

壮骨止痛方有效成分关联分析

刘乐平, 刘慧萍, 谢瑾如, 杨璐瑜, 王梦雅, 彭 婷, 刘平安*, 张国民*

湖南中医药大学 中药方证研究转化医学实验室, 湖南 长沙 410208

摘 要: 对壮骨止痛方有效成分进行关联分析, 探讨其对“肾虚血瘀证”疾病网络的干预作用。通过对壮骨止痛方传统功效、有效成分和现代药理作用研究的文献调研, 并利用 Cytoscape 软件进行复杂网络分析, 同时还验证了壮骨止痛方组方结构, 并有效地归纳了有效成分的“君、臣、佐、使”。壮骨止痛方药效物质基础为补骨脂素、淫羊藿苷、枸杞多糖、骨碎补总黄酮、齐墩果酸、金粉蕨素和牛膝甾酮。壮骨止痛方的补肾活血功效与其提高雌激素、增加骨密度等现代药理作用有较大的关联性。壮骨止痛方的有效成分符合各单味药“君、臣、佐、使”的组方结构, 壮骨止痛方其有效成分可经由 Wnt/ β -catenin、ERK/MAEK/NF- κ B 等多条信号通路相互作用, 多途径、多靶点共同发挥补肾活血壮骨作用。

关键词: 壮骨止痛方; 有效成分; 关联分析; 传统功效; 补肾活血; 补骨脂素; 淫羊藿苷; 枸杞多糖; 齐墩果酸

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)06-1451-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.032

Association analysis on effective components in Zhuanggu Zhitong Prescription

LIU Le-ping, LIU Hui-ping, XIE Jin-ru, YANG Lu-yu, WANG Meng-ya, PENG Ting, LIU Ping-an, ZHANG Guo-min

Key Laboratory of Translational Medicine in the Research of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: To analyze the intervention of the effective components of Zhuanggu Zhitong Prescription for the disease networks of blood stasis syndrome of kidney deficiency. According to the literature research on the traditional efficacy, active ingredients, and modern pharmacology of Zhuanggu Zhitong Prescription, the complex network analysis was performed by using cytoscape, and the structure of Zhuanggu Zhitong Prescription was also validated. The results showed that the effective constituents of Zhuanggu Zhitong Prescription were psoralen, epimedium glycosides, lycium barbarum polysaccharides, total flavonoids of *Rhizoma Drynariae*, oleanolic acid, fennelin, and inosterone. Moreover, four basic elements of Sovereign-Minister-Assistant-Guide (Jun-Chen-Zuo-Shi) of the effective components of Zhuanggu Zhitong Prescription were summarized effectively. There have a greater correlation between tonifying kidney and activating blood function of Zhuanggu Zhitong Prescription and modern pharmacology, such as raising estrogen levels and increasing the degree of bone mineral density. The effective ingredients in Zhuanggu Zhitong Prescription in line with the prescription structure of Sovereign-Minister-Assistant-Guide in the single herb medicine. The active ingredients of Zhuanggu Zhitong Prescription can interact with multiple signaling pathways through multi-channel and multi-target such as Wnt/ β -catenin, ERK/MAEK/NF- κ B and so on, in order to exert the effect of tonifying kidney and activating blood and strengthening bone.

Key words: Zhuanggu Zhitong Prescription; active ingredients; association analysis; traditional efficacy; tonifying kidney and activating blood; epimedium glycosides; lycium barbarum polysaccharides; oleanolic acid

壮骨止痛方是集中医理论及现代药理研究研制而成, 在传统中医方面具有补益肝肾、壮骨止痛之功效, 在现代医学亦可有效治疗骨质疏松症等疾病,

且已于 2005 年获得国家新药证书。目前, 壮骨止痛方相关的计算机生物学研究活跃, 通过应用数据分析及理论方法、大规模数学建模及计算机仿真技术

收稿日期: 2017-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81303123, 81573956); 湖南省中医药科研计划重点项目 (201612); 湖南省教育厅科学研究重点项目 (16A162); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201710541002); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目 (2015217, 2015220, 2016284, 2016281); 湖南省自然科学基金面上项目 (2018JJ2297)

作者简介: 刘乐平 (1996—), 女, 湖南长沙人, 本科, 研究方向为临床医学。

*通信作者 张国民, 教授, 硕士生导师, 主要从事中医方证药效作用研究。Tel: 13574819158 E-mail: 834095773@qq.com
刘平安, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药药理学研究。Tel: 13974819158 E-mail: 723679086@qq.com

等,对壮骨止痛方相关作用靶点的生物序列的片段拼接及序列对接、壮骨止痛方有效成分的识别基因及种族树结构进行大数据分析,通过计算机预测作用蛋白结构,从而构建生物数据库。本文基于数据库挖掘方法分析壮骨止痛方的传统功效及其有效成分发挥药效作用的关联性,利用 Cytoscape 进行相关性分析,采用 GEO 数据库在线分析工具 GEO2R 进行分析,应用 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 数据库中的 KEGG (京都基因与基因组百科全书) 筛选出相关信号通路;分析壮骨止痛方组成并对其进行“君、臣、佐、使”药物归类,利用“疾病-药物-有效成分-信号通路-基因-靶点”的网络结构分析其相互作用,对壮骨止痛方有效成分、主要功效及体内作用过程中主要影响靶点进行专业综合地分析,将中药传统理论与现代医学信息学研究相结合,以加快中医药理论验证实践,为壮骨止痛方临床用药提供参考。

