

基于网络药理学探讨黄芪-熟地黄药对治疗骨质疏松症的作用机制[△]

冯天笑^{1,2*}, 黄湘龙³, 霍路遥^{1,2}, 王平^{1,2#}(1. 天津中医药大学第一附属医院骨伤科, 天津 300381; 2. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381; 3. 天津中医药大学研究生院, 天津 301617)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)10-1157-08

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.10.002

摘要 目的:基于网络药理学方法,探讨黄芪-熟地黄药对治疗骨质疏松症(osteoporosis, OP)的作用机制。方法:首先,借助中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)及 UniProt 数据库筛选黄芪-熟地黄药对的活性成分及作用靶点,利用 Cytoscape 3.7.0 软件构建并分析中药-活性成分-作用靶点网络。然后,通过 GeneCards、OMIM 和 DisGeNET 数据库筛选 OP 相关靶点,将两者相互映射后获得黄芪-熟地黄药对治疗 OP 的作用靶点,运用 STRING 数据库及 Cytoscape 3.7.0 软件建立并分析交集靶点蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,筛选核心靶点。最后,分别利用 Funrich 3.1.3 软件和 David 6.8 数据库对核心靶点进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。结果:经筛选共得到黄芪-熟地黄药对活性成分 19 个,作用靶点 117 个,OP 相关靶点 3 630 个,中药-疾病交集靶点 83 个。经网络拓扑学分析后筛选出 25 个核心靶点,主要包括 IL-6、JUN、VEGFA、TNF、TP53、MAPK1、MAPK8、IL-1 β 、EGF 和 PTGS2 等。GO 功能富集分析结果显示,核心靶点涉及到的生物过程主要包括影响类固醇受体通路、免疫反应和信号转导等;分子功能层面表明黄芪-熟地黄药对可能通过影响细胞因子、配体依赖性核受体和蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶等活性等分子途径发挥抗 OP 作用。细胞成分层面表明细胞外、核质等细胞组分可能与黄芪-熟地黄药对抗 OP 的机制有关。KEGG 通路富集分析结果显示,核心靶点基因涉及到的信号通路主要与细胞增殖、分化,炎症和代谢相关通路有关。结论:黄芪-熟地黄药对治疗 OP 的作用机制呈多成分、多靶点和多通路的特性;可能通过影响机体成骨细胞和破骨细胞的增殖、分化,炎症反应和代谢等途径维持机体骨形成-骨吸收动态平衡,发挥抗 OP 的作用。

关键词 骨质疏松症;网络药理学;黄芪-熟地黄;作用机制

Mechanism of Drug Pair of Astragali Radix and Rehmanniae Radix Praeparata in the Treatment of Osteoporosis Based on Network Pharmacology[△]

FENG Tianxiao^{1,2}, HUANG Xianglong³, HUO Luyao^{1,2}, WANG Ping^{1,2}(1. Dept. of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China; 2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381, China; 3. Dept. of Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To probe into the mechanism of drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata in the treatment of osteoporosis (OP) based on network pharmacology. METHODS: Traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and UniProt database were adopted to screen the active ingredients and effect targets of the drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata, the Cytoscape 3.7.0 software was used to construct and analyze traditional Chinese medicine-active ingredients-effect targets network. Then the OP-related targets were screened by GeneCards, OMIM and DisGeNET databases, the effect targets of the drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata for the treatment of OP were obtained by mapping them to each other, STRING database and Cytoscape 3.7.0 software were used to establish and analyze the intersection targets and protein-protein interaction (PPI) network to screen the core targets. Finally, the Funrich 3.1.3 software and David 6.8 database were respectively adopted to conduct gene ontology (GO) functional

[△] 基金项目:王平劳模创新工作室-天津市教委资助项目(No. 津教工[2013]号);中医传承工作室-天津卫计委资助项目(No. 津卫中[2017]193号)

* 硕士研究生。研究方向:中医药防治骨与关节疾病。E-mail: fengtianxiao123@163.com

通信作者:主任医师,博士生导师。研究方向:中医药防治骨与关节疾病。E-mail: yfywangping@sina.com

enrichment analysis and the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. RESULTS: Totally 19 active ingredients, 117 effect targets, 3 630 OP-related targets and 83 intersection targets of traditional Chinese medicine-diseases in the drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata were screened out. After network topology analysis, 25 core targets were screened, including IL-6, JUN, VEGFA, TNF, TP53, MAPK1, MAPK8, IL-1 β , EGF and PTGS2, etc. The results of GO functional enrichment analysis showed that the core targets mainly involving biological processes included steroid receptor pathway, immune response and signal transduction, etc; at the molecular functional level, the drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata may exert its anti-OP effects through affecting molecular pathways including cytokines, ligand-dependent nuclear receptors and protein serine/threonine kinases, etc. At the cellular components level, the extracellular, nucleoplasm and other cellular components may be related to the anti-OP mechanism of the drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata. The results of KEGG pathway enrichment analysis showed that the core target genes mainly involving signaling pathways related to cell proliferation, differentiation, inflammation, and metabolism-related pathways. CONCLUSIONS: The mechanism of drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata in the treatment of OP presents the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway; which may affect the proliferation and differentiation of osteoblasts and osteoclasts, inflammatory response and metabolism to maintain the dynamic balance of bone formation-bone resorption, and exert anti-OP effects.

