

· 基础研究 ·

基于网络药理学的续断抗骨质疏松分子作用机制研究

阚雪纯,何润东,葛佳颖,吴俊*,苗登顺*

南京医科大学基础医学院人体解剖学系,江苏 南京 211166

[摘要] **目的:**基于网络药理学探讨续断治疗骨质疏松症(osteoporosis, OP)的作用机制。**方法:**通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP),以药代动力学特征为标准获取续断的活性成分,并预测相关活性成分的作用靶点;与GeneCards和DisGeNET数据库获取的骨质疏松疾病靶点映射,筛选续断治疗OP的潜在靶点。利用STRING数据库和Cytoscape软件构建中药-活性成分-疾病-靶标调控网络和潜在靶点间的蛋白互作网络。同时通过Enrichr在线工具进行潜在靶点的GO分析以及KEGG通路富集分析。最后通过AutoDock Vina软件将续断活性成分与重要的靶蛋白进行分子对接验证。**结果:**共获得续断活性化合物8个,根据靶点预测技术预测出相关靶点53个,与疾病靶点映射得续断-OP疾病交集靶点14个。富集分析显示续断可通过多条主流信号通路及细胞代谢过程调控OP的发生发展。分子对接实验证实续断的活性成分和靶标之间具有良好的结合能力。**结论:**续断除了通过直接作用骨代谢相关途径,还参与调控上下游多条信号通路,从而干预OP的进展。

[关键词] 续断;骨质疏松症;信号通路;网络药理学;分子机制

[中图分类号] R681

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)01-035-06

doi:10.7655/NYDXBNS20220106

Investigation of the mechanism of osteoporosis treated by XuDuan based on network pharmacology

KAN Xuechun, HE Rundong, GE Jiaying, WU Jun*, MIAO Dengshun*

Department of Human Anatomy, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of XuDuan in the treatment of osteoporosis (OP). **Methods:** The pharmacokinetic characteristics were used as the standard to obtain the active components of the XuDuan and predict the target of the relevant active components through Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP), and the targets of osteoporosis obtained from the GeneCards and DisGeNET databases were intersected to screen out potential targets for the treatment of osteoporosis by XuDuan. Using the String database and Cytoscape software, we built a drug-active ingredient-osteoporosis-potential target network and a protein-protein interaction network between potential targets. Then, the gene ontology (GO) biological function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Gnomes (KEGG) pathway enrichment of potential targets were analyzed through the Enrichr databases. At last, molecular docking of the active ingredients of XuDuan with important target proteins was verified by AutoDock Vina software. **Results:** A total of 8 XuDuan active compounds were screened while 53 related targets were obtained by using the related target prediction technique. Also mapping with disease targets, 14 XuDuan-OP disease intersection targets were sifted. Enrichment analysis shows that XuDuan can regulate the development of OP through multiple mainstream signal pathways and cellular metabolic processes. At last, high molecular docking scores between active components and targets were obtained. **Conclusion:** In addition to directly acting on bone metabolism-related pathways, XuDuan is also involved in regulating multiple upstream and downstream signaling pathways, thereby intervening in the progress of OP.

[Key words] XuDuan; osteoporosis; pathway; network pharmacology; mechanism

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(01):035-040]

[基金项目] 国家自然科学基金(81600697, 81730066)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wjxue1988@njmu.edu.cn, dsmiao@njmu.edu.cn

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨量及骨组织微结构异常为特征的代谢性骨疾病,好发于中老年人群以及绝经后妇女,可导致骨脆性增加,显著提高骨折的风险^[1-2]。近年来,随着社会老龄化问题的加重,骨质疏松及其并发症的发病率和死亡率不断提高,进一步加重了社会经济负担,严重影响人类健康^[3]。

目前针对OP的防治药物主要包括骨吸收抑制剂、骨形成促进剂以及骨矿化物,如双磷酸盐类、降钙素、甲状旁腺素等,但这些药物只能改善患者临床症状、延缓病情,并不能从根本上改善骨代谢情况,亦不能恢复成骨与破骨进程的动态平衡,并且存在一定的不良反应^[3-5]。