1 壮骨止痛方的传统功效及应用

壮骨止痛方由补骨脂、淫羊藿、枸杞子、女贞子、骨碎补、狗脊、川牛膝组成。《本草经疏》称其:“益肝肾,则筋骨自坚”。方中补骨脂辛、苦,温,归肾经,温肾助阳为君;臣药淫羊藿,助君药温补

肾阳。而针对肝肾亏虚所致无法温养筋骨,淫羊藿又有强筋骨之功用。阴阳相生,“善补阳者,必于阴中求阳,则阳得阴助,而生化无穷”,故佐以枸杞子、女贞子,滋补肝肾之阴精,助肝肾之阳化生。狗脊补肝肾、强腰膝。骨碎补续伤止痛、通经活络、补中寓通、补而不滞。伍以川牛膝,亦逐瘀通经,且牛膝归肝、肾经,善走下,引诸药下行增强药效,为引经使药。诸药合之,具补肝肾、壮筋骨、止疼痛之功效。临床适用于“骨萎”“骨痹”及肾气衰、肝肾精不足之腰背疼痛、酸软少力、步履维艰、头目眩晕等。

2 壮骨止痛方的现代研究

2.1 壮骨止痛方单味药的活性成分及生物活性

以补骨脂、淫羊藿、枸杞子、女贞子、骨碎补、川牛膝、狗脊、化学成分为中文检索词,以 *Psoralea corylifolia*、*Herba Epimedii*、*Fructus Lycii*、*Ligustrum lucidum*、*Drynaria total flavonoids*、*Radix Cyathulae*、*Woodwardia japonica*、composition 为英文检索词,在万方数据知识服务平台、PubMed、Scifinder、VIP、CNKI 进行检索,对获得的文献数据^[1-12]进行分析,结合中国天然产物化学成分库的数据,得出 7 味药具有生物活性的化合物,见表 1。

表 1 壮骨止痛方中单味药的活性成分

Table 1 Effective components of single herb in Zhuanggu Zhitong Prescription

单味药	有效成分/部位	生物活性
补骨脂	补骨脂素	雌激素活性、抗肿瘤、抗菌(结核分枝杆菌)、止血、光敏剂
	补骨脂异黄酮	抗骨质疏松
	补骨脂酚	增强细胞增殖、雌激素样活性、抗菌
	补骨脂定	雌激素样活性、诱导内源性雌激素敏感性基因的表达、抗凝、抗真菌、细胞毒活性
	异补骨脂素	抗凝、抗骨质疏松
淫羊藿	淫羊藿苷	骨诱导潜能、促进成骨细胞生长、骨髓基质细胞增殖、抑制细胞钙化
	淫羊藿总黄酮	促进成骨细胞增殖和分化成熟、抑制血管生成、维持骨代谢的正平衡状态、抗衰老
	淫羊藿多糖	促进血小板凝聚、促进骨髓造血
枸杞子	枸杞多糖	保肝、抗肿瘤、抗衰老、调血脂、抗糖尿病、保护生殖系统、增强免疫功能
	烟酸	抗高血脂、扩张周边血管
	甜菜碱	降低血浆中高半胱氨酸浓度、镇静、解热镇痛、降低甲基供体、调节体内渗透压、促进脂肪代谢、抑制脂肪肝
骨碎补	骨碎补总黄酮	抗骨质疏松、抗炎
	柚皮苷	调血脂、抗氧化应激、抗炎、降血糖、抗骨质疏松
女贞子	齐墩果酸	抗血小板凝聚、保肝、促进色素形成、抗肿瘤、降血糖、调血脂
	女贞子多糖	抗氧化、抗衰老、免疫调节
狗脊	原儿茶酸	促成骨细胞增殖、抗血小板聚集
	金粉藤素	抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤
川牛膝	牛膝甾酮	促进蛋白质合成、抗血小板聚集、降血糖
	牛膝多糖	促红细胞免疫功能
	阿魏酸	抑制血小板聚集
	牛膝总皂苷	抗炎、镇痛、活血

2.2 壮骨止痛方的有效成分及现代药理作用

2.2.1 壮骨止痛方的有效成分 经过对文献调研的活性成分进一步筛选, 得到每一味药的有效成分或部位: 补骨脂中的异补骨脂素、补骨脂素、补骨脂定, 淫羊藿中的淫羊藿苷、淫羊藿总黄酮、淫羊藿多糖, 枸杞子中的枸杞多糖、甜菜碱、胡萝卜素, 女贞子中的女贞子素、齐墩果酸、女贞子多糖, 骨碎补中的骨碎补总黄酮、柚皮苷, 狗脊中的原儿茶酸、 β -谷甾醇, 川牛膝中的促脱皮甾酮、红甾酮、

杯苋甾酮、阿魏酸。

根据对壮骨止痛方药理作用的研究可知, 补骨脂素、齐墩果酸、枸杞多糖、淫羊藿苷、骨碎补总黄酮、金粉蕨素、牛膝甾酮的作用显著, 因此本文选取这 7 种有效成分/部位进行研究。

2.2.2 壮骨止痛方的现代药理作用 对壮骨止痛方的现代药理学研究进行文献调研后发现, 壮骨止痛方对内分泌系统和运动系统均有影响^[13-25], 如表 2 所示。

