

基于网络药理学方法分析落新妇苷干预骨关节炎的作用机制及实验验证

宋 伟, 张育民, 马 涛, 王 军*

西安市红会医院 关节外科, 陕西 西安 710054

摘 要: 目的 通过网络药理学预测落新妇苷治疗骨关节炎的潜在机制, 并通过实验进行验证。方法 从PubChem获得落新妇苷分子化学式 $C_{21}H_{22}O_{11}$, 通过PharmMapper和Swiss Target数据库筛选出与落新妇苷相关的靶点; 在GeneCards、TTD、Disease Gene Search Engine 3个数据库筛选出与骨关节炎疾病密切相关的靶点基因; 将落新妇苷-靶点基因和骨关节炎-靶点基因的网络合并, 筛选出共同作用靶点, 导入String数据库, 导入Cytoscape进行可视化分析; 将靶点基因上传到DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行基因功能和KEGG通路富集分析。建立白细胞介素(IL)-1 β 诱导的人软骨细胞模型, 造模同时给予落新妇苷低、高质量浓度(12.5、25.0 $\mu\text{g/mL}$) 干预, CCK8法检测药物干预1、2、3 d软骨细胞活性; Western blotting法和实时荧光定量PCR法检测药物干预24 h后肿瘤坏死因子(TNF)- α 和G1/S-特异性周期蛋白-D1(CCND1)蛋白和mRNA表达。结果 通过挖掘数据获得377个与落新妇苷相关的潜在靶点和2 758个骨关节炎的潜在基因; 对网络进行对接, 获得43个潜在靶基因, 随后构建PPI网络; 关键基因为TNF、癌基因同源物(HRAS)、肿瘤标志物热休克蛋白90 α (HSP90AAS)、淀粉样蛋白前体蛋白(APP)和CCND1; 关键通路为AGE/RAGE信号通路、肿瘤聚糖信号通路、MAPK信号通路、PI3K-AKT信号通路、细胞增殖、凋亡等。与模型组比较, 落新妇苷低、高质量浓度组人软骨细胞吸光度($A_{450\text{nm}}$)值均显著升高, 差异有统计学意义($P<0.05$), TNF- α 蛋白和mRNA表达均显著降低($P<0.05$), CCND1蛋白和mRNA表达均显著升高($P<0.05$)。结论 落新妇苷可能通过直接作用于STAT1、STAT3、RAS等靶点, 干预AGE/RAGE通路, 从而调节TNF- α 和CCND1的表达, 进而促进软骨细胞的增殖和抑制炎症因子的产生。

关键词: 网络药理学; 落新妇苷; 骨关节炎; 软骨细胞; AGE/RAGE通路; 肿瘤坏死因子- α ; G1/S-特异性周期蛋白-D1

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 04-0728-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.04.008

Analysis of mechanism and experimental validation of interventions of osteoarthritis by network pharmacology

SONG Wei, ZHANG Yumin, MA Tao, WANG Jun

Joint Surgery, Honghui Hospital, Xi'an 710054, China

Abstract: Objective To predict the potential mechanism of astilbin in the treatment of osteoarthritis through network pharmacology and verify it by experiments. **Methods** The molecular formula $C_{21}H_{22}O_{11}$ of astilbin was obtained from PubChem, and the targets related to astilbin were screened by PharmMapper and Swiss Target database. Three databases were used to screen out the target genes closely related to osteoarthritis. The networks of astilbin target gene and osteoarthritis target gene were combined to screen out the common targets, which were imported into String database and Cytoscape for visual analysis. The target genes were uploaded to David (<https://david.ncifcrf.gov/>) Gene function and KEGG pathway enrichment were analyzed. Human chondrocyte model induced by IL-1 β was established, and astilbin was given at low and high doses (12.5 and 25.0 $\mu\text{g/mL}$) at the same time. CCK8 method was used to detect the activity of chondrocytes on day 1, 2 and 3. Western blotting method and real-time fluorescence quantitative PCR method were used to detect the expression of TNF- α and CCND1 protein and mRNA. **Results** By mining data, 377 potential targets related to astilbin and 2 758 potential genes for osteoarthritis were obtained. The network was then docked to obtain 43 potential target genes, and then a PPI network was constructed. The key genes are TNF (tumor necrosis factor), HRAS (oncogene homolog), HSP90AAS (tumor marker heat shock protein 90 α), APP (amyloid precursor protein), and CCND1 (G1/S-specific cyclin-D1). The key pathways are the AGE/RAGE signaling pathway and tumor clustering. Sugar signaling pathway, MAPK signaling pathway,

收稿日期: 2020-08-12

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2019JM-493)

第一作者: 宋 伟, 研究方向为骨与关节疾病。E-mail: songgwi@163.com

*通信作者: 王 军 E-mail: songgwi@163.com

P13K-AKT signaling pathway, cell proliferation, apoptosis and other related pathways. Compared with model group, the absorbance ($A_{450\text{nm}}$) of human chondrocytes in astilbin low-dose and high-dose groups were significantly increased ($P < 0.05$), the expression of TNF- α protein and mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression of CCND1 protein and mRNA were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Astilbin may directly target STAT1, STAT3, RAS and other targets, and this target interferes with the AGE/RAGE pathway, thereby regulating the expression of TNF- α and CCND1, and proving the efficacy of astilbin in the treatment of osteoarthritis.