作为我国传统医学的主要治疗方法,中医根据临床症状和体征将骨质疏松归属于“骨痿”“骨枯”“骨痹”等范畴,其病因主要概括为肾精不足、脾胃虚弱、肝失条达和瘀血阻络^[6]。与西医疗法相比,中医治疗有单味中药疗法、复方制剂疗法、针灸疗法等,具有不良反应小,疗效显著的优势,可为OP的防治提供新的方向^[7-8]。续断,又名川断、川续断,为川续断科植物川续断的干燥根,因能“续折接骨”而得名。性微温,味苦、辛,归肝、肾经。具有补肝肾、强筋骨、续折伤、止崩漏的功效,临床上常用于肝肾不足、腰膝酸软、风湿痹痛、跌扑损伤、筋伤骨折、崩漏、胎漏等疾病^[9]。已有研究证实,续断可通过多种信号途径参与骨形成与骨代谢过程^[4,10-11],其活性成分皂苷可诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化从而能促进成骨细胞分化和矿化,因此有望用于OP的治疗。

与化学药物的药理特征通常为单一成分相比,中药尤其是复方制剂具有多成分、多靶点的特点^[12],其作用机制也更为复杂。然而近年来生物信息学、系统生物学以及多重药理学的发展,使明确中医药发挥疗效的分子机制以及基于复杂的生物系统探索中草药配方成为可能^[13]。网络药理学是融合多学科理论发展形成的一种新方法,它是在现代药理学研究的基础上提出的一种新的药物设计与开发方法和策略。网络药理学促进了医学研究从之前的“单一靶点、单一药物”向“多靶点、多药物”这一新模式的转变,为新药开发提供了新途径和新策略^[14]。本研究基于网络药理学的方法,分析续断的有效活性成分、作用靶点及其可能的作用机制,同时通过网络分析的方法进一步预测续断抗OP的靶点,并对相关靶点进行通路富集分析,探讨续断治疗OP

的潜在作用机制。

1 资料和方法

1.1 资料

通过检索中药系统药理学数据库和分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)^[15],以口服生物利用度(oral bio-availability, OB)≥30%、药物相似度(drug-likeness, DL)≥0.18^[16]为指标筛选续断活性成分。同时采用TCMSP靶点预测模型对相关活性成分作用靶点。再将靶点在Uniprot数据库^[17]中进行搜索,选择物种设置为人,对搜集筛选得到的靶点蛋白或基因信息进行校正,获得靶点标准的Uniprot名称,将续断每种活性成分的靶点集与疾病靶点集进行映射取交集,得到续断抗OP的有效成分。

1.2 方法

1.2.1 OP相关靶基因的获取以及中药-疾病调控网络的构建

在疾病相关数据库(GeneCards数据库^[18]和DisGeNET数据库^[19])中分别以“Osteoporosis”为关键词检索与OP相关的靶基因,获得的基因集作为疾病靶点,并将其与续断作用靶点在软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)中取交集后获得续断-OP疾病交集靶点。最后利用Cytoscape软件构建“续断活性成分-靶蛋白-疾病”交互网络。选取节点度(Degree)大于中位数4倍的靶蛋白,并进行数据可视化处理,得到中药-成分-疾病-靶标调控网络。

1.2.2 GO富集分析与KEGG通路分析

通过Enrichr在线工具^[20]进行交集靶点的基因本体论(GO)分析以及KEGG通路富集分析,并对具有统计学意义($P < 0.05$)的结果进行可视化处理。

1.2.3 中药-疾病靶标蛋白互作用网络的构建与核心

利用STRING在线软件^[21]将所得14个基因交集靶点输入软件,筛选条件为种属选择人,最小互作分数值为0.4,构建续断治疗OP的基因PPI网络。利用Cytoscape软件中的插件Cytohubba,根据MCC、Degree、Betweenness等参数进行分析,对得分前3位的基因取交集,确认网络中的核心靶点。

1.2.4 分子对接实验

根据靶点预测结果,通过PDB数据库^[22]找到核心靶点蛋白的PDB-ID,使用PyMOL软件删除水分子和小分子配体,通过PubChem数据库^[23]获得调节

核心靶点的分子活性成分结构,使用 ChemBio 3D 绘制小分子的二维结构,并将其保存为 PDBQT 格式备用。将处理好的受体和配体分别保存为 PDB 格式备用,并在 AutoDock Vina 分子对接软件下,对续断活性成分和重要靶蛋白进行分子对接验证。