KEYWORDS Osteoporosis; Network pharmacology; Drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata; Mechanism

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨微观结构破坏和骨的脆性增加为病理特征的全身性骨骼疾病^[1]。随着人口老龄化的进展,我国 OP 及骨质疏松性骨折 (osteoporotic fracture, OPF) 的发病率逐年升高,致死率和致残率逐渐升高,严重影响老年患者的生活质量^[2-3]。预计至 21 世纪中叶,我国 OP 患者或低骨量人群数量将达到 2.12 亿,给个人、家庭和社会带来沉重的负担^[4]。OP 发病机制复杂,成骨细胞骨形成与破骨细胞骨吸收相耦联的骨代谢平衡紊乱是疾病形成和进展的关键病理成因^[5]。网络药理学通过构建药物生物作用网络,选取特定的靶点基因进行富集分析,探讨药物与疾病的相关性,预测中药治疗疾病的作用机制,指导新药研究与开发。本研究基于网络药理学的原理和

方法,分析黄芪-熟地黄药对的主要成分、作用靶点及 OP 相关靶标,并进一步对筛选的靶标进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析,以探讨黄芪-熟地黄药对抗 OP 作用机制,为进一步阐释其治疗 OP 的物质基础和作用机制提供理论依据,为后续其活性成分开发及新药发掘提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 数据库与软件

本研究所使用的数据库及相关软件见表 1,相关数据库及软件的使用时间截止至 2020 年 8 月;本研究的思路流程图见图 1。

表 1 本研究所使用的数据库及相关软件

Tab 1 Databases and related softwares used in this study

数据库或软件	网址	作用
中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)	http://lsp.nwu.edu.cn/tcmstp.php	收集黄芪-熟地黄药对活性成分及其对应的作用靶点信息
Uniport 数据库	http://www.uniprot.org/	作用靶点名称标准化
STRING 11.0 数据库	https://string-db.org/	蛋白相互作用分析
GeneCards 数据库	https://www.genecards.org/	预测疾病靶标
OMIM 数据库	https://www.omim.org/	预测疾病靶标
DisGeNET 数据库	https://www.uniprot.org/database/DB-0218	预测疾病靶标
Cytoscape 3.7.0 软件	https://cytoscape.org/	网络图构建及网络拓扑学分析
Funrich 3.1.3 软件	http://www.funrich.org/	GO 富集分析
David 6.8 数据库	https://david.ncifcrf.gov/	KEGG 通路富集分析
R 语言 3.6.3 软件	https://www.r-project.org/	韦恩图、条形图、柱状图和气泡图的构建

1.2 黄芪-熟地黄药对活性成分及作用靶点的获取

本研究借助 TCMSP 平台,以“黄芪”和“熟地黄”为检索词,检索黄芪-熟地黄药对富含的活性成分。基于 TCMSP 平台中 ADME 参数,主要设定口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 及类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为筛选条件对药对富含的活性成分进行筛选。化合物的 OB 及 DL 值越高,

表明化合物的活性和临床应用价值越高。经过筛选后,获得药对富含的活性成分及其对应的作用靶点信息。将所获取的作用靶点逐一输入 Uniport 数据库,设定物种为“Homo sapiens”,对作用靶点名称进行标准化处理。由于某些作用靶点在 Uniport 数据库中无法检索到标准名称,故删除该类作用靶点,实际获取的作用靶点较前有所减少。

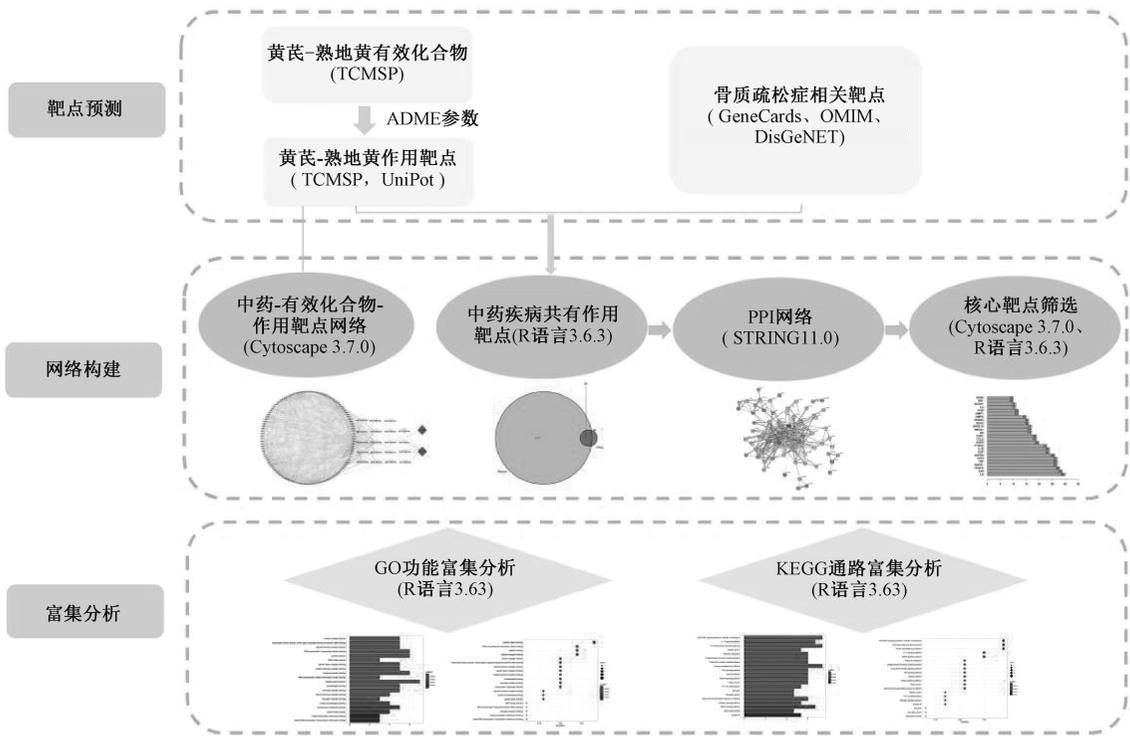


图1 黄芪-熟地黄药对治疗OP的网络药理学研究流程图

Fig 1 Flow chart of network pharmacologic research on drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata in the treatment of OP