表 2 壮骨止痛方的现代药理研究

Table 2 Modern pharmacological studies on Zhuanggu Zhitong Prescription

作用系统	功效	现代药理作用
内分泌系统	增加血清雌二醇 (E_2) 含量	雌激素样作用; 通过兴奋垂体、肾上腺轴或性腺轴的功能, 促进肾上腺皮质分泌雌激素
	稳定细胞内的稳态	降低细胞的信号传导, 提高分泌颗粒素 II 的表达
	增加效应组织上雌激素受体的敏感性	机制不明确
	调节 Treg/Th17 平衡	作用于雌激素信号通路, 调控 Forkhead 家族转录因子 3(Foxp3) 和 RAR 相关孤儿受体 γt (ROR γt) 的表达
	调节胰岛素的生理效应	提高胰岛素受体的表达量
运动系统	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路	提升血清 β -catenin 的含量
	促进骨形成, 抑制骨吸收	降低血清甲状旁腺激素 (PTH) 含量, 调节神经肽 Y (NPY) 和 α -黑素细胞刺激激素 (α -MSH) 神经骨骼信号, 通过调节 RANKUOPG 的比值来影响 RANKL/RANK/OPG 系统, 抑制大鼠血清硬骨素 (sclerostin) 的表达
	促进成骨细胞的增殖分化	提高 TGF- β -Smad 通路的表达水平
	促进骨原细胞的增生	升高胰岛素样生长因子-II (IGF-II) 水平, 降低白细胞介素-6 (IL-6)、前列腺素 B (PGB) 水平
	降低骨转换	升高 E_2 水平, 降低降钙素水平
神经系统	调控骨生成及骨密度、骨量的增加	促进下丘脑瘦素受体表达, 增强瘦素中枢调节骨代谢作用, 瘦素与表达于脑干 5-羟色胺 (5-HT) 能神经元上的 Ob-Rb 相结合, 减少 5-HT 的合成并抑制 5-HT 与下丘脑腹内侧核上的 5-HT 受体 Htr2c 之间的信号传导
	保护骨骼肌	降低热休克蛋白的表达量
	调节下丘脑-垂体-靶腺轴	调节机体内环境中 Ca、P、Mg、Zn 等无机元素的平衡
	改善血液流变性, 降低血浆黏度	抑制红细胞的聚集指数, 抑制血小板聚集, 调节血脂
	促进微循环的血流, 改善肾上腺素引起的微循环障碍, 保证血液中钙及营养物质正常运输	延长由肾上腺素引起的血管反应的潜伏期, 使血管扩张, 血流加快, 血细胞团聚减轻
循环系统	降低血管内皮细胞内的钙浓度	钙通道阻滞剂样作用, 阻断钙通道, 减少外钙内流入细胞
	提高血管舒张性, 改善血液局部高凝状态, 加快血液循环	调节血管内皮细胞分泌的血管舒张活性因子和血管收缩因子

3 壮骨止痛方传统功效与现代药理的相关性研究

3.1 肾虚与血瘀的机制

中医讲究辨证论治, 壮骨止痛方则主要是针对肾虚血瘀型原发性骨质疏松症, 即肾虚血瘀证。

基于以往对该病发病机制及临床表现的研究显示, 从中医角度论证, 骨质疏松症源于肾虚, 而血瘀为该病发生的一个重要因素。因此, 壮骨止痛方的传统功效实质为补肾兼活血, 补肾为主,

活血为辅。经过文献调研,肾虚与血瘀的机制主要有以下几方面^[26-30]。

3.1.1 肾虚 《医经精义·中卷》指出:“肾藏精,精生髓,髓养骨,故骨者,肾之合也,髓者,精之所生也,精足则髓足,髓在骨内,髓足则骨强。”意为肾藏精生髓充骨,肾精充足,生髓有益,骨赖于髓养而坚固有力。《素问·痿论篇》亦云:“肾者水藏也,今水不胜火,则骨枯而髓虚,故足不任身,发为骨痿。”说明肾精亏虚则骨髓生化无源,骨骼失养而痿弱无力,导致骨质疏松。

研究显示,肾虚可通过多途径、多因素影响骨代谢。其一,肾虚会引起下丘脑-垂体-性腺轴的异常改变。李波等^[31]研究显示,肾阳虚动物血中皮质醇和睾酮水平降低的同时,下丘脑 CRH 基因表达量增加,同时垂体 POMC 基因表达量降低。其二,肾虚引起肠钙-骨钙代谢紊乱,导致体内微量元素发生改变。其三,肾虚对骨质疏松症相关基因的表达、调控也会产生不良影响,蒋淑君等^[32]的实验结果提示,肾阳虚动物性腺水平的损伤与钙调蛋白 mRNA 表达升高有关。孙鑫等^[33]研究发现,肾阳虚大鼠下丘脑中蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) α 与 PKC β_2 的表达发生改变,说明 PKC 的变化可能是肾虚发生的生物学机制之一。

3.1.2 血瘀 现代医学研究证实,血瘀的病理学基础是微循环障碍、血液流变学改变、血流动力学障碍等,其中,微循环障碍主要与血液黏滞性增高和红细胞变形能力降低两因素相关。何升华等^[34]研究表明,原发性骨质疏松症患者血细胞参数平均红细胞体积 (MCV)、红细胞体积分布宽度 (RDW-CV)、平均血小板体积 (MPV)、血小板体积分布宽度 (PDW) 4 项检测指标的异常升高与血瘀证及微循环障碍密切相关。