Key words: network pharmacology; astilbin; osteoarthritis; chondrocytes; AGE/RAGE pathway; TNF- α ; CCND1

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种退行性疾病,发病以老年人为主,是导致残疾的几大原因之一^[1]。关节软骨的进行性退化引起骨与骨之间的摩擦,导致严重的疼痛、僵硬和残疾,炎症和分解代谢的改变与OA的发生和发展关系密切^[2]。炎症介质的下调对OA的进展具有减缓作用,目前虽然在该病的相关发病机制研究方面取得了一定突破,但治疗方案仍然不足。相对于其他炎症性关节疾病,目前还没有有效的药物治疗OA,非甾体类抗炎药(NSAIDs)在临床上广泛使用,但仅能暂时缓解OA症状,而且会增加心肌梗死的风险^[3]。中医药在退行性疾病中具有较为理想的疗效,可以提高患者关节活动和降低疼痛^[4]。

落新妇苷最早从植物落新妇的根茎中分离获取,是一种天然的类黄酮化合物,因其多种药理特性而被广泛应用^[5]。有报道指出,落新妇苷具有多种生物活性,可以用于抗肝纤维化^[6]、抗氧化^[7]、抗糖尿病肾病^[8]、抗炎^[9]等。此外,还有研究表明落新妇苷可以通过NF- κ B信号通路抑制骨髓分化因子88(MyD88)、p65和 κ B激酶 β (IKK β),从而治疗慢性炎症性疾病,如风湿性关节炎^[10]。落新妇苷被证实不具有遗传毒性,进一步表明了其在临床应用中的巨大价值,然而,其治疗OA的作用机制尚未完全阐明。本研究基于白细胞介素(IL)-1 β 诱导的软骨细胞模型,运用网络药理学和细胞实验验证相结合的方法,为深入探讨落新妇苷抗OA的作用机制提供新思路和新方法。

1 材料

1.1 主要试剂

落新妇苷(批号BCTG-0233,质量分数 $\geq 98\%$)和二甲亚砜(DMSO,质量分数98%),均购自大连美伦生物科技有限公司。DMEM培养基、胰蛋白酶、链霉素、青霉素(美国Promega公司);胎牛血清(FBS)和胶原酶II(Gibco公司)、兔IL-1 β 粉剂(美国Sigma公司);Trizol(Invitrogen, Carlsbad, California);iScriptTMcDNASynthesis Kit逆转录试剂盒(BioRad Laboratories, Hercules, CA);肿瘤坏死因

子(TNF)- α 、G1/S-特异性周期蛋白-D1(CCND1)及GAPDH引物(美国Sigma公司);RIPA裂解溶液(碧云天生物技术有限公司);BCA蛋白定量测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);兔抗CyclinD1、兔抗TNF- α 、GAPDH(Addgene, 美国);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG二抗(Cell Signaling)。

1.2 实验细胞

人软骨细胞来源于人软骨组织,人体软骨样本取自本院骨科接受全膝关节置换手术的OA患者,均经患者知情同意。组织收集根据本院医学伦理委员会的规定,并遵循《赫尔辛基宣言》的指导原则。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 落新妇苷作用靶点查询 通过PubChem服务器(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行检索,输入关键词“Astilbin”,下载落新妇苷对应的化学式、3D结构以及SDF格式文件^[11]。通过反向药效团匹配PharmMapper数据库(<http://59.78.98.102/pharmmapper/get.php>),上传落新妇苷的SDF格式文件,点击Upload,按照软件设定配体空腔要求选择Pharmacophore Models Whose Pkd ≥ 6.0 ,查询出与落新妇苷有关靶点,根据匹配度fit score由高到低排序所有靶点;通过Swiss Target数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>),输入落新妇苷化学式,获得相关的潜在靶点,将得到的对应靶点信息进行汇总。采用Uniprot数据库(<http://www.uniprot.org/>)对的靶点进行搜索,限定物种为人,对靶点名称进行规范校正,校正为官方名称。

2.1.2 骨关节炎靶点映射 登陆GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、Therapeutic Target Database数据库(TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)和Disease Gene Search Engine数据库(<http://210.107.182.61/geneSearch/>)输入骨关节炎搜索已报道的与此相关的靶点,进行检索及筛选,删除重复的靶点,获得与OA相关的靶点,并与落新妇苷相关

靶点之间进行匹配。

2.1.3 网络合并及基因富集分析 将落新妇苷和OA相关靶点的匹配后,获得落新妇苷-骨关节炎出共同靶点基因,导入String数据库(<https://string-db.org/>)分析检索已知蛋白质之间和预测蛋白质之间相互作用关系,获取蛋白作用关系网络,使用Cytoscape3.6.1软件构建蛋白互作网络(PPI)。将这些基因上传到DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因(Gene Ontology, GO)功能和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析,进一步说明落新妇苷在治疗骨关节炎方面的潜在机制。