1.3 中药-活性成分-作用靶点网络的构建及网络拓扑学分析

将所获取的活性成分及潜在作用靶点信息导入 Cytoscape 3.7.0 软件进行可视化处理,构建中药-活性成分-作用靶点网络。然后通过软件中的“Network Analyzer”插件对所构建的作用网络进行网络拓扑学分析,以节点度值(Degree)及介度中心性(betweenness centrality)来反应节点的重要程度,明确网络中较为重要的活性成分及作用靶点。

1.4 OP 相关靶标获取

以“Osteoporosis”为关键词,分别检索 GeneCards、OMIM 和 DisGeNET 数据库,收集疾病相关靶标,删除多余重复靶标后获得 OP 相关靶标。

1.5 中药-疾病靶点共有靶点构建

利用 R 语言 3.6.3 软件,将中药作用靶点与疾病相关靶标取交集,构建中药-疾病共同靶点的韦恩图,从而得到中药-疾病交集的靶点基因信息。

1.6 中药-疾病共有靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein Interaction, PPI) 网络的构建与核心靶点筛选

将中药-疾病交集靶点基因信息导入 STRING 11.0 数据库,设定物种为“Homo sapiens”,设置“High confidence (0.700)”及“Hide disconnected nodes in the network”,其余保留为系统默认参数,以此构建 PPI 网络。然后将所得信息导入 Cytoscape 3.7.0 软件进行分析,以节点度值大于平均节点度值为标准筛选核心靶点,并绘制条形图。

1.7 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

借助 Funrich 3.1.3 软件中的 Gene enrichment 功能对核心靶点的不同生物学过程进行分析,分别选取生物过程

(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC)模块,获取 GO 功能富集分析结果($P < 0.05$)。利用 David 6.8 数据库对核心靶点进行 KEGG 通路富集分析,获得显著富集的信号通路($P < 0.05$),利用 R 语言 3.6.3 软件绘制柱状图和气泡图。

2 结果

2.1 黄芪-熟地黄药对活性成分及作用靶点的获取结果

经过检索可知,黄芪-熟地黄药对在 TCMSP 中共有化合物 163 个,其中黄芪 87 个,熟地黄 76 个。按照 OB 及 DL 参数筛选后,共获得药对富含的活性成分 19 个,其中黄芪 17 个,熟地黄 2 个。经过 Uniport 数据库对其对应的作用靶点信息进行标准化处理后,共获得作用靶点 117 个。

2.2 中药-活性成分-作用靶点网络的构建及分析结果

借助 Cytoscape 3.7.0 软件构建起中药-活性成分-作用靶点网络图,结果见图 2。由图 2 可知,该网络共包含 136 个节点,1 387 条边。其中右侧菱形节点代表中药,中间三角形节点代表活性成分,左侧箭头形状节点代表作用靶点,每条边代表节点与节点之间相互作用的关系。网络拓扑学分析结果显示,该网络的平均节点度值为 20.323,平均介度中心性为 0.008。其中,槲皮素 (MOL000098)、山柰酚 (MOL000422)、豆甾醇 (MOL000449)、谷甾醇 (MOL000359) 和 7-O-甲基异丙醇胺 (MLO000378) 等活性成分,以及 IL-6、TNF、TP53、VEGFA、NOS3、MAPK1、ESR1、JUN、PTGS2 和 EGF 等作用靶点在网络中具有重要作用,可能为黄芪-熟地黄药对发挥治疗作用的核心活性成分及作用靶点。

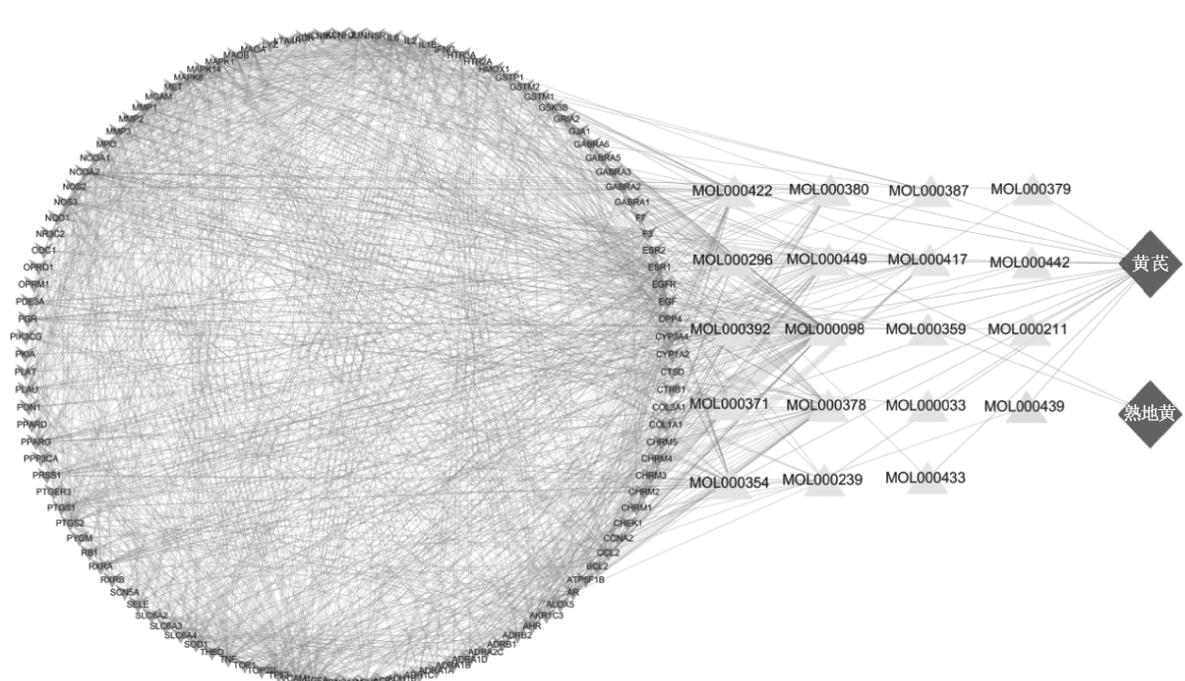


图2 中药-活性成分-作用靶点网络

Fig 2 Traditional Chinese medicine-active ingredients-effect targets network

2.3 疾病相关靶点获取及中药-疾病共有作用靶点的构建结果

经筛选去重后共获得 OP 相关靶点 3 630 个。将中药与疾病靶点相互映射共获得 83 个共有靶点,绘制韦恩图,见图 3。图 3 中,左侧较大圆形代表疾病靶点,右侧较小圆形代表中药靶点,交集部分代表两者共有作用靶点。