2 结果

2.1 续断活性成分及其靶基因

通过 TCMSP 数据库检索有关续断中所有已报

道的成分,并且按 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 作为筛选续断潜在活性成分的标准,共获得续断活性化合物 8 个(表 1)。接着利用相关靶点预测技术预测上述活性成分作用靶点 53 个,再以“Osteoporosis”为关键词,分别在 GeneCards 和 DisGeNET 数据库中收集到 4 273 和 1 098 个相关疾病基因数据库作为疾病靶点。将 GeneCards 和 DisGeNET 数据库中获得的相关化合物靶点与活性成分作用靶点取交集得到续断作用靶点 14 个(图 1)。

表 1 经 OB 和 DL 筛选的续断活性成分

Table 1 Active ingredients of XuDuan screened by OB and DL

编号	名称	中文名	OB(%)	DL
MOL003152	gentisin	龙胆根素	64.06	0.21
MOL000358	beta-sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75
MOL000359	sitosterol	谷甾醇	36.91	0.75
MOL009312	(E,E)-3,5-Di-O-caffeoylquinic acid	(-)-3,5-二咖啡酰奎宁酸	48.14	0.68
MOL009317	cauloside A qt	葎岩仙皂苷 A	43.32	0.81
MOL008188	japonine	臭山羊碱	44.11	0.25
MOL009322	syvestroside III	林生续断苷 III	48.02	0.53
MOL009323	syvestroside III qt	林生续断苷 III qt	56.47	0.43

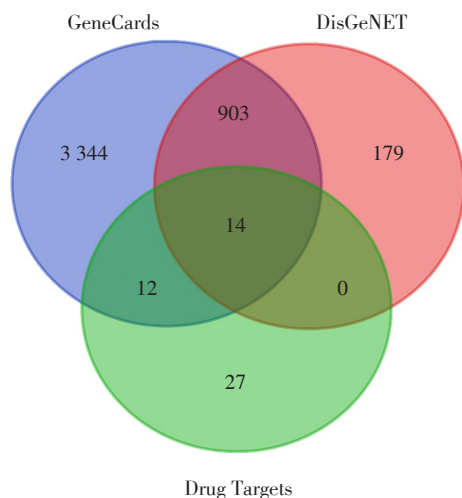
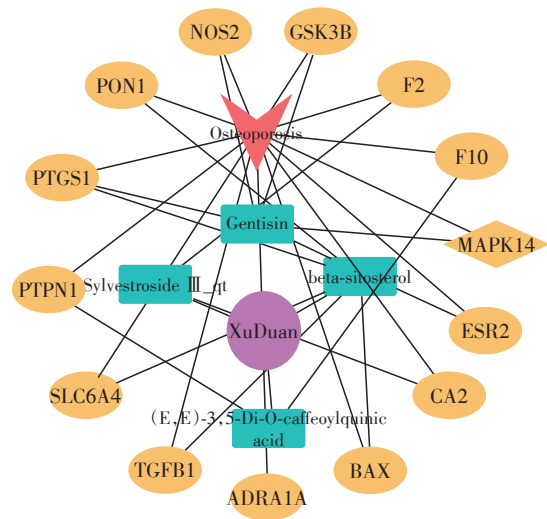


图 1 续断作用靶点韦恩图

Figure 1 Venn diagram of XuDuan targets

2.2 中药-疾病调控网络的构建和分析

通过 GeneCards 和 DisGeNET 数据库获得 OP 疾病相关靶点,并与续断作用靶点取交集后获得续断-OP 疾病交集靶点 14 个。然后,利用 Cytoscape 软件构建中药-疾病调控网络(图 2)。由图可见续断主要通过龙胆根素、 β -谷甾醇、林生续断苷 III qt 以及(-)-3,5-二咖啡酰奎宁酸等 4 种活性成分作用于



