4* BMSCs 细胞 BMP2 和 PPAR γ 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 8 Effect of p38 MAPK-IN-1 on the relative expression levels of BMP2 and PPAR γ proteins in overexpressing *TTP4* BMSCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

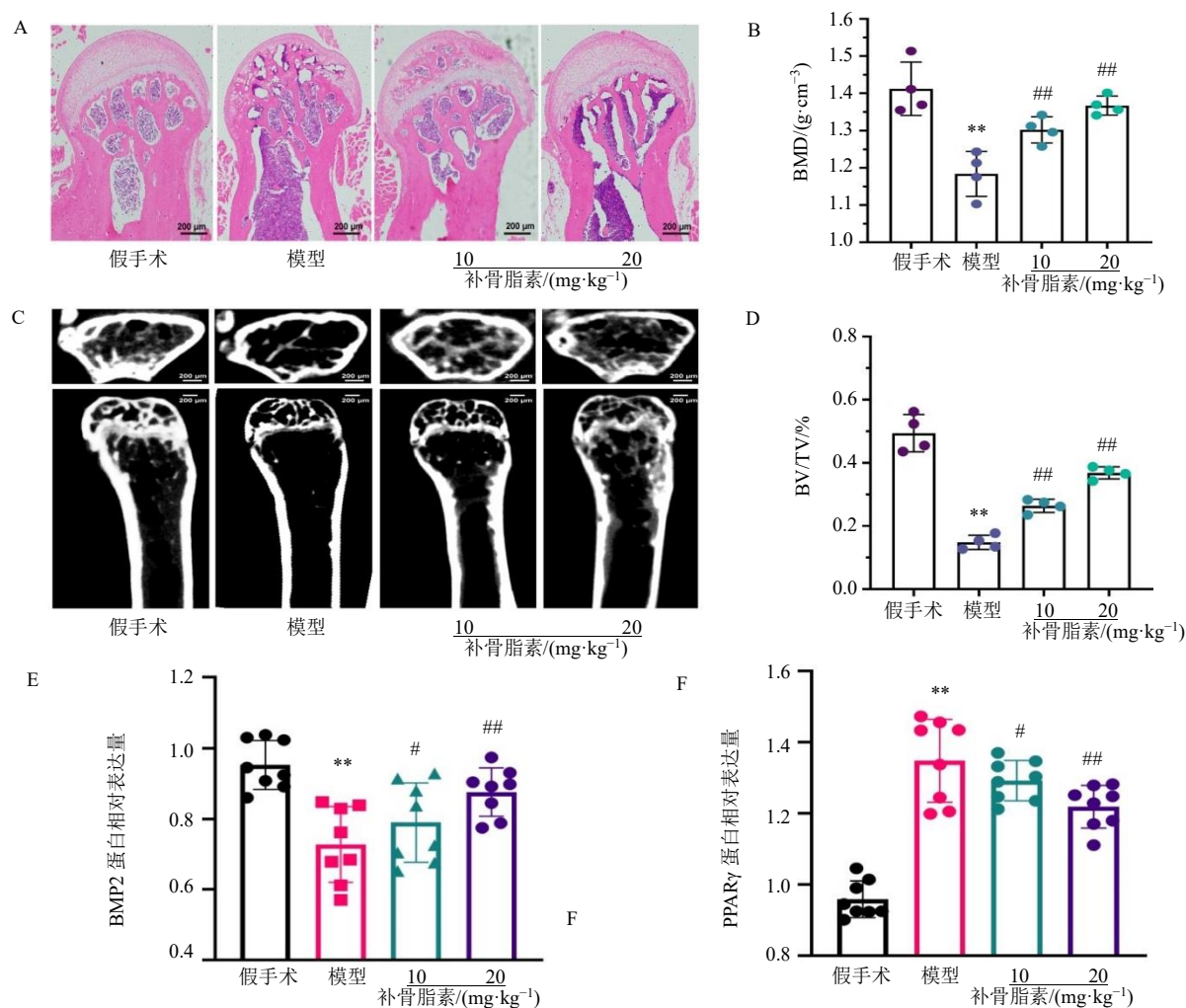


图 9 小鼠股骨 HE 染色 (A)、小鼠股骨 BMD (B)、小鼠股骨显微 CT 检测 (C)、小鼠股骨 BV/TV (D) 以及 BMP2 (E) 和 PPAR γ (F) 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 9 HE stain of mice femur (A), bone mineral density (B), Micro-CT assay of mice femur (C), BV/TV of mice femur (D), expression protein of BMP2 (E) and PPAR γ (F) ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

股骨头位置骨小梁密度明显减少,股骨头内出现较多空洞。补骨脂素组骨小梁数目及厚度明显增加,股骨头内空洞减少。Micro-CT 检测显示,补骨脂素组小鼠股骨密度明显升高。与模型组比较,补骨脂素组 BMD 和骨体积分数 (BV/TV) 明显升高 ($P < 0.01$)。通过 ELISA 实验检测小鼠股骨成骨相关蛋白 (BMP2) 含量显著升高,成脂相关蛋白 (PPAR γ) 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),进一步证明补骨脂素促进成骨分化抑制成脂分化的活性。

4 讨论

绝经后骨质疏松症是绝经后女性常见的代谢性骨病,表现为骨量减少、结构破坏,骨折风险大增。随着人口老龄化,其发病率攀升,严重影响患者生活,加重社会经济负担。现有的治疗手段存在不良反应多、疗效欠佳等问题。补骨脂素作为植物天然活性成分,在调节骨代谢方面有潜力,对开发新型抗骨质疏松药物意义重大。