值大于平均节点度值的 25 个节点为治疗的核心靶点,结果见图 5。由图 5 可知,IL-6、JUN、VEGFA、TNF、TP53、MAPK1、MAPK8、IL-1 β 、EGF 和 PTGS2 等靶点度值显著高于其他靶点,在网络中发挥着重要的联系作用,可能为黄芪-熟地黄药对发挥其治疗作用的核心靶点。

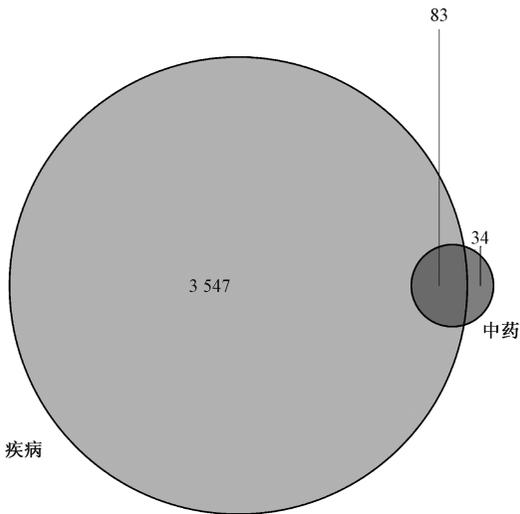


图3 中药-疾病共有作用靶点韦恩图

Fig 3 Venn diagram of common targets for traditional Chinese medicine-disease

2.4 中药-疾病交集靶点 PPI 网络的构建与核心靶点筛选结果

将 83 个共有作用靶点信息上传至 STRING 数据库,经处理后构建交集靶点 PPI 网络及相互作用信息,结果见图 4。由图 4 可知,该网络共包括 83 个节点,356 条边,各节点表示各作用靶点,每条边表示靶点蛋白间相互作用的关系。经网络拓扑学分析可知,该网络的平均节点度值为 9.247,选择节点度

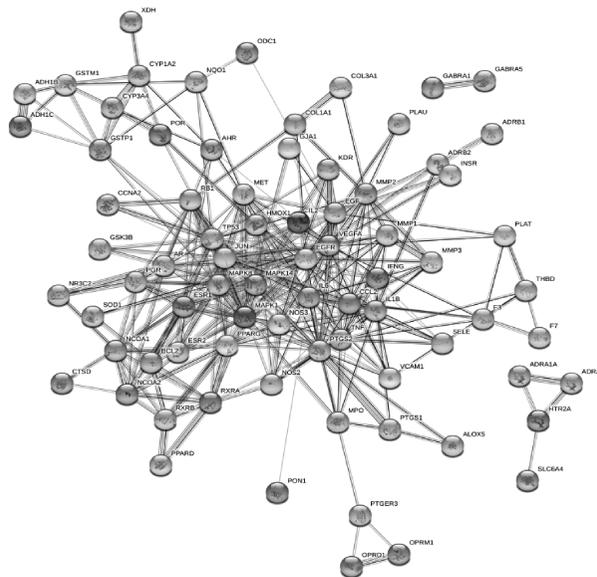


图4 中药-疾病共有靶点 PPI 网络

Fig 4 PPI network of common targets for traditional Chinese medicine-disease

2.5 GO 功能富集分析结果

在核心靶点的 GO 功能富集分析中,共获取了 70 个 GO 条目($P < 0.05$),其中 BP、MF 和 CC 各有 10、14 和 46 个条目,分别选取富集显著的前 5 条进行可视化。BP 主要包括类固醇受

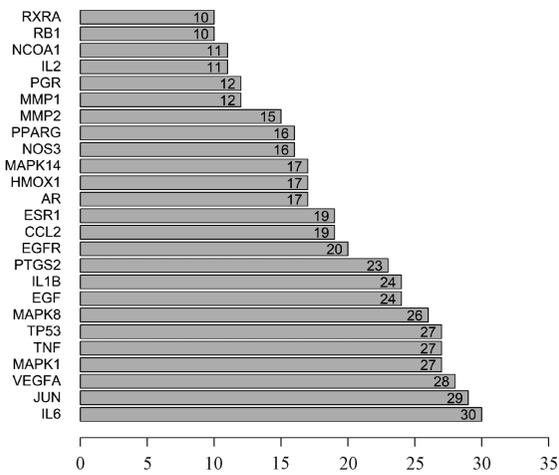


图5 核心靶点相关信息

Fig 5 Related information of core targets

体信号通路 (steroid hormone receptor signaling pathway)、免疫反应 (immune response)、信号转导 (signal transduction)、转录 (transcription) 和细胞通讯 (cell communication), 结果见图 6 (A)。MF 主要包括细胞因子活性 (cytokine activity)、配体依赖性核受体活性 (ligand-dependent nuclear receptor activity)、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (protein serine/threonine kinase activity)、金属肽酶活性 (metallopeptidase activity) 和生长因子活性 (growth factor activity), 结果见图 6 (B)。CC 主要包括细胞外空间 (extracellular space)、核质 (nucleoplasm)、细胞外 (extracellular)、细胞外区域 (extracellular region) 和血小板 α 颗粒管腔 (platelet alpha granule lumen), 结果见图 6 (C)。