红色代表骨质疏松症,紫色代表中药续断,绿色代表续断的活性成分,黄色代表中药-疾病共同靶标基因。

图 2 中药-成分-疾病-靶标调控网络

Figure 2 Regulation network of XuDuan-compound-disease-target

14 个靶标基因影响 OP 的发生。

2.3 续断抗骨质疏松靶蛋白相互作用网络构建与关键靶点筛选

将疾病靶点与有效成分靶点通过韦恩图取交集得到的 14 个药物-疾病靶点基因导入 String 在线数

数据库,以综合得分(combined score)>0.4为阈值,构建得到续断抗OP靶点蛋白相互作用网络图(图3)。

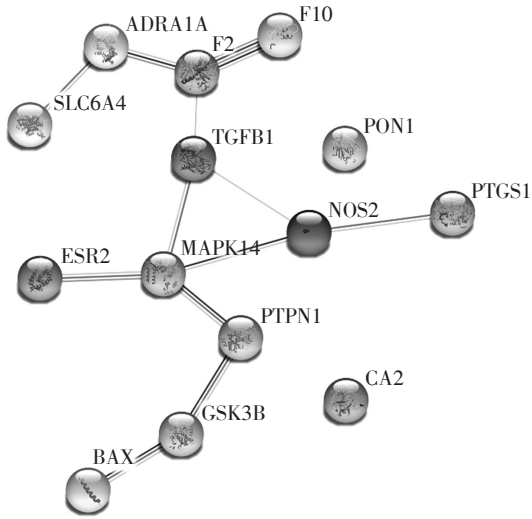


图3 续断抗骨质疏松靶蛋白相互作用网络

Figure 3 Network of XuDuan target genes on osteoporosis

2.4 GO富集分析和KEGG通路分析结果

为了进一步明确续断抗骨质疏松的可能机制,利用Enrichr在线工具分析上述靶基因参与的主要信号通路。GO分析结果显示,上述交集靶点的生物过程主要包括参与调控蛋白质在细胞核中的定

位、活性氧代谢、未折叠蛋白反应等;细胞组分主要包括高尔基体腔、球形高密度脂蛋白颗粒以及内质网腔;分子功能主要与芳香酯酶活性、羧酸酯水解酶活性和多巴胺跨膜转运体活性等有关(图4A~C)。KEGG通路富集结果显示,差异蛋白主要富集在与催乳素信号通路、利什曼病、结肠直肠癌等相关的信号通路中(图4D)。

2.5 分子对接

利用Cytoscape软件中的插件Cytohubba,根据MCC、Degree、Betweenness等参数对2.3中获得的相互作用网络进行分析,对得分前3位的基因取交集,确认MAPK14和TGFB1为网络中的核心靶点。将MAPK14和TGFB1分别通过对接平台AutoDock Vina与续断的活性成分Gentisin和beta-sitosterol进行分子对接,分别获得20个模型,Gentisin与MAPK14(最低结合能为-6.2 kcal/mol)、beta-sitosterol与TGFB1(最低结合能为-9.0 kcal/mol)的分子对接结果显示(图5)。一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低,发生的作用可能性越大,结合能 ≤ -5 kcal/mol时则视为成分与靶点有较好的活性,结合能 ≤ -7 kcal/mol时则结合活性强烈^[24]。本研究结果说明续断的活性成分和靶标之间具有良好的结合能力。

A

- regulation of protein localization to nucleus (GO:1900180)
- positive regulation of ROS metabolic process (GO:2000379)
- activation of signaling protein activity involved in UPR (GO:0006987)
- positive regulation of IRE1-mediated UPR (GO:1903896)
- extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:00097191)
- positive regulation of nuclease activity (GO:0032075)
- protein carboxylation (GO:0018214)
- peptidyl-glutamic acid carboxylation (GO:0017187)
- positive regulation of protein complex assembly (GO:0031334)
- regulation of IRE1-mediated UPR (GO:1903894)

C

- Golgi lumen (GO:0005796)
- spherical high-density lipoprotein particle (GO:0034366)
- endoplasmic reticulum lumen (GO:0005788)
- intrinsic component of external side of plasma membrane (GO:0031233)
- secretory granule lumen (GO:0034774)
- microvillus (GO:0005902)
- platelet alpha granule lumen (GO:0031093)
- mitochondrial envelope (GO:0005740)
- actin-based cell projection (GO:0098858)
- platelet alpha granule (GO:0031091)

B

- arylesterase activity (GO:0004064)
- carboxylic ester hydrolase activity (GO:0052689)
- dopamine transmembrane transporter activity (GO:0005329)
- alpha-adrenergic receptor activity (GO:0004936)
- type II transforming growth factor beta receptor binding (GO:0005114)
- type I transforming growth factor beta receptor binding (GO:0034713)
- monoamine transmembrane transporter activity (GO:0008504)
- death domain binding (GO:0070513)
- tau-protein kinase activity (GO:0050321)
- dynactin binding (GO:0034452)