2.2 细胞实验验证

2.2.1 细胞培养与处理 人体软骨样本取自本院骨科接受全膝关节置换手术的OA患者,获得软骨组织后剪碎,用0.25%胰蛋白酶消化30 min。将组织置于含抗生素的胶原酶II(2 mg/mL)DMEM溶液中,在37℃下进一步消化6 h,收集上清液分别置于10 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min(离心半径10 cm),去除离心后的上清液,加入DMEM(含有10% FBS、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素),在37℃、含5% CO₂的细胞培养箱中培养。选取第1~3代的细胞进行后续实验。

2.2.2 CCK8法检测落新妇苷对人软骨细胞活性的影响 取第3代软骨细胞,以 1×10^4 /孔的密度接种于96孔板中,培养24 h后分为4组:对照组、模型组和落新妇苷低、高质量浓度(12.5、25.0 μg/mL)组,每组6孔。对照组加入DMEM培养液,模型组加入含有10 μg/mL IL-1β的DMEM培养基,落新妇苷低、高质量浓度组加入含有10 μg/mL IL-1β和相应质量浓度落新妇苷的DMEM培养基。放入培养箱中继续培养,分别于给药后0、1、2、3 d取出1块培养板进行检测,每孔加入CCK8试剂10 μL。采用酶标仪检测软骨细胞的吸光度($A_{450\text{nm}}$)值。

2.2.3 Western blotting法检测TNF-α和CCND1蛋白表达 取软骨细胞接种于6孔板,分组及给药同“2.2.2”项,孵育24 h后,将各组细胞放于冰上用RIPA裂解30 min,离心取上清液,根据BCA蛋白定量结果上样。加入10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)处理2 h,转膜后加入5%脱脂奶粉室温封闭1 h,洗膜后加入内参抗体GAPDH、一抗TNF-α和CCND1抗体4℃孵育过夜。TBST缓冲液洗3次,洗膜后用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)孵育1 h,洗膜后ECL化学发光显色,采用Image J软件对相关蛋白表达进行分析。

2.2.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测 细胞接种及分组给药同“2.2.3”项,孵育24 h后,采用Trizol法提取各组细胞的总RNA,逆转录酶转录为cDNA,以此cDNA为模板,按三步法行qRT-PCR扩增,采用GAPDH基因作为内源性参照物,检测TNF-α和CCND1的mRNA在各组细胞中的表达量。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因的相对表达量,引物列表见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	引物序列
CCND1	Forward GAGACCAGUUGGUCAGUGU
	Reverse AUUCAUGGCUGAAGUCACS
TNF-α	Forward TTTCTGTGGTACCCTCTGTGC
	Reverse GATCGGTCCCAACAAGGAGG
GAPDH	Forward CTCCTCGAAGTACCCTGTGC
	Reverse CATGGTGCAGCGATGCTTTA

2.3 数据分析

采用SPSS 23.0统计学软件进行数据分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较先采用方差分析,然后采用 q 检验进行两两比较。

3 结果

3.1 落新妇苷和骨关节炎作用靶点查询

从PubChem获得落新妇苷分子化学式C₂₁H₂₂O₁₁。通过PharmMapper和Swiss Target数据库筛选出与落新妇苷相关的靶点385个,使用UniProt数据库中的UniprotKB工具进行更正后,去除与人类无关以及无对应关系或者重复的靶点后,共筛选出包括eapA、dhaK、avrPph3、CSDE1在内的377个潜在靶点。在GeneCards、TTD、Disease Gene Search Engine 3个常用数据库筛选出与骨关节炎疾病密切相关的靶点基因,剔除重复基因后共得到2 758个基因。结果说明引起骨关节炎因素众多且发病机制复杂。

3.2 合并构建PPI网络

将落新妇苷-靶点基因和骨关节炎-靶点基因的网络合并,筛选出共同作用靶点基因43个。将43个靶点,导入String数据库,将相互作用靶点的结果导入Cytoscape进行可视化分析,得到由43个节点、152条边组成的网络,网络密度为0.588,平均节点度为6.08,当网络密度大于0.5及平均节点度大于3时,网络具有较好的关联性,点与点之间连接紧密,见图1。由网络可知,自由度较大的前5位靶点是肿瘤坏死因子(TNF)、癌基因同源物(HRAS)、肿瘤标志物热休克蛋白90α(HSP90AAS)、淀粉样蛋白前体蛋白(APP)和G1/S-特异性周期蛋白-D1(CCND