2.6 KEGG 通路富集分析结果

黄芪-熟地黄药对治疗 OP 的核心靶点 KEGG 通路富集分析共获得 124 个条目 ($P < 0.05$)。按照 P 值基因富集数量综合过滤, 对其进行排序, 取排序居前 20 位的条目绘制柱状图及气泡图, 结果见图 7—8。由图 7—8 可知, 黄芪-熟地黄治疗 OP 核心靶点的 KEGG 通路主要涉及糖尿病并发症的 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路 (fluid shear stress and atherosclerosis)、人巨细胞病毒感染信号通路 (human cytomegalovirus infection)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (MAPK signaling pathway)、内分泌失调信号通路 (estrogen signaling pathway)、南美锥虫病 (Chagas disease/American trypanosomiasis)、C 型凝集素受体信号通路 (C-type lectin receptor signaling pathway) 和 TNF 信号通路 (TNF signaling pathway) 等。

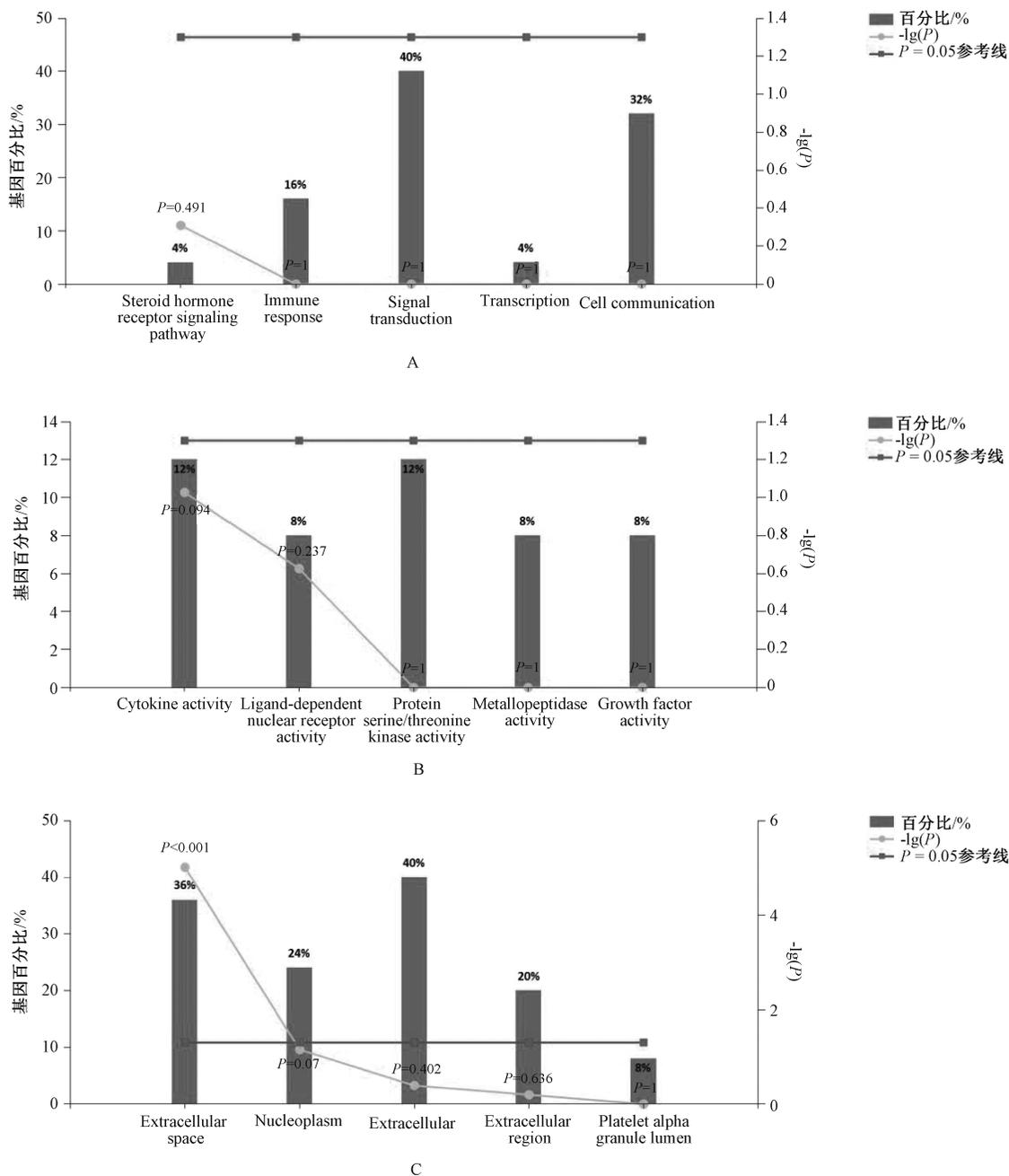
3 讨论

中药具有多组分的特征, 作用于人体的机制相对复杂。基于动物实验或细胞实验等方法的传统中药研究策略难以充分阐明黄芪-熟地黄药对治疗 OP 的作用机制。因此, 有必要在系统水平上分析药物与疾病相关的基因、蛋白和信号通路的生物学过程, 以揭示与其疗效相关的作用机制。本研究中发现, 黄芪-熟地黄药对主要富含槲皮素 (quercetin)、山柰酚 (kaempferol)、豆甾醇 (sitosterol) 和谷甾醇 (stigmasterol) 等 19