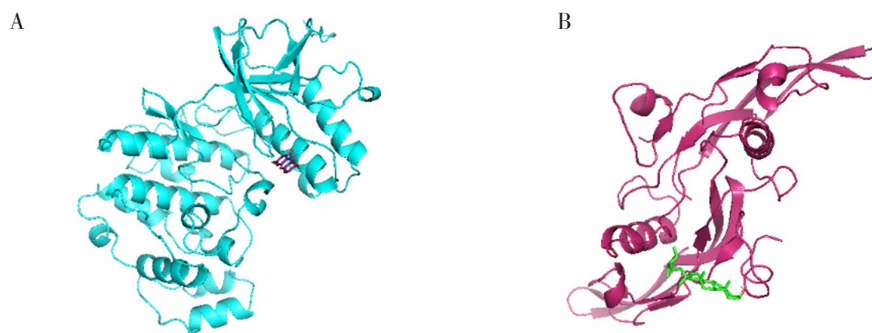
D

- prolactin signaling pathway
- leishmaniasis
- colorectal cancer
- AGE-PAGE signaling pathway in diabetic complications
- amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
- chagas disease (American trypanosomiasis)
- tuberculosis
- nitrogen metabolism
- toxoplasmosis
- endometrial cancer

A:靶基因参与的细胞内生物过程;B:靶基因参与的细胞分子功能;C:靶基因参与的细胞内成分构成;D:靶基因的KEGG信号通路分析。

图4 GO富集分析和KEGG通路分析

Figure 4 Enrichment analysis of GO and KEGG of XuDuan target genes on osteoporosis



A: MAPK14蛋白与Gentisin的分子对接;B: TGFB1蛋白与beta-sitosterol的分子对接。

图5 分子对接模式图

Figure 5 Docking model of of Xu Duan active ingredient with the key target molecule

3 讨论

OP是一种由多因素导致的代谢性疾病,严重影响患者的身心健康和生活质量;目前临床治疗OP的药物多为单一化合物的靶点治疗,但仅能减轻OP的相关症状,且价格昂贵、不良反应较大,很难达到理想的治疗效果。近年来,中草药由于其本身具有的整体治疗效果及具有不良反应小、疗效显著、可长期服用等特点,得到国内外的广泛关注。

网络药理学作为系统生物学的重要组成部分^[25]可用于进一步探究中药治疗疾病的物质基础和分子机制。本文利用网络药理学方法,构建了续断-活性成分-靶蛋白网络及活性成分-靶蛋白-疾病的蛋白质相互作用网络;研究发现,续断的主要活性成分可通过多靶点、多基因影响OP的发生发展,可用于治疗OP。

本研究证明续断治疗OP的靶基因主要涉及MAPK14、TGFB1、NOS2、PTPN1、F2等,这些基因可通过影响蛋白质在细胞核中的定位、活性氧代谢、未折叠蛋白反应等生物过程,以及芳香酯酶、羧酸酯水解酶和多巴胺跨膜转运体等功能蛋白的活性,从基因水平调控OP的过程。同时,KEGG通路分析发现,续断治疗OP的核心靶标涉及的通路包括催乳素信号通路、利什曼病信号通路、结肠直肠癌信号通路、糖尿病并发症的AGE-RAGE信号通路、肌萎缩性脊髓侧索硬化症信号通路、肺结核信号通路等,它们分别从不同的生理学过程影响OP的发生发展,使OP与多种疾病产生关联。已有研究证实ESR1(ER α)被激活后可以抑制破骨细胞生长而促进成骨细胞增殖^[26],而在高雪等^[27]的研究中指出甲状腺素可作用于MAPK通路,通过ER促进基因转录和细胞增殖,由此可见MAPK在骨质疏松中的潜

在作用。同样,作为OP易感性的重要候选基因^[28],TGFB1通过调控骨髓间充质干细胞以及成骨细胞的增殖分化在OP的发生发展中作用巨大^[29-30]。

利用CytosHubba筛选出关键靶点,进一步的分子对接预测发现续断中的龙胆根素、 β -谷甾醇与关键靶蛋白MAPK14、TGFB1体现出良好的分子对接活性,显示本研究数据较为准确,具有较高的可信度。

本研究在文献检索和活性成分筛选的基础上,对续断抗OP有效成分进行了预测,并通过网络药理学的方法对续断多成分、多靶点、多途径的复杂作用机制进行了研究,预测了续断治疗OP的潜在靶点,为进一步深入研究其作用机制提供了参考。

[参考文献]