1)。相关基因靶点集中在炎症、凋亡和增殖通路上,结果见图2。

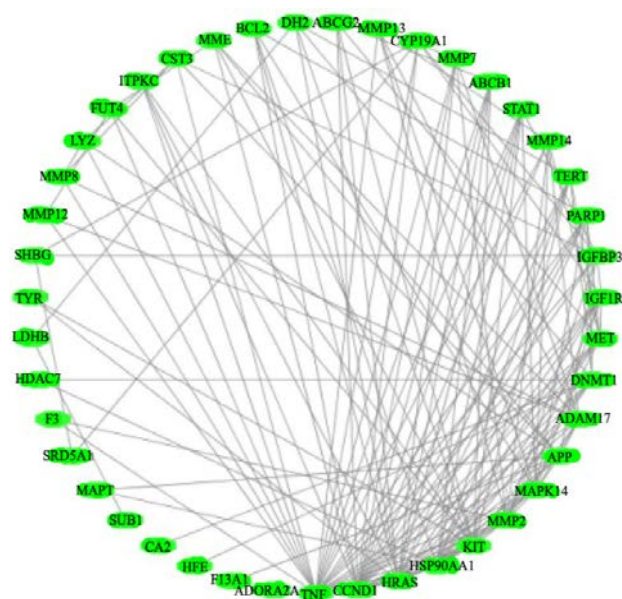
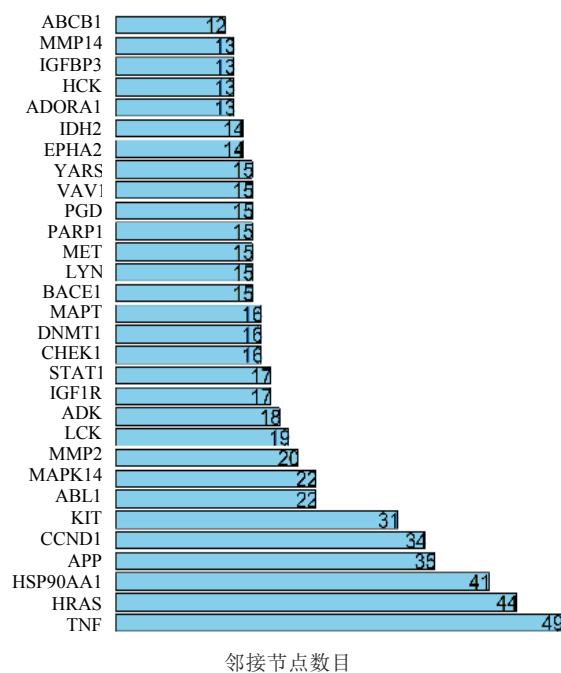


图1 作用靶点网络

Fig. 1 Target network

3.3 基因富集及通路分析

富集的GO分析分为生物过程(BP)、细胞成分(CC)和分子功能(MF)3部分。GO分析结果表明,BP分析显示细胞对药物的反应、细胞增殖与凋亡的正负调控、细胞死亡、磷酸化、磷代谢过程、催化活性的正调控、高分子代谢过程的正调控。其



邻接节点数目

图2 作用靶点排名

Fig. 2 Ranking of action targets

中,细胞的增殖与凋亡与骨关节炎的发病具有相关性,而细胞的磷酸化调节和控制蛋白质活力和功能。CC主要富集于细胞外区域、细胞质膜。MF分析显示与基因和蛋白质结合有关,同时可以影响金属内肽酶活性和蛋白质活性。结果见图3。经过KEGG通路富集后显示,落新妇苷参与多条信号通路, $P < 0.05$ 的信号通路共有49条,其中参与调控骨

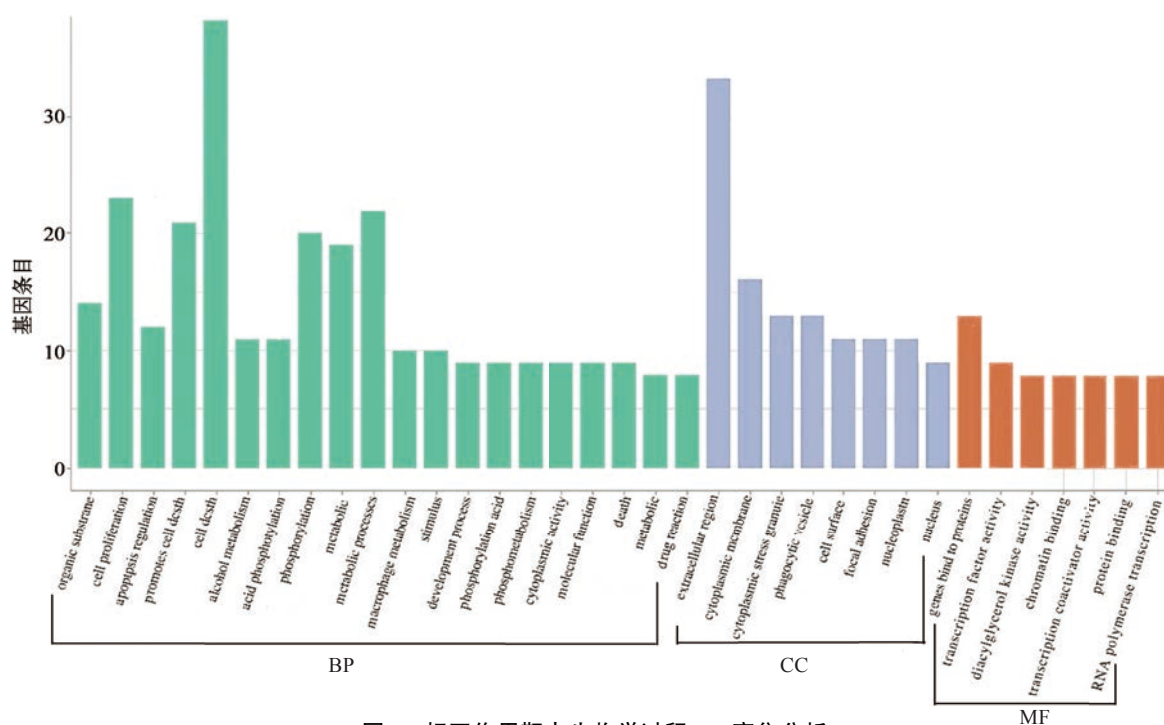


图3 相互作用靶点生物学过程GO富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of biological processes of interacting targets

