

基于系统药理学的续断治疗骨质疏松作用机制研究

高歌¹, 潘晓华², 高雪¹, 贾芙蓉³, 温剑平^{1*}

1. 吉林大学基础医学院, 吉林 长春 130021

2. 吉林大学第一医院, 吉林 长春 130021

3. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021

摘要:目的 利用系统药理学的方法探讨续断治疗骨质疏松的可能作用机制。方法 使用中药系统药理学数据库(TCMSP)获得续断的药物成分, 筛选活性成分, 预测靶蛋白。在TTD和CTD数据库查询骨质疏松对应靶蛋白, 构建药物-靶蛋白-疾病相互作用网络。借助DAVID数据库对核心靶蛋白作用通路进行分析。利用String数据库构建主要信号通路的蛋白质相互作用网络。结果 获得7个续断活性成分及其63个靶蛋白, 筛选到骨质疏松疾病靶蛋白118个, 得到续断与骨质疏松交叉作用蛋白118个, 进而富集到与细胞增殖分化及免疫功能等相关的24条信号通路, 其中PI3K-AKT信号通路包含有最多数量的相关基因。String数据库分析表明AKT1、MAPK1、MAPK3在信号通路中出现的频率较高。结论 续断可能主要通过AKT1、MAPK1、MAPK3影响PI3K-AKT信号通路治疗骨质疏松。

关键词: 续断; 系统药理学; 靶蛋白; 信号通路; 骨质疏松

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4581-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.017

Mechanism of *Dipsaci Radix* in treatment of osteoporosis based on systematic pharmacology

GAO Ge¹, PAN Xiao-hua², GAO Xue¹, JIA Fu-rong³, WEN Jian-ping¹

1. School of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China

2. First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China

3. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China

Abstract: **Objective** To explore the possible mechanism of *Dipsaci Radix* in the treatment of osteoporosis based on systems pharmacology method. **Methods** The drug components of *Dipsaci Radix* were obtained from TCMSP database to screen active ingredients and predict target protein. The target protein of osteoporosis was searched in the TTD and CTD database in order to build Drug-Target protein-Disease interaction Network. Then, the analysis on the role of core target protein pathways were performed by DAVID tool. The protein interaction network of primary signal pathways was built in String database. **Results** Seven active ingredients of *Dipsaci Radix* and their 63 target proteins were obtained, 118 targets of osteoporosis were selected, and 118 cross-acting proteins between *Dipsaci Radix* and osteoporosis were obtained. Then 24 signaling pathways related to cell proliferation and differentiation and immune function were enriched, wherein PI3K-AKT signaling pathway contained the largest number of related genes. String database analysis showed that AKT1, MAPK1, and MAPK3 protein appeared frequently in signal pathways. **Conclusion** *Dipsaci Radix* may affect the PI3K-AKT signaling pathway mainly through AKT1, MAPK1, and MAPK3 for the treatment of osteoporosis. This study provides a new idea for the further mechanism study on the treatment of osteoporosis of *Dipsaci Radix*.

Key words: *Dipsaci Radix*; system pharmacology; target protein; signaling pathway; osteoporosis

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种以骨量减少、骨密度降低、骨脆性增加等为主要特征的全身代谢性骨质疾病^[1], 成骨细胞骨形成与破骨细胞骨

吸收间动态平衡的失调是造成其病理变化的主要原因^[2]。祖国医学认为肾气虚损、肝血不足是引起OP的主要病机, 通常在临床上表现为腰背酸软、双下

收稿日期: 2018-03-29

基金项目: 吉林省科技发展计划重点科技攻关项目(20150204070YY)

作者简介: 高歌(1994—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药治疗骨质疏松研究。Tel: 13195353956 E-mail: 709786635@qq.com

*通信作者 温剑平, 男, 博士, 副教授, 研究生导师, 研究方向为中药活性成分的研究。Tel: (0431)85619487 E-mail: Wenjp@jlu.edu.cn