个活性成分。槲皮素具有多种生物学活性。郑红等^[6]的研究结果发现, 槲皮素可通过上调去势骨质疏松症大鼠的骨形态发生蛋白-2、Smad4 水平, 促进成骨细胞分化, 并可抑制破骨细胞的骨吸收过程, 诱导破骨细胞凋亡, 维持骨代谢稳定。顾艺婧等^[7]的研究结果发现, 槲皮素可清除衰老的骨髓间充质干细胞 (BMSC), 促进 BMSC 的增殖及分化, 防治雌激素缺乏性 OP。山柰酚具有雌激素活性, 可通过刺激雌激素信号转导, 激活 WNT/ β -catenin 信号通路诱导成骨细胞分化而发挥治疗作用^[8]。豆甾醇和谷甾醇均属于植物甾醇类化合物, 具有雌激素活性, 其中 β -谷甾醇是目前研究的热点之一。已有研究结果显示, β -谷甾醇可以诱导卵巢颗粒细胞 E2 的形成, 推动骨细胞膜雌激素受体结合促进成骨过程, 并且可以直接刺激成骨细胞 OPG mRNA 的表达, 抑制破骨细胞分化因子的分泌, 双向调控骨代谢动态平衡^[9]。由图 2 可知, 槲皮素、山柰酚、豆甾醇和谷甾醇等有效成分作用于多个靶点, 而 IL-6、TNF、TP53、VEGFA、NOS3、MAPK1、ESR1、JUN、PTGS2 和 EGF 等作用靶点也能与多个活性成分相互作用, 提示黄芪-熟地黄药对的有效成分之间存在协同调控作用。

PPI 网络显示, IL-6、JUN、VEGFA、TNF、TP53、MAPK1、MAPK8、IL-1 β 、EGF 和 PTGS2 等是黄芪-熟地黄药对治疗的核心靶点。IL-6、TNF 和 IL-1 β 等炎症因子的表达参与调控细胞的生长、分化等各方面, 能够发挥抗炎、免疫调节等作用, 影响 OP、腰椎间盘突出症和膝关节炎等退行性疾病的发生和进展^[10]。JUN 属于转录因子 AP-1 家族, 最新研究结果显示, JUN 可以通过增加骨祖细胞的数量促进骨形成^[11]; 在此基础上, Sun 等^[12]提出通过调节 JUN 的活性促进成骨可以作为 OP 的一种潜在治疗方法。VEGFA (血管内皮生长因子 A) 在骨骼损伤修复过程中发挥着特异性作用。Buettmann 等^[13]的研究结果发现, VEGFA 可显著促进髓内血管生成及成骨细胞分化, 可作为 OP 及 OPF 的有效治疗靶点之一。TP53 (肿瘤蛋白 P53) 可影响细胞周期、DNA 修复和细胞凋亡等多种生物学过程。Jia 等^[14]的研究结果发现, TP53 Arg72Pro 多态性与 OP 的发病风险密切相关。上述核心靶点的相互作用、共同调节可能是黄芪-熟地黄药对治疗 OP 的作用机制。本研究所聚焦的相关靶点可考虑作为今后实验研究的重要关注对象。

KEGG 通路富集分析结果提示, 黄芪-熟地黄药对可通过上下游多条通路, 作用于成骨细胞、破骨细胞和骨髓间充质细胞等, 从影响细胞增殖、分化, 炎症反应和代谢等多种层面调节骨代谢平衡, 从而发挥抗 OP 的作用。(1) 细胞增殖、分化相关通路: 成骨细胞-破骨细胞间相耦联的骨形成-骨吸收动态过程中的负平衡是 OP 发生和进展的主要病理成因及临床治疗关键点, 与此相关的信号通路主要包括 AGE/RAGE 信号通路、动脉粥样硬化信号通路和 MAPK 信号通路等。其中, AGERS 与受体 AGE 结合可激活 P38MAPK、ERK1/2 和 JNK 等多种细胞内信号级联, 激活核因子 κ B (NF- κ B), 促进破骨细胞的形成和分化, 影响骨重塑过程, 同时增加 IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达, 参与炎症细胞转导和破骨细胞自噬的过程, 影响 OP 进展^[15]。动脉粥样硬化信号通路可通过调控 NF- κ B 信号通路、MAPK 信号通路等下游通路调节骨稳态状态, 维持骨代谢平衡^[16]。活化的 MAPK 可通过促进成骨细胞的生成, 抑制破骨



A. BP 富集分析; B. MF 富集分析; C. CC 富集分析

A. BP enrichment analysis; B. MF enrichment analysis; C. CC enrichment analysis

图6 黄芪-熟地黄药对治疗OP的GO功能富集分析

Fig 6 GO functional enrichment analysis on drug pair of astragali radix and rehmanniae radix praeparata in the treatment of OP

细胞分化,发挥抗OP的治疗作用^[17]。(2)炎症相关通路:炎症因子可诱导并加速OP的发生和进展而发挥重要作用,与此相关的信号通路主要涉及IL-17信号通路、TNF信号通路等^[18]。IL-17是一种重要的炎症细胞因子,可通过JAK2/STAT3信号通路促进RANKL的表达,加速骨吸收^[19]。IL-17与其受体结合后可通过MAPK、NF-κB等途径诱导或协同其他炎症因子(如IL-6、IL-1β和TNF-α)发挥促炎效应,可诱导骨组织产生一氧化氮合酶(NOS)及基质金属蛋白酶,抑制基质修

复成分的产生,加速骨组织破坏^[20]。TNF信号通路介导的慢性炎症是OP发病和治疗过程中的重要途径。研究结果发现,TNF信号通路可通过调控其下游通路如MAPK信号通路、NF-κB信号通路和凋亡信号通路等影响骨重建过程^[21]。(3)代谢相关通路:内分泌失调可引起患者雌激素水平降低,导致成骨细胞和破骨细胞比例失衡,骨形成和骨吸收间呈负平衡,骨转换加快^[22]。郭鱼波等^[23]的研究结果发现,乳腺癌患者接受内分泌辅助治疗如芳香化酶抑制剂后可导致体内雌激