血瘀造成骨内微循环障碍,即血液中的营养物质无法进入骨组织,骨组织间营养吸收障碍,参与骨代谢的局部调节因子功能紊乱,导致成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收的稳态被打破,从而发生骨质疏松。

3.2 壮骨止痛方现代药理与传统功效的关联

根据前期调研^[35-62],结合肾虚与血瘀机制的研究,可发现具有补肾活血功效的有效成分。壮骨止痛方有效成分现代药理与补肾活血的关联见表 3。

4 壮骨止痛方有效成分发挥药效的关联性研究

根据所收集的数据,壮骨止痛方有效成分所发

挥的药效作用见表 4。异补骨脂素、补骨脂素均具有雌激素样作用;齐墩果酸、补骨脂定、杯苋甾酮、骨碎补总黄酮、金粉蕨素均能提高骨密度;异补骨脂素、补骨脂素、补骨脂定均能上调 TGF- β_1 的基因、蛋白表达水平;补骨脂定和杯苋甾酮均可增加骨小梁面积率;淫羊藿苷、柚皮苷不仅共同上调 BMP-2 的表达量,促进 BMSCs 骨向分化,也共同提高碱性磷酸酶活性、促进骨钙素表达和诱导钙化结节;柚皮苷、骨碎补总黄酮和枸杞多糖均能抑制 TNF- α 、IL-1 等细胞因子释放;柚皮苷和骨碎补总黄酮均可促进软骨细胞的增殖,保护软骨细胞的功能;柚皮苷和金粉蕨素共同刺激骨形态发生蛋白-2、骨桥蛋白和 I 型胶原的分泌;齐墩果酸、柚皮苷、杯苋甾酮和骨碎补总黄酮均能提高血钙、血磷水平;骨碎补总黄酮、枸杞多糖和金粉蕨素共同促进骨折的愈合,加速骨骼的生长;柚皮苷和骨碎补总黄酮均能增强 IGF-I 的活性。这些成分通过上述机制促进成骨细胞增殖、分化,增加骨形成以及抑制破骨细胞增殖、分化,降低骨吸收来共同发挥补肾壮骨的主要功效。

除此之外,杯苋甾酮和骨碎补总黄酮能降低血浆黏度、抑制血小板聚集,杯苋甾酮和枸杞多糖均可提高 SOD 活性;骨碎补总黄酮和金粉蕨素可以促进微循环血流量,通过各种方式协同发挥活血化瘀的辅助功效。

“共性”之外,一些成分还具有诸多“个性”。如齐墩果酸能调节基质金属蛋白酶的表达,补骨脂定能增强骨最大抗弯强度以及升高血清 E₂ 和 CT 水平,淫羊藿苷可上调 Runx 2 的表达量,促使 BMSCs 向成骨细胞分化并增加 ALP 分泌量、活性及 Osteocalcin 基因的表达,促进细胞矿化的发生,从而促使新生成骨细胞的成熟等。

5 壮骨止痛方有效成分组方结构及归类分析

壮骨止痛方中补骨脂为君药,是发挥壮骨止痛方补肾壮骨功效的“前锋”,淫羊藿为臣药,有辅助君药治疗主证之功效,枸杞子、骨碎补、女贞子、狗脊则合为佐药,治疗次要兼证,川牛膝为使药,引方中诸药直达病所。为剖析本方有效成分是不是满足“君、臣、佐、使”的组方结构,本研究使用 Scifinder 数据库从每个有效成分施展其功效的方面来进行分析。壮骨止痛方的有效成分主要为补骨脂素 (psoralen)、淫羊藿苷 (icariine)、枸杞多糖 (*Lycium barbarum polysaccharides*)、骨碎补总黄酮

表 3 壮骨止痛方有效成分现代药理与补肾活血功效的关联

Table 3 Association between modern pharmacology and tonifying kidney and activating blood function of effective components in Zhuanggu Zhitong Prescription