- [1] FU S Q, WANG Z Y, JIANG Z M, et al. Integration of zebrafish model and network pharmacology to explore possible action mechanisms of *Morinda officinalis* for treating osteoporosis[J]. Chem Biodivers, 2020, 17(5): e2000056
- [2] COUGHLAN T, DOCKERY F. Osteoporosis and fracture risk in older people[J]. Clin Med (Lond), 2014, 14(2): 187-191
- [3] TANAKA S. Molecular understanding of pharmacological treatment of osteoporosis[J]. EFORT Open Rev, 2019, 4(4): 158-164
- [4] 赵金龙,梁桂洪,韩燕鸿,等.川续断提取物续断皂苷VI防治骨质疏松症的研究进展[J].中国骨质疏松杂志, 2020, 26(5): 755-759
- [5] 王文汇.抗骨质疏松药物的作用及进展[J].中国医刊, 2021, 56(11): 1189-1192
- [6] 王桂云,刘湘琳,陈沙,等.中医药治疗骨质疏松症的研究进展[J].湖南中医杂志, 2020, 36(6): 162-165
- [7] JIN Y X, WU P, MAO Y F, et al. Chinese herbal medicine for osteoporosis: a meta-analysis of randomized con-

- trolled trials[J]. *J Clin Densitom*, 2017, 20(4):516-525
- [8] 冯利科,朱俊义,姚慧敏. 骨质疏松症的中医药疗法进展[J]. *通化师范学院学报*, 2019, 40(2):51-55
- [9] 汪文来,鞠大宏,刘梅洁,等. 续断有效成分药理学研究进展[J]. *中国医药导刊*, 2015, 17(10):1059-1060
- [10] 陶益,陈西,任玉超,等. 酒续断对骨质疏松型大鼠OPG/RANK/RANKL轴系统的调控研究[J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(8):1127-1129
- [11] 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
- [12] 傅春燕,刘永辉,曾立,等. 中药(复方)药代动力学研究进展[J]. *邵阳学院学报(自然科学版)*, 2021, 18(5):101-108
- [13] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11):682-690
- [14] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2):110-120
- [15] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6:13
- [16] 李嘉程,许波,李刚,等. 基于网络药理学研究杜仲抗骨质疏松的分子机制[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(8):936-942
- [17] PUNDIR S, MARTIN M J, O'DONOVAN C. UniProt protein knowledgebase [J]. *Methods Mol Biol Clifton N J*, 2017, 1558:41-55
- [18] REBHAN M, CHALIFA-CASPI V, PRILUSKY J, et al. GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases[J]. *Trends Genet*, 1997, 13(4):163
- [19] PIÑERO J, BRAVO À, QUERALT-ROSINACH N, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(d1):833-839
- [20] KULESHOV M V, JONES M R, ROUILLARD A D, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(w1):90-97
- [21] VON MERING C, HUYNEN M, JAEGGI D, et al. STRING: a database of predicted functional associations between proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1):258-261
- [22] BURLEY S K, BERMAN H M, KLEYWEGT G J, et al. Protein data bank (PDB): the single global macromolecular structure archive [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1607:627-641
- [23] KIM S, THIESSEN P A, BOLTON E E, et al. PubChem substance and compound databases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(d1):1202-1213
- [24] 冯群,关永霞,黄志艳,等. 基于网络药理学和分子对接的荆防败毒散预防新型冠状病毒肺炎的活性成分研究[J]. *药学实践杂志*, 2020, 38(6):485-491, 538
- [25] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11):682-690
- [26] MARTIN-MILLAN M, ALMEIDA M, AMBROGINI E, et al. The estrogen receptor - alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(2):323-334
- [27] 高雪,何欣,贾芙蓉,等. 基于网络药理学方法探讨蛇床子治疗骨质疏松可能的分子途径 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(6):686-691
- [28] LANGDAHL B L, UITTERLINDEN A G, RALSTON S H, et al. Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFβ1) and osteoporosis: the GENOMOS study [J]. *Bone*, 2008, 42(5):969-981
- [29] WANG G, ZHAO F, YANG D, et al. Human amniotic epithelial cells regulate osteoblast differentiation through the secretion of TGFβ1 and microRNA-34a-5p [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2):791-799
- [30] ZHAO L, HANTASH B M. TGF-β1 regulates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Vitam Horm*, 2011, 87:127-141

[收稿日期] 2021-05-12

(本文编辑:蒋莉)