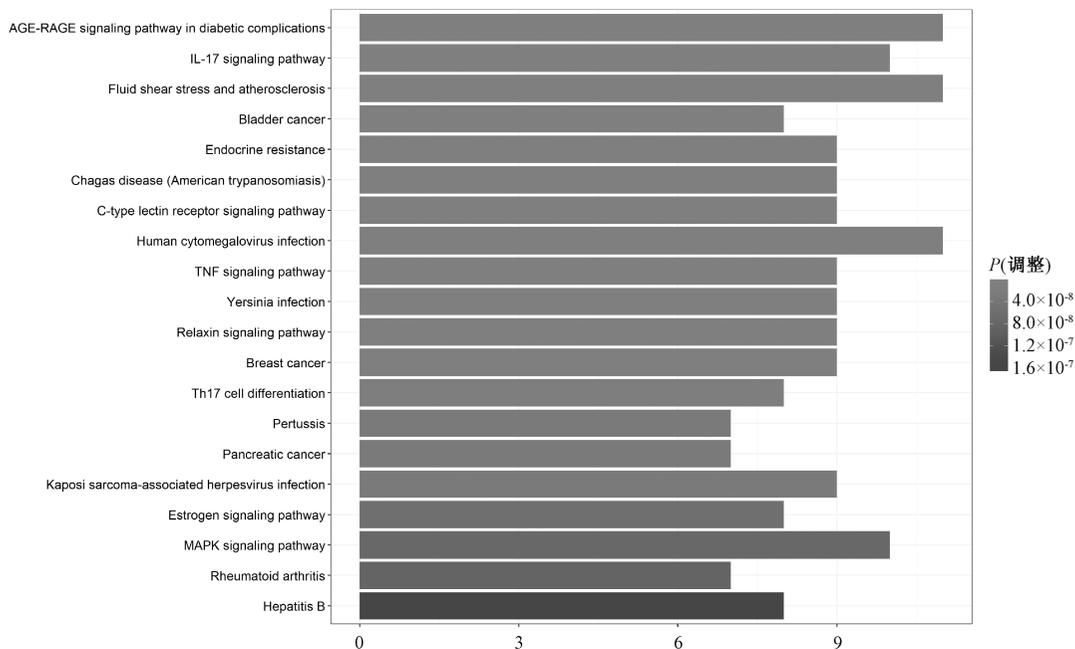


图7 KEGG 通路富集分析柱状图

Fig 7 Histogram of KEGG pathway enrichment analysis

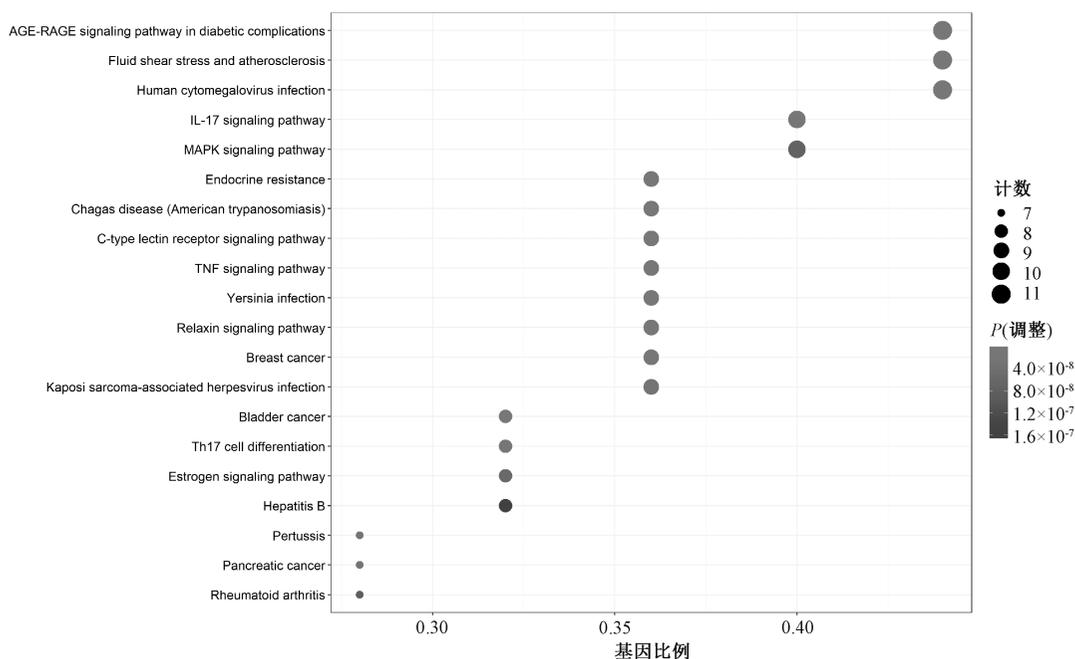


图8 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig 8 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis

素水平明显降低,骨量加速丢失,继发内分泌相关性 OP,甚至发生 OPF,极大威胁患者的生命健康。此外,富集程度较高的 KEGG 信号通路还包括人巨细胞病毒感染信号通路、南美锥虫病和鼠疫感染等信号通路,上述通路与 OP 的相关性尚缺乏文献支持,仍需进一步研究论证。

综上所述,本研究基于网络药理学研究方法,初步揭示了黄芪-熟地黄药对所富含的槲皮素、山柰酚、甾甾醇和甾甾醇等多种活性成分可能通过 AGE-RAGE 信号通路、动脉粥样硬化

化信号通路、MAPK 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路和内分泌失调信号通路等集中作用于 IL-6、JUN、VEGFA、TNF、TP53、MAPK1、MAPK8、IL-1 β 、EGF 和 PTGS2 等靶点基因,通过影响机体成骨细胞和破骨细胞的增殖、分化,炎症反应和代谢等途径,调节骨形成-骨吸收的动态平衡,维持骨代谢稳态。本研究仅通过网络药理学的方法预测黄芪-熟地黄药对治疗 OP 的潜在作用机制,上述结论及具体作用机制仍需进一步实验研究论证。