有效成分		传统功效的现代药理研究	
		补肾壮骨	活血化瘀
壮骨止痛 胶囊 A 部分石 油醚部 位(补骨 脂、女贞 子)	异补骨脂素	雌激素样作用, 促成骨细胞分化成熟, 抑制破骨细胞分化成熟; 升高成骨细胞转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 水平	
	补骨脂素	雌激素样作用, 促成骨细胞分化成熟, 抑制破骨细胞分化成熟; 升高 TGF- $\beta 1$ 水平	
	齐墩果酸	提高骨密度; 调节基质金属蛋白酶的表达, 促进成骨细胞成活, 促进骨形成; 提高血钙、血磷水平	
壮骨止痛 胶囊 B 部分无 水乙醇 部 位 (淫羊 藿、川 牛膝、 骨 碎 补、枸 杞子、 狗脊)	补骨脂定	提高骨密度, 增加骨小梁面积率, 增加骨最大抗弯强度, 升高 E_2 和降钙素 (CT) 水平, 升高 TGF- $\beta 1$ 水平	
	淫羊藿苷 (ICA)	升高 TGF- $\beta 1$ 水平; 上调成骨细胞诱导因子 BMP-2 的表达量, 促进骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 骨向分化; 上调 Runx 2 的表达量, 促进 BMSCs 骨向分化; 增加碱性磷酸酶 (ALP) 分泌量、活性及 Osteocalcin 基因的表达, 促细胞矿化; 上调 Cbfa1 和 BMP-4 mRNA 的表达; 促人成骨细胞内骨保护素 (OPG) 蛋白表达; 提高碱性磷酸酶活性; 促进骨钙素表达; 诱导钙化结节; 上调成骨细胞分化的关键基因 (BGP、OPN、COL1) 表达	
	柚皮苷	下调破骨细胞分化的关键基因 (RANK、TRAP、MMP-9、NFATc1) mRNA 的表达; 上调 C-fos mRNA 表达; 增强成骨样细胞促胰岛素样生长因子 (IGF-I) 的活性; 提高血钙、血磷水平; 抑制核转录因子- α (TNF- α)、IL-1 等细胞因子释放; 促进软骨细胞的增殖, 保护软骨细胞的功能; 上调 BMP-2 的表达量; 抑制 RANKL 的表达, 促进成骨细胞增殖分化和抑制破骨细胞活性; 提高碱性磷酸酶活性; 促进骨钙素表达; 刺激骨形态发生蛋白-2、骨桥蛋白和 I 型胶原的分泌; 诱导钙化结节	
	杯苋甾酮	增加骨小梁面积率; 增大骨小梁密度、总体积及密质骨面积, 减小骨髓腔面积; 提高血钙、血磷水平	降低血栓长度、湿质量和干质量, 改善红细胞变形能力; 抑制血小板聚集; 降低血浆黏度; 延长血浆复钙时间; 增加毛细血管开放数, 对抗肾上腺素引起的细动脉收缩; 提高超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; 提高过氧化氢酶 (CAT) 活性; 提高过氧化脂质 (LPO) 水平
	骨碎补总黄酮	抑制 TNF- α 、IL-1 等细胞因子释放; 增强 IGF-I 的活性; 抑制前列腺素 E_2 和 5-HT 释放, 发挥镇痛作用; 提高血钙、血磷水平; 提高骨密度; 促进软骨细胞的增殖, 保护软骨细胞的功能; 促进骨折的愈合, 加速骨骼的生长; 改善肾脏功能, 降低血中肌酐、尿素氮的含量; 上调 Smad 1、Smad 5 mRNA 的表达水平, 促进骨形成、修复骨损伤	降低血浆黏度, 抑制血小板聚集, 促进微循环血流
	枸杞多糖	抑制 TNF- α 、IL-1 等细胞因子释放; 促进骨折的愈合, 加速骨骼的生长; 促进巨噬细胞吞噬, 促进调节免疫功能	提高谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性; 提高 SOD 活性; 降低血清胆固醇 (TC) 及三酰甘油 (TG) 含量
	金粉蕨素	提高骨密度; 促进骨折的愈合, 加速骨骼的生长; 刺激骨形态发生蛋白-2、骨桥蛋白和 I 型胶原的分泌	促进微循环血流, 促进释放 NO 和前列环素, 抑制天冬氨酸调亡蛋白酶 3 活化

表 4 壮骨止痛方有效成分所发挥的药效作用

Table 4 Pharmacodynamic role of effective components in Zhuanggu Zhitong Prescription

药效作用	有效成分/部位									
	异补骨脂素	补骨脂素	齐墩果酸	补骨脂定	淫羊藿苷	柚皮苷	杯苋甾酮	骨碎补总黄酮	枸杞多糖	金粉蕨素
雌激素样作用	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
提高骨密度	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
促 TGF- β 1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
调节基质金属蛋白酶的表达	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
增加骨最大抗弯强度	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
增加骨小梁面积率	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
升高 E ₂ 和 CT 水平	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
上调 BMP-2 的表达量	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
上调 Runx 2 的表达量	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
增加 ALP 分泌量、活性及 Osteocalcin 基因的表达， 促细胞矿化	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
上调 Cbfa1 和 BMP-4 mRNA 的表达	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
促 OPG 蛋白表达	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
提高碱性磷酸酶活性	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
促进骨钙素表达	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
诱导钙化结节	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
上调 BGP、OPN、COL1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
下调 RANK、TRAP、MMP-9、NFATc1 mRNA 的表达	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
上调 C-fos mRNA 表达	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
抑制 TNF- α 、IL-1 等细胞因子释放	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
促进软骨细胞的增殖，保护软骨细胞的功能	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
抑制 RANKL 的表达	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
刺激骨形态发生蛋白-2、骨桥蛋白和 I 型胶原的分泌	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
增大骨小梁密度、总体积及密质骨面积，减小骨髓腔面积	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
抑制前列腺素 E ₂ 和 5-HT 释放	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
提高血钙、血磷水平	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
促进骨折的愈合，加速骨骼的生长	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
改善肾脏功能，降低血中肌酐、尿素氮的含量	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
上调 Smad 1、Smad 5 mRNA 的表达水平	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
促进巨噬细胞吞噬，促进免疫调节功能	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
增强 IGF-I 的活性	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
降低血栓长度、湿质量和干质量，改善红细胞变形能力	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
延长血浆复钙时间	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
降低血浆黏度	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
增加毛细血管开放数，对抗肾上腺素引起的细动脉收缩	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
提高 SOD 活性	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
提高 CAT 活性	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
提高 LPO 水平	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
抑制血小板聚集	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
促进微循环血流	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
提高 GSH-Px 活性	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
降低 TC 及 TG 含量	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
促进释放 NO 和前列环素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
抑制天冬氨酸凋亡蛋白酶 3 活化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