肢乏力、关节酸痛等。中医治疗 OP 的原则重在调补肝、脾、肾^[3]。

续断为川续断科植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的干燥根，以“续折接骨”而得名，明代地方本草专著《滇南本草》云其“补肝，强筋骨，定经络，止经中（筋骨）酸痛”。常用于治疗筋伤骨折、腰膝酸软^[4]，目前其亦是治疗 OP 常采用的中药之一。复方补骨脂冲剂、补肾健骨胶囊、复方杜仲健骨颗粒等治疗 OP 的制剂中均含有续断。现代研究认为多成分、多靶点是中药发挥治疗作用的特点之一。系统药理学通过建立多个元素间相互作用模式，分析中药成分的可能作用机制，为中药现代化研究提供了一种有效手段^[5]。本研究利用系统药理学方法对续断活性成分、靶蛋白和所涉及的信号通路进行分析，探讨其可能作用机制，为其治疗 OP 的实验研究提供理论依据。

1 方法

1.1 药物成分检索及筛选

从中药系统药理学数据库^[6] (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database, TCMSP) 中获得续断的化学成分，利用口服生物利用度 ($OB \geq 30\%$) 和类药性 ($DL \geq 0.18$)^[7] 筛选出符合标准的化合物。

1.2 药物靶蛋白预测

将筛选出的续断活性成分利用 TCMSP 数据库中小分子化合物目标识别的功能，获得化合物所对应的靶蛋白名称。利用 UniProt 数据库 (www.uniprot.org) 可以将靶蛋白名称转换为标准基因，使用 Cytoscape 3.2.1 软件建立药物活性成分和靶蛋白之间的可视化联系^[8]。

1.3 疾病靶蛋白检索

使用 TTD (Therapeutic Target Database, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>) 和 CTD (Comparative Toxicogenomics Database, <http://ctdbase.org/>) 2 个数据库检索 OP 相关靶蛋白^[9]。在数据库中以“osteoporosis”和“homo sapiens”为关键词进行检索。

1.4 药物-靶蛋白-疾病相互作用网络的构建与分析

利用 Bisogenet 软件研究续断活性成分与靶蛋白及疾病之间的相互联系，将数据进行可视化处理及分析^[10]。该软件可以在 DIP (<http://dip.doe-mbi.ucla.edu/>) 和 BIOGRID (<http://www.thebiogrid.org>) 2 个蛋白质数据库的支持下，将预测靶蛋白与已知

数据相关联，建立蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。本研究利用 Bisogenet 软件得到药物靶点及疾病靶点的蛋白质网络关系图。将 2 个网络进行拓扑分析，得到核心靶点。

1.5 核心靶蛋白相关通路分析

将核心靶蛋白输入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 搜索列表中，富集得到核心靶蛋白相关信号通路^[11]。利用 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 分析主要信号通路中靶蛋白之间的相互联系。

2 结果

2.1 活性成分及靶蛋白分析

本研究查询到续断包含的 31 种成分，利用药物的吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 过程参数 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为筛选标准对这 31 种成分进行分析，得到 6 个活性成分，另根据文献报道^[12-13] 添加川续断皂苷 VI，7 个化合物信息见表 1。

表 1 续断中具有良好口服生物利用度和类药性的化合物
Table 1 Compounds with good oral bioavailability and drug-like in *Dipsaci Radix*

MOL-ID	化合物名称	OB/%	DL
MOL003152	1,7-二羟基-3-甲氧基咕吨酮	64.06	0.21
MOL009323	林生续断苷 III	56.47	0.43
MOL009312	3,5-二咖啡酰奎宁酸	48.14	0.68
MOL009317	藏岩仙皂苷 A	43.31	0.81
MOL000358	beta-谷甾醇	36.91	0.75
MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75
MOL003106	川续断皂苷 VI	1.67	0.07

利用 TCMSP 查询表 1 化合物对应的靶蛋白，得到 63 个靶蛋白，建立药物活性成分和靶蛋白之间的网络关系图，见图 1。分析显示 7 个活性成分通过 90 条边与 63 个靶蛋白相连。其中有文献报道的川续断皂苷 VI 与 13 个靶蛋白相关联。