关节炎的信号通路有AGE/RAGE信号通路、肿瘤聚糖信号通路、MAPK信号通路、PI3K-AKT信号通路、细胞增殖、凋亡等相关通路,见图4。其中AGE/RAGE信号通路与骨关节炎密切相关,因此综合网络药理学与文献调研结果,初步推测落新妇苷可能通过调节AGE/RAGE信号通路治疗骨关节炎,进一步设计细胞实验验证落新妇苷药理作用。

3.4 落新妇苷对软骨细胞增殖的影响

如图5所示,干预1、2及3 d,与对照组比较,模

型组细胞 $A_{450\text{ nm}}$ 值显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,落新妇苷低、高质量浓度组 $A_{450\text{ nm}}$ 值均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与落新妇苷高质量浓度组比较,低质量浓度细胞 $A_{450\text{ nm}}$ 值显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在本实验中落新妇苷 $12.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 组比 $25.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 组对软骨细胞的促增殖作用明显,软骨细胞的增殖能力与落新妇苷浓度的关系尚需探讨,但与时间成正相关。

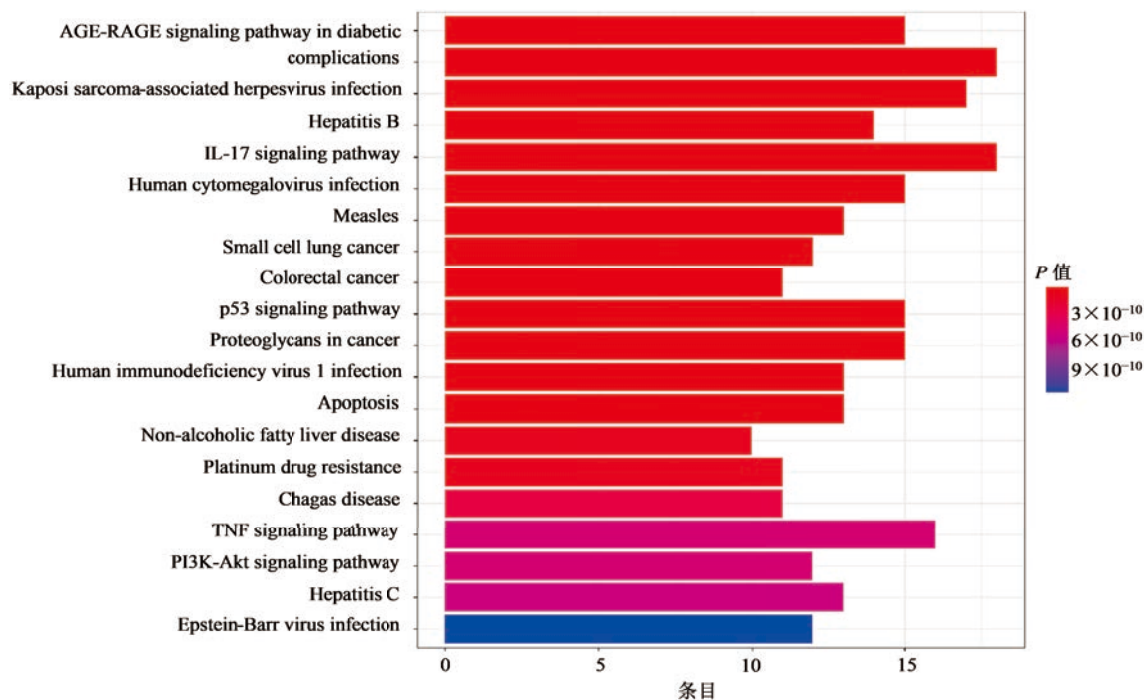
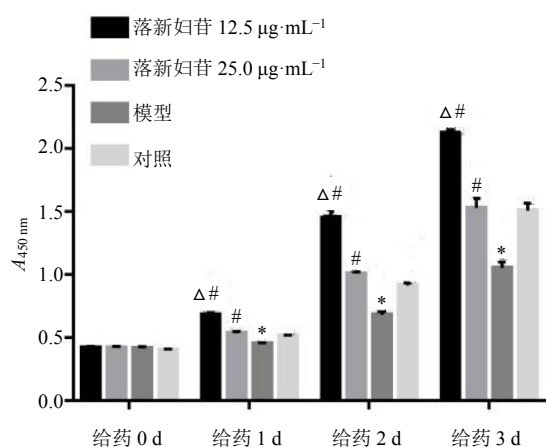


图4 相互作用靶点KEGG通路分析

Fig. 4 KEGG pathway analysis of interacting target



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与落新妇苷 $25.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs astilbin $25.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group

图5 细胞增殖曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)