“+”表示该成分有此药效作用，“-”表示该成分无此药效作用

“+” indicates that the component has this effect, “-” indicates that the component has not this effect

骨功效的主要作用通路。从各味药的有效成分来看,补骨脂素涉及的信号通路最多,涉及 TGF- β /Smads、ERK/MARK/NF- κ B、mTOR、Hedgehog、PI3K/AKT、SCF/Kit/MITF、Caspase 凋亡信号通路、IL-1 β 炎症信号通路、Notch 和 Wnt- β -catenin 信号通路,这符合其在本方中作为君药的有效成分发挥主要作用的地位。其次,淫羊藿苷作为臣药的有效成分也涉及较多通路,除了共同通路外还与 TGF- β /Smads、Hedgehog、PI3K/AKT、cAMP-PKA 和 OPG/RANKL 信号通路有关。齐墩果酸和骨碎补总黄酮、枸杞多糖作为使药涉及通路也较多,除了共同作用通路外,齐墩果酸作用于 mTOR、PI3K/AKT、SIRT1/PML、Nrf2/HO-1、TBX20/PPAR α 、UCP2 和 FGF-2/p53 信号通路,骨碎补总黄酮涉及 TGF- β /Smads、PI3K/AKT、OPG/RANKL 和 GABA 信号通路,枸杞多糖涉及 PI3K/AKT 和 Hedgehog 信号通路。金粉蕨素和牛膝甾酮涉及的通路最少,除了共同作用通路外,分别作用于第 2 信使 NO 和 cAMP-PKA 通路。

综合单味药在方中的剂量、作用的靶点数目以及涉及的相关信号通路和第 2 信使等 3 方面的信息,发现补骨脂素在方中剂量最多,作用靶点、涉及的相关信号通路和第 2 信使数目最多,是壮骨止痛方补肾、活血、壮骨、止痛的“前锋”,所以为君;淫羊藿苷在方中剂量、作用靶点、涉及的相关信号通路和第 2 信使数目紧随君药其后,虽不及君药,但其能增益君药之效用,所以为臣;枸杞多糖、骨碎补总黄酮、齐墩果酸、金粉蕨素在以上方面较君药、臣药少,但四者与君、臣药之间所关联的信号通路或第 2 信使有所重合,故四者有辅助之效,故归为佐药,牛膝甾酮则在这 3 个方面最少,故为使药,引药下行。

因壮骨止痛方的主要疗效为补肾,所以按各成分可否直接发挥补肾作用分为直接成分和间接成分。直接成分主要为补骨脂素、淫羊藿苷、齐墩果酸和枸杞多糖,间接成分为骨碎补总黄酮、金粉蕨素和牛膝甾酮。

由此可见,以方中剂量大小、作用靶点数目、涉及相关信号通路和第 2 信使数的角度,是能够解释各味药之配伍及其有效成分组合的“君、臣、佐、使”。但仅仅从单一的角度来得出结论是不够的。随着现代中医的发展,相信在未来会有更多角度的组方结构分析。

6 讨论

在中医药历史的长河中,从《伤寒论》到《本

草纲目》,无数珍贵的中药配方被一一记载。然而在这巨大的知识库中,许多资源都分散各处,缺乏系统性,如何有效地整合、分析和利用这些资源,是现代中医面临的重要挑战。中医药在现代化研究的进程中不断地发展,中医药学与现代医学、生物学、计算机信息技术等多种新学科互相融合、相互影响,从而使多学科交叉融合成为中医药学科发展的重要趋势,数据挖掘是中医走向现代化的不可或缺的部分。

本文通过对壮骨止痛方中医药理论和现代药理学的文献研究,利用生物信息学技术在传统中医药理论和现代药理学之间架起一座桥梁,将各有效成分影响的作用信号通路沟通起来。对壮骨止痛方在复方、有效成分、分子靶向 3 个化学层次进行挖掘。

壮骨止痛方在传统中医理论上主治肾虚血瘀证,其传统的功效遵循了虚则补至的原则,补肾气温肾阳,活血化瘀。经过大量的文献研究,在现代药理学方面,壮骨止痛方的药效物质基础为补骨脂素、淫羊藿苷、枸杞多糖、骨碎补总黄酮、齐墩果酸、金粉蕨素和牛膝甾酮等有效成分。通过分析可发现,壮骨止痛方有效成分之间有其“共性”,即共同发挥补肾壮骨的主要功效,而各成分利用其“个性”来发挥其活血化瘀的辅助功效,二者合一,能有效治疗肾虚血瘀证。通过对壮骨止痛方有效成分的分析,并在其配伍上进行有效的归类,揭示了传统中医药理论和现代药理学的关联性。

基于利用“疾病-药物-有效成分-信号通路-基因-靶点”的网络结构分析壮骨止痛方各成分间的相互作用,揭开多分子药物在人体内作用的奥妙之处,既利用了现代化技术手段,又从中医传统理论出发,解释了中医药治疗病证的机制。对深入开展壮骨止痛方配伍规律的客观化和规范化研究打下夯实的基础;得出壮骨止痛方配伍的规律和单味药或是药对的频繁项集,为壮骨止痛方临床和实验研究提供思路,减少了研究的盲目性,缩短了研究的周期,促进了壮骨止痛方的中医辨证现代化和微观化。

参考文献

- [1] Ji G Q, Deng J, Mo Z C, et al. Study on antioxidant activity of *Drynaria fortune* extracts in vitro [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010, 31(8): 65-53.
- [2] Meng F H, Li Y B, Xiong Z L, et al. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim. [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(3): 189-193.