2.2 药物-靶蛋白-疾病相互作用网络分析

在 TTD 和 CTD 2 个数据库中查询到 118 个 OP 疾病靶蛋白。将药物靶蛋白的 PPI 网络和疾病靶蛋白的 PPI 网络进行交联分析，结果见图 2。药物靶蛋白的 PPI 网络中有 2 235 个节点 (靶蛋白)，45 033 条边。疾病靶蛋白 PPI 网络中有 4 403 个节点 (靶蛋白)，102 537 条边。将药物靶蛋白 PPI 网络和疾病靶蛋白 PPI 网络相映射后，得到核心靶蛋白 118 个。

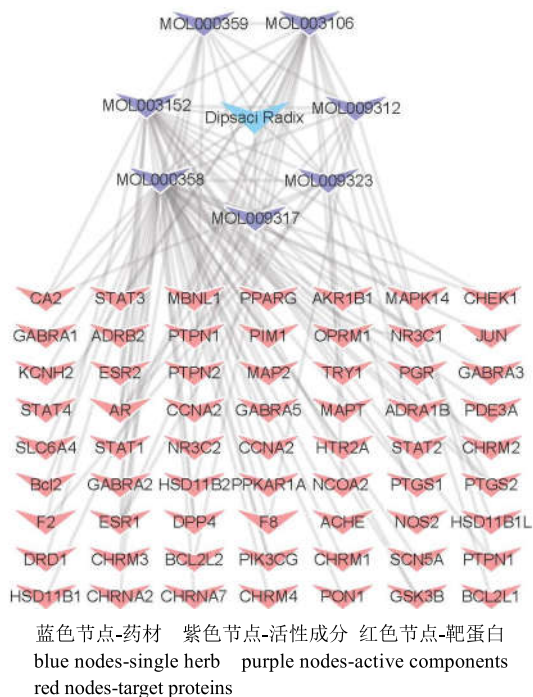


图 1 药物-成分-靶蛋白网络图

Fig. 1 Drug-components-target proteins network

2.3 核心靶蛋白相关通路分析

将 118 个核心靶蛋白导入 DAVID 数据库中进行通路富集分析, 共得到 24 条信号通路, 见表 2。

2.4 信号通路所含核心靶蛋白相互作用网络

提取核心靶蛋白数量排名前 5 的信号通路, 利用 String 数据库构建其中所含核心靶蛋白的相互作用网络, 见图 3。分析显示图 3 中有 20 个节点, 123 条边, 平均节点度为 12.3。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、促分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、MAPK3 均通过 18 条线与其他核心靶蛋白相连。节点上的不同颜色分别代表不同信号通路, AKT1、MAPK1、MAPK3 同时存在于 5 条通路中, 为 PI3K-AKT、甲状腺激素、MAPK、FoxO 和 HIF-1 信号通路的共同分子。

3 讨论

续断作为治疗骨折、骨质疏松配方药物中的重要成分在临床上得到了较为广泛的应用。在实验研究方面已经证明了其具有促进成骨生长等方面作用, 但其作用信号通路尚未得到充分的研究。