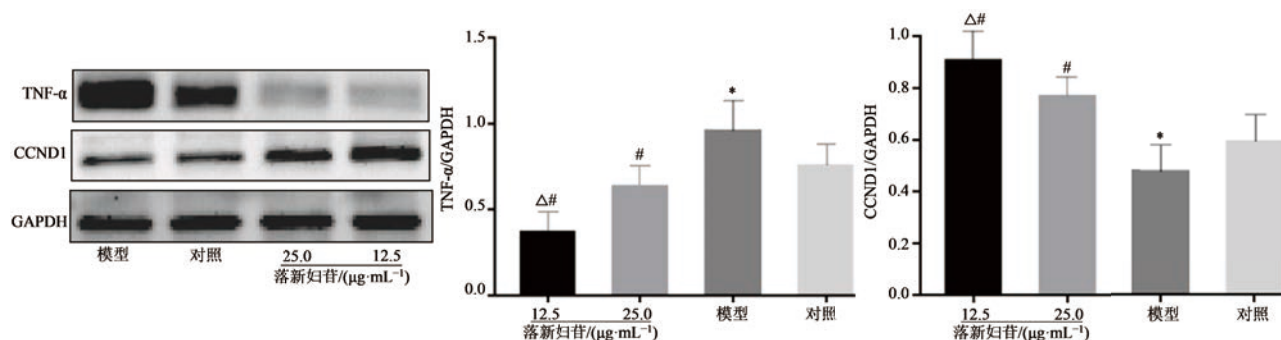
Fig. 5 Cell proliferation curve of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.5 落新妇苷对软骨细胞TNF- α 和CCND1蛋白表达的影响

Western blotting检测显示,与对照组比较,模型组TNF- α 蛋白表达显著升高,CCND1蛋白表达显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,落新妇苷低、高质量浓度组TNF- α 蛋白表达均显著降低,CCND1蛋白表达均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与落新妇苷高质量浓度组比较,低质量浓度组TNF- α 蛋白表达显著降低,CCND1蛋白表达显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图6。

3.6 落新妇苷对软骨细胞TNF- α 和CCND1的mRNA表达的影响

qRT-PCR结果显示,与对照组比较,模型组TNF- α mRNA表达显著升高,CCND1 mRNA表达显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与落新妇苷 25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; Δ $P < 0.05$ vs astilbin 25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group

图6 软骨细胞TNF-α、CCND1蛋白表达及其代表性蛋白条带($\bar{x} \pm s, n=6$)

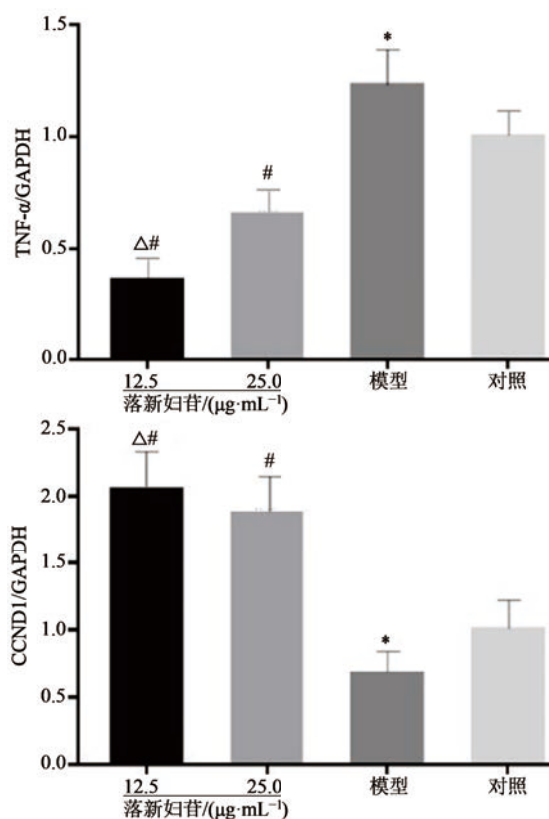
Fig. 6 Expression of TNF-α and CCND1 in chondrocytes and their representative protein bands ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组比较,落新妇苷低、高剂量组TNF-α mRNA表达均显著降低,CCND1 mRNA表达均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与落新妇苷高剂量组比较,低剂量组TNF-α mRNA表达均显著降低,CCND1 mRNA表达均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图7。

4 讨论

骨关节炎是最常见的关节疾病,也是致残的主要原因之一。随着人口老龄化,预计膝骨关节炎的患病率将持续上升,并给社会医疗系统带来重大负担^[11]。尽管近几十年来已发现多种危险因素与OA的发作有关,但物理疗法的治疗效果仍然有限。而非甾体类抗炎药作为OA治疗的主要药物^[12],却仅能暂时缓解临床症状而不能减缓OA的发展。因此,迫切需要一种具有合适分子靶点的药物来抑制OA中的软骨降解。软骨细胞是关节软骨中的细胞,其作用是平衡细胞外基质的合成和降解^[13]。从OA患者中获得的软骨细胞释放IL-1β,其可诱导金属蛋白酶(MMPs)的产生,导致软骨变性^[14]。基质降解的重要介质是诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)和环氧合酶(COX-2),它们促进一氧化氮(NO)和前列腺素E2(PGE2)的释放,这些炎症介质会进一步引起疼痛并增强炎症反应^[12],而软骨细胞的凋亡也会加快软骨的降解^[15]。