- [3] Zhou R, Li B G, Zhang G L. Chemical study on *Cyathula officinalis* Kuan. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(3): 245.
- [4] Qi W U, Yang X W, Yang S H, et al. Chemical constituents of *Cibotium barometz* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2007, 19(2): 240-234.
- [5] 谢 忱, 徐丽珍, 李宪铭, 等. 枸杞子化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(5): 323-324.
- [6] Yin Z, Zhang W, Zhang J, et al. Isolation, purification, structural analysis and coagulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Ligustrum lucidum* Ait. flowers [J]. *Chem Cent J*, 2017, 11(1): 98.
- [7] Wu JM, Ke X, Fu W, et al. Inhibition of hypoxia-induced retinal angiogenesis by specnuezhenide, an effective constituent of *Ligustrum lucidum* Ait. through suppression of the HIF-1 α /VEGF signaling pathway [J]. *Molecules*, 2016, 21(12): 1756.
- [8] Wu H T, He X J, Hong Y K, et al. Chemical characterization of lycium barbarum polysaccharides and its inhibition against liver oxidative injury of high-fat mice [J]. *Internat J Biol Macromol*, 2010, 46(5): 540-543.
- [9] 钱 茜. 骨碎补化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(3): 186-188.
- [10] 张金玲, 王小虎, 邓振涛, 等. 中药女贞子化学成分及药理作用研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(36): 4100-4101.
- [11] 江洪波. 女贞子及其化学成分功效的现代研究 [J]. 医学信息, 2013(17): 609-610.
- [12] 杨 军, 张小莉, 莫新民. 基于蛋白质组学壮骨止痛方治疗骨质疏松症的作用机理研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(12): 817-820.
- [13] 李劲平, 曾 英, 雷晓明, 等. 壮骨止痛胶囊抗实验性绝经后骨质疏松作用的三维组学分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3203-3207.
- [14] 曾 英, 李伟娟, 章文娟, 等. 壮骨止痛胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织 Treg/Th17 平衡的调节作用 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(7): 555-561.
- [15] 刘平安, 戴瑜娉, 孟小莎, 等. 基于 TGF- β -Smad 通路探讨壮骨止痛方对绝经后骨质疏松症的治疗 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(7): 31-34.
- [16] 易仲媛, 甘国兴, 郭小玲, 等. 壮骨止痛方对去卵巢骨质疏松大鼠下丘脑神经肽 Y 及 α -促黑素的影响 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(2): 20-23.
- [17] 杨 军, 曲 璇, 莫新民, 等. 壮骨止痛方对骨质疏松大鼠核因子 κ B 受体活化因子配体和骨保护素的影响 [J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(6): 14-16.
- [18] 易仲媛, 甘国兴, 李劲平, 等. 壮骨止痛方对去卵巢骨质疏松大鼠下丘脑瘦素及其受体的影响 [J]. 光明中医, 2016, 31(19): 2803-2806.
- [19] 杨 军, 莫新民. 壮骨止痛方对骨质疏松大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路、血清 Sclerostin 水平的影响 [J]. 中医药通报, 2017, 16(3): 67-69.
- [20] 林广珍, 蒋云霞, 莫文秋, 等. 中药活性成分防治骨质疏松机理研究概况 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(3): 47-48.
- [21] 张甲翠, 陈素芳. 老年骨质疏松症的研究新进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(20): 3742-3744.
- [22] 任之强, 庄 洪, 晋大祥. 活血化瘀法在治疗原发性骨质疏松症中的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(5): 569-574.
- [23] 沈家峰, 任 洁, 卢建华. 活血化瘀法用于绝经后骨质疏松症文献综述 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2016, 26(11): 1052-1055.
- [24] 史彩萍. 中医综合疗法治疗老年性骨质疏松症疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(35): 3950-3951.
- [25] 何升华, 任之强, 王 建, 等. 从血瘀对骨代谢的影响探讨血瘀在女性原发性骨质疏松症发病中的作用机制 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(1): 69-73.
- [26] 上官文姬, 李展春, 程光齐, 等. 骨碎补总黄酮对绝经后骨质疏松大鼠疼痛介质和疼痛反应影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(3): 10-12.
- [27] 杨岩冰, 曾 英, 李劲平, 等. 补骨脂-淫羊藿药对去卵巢骨质疏松型大鼠血清 IL-10、TNF- α 水平的影响 [J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(3): 159-161.
- [28] 刘慧萍, 彭 昕, 张国民, 等. 壮骨止痛方提取物对去势雌鼠 Dkk1 蛋白的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(10): 2393-2395.
- [29] 任之强, 赵志强, 晋大祥, 等. 骨质疏松症肾虚血瘀量化评分与性激素和血细胞参数关系研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(5): 560-563.
- [30] 钱 茜. 骨碎补化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(3): 186-188.
- [31] 李 波, 安 睿, 王新宏. 淫羊藿苷和补肾复方对肾虚大鼠下丘脑 CRH 基因和垂体 POMC 基因表达的影响 [J]. 中成药, 2008, 30(1): 132-134.
- [32] 蒋淑君, 崔存德, 许兰芝. 肾虚大鼠下丘脑-垂体-性腺轴钙调蛋白的基因表达及补肾中药的调整作用 [J]. 中国组织工程研究, 2004, 8(24): 5056-5057.
- [33] 孙 鑫, 郑洪新, 燕 燕, 等. 补肾与健脾方对骨质疏松症大鼠干预作用及下丘脑 PKC 蛋白表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(5): 387-389.
- [34] 何升华, 任之强, 王 建, 等. 从血瘀对骨代谢的影响探讨血瘀在女性原发性骨质疏松症发病中的作用机制 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(1): 69-73.
- [35] 殷方明, 肖涟波, 张 昀. 骨碎补柚皮苷对炎症及骨作用的相关研究进展 [J]. 中国骨伤, 2015, 28(2): 182-186.