参考文献

- [1] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future[J]. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [2] Zeng Q, Li N, Wang Q, et al. The Prevalence of Osteoporosis in China, a Nationwide, Multicenter DXA Survey[J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(10): 1789-1797.
- [3] Marques A, Ferreira RJ, Santos E, et al. The accuracy of osteoporotic fracture risk prediction tools: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(11): 1958-1967.
- [4] Lin X, Xiong D, Peng YQ, et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China: current perspectives[J]. *Clin Interv Aging*, 2015, 10: 1017-1033.
- [5] Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 421746.
- [6] 郑红, 唐薇, 角建林, 等. 槲皮素通过促进成骨分化治疗去势骨质疏松症大鼠的分子机制[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5): 16-20.
- [7] 顾艺婧, 傅稼耀, 武文婧, 等. 槲皮素通过抗骨相关细胞衰老老作用治疗雌激素缺乏骨质疏松症的初步研究[J]. *同济大学学报: 医学版*, 2019, 40(3): 274-280.
- [8] Sharma AR, Nam JS. Kaempferol stimulates WNT/ β -catenin signaling pathway to induce differentiation of osteoblasts[J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 74: 108228.
- [9] 曾莉萍, 徐贤柱, 饶华, 等. 杜仲叶 β -谷甾醇对成骨细胞和卵巢颗粒细胞的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(5): 1051-1053.
- [10] Raposo M, Bettencourt C, Ramos A, et al. Promoter variation and expression levels of inflammatory genes IL1A, IL1B, IL6 and TNF in blood of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patients[J]. *Neuromolecular Med*, 2017, 19(1): 41-45.
- [11] Lerbs T, Cui L, Muscat C, et al. Expansion of bone precursors through Jun as a novel treatment for osteoporosis-associated fractures[J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 14(4): 603-613.
- [12] Sun Z, Yin Z, Liu C, et al. The changes in the expression of NF-KB in a degenerative human intervertebral disc model[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(1): 115-122.
- [13] Buettmann EG, McKenzie JA, 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.
- [14] Jia F, Sun R, Li J, et al. Interactions of Pri-miRNA-34b/c and TP53 Polymorphisms on the Risk of Osteoporosis[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(7): 398-401.
- [15] 孙菁, 朱媛媛, 郭海英, 等. 基于 AGEs/RAGE/NF- κ B 通路探讨老年性骨质疏松症发病机制[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(6): 919-923.
- [16] 马江涛, 黄红, 万雷, 等. 骨碎补治疗骨质疏松性骨折的网络药理学研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(7): 89-92.
- [17] Ge C, Xiao G, Jiang D, et al. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development[J]. *J Cell Biol*, 2007, 176(5): 709-718.
- [18] 徐慧敏, 黄传兵, 毛古燧, 等. 炎症因子在类风湿关节炎合并骨质疏松发病机制中的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2018, 7(6): 63-67.
- [19] Wang Z, Tan J, Lei L, et al. The positive effects of secreting cytokines IL-17 and IFN- γ on the early-stage differentiation and negative effects on the calcification of primary osteoblasts in vitro[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 57: 1-10.
- [20] Kotake S, Yago T, Kawamoto M, et al. Role of osteoclasts and interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: crucial 'human osteoclastology' [J]. *J Bone Miner Metab*, 2012, 30(2): 125-135.
- [21] Zhao B. TNF and Bone Remodeling [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, 15(3): 126-134.
- [22] 马江涛, 黄红, 万雷, 等. 基于网络药理学探讨黄芪治疗肌少——骨质疏松症的作用机制[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(11): 2367-2374.
- [23] 郭鱼波, 郭林涛, 沈静, 等. 乳腺癌内分泌相关骨质疏松的机制及其防治的前景探讨[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(10): 1375-1383.

(收稿日期: 2021-02-24)

(上接第 1156 页)

- [12] 冯飞, 许崇涛. 利血平抑郁模型的剂量探讨[J]. *汕头大学学报: 医学版*, 2007, 20(4): 223-225.
- [13] Park BK, Kim YR, Kim YH, et al. Antidepressant-like effects of Gyejibokryeong-hwan in a mouse model of reserpine-induced depression[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 5845491.
- [14] Siemian JN, Wang K, Zhang Y, et al. Mechanisms of imidazoline I₂ receptor agonist-induced antinociception in rats: involvement of monoaminergic neurotransmission [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(9): 1519-1534.
- [15] Dutta AK, Santra S, Sharma H, et al. Pharmacological and behavioral characterization of D-473, an orally active triple reuptake inhibitor targeting dopamine, serotonin and norepinephrine transporters[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113420.
- [16] Adeoluwa OA, Aderibigbe AO, Bakre AG. Evaluation of antidepressant-like effect of *Olax Subscorpioidea Oliv.* (Olaaceae) extract in mice[J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2015, 65(6): 306-311.
- [17] Ozaki M, Weissbach H, Ozaki A, et al. Monoamine oxidase inhibitors and procedures for their evaluation in vivo and in vitro[J]. *J Med Pharm Chem*, 1960, 2: 591-607.
- [18] 江南, 许晓燕, 余梦瑶, 等. 当药黄酮抗抑郁作用研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(1): 129-134, 162.
- [19] 徐永君, 盛慧. 抑郁症发病机制研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(3): 323-326.
- [20] 周荣仙, 熊磊, 王纳. 中药抗抑郁机制研究进展[J]. *云南中医学院学报*, 2019, 42(1): 98-102.
- [21] 孟倩, 周志焕, 梅妍. 中药可治抑郁症吗? [J]. *医学争鸣*, 2020, 11(1): 42-46.

(收稿日期: 2021-02-20)