在临床中,落新妇主要被用于治疗风湿关节疼痛。落新妇中含有黄酮类、萜类化合物等多种的活性成分,临床中常用于治疗类风湿关节炎、痛风、高尿酸血症、肾炎、尿道感染等疾病^[16]。研究表明,落新妇根茎提取物可以通过免疫调节作用治疗抑制特定炎症细胞的活动,然而其作用机制尚未明确。落新妇苷是从根茎中分离获得的二氢黄酮醇衍生物,它具有多种药理作用,包括抗氧化、抗炎、抗糖尿病及肾病等特性。研究显示,落新妇苷可选择性抑制淋巴细胞功能从而减少关节炎的功能障碍^[17],还可缓解接触性过敏,通过抑制被激活的免疫细胞来减轻红斑狼疮的症状^[18]。虽然有报道证明从土茯苓中提取的落新妇苷可以抑制炎症因子及减低免疫反应,但是尚未有报道将落新妇苷运用在



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与落新妇苷 25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; Δ $P < 0.05$ vs astilbin 25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group

图7 软骨细胞TNF-α、CCND1基因表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Expression of TNF-α and CCND1 genes in chondrocytes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

OA中。

网络药理学是建立在疾病与药物基因层面上的一门新兴学科。它有助于预测新的药物靶点,找出作用模式,探索新药。考虑到中药成分和功能的复杂性,网络药理学无疑为其靶标和信号通路的识别提供了一条捷径,同时网络药理学作为一种新的工具,也为细胞及机体层面的研究提供了便利。网络药理学技术可以预测潜在有效成分的药理作用,确定主要有效成分^[19]。本研究首先利用药物数据库获得了落新妇苷作用的潜在靶基因,随后通过与骨关节炎的靶基因对接,找出药物-疾病基因作用,寻找其潜在通路和细胞功能。结果表明,落新妇苷可以通过AGE/RAGE、MAPK通路、PI3K-AKT通路以及肿瘤相关发挥治疗骨关节炎的作用。

GO功能分析显示,上述靶点基因涉及到金属内肽酶活性、肽链内切酶活性、蛋白酶结合、外源生物膜转运蛋白活性、TNF受体结合、细胞凋亡和炎症激活等多种生物过程。

炎症介质的产生能够分泌IL等炎症因子,这又会促进TNF- α 、IL-1等其他炎症因子的释放,导致软骨基质的降解,因此,如何维持关节内环境稳定是有效抑制骨关节炎中的炎症反应的方法之一。骨关节炎病理过程中的重要特征是软骨细胞凋亡,大量研究发现,骨关节炎患者的软骨细胞凋亡率显著高于正常关节,因此治疗骨关节炎的一个方法是减少软骨细胞凋亡。交互网络43个靶点中degree较大的为TNF- α 和CCND1,而这两个靶点作为AGE/RAGE通路的下游靶点在炎症介导与细胞凋亡的过程中起着重要作用,因此本研究基于AGE/RAGE通路研究落新妇苷对IL-1 β 诱导的软骨细胞的影响。研究结果表明,落新妇苷减少TNF- α 的蛋白和基因表达,增加CCND1的表达,证实了落新妇苷可能通过AGE/RAGE通路治疗骨关节炎。

目前的研究认为,晚期糖基化终末产物(AGEs)是OA患者致病的重要分子学基础。体内AGEs在正常情况下都维持平衡状态,当机体发生异常情况,如糖尿病、衰老等都会使体内AGEs明显升高,产生一系列病理生理改变。而AGEs在OA上的致病因素主要有2个:加快软骨细胞的凋亡和促进相关炎症反应的发生。AGE/RAGE可促进氧化应激诱导细胞内活性氧大量产生,而ROS的增加会导致II型胶原表达下降以及炎症因子的增加从而导致内质网应激,最终引起软骨细胞凋亡;AGE/RAGE通路的激活会引起大量炎症因子的激活,导致炎症介

质的产生,最终引起MMP的表达下调,造成对II型胶原的破坏^[20]。

网络药理学研究发现,落新妇苷在骨关节炎中,主要富集在与细胞增殖凋亡和细胞炎症相关的通路中。与AGE/RAGE的相关度最高,同时AGE/RAGE也与软骨细胞的凋亡和炎症有关,因此本研究选择了AGE/RAGE通路作为机制研究,而TNF- α 和CCND1的蛋白及基因层面的结果也表明,落新妇苷可以抑制炎症介质TNF- α 的产生,同时可促进软骨细胞的增殖活性及细胞周期蛋白D1。既往研究表明CCND1对OA发展起着重要的调节作用,CCND1基因的沉默会加快IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡^[21]。Zheng等^[22]的研究表明补骨脂素可通过CCND1-Wnt/ β -catenin信号通路促进软骨细胞增殖。本研究结果表明,CCND1可以作为落新妇苷作用于软骨细胞的靶标。此外,CKK8增殖试验表明,落新妇苷可以促进软骨细胞的增殖,这可能是由于CCND1上调引起的。