- [36] 李风波, 孙晓雷, 马剑雄, 等. 柚皮苷对破骨细胞分化的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 308-312.
- [37] 苏友新, 闫虎, 陈宝军, 等. 壮骨健膝方含药血清中药物成分骨碎补柚皮苷对 IL-1 β 诱导兔退变软骨细胞“caveolin-p38MAPK”信号通路的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(12): 1492-1498.
- [38] 岑妍慧, 赵飞兰, 范蓉, 等. 生殖相关肾虚证和补肾中药作用机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(12): 2226-2228.
- [39] 翟远坤, 潘亚磊, 牛银波, 等. 柚皮苷及其代谢物柚皮素对乳鼠颅骨成骨细胞分化成熟影响的比较研究 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(16): 1373-1379.
- [40] 杨军, 张小莉, 刘仕杰, 等. 齐墩果酸对去卵巢骨质疏松症雌鼠的疗效及机理研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1564-1565.
- [41] 李劲平, 林清, 王小静, 等. 壮骨止痛胶囊 A 部分抗骨质疏松有效成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1049-1051.
- [42] 高毅. 淫羊藿苷对成骨细胞增殖分化的影响及机制探讨 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [43] 彭丽红, 马改霞. 骨质疏松症的中医药治疗研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(1): 98-101.
- [44] 栗会敏. 壮骨止痛胶囊 B 部分无水乙醇部位抗骨质疏松活性成分研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [45] 林清. 壮骨止痛胶囊 A 部分石油醚部位抗骨质疏松活性成分研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [46] 郭海玲, 赵咏芳, 王翔, 等. 淫羊藿苷对人成骨细胞增殖及 OPG 蛋白表达的实验研究 [J]. 中国骨伤, 2011, 24(7): 585-588.
- [47] 甘国兴, 莫新民, 李劲平, 等. 壮骨止痛方药效部位的筛选及其对骨质疏松雌鼠骨代谢相关激素的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 126-130.
- [48] 武密山, 赵素芝, 任立中, 等. 柚皮苷对乳鼠成骨细胞增殖及 c-fos、c-jun 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5): 677-681.
- [49] 吴昊, 查振刚, 姚平, 等. 淫羊藿苷对骨髓间充质干细胞骨向诱导的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(4): 410-415.
- [50] 朱慧锋, 王维佳, 王珠美. 骨碎补总黄酮对骨质疏松大鼠 Smad1 Smad5 基因表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(1): 200-204.
- [51] 吴海燕. 牛膝类药材的化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 吉林畜牧兽医, 2009, 30(12): 13-14.
- [52] 周军. 牛膝中化学成分和药理作用研究进展 [J]. 天津药学, 2009, 21(3): 66-67.
- [53] 吴涛, 徐俊昌, 南开辉, 等. 淫羊藿苷促进羊骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化 [J]. 中国组织工程研究, 2009, 13(19): 3725-3729.
- [54] 金珉廷, 郑洪新. 中医肾藏精生髓主骨理论与骨质疏松症 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(3): 35-36.
- [55] 刘剑刚, 谢雁鸣, 徐哲, 等. 骨碎补总黄酮的活血化瘀作用及对实验性微循环障碍和骨质疏松症的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(1): 46-49.
- [56] 孟大利, 李铄. 中药牛膝化学成分和药理活性的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(2): 120-124.
- [57] 陈红, 石圣洪. 中药川、怀牛膝对小鼠微循环及大鼠血液流变学的影响 [J]. 中国微循环, 1998(3): 182-184.
- [58] 郭音, 罗赤苗, 陈嘉勤, 等. NF- κ B 信号通路在小鼠阻塞性黄疸及运动与黑果枸杞多糖干预中的差异表达 [J]. 中国体育科技, 2017, 53(4): 119-124.
- [59] 刘锡建, 肖稳发, 曹俭, 等. 枸杞多糖的研究进展 [J]. 上海工程技术大学学报, 2008, 22(4): 299-302.
- [60] 段文杰. 枸杞子的药理作用及价值 [J]. 黑龙江医药, 2013, 26(1): 127-128.
- [61] 庾勤慧, 朱炳阳, 廖端芳, 等. 金粉蕨素抑制氧化应激诱导的血管内皮细胞凋亡 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(3): 283-286.
- [62] 庾勤慧, 黄红林, 谢志忠, 等. 金粉蕨素对溶血性磷脂酰胆碱损伤血管内皮依赖性舒张功能的保护作用及机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(1): 27-30.