本研究通过多个公共在线数据库获取补骨脂素潜在作用靶点,并结合 GEO 数据库筛选出 7 个与补骨脂素抗绝经后骨质疏松症作用相关的潜在靶点。分子对接结果显示补骨脂素与 TTPA 蛋白结合能较低且存在多个氢键互作位点,提示二者极有可能相互结合,为后续研究 TTPA 在补骨脂素抗绝经后骨质疏松症作用中的关键地位奠定基础。单基因 GSEA 富集分析表明,这些潜在靶基因主要涉及脂类物质代谢、p38 MAPK 通路、Wnt 通路及性激素相关通路等,其中 TTPA 基因参与多条通路,暗示其在补骨脂素调控机制中的重要性,可能通过上述通路调节雌激素缺乏导致的 BMSCs 成脂/成骨分化失衡。

在靶基因与骨稳态关系的实验验证中,qPCR 实验发现 CTSD、IGHG1、MYO5A 在绝经后骨质疏松症患者骨组织中高表达,TTPA 低表达。RNAi 技术沉默靶基因后发现,TTPA 基因沉默对 BMSCs 分化倾向影响最为显著,抑制成骨分化、促进成脂分化,这与之前富集分析结果相呼应,进一步证实 TTPA 在维持骨稳态中的关键作用。

补骨脂素靶向 TTPA 介导的 p38 MAPK 信号通路调控 BMSCs 成骨/成脂分化平衡的实验表明,TTPA 基因沉默会导致 BMSCs 成骨/成脂分化失衡,而补骨脂素处理能有效抑制这种失衡。同时,p38 MAPK 通路激动剂和抑制剂分别能逆转 TTPA 基因沉默和过表达造成的 BMSCs 分化异常,明确 TTPA

对 BMSCs 分化平衡的影响是通过 p38 MAPK 通路介导的,揭示了补骨脂素抗绝经后骨质疏松症的关键分子机制。

在动物实验中,HE 染色、Micro-CT 检测及 ELISA 实验结果均表明补骨脂素能增加骨小梁数目和厚度、提高股骨 BMD,促进成骨分化并抑制成脂分化,证实了补骨脂素在体内的抗绝经后骨质疏松症效果,为其临床应用提供了有力的实验支持。

综上,本研究揭示了补骨脂素治疗绝经后骨质疏松症的潜在机制,为该领域的研究提供了新的视角和方向。但在将这一研究成果转化为临床实践之前,仍需开展大量深入细致的研究工作,以期为绝经后骨质疏松症的临床治疗开辟新的途径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Duan J X, Li H, Wang C, *et al.* BMSC-derived extracellular vesicles promoted osteogenesis via Axin2 inhibition by delivering MiR-16-5p [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110319.
- [2] Li H, Wang C Y, Yao J L, *et al.* Circ_0114581 promotes osteogenic differentiation of BMSCs via the MiR-155-5p/HNRNPA3 axis [J]. *Life Sci*, 2023, 333: 122127.
- [3] Li X M, Yang Q, Li X B, *et al.* Estrogen-like neuroprotection of isopsoralen against spinal cord injury through estrogen receptor ER α [J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32(1): 259-265.
- [4] Endo Y, Funayama H, Yamaguchi K, *et al.* Basic studies on the mechanism, prevention, and treatment of osteonecrosis of the jaw induced by bisphosphonates [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2020, 140(1): 63-79.
- [5] 马晓楠, 陈蓉. 基于 CiteSpace 分析植物雌激素用于绝经综合征的热点与趋势 [J]. *中华健康管理学杂志*, 2025, 19(3): 220-225.
- [6] 姚雅琦, 陈妍妍, 汤露环, 等. 不同炮制方法对补骨脂中手性成分含量变化的影响 [J]. *中草药*, 2024, 55(15): 5104-5111.
- [7] Wu Y, Xu Y, Cai H, *et al.* Overexpression of SULT1E1 alleviates salt-processed Psoraleae Fructus-induced cholestatic liver damage [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(2): 392-403.
- [8] Li W, Chen F, Chen M, *et al.* Psoralen mediates BMSCs osteogenic differentiation via cross-talk between Wnt/ β -catenin and BMP/smad signaling pathways [J]. *Physiology*, 2024, 39(S1): 3.
- [9] 陈姣, 王继森, 郭亭君, 等. 基于网络药理学和实验验证探究青龙白虎汤改善急性咽炎的作用机制 [J]. 中

- 草药, 2024, 55(17): 5875-5886.
- [10] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [11] 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 Res*, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [12] Gallo K, Goede A, Preissner R, *et al.* SuperPred 3.0: Drug classification and target prediction-A machine learning approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W726-W731.
- [13] Subramanian A, Tamayo P, Mootha V K, *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [14] Sehnal D, Bittrich S, Deshpande M, *et al.* Mol* Viewer: Modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures [J]. *Nucleic Acid Res*, 2021, 49(W1): W431-W437.
- [15] Irwin J J, Tang K G, Young J, *et al.* ZINC20-A free ultralarge-scale chemical database for ligand discovery [J]. *J Chem Inf Model*, 2020, 60(12): 6065-6073.
- [16] Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack A F, *et al.* AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings [J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(8): 3891-3898.
- [17] Jaiswal N, Haynesworth S E, Caplan A I, *et al.* Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *J Cell Biochem*, 1997, 64(2): 295-312.
- [18] Wang J, Li S F, Wang T, *et al.* Isopsoralen-mediated suppression of bone marrow adiposity and attenuation of the adipogenic commitment of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Med*, 2023, 51(1): 4.
- [19] 曹柳, 唐晓晴, 罗青, 等. 补骨脂素对溃疡性结肠炎小鼠肠道屏障及继发性肝损伤的改善作用 [J]. *天然产物研究与开发*, 2024, 36(7): 1121-1129.

[责任编辑 高源]