落新妇苷可能通过调控AGE/RAGE信号通路,抑制AGE/RAGE信号通路下游蛋白TNF- α 表达,促进下游蛋白CCND1表达,进而促进IL-1 β 诱导的软骨细胞的增殖和抑制炎症因子的产生,AGE是落新妇苷治疗软骨细胞的潜在靶点。本研究为落新妇苷临床治疗骨关节炎的原因提供参考,其具体机制仍需深入探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Thielen N, van der Kraan P, van Caam A. TGF β /BMP signaling pathway in cartilage homeostasis [J]. Cells, 2019, 8(9): 969.
- [2] Ahn H, La J, Chung J, et al. (250) the relationship between beta-endorphin and experimental pain sensitivity in older adults with knee osteoarthritis pain [J]. J Pain, 2019, 20(4): S37.
- [3] Bamborough P, Morse M A, Ray K P. Targeting IKK β for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Drug News Perspect, 2010, 23(8): 483-490.
- [4] 杨杰,王晓云,孙宇,等. 膝骨关节炎中医药治疗研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(7): 219-224.
Yang J, Wang X Y, Sun Y, et al. Research progress of traditional Chinese medicine treatment of knee osteoarthritis [J]. J Liaoning Univ Trad Chin Med, 2018, 20(7): 219-224.
- [5] Lu C L, Zhu Y F, Hu M M, et al. Optimization of astilbin extraction from the rhizome of *Smilax glabra*, and

- evaluation of its anti-inflammatory effect and probable underlying mechanism in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages [J]. Mol Basel Switz, 2015, 20 (1): 625-644.
- [6] Wang J, Zhao Y, Xu Q. Astilbin prevents concanavalin A-induced liver injury by reducing TNF- α production and T lymphocytes adhesion [J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56(4): 495-502.
- [7] Yu L, Huang H Q, Yu L L, et al. Utility of hesperidinase for food function research: enzymatic digestion of botanical extracts alters cellular antioxidant capacities and anti-inflammatory properties [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(34): 8640-8647.
- [8] Li G S, Jiang W L, Yue X D, et al. Effect of astilbin on experimental diabetic nephropathy *in vivo* and *in vitro* [J]. Planta Med, 2009, 75(14): 1470-1475.
- [9] Huang H Q, Cheng Z H, Shi H M, et al. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(9): 4562-4569.
- [10] Dong L S, Zhu J Q, Du H Z, et al. Astilbin from *Smilax glabra* Roxb. attenuates inflammatory responses in complete freund's adjuvant-induced arthritis rats [J]. Evid - Based Complementary Altern Med, 2017, 2017: 1-10.
- [11] 张 潇, 高 耀, 向 欢, 等. 基于网络药理学的交泰丸治疗抑郁症作用机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1584-1590. Zhang X, Gao Y, Xiang H, et al. An exploration on mechanism of antidepressant of Jiaotai Pills based on network pharmacology [J]. Chin Trad Herbal Drugs, 2017, 48(8): 1584-1590.
- [12] Kempuraj D, Selvakumar G P, Thangavel R, et al. Glia maturation factor and mast cell-dependent expression of inflammatory mediators and proteinase activated receptor-2 in neuroinflammation [J]. J Alzheimers Dis, 2018, 66 (3): 1117-1129.
- [13] Wang M N, Shen J, Jin H T, et al. Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1240: 61-69.
- [14] Lianxu C, Hongti J, Changlong Y. NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1 β -induced and TNF- α -induced chondrocytes [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(4): 367-376.
- [15] Iezaki T, Ozaki K, Fukasawa K, et al. ATF₃ deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development [J]. J Pathol, 2016, 239(4): 426-437.
- [16] Wang M, Yang X B, Zhao J W, et al. Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Smilax glabra* Roxb. [J]. Carbohydr Polym, 2017, 156: 390-402.
- [17] Cai Y, Chen T, Xu Q. Astilbin suppresses collagen-induced arthritis via the dysfunction of lymphocytes [J]. Inflamm Res, 2003, 52(8): 334-340.
- [18] Guo L L, Liu W, Lu T T, et al. Decrease of functional activated T and B cells and treatment of glomerulonephritis in lupus-prone mice using a natural flavonoid astilbin [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124002.
- [19] 孟凡翠, 汤立达. 中药网络药理研究中存在的问题与发展展望 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2232-2237. Meng F C, Tang L D. Active components and mechanism of Tibetan medicine *Gentiana straminea* against cytokine storm [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(8): 2232-2237.
- [20] 黄文舟, 殷娉娉, 敖 鹏, 等. 晚期糖基化终末产物与骨性关节炎相关性的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2017, 25(9): 820-823. Huang W Z, Yin C C, Ao P, et al. Current research on the correlation between advanced glycation end products and osteoarthritis [J]. Orthoped J Chin, 2017, 25(9): 820-823.
- [21] Zan P F, Yao J, Wu Z, et al. Cyclin D1 gene silencing promotes IL-1 β -induced apoptosis in rat chondrocytes [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 290-299.
- [22] Zheng W W, Lin P D, Ma Y H, et al. Psoralen promotes the expression of cyclin D1 in chondrocytes via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2017, 40 (5): 1377-1384.

[责任编辑 兰新新]