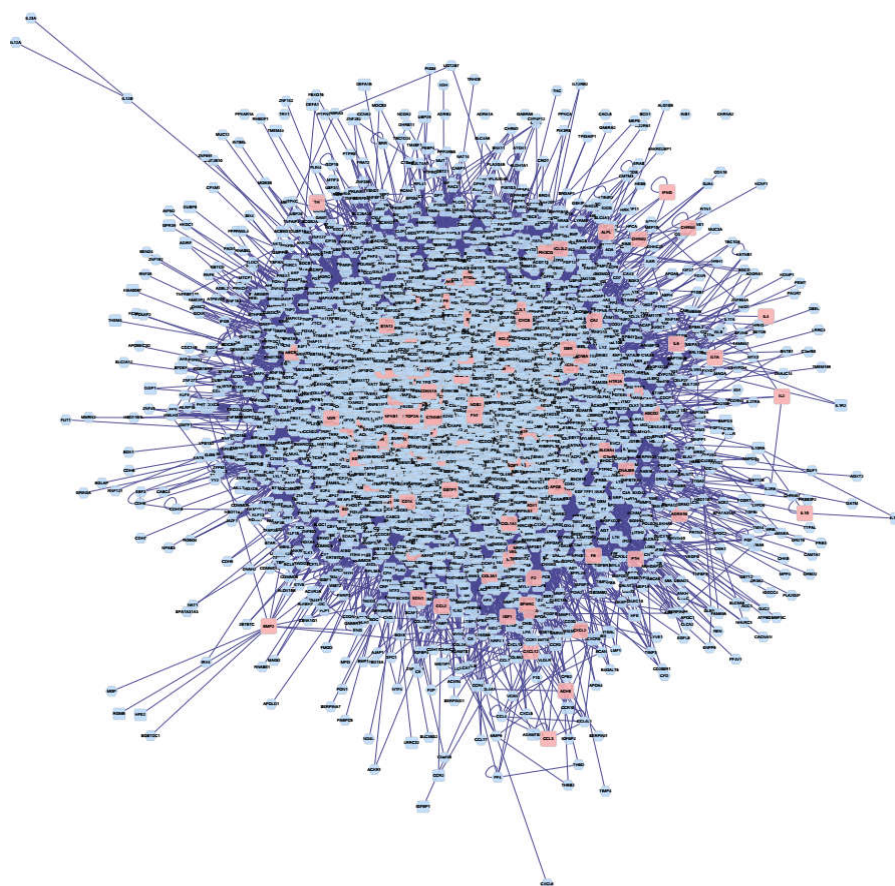


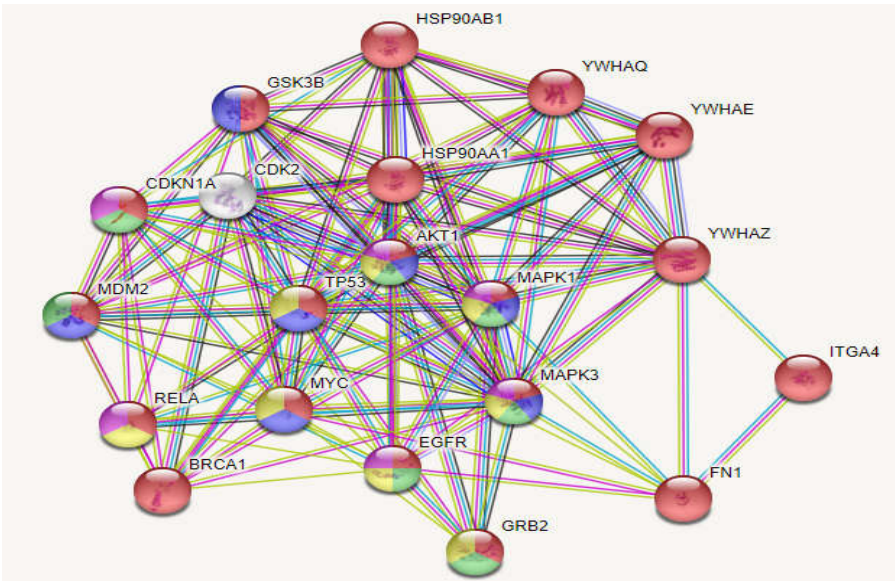
图 2 药物-靶蛋白-疾病 PPI 网络图

Fig. 2 Drug-target proteins-diseases PPI network

表 2 续断活性成分影响 OP 的信号通路

Table 2 Effects of active ingredients of *Dipsaci Radix* on related signaling pathways of osteoporosis

信号通路名称	所含靶蛋白数	蛋白占比/%	P 值
PI3K-AKT signaling pathway	20	16.9	3.1×10^{-7}
thyroid hormone signaling pathway	14	11.9	6.3×10^{-9}
MAPK signaling pathway	13	11.0	2.6×10^{-4}
FoxO signaling pathway	12	10.2	2.8×10^{-6}
HIF-1 signaling pathway	11	9.3	1.1×10^{-6}
Wnt signaling pathway	11	9.3	2.5×10^{-5}
estrogen signaling pathway	10	8.5	1.1×10^{-5}
hippo signaling pathway	10	8.5	2.9×10^{-4}
ErbB signaling pathway	9	7.6	3.1×10^{-5}
TGF- β signaling pathway	8	6.8	1.8×10^{-4}
chemokine signaling pathway	8	6.8	1.7×10^{-2}
B cell receptor signaling pathway	7	5.9	4.3×10^{-4}
T cell receptor signaling pathway	7	5.9	3.5×10^{-3}
cAMP signaling pathway	7	5.9	6.4×10^{-2}
TNF signaling pathway	6	5.1	1.8×10^{-2}
Jak-STAT signaling pathway	6	5.1	5.7×10^{-2}
notch signaling pathway	5	4.2	4.8×10^{-3}
NOD-like receptor signaling pathway	5	4.2	7.7×10^{-3}
GnRH signaling pathway	5	4.2	4.1×10^{-2}
toll like receptor signaling pathway	5	4.2	6.5×10^{-2}
sphingolipid signaling pathway	5	4.2	9.3×10^{-2}
VEGF signaling pathway	4	3.4	5.7×10^{-2}
p53 signaling pathway	4	3.4	7.1×10^{-2}
hedgehog signaling pathway	3	2.5	5.7×10^{-2}



节点-蛋白质 线-蛋白质间相互联系 亮蓝色线-数据源于蛋白数据库 紫色线-数据源于高通量实验 绿色及黑色线-基因邻域及共表达预测
黄色线-数据源于文本挖掘
nodes-proteins edges-protein-protein associations light blue line-data from curated databases purple line-data from high throughput experiment
green and dark blue line-predicted interaction of genetic neighborhood or gene co-expression yellow line-data by text mining

图 3 信号通路交联蛋白网络

Fig. 3 Signaling pathway crosslinked protein network

本研究通过研究续断活性成分对应的靶蛋白和相互作用蛋白、OP 靶蛋白和相互作用蛋白，分析两者的共有靶蛋白及共有靶蛋白所涉及的信号通

路。从信号通路角度探讨续断治疗 OP 的可能机制。
表 2 中富集得到的 24 条信号通路，有 14 条与细胞增殖、分化、凋亡等生理过程有关，包括

PI3K-AKT、MAPK、FoxO、Hedgehog、Hippo、ErbB、TGF- β 、Chemokine、cAMP、TNF、Jak-STAT、Sphingolipid、VEGF、p53。推测续断可能通过这些信号通路调节成骨细胞生成和减少破骨细胞的增殖、分化、凋亡而起到治疗 OP 的作用，其中 PI3K-AKT 包含最多数量的靶蛋白，可能是续断治疗 OP 较关键的信号通路。已有文献报道 PI3K-AKT、MAPK、TGF- β 、Hedgehog 4 条信号通路与 OP 有关，均可通过促进成骨细胞生成或减少破骨细胞分化影响 OP^[14-17]。续断的实验研究亦表明，其活性成分川续断皂苷 VI 可通过 PI3K-AKT、MAPK 信号通路对成骨发生有促进作用^[12-13,18]。

本研究富集到与胚胎发育有关的 3 条信号通路 Wnt、Estrogen、Notch，说明续断尚可能通过干细胞分化途径影响骨形成。已有文献证实川续断皂苷 VI 可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[13]。

图 3 的结果表明，核心靶蛋白 AKT1、MAPK1、MAPK3 发生多次交联，在这些信号通路中起到重要的枢纽作用，可能为续断治疗 OP 的关键靶蛋白。现有文献证明，激活后的 AKT 可以通过磷酸化下游的 RANK/RANKL 信号参与调控破骨细胞分化^[9]。活化后的 MAPK1、MAPK3 可以将信号传递至下游 ERK1/2、JNK 等信号通路从而促进成骨细胞的增殖与分化^[20]。本研究亦通过系统药理学方法揭示了 AKT、MAPK1、MAPK3 在抗 OP 信号通路中的重要性。

本研究富集的 24 条信号通路中尚有 HIF-1、GnRH 等 7 条信号通路无相关实验研究支持，这些信号通路为续断抗 OP 机制的研究提供了新的靶点。随着系统药理学方法的不断发展和完善，其对实验研究将会有越来越重要的指导意义，也将成为药物研究重要的前瞻手段。

参考文献

- [1] 范超领, 葛继荣. 补肾方药影响骨质疏松症相关信号转导通路的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(4): 446-451.
- [2] 宋芳婷, 李冬梅. 补肾中药抗骨质疏松机理研究进展 [J]. 黑龙江中医药, 2013, 42(1): 55-56.
- [3] Zhao X L, Feng Y X, Peng Y. Prevention and treatment of osteoporosis with Chinese herbal medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(4): 265-270.
- [4] 牛银波, 潘亚磊, 李晨睿, 等. 续断防治骨质疏松的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7): 892-894.
- [5] 王永华, 杨凌. 基于系统药理学的现代中药研究体系 [J]. 世界中医药, 2013, 8(7): 801-808.
- [6] Xue R, Fang Z, Zhang M, *et al.* TCMID: Traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, doi: 10.1093/nar/gks1100.
- [7] Zheng C, Wang J, Liu J, *et al.* System-level multi-target drug discovery from natural products with applications to cardiovascular diseases [J]. *Mol Divers*, 2014, 18(3): 621-635.
- [8] 李静, 高丽, 高耀, 等. 基于网络药理学的款冬花止咳化痰活性成分靶点探究 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 179-187.
- [9] Zhu F, Shi Z, Qin C, *et al.* Therapeutic target database updata 2012: A resource for facilitating target-oriented drug discovery [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, doi: 10.1093/nar/gkr797.
- [10] Martin A, Ochagavia M E, Rabasa L C, *et al.* Biso Genet: A new tool for gene network building, visualization and analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, doi: 1186/1471-2105-11-91.
- [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.
- [12] 武密山, 赵素芝, 任立中, 等. 川续断皂苷 VI 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的研究 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2): 222-226.
- [13] 李家, 林晓晨, 王雅冰, 等. 续断皂苷 VI 对小鼠骨髓基质干细胞成骨分化的影响 [J]. 口腔颌面修复学杂志, 2017, 18(1): 28-32.
- [14] 陈亚辉, 龚忠勤, 崔燎, 等. PI3K/Akt 信号通路在骨质疏松病理过程中的作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(3): 356-360.
- [15] 张波, 耿彬, 谭小义, 等. MAPK 信号通路骨质疏松关系的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(23): 2161-2164.
- [16] 王小娜, 李正, 王瑒, 等. TGF- β 1 在雷奈酸锶促进大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(12): 2357-2361.
- [17] 罗明, 黄宏兴, 黄红, 等. Hedgehog 信号通路与骨质疏松症 [J]. 中国骨伤, 2014, 27(2): 169-172.
- [18] Ke K, Li Q, Yang X F, *et al.* Asperosaponin VI promotes bone marrow stromal cell osteogenic differentiation through the PI3K/AKT signaling pathway in an osteoporosis model [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep35233.
- [19] Adapala N S, Barbe M F, Tsygankov A Y, *et al.* Loss of Cbl-PI3K interaction enhances osteoclast survival due to p21-Ras mediated PI3K activation independent of Cbl-b [J]. *Cell Biochem*, 2014, 115(7): 1277-1289.
- [20] Kim H K, Kim M G, Leem K H. Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis [J]. *Molecules (Basel Switzerland)*, 2013, 18(12): 15474-15489.