

基于网络药理学的续断-补骨脂药对治疗骨关节炎作用机制研究

祝乃强¹, 侯静怡², 刘金欣², 马桂云¹ (1.承德医学院附属医院脊柱外科, 河北 承德 067000; 2.承德医学院, 河北 承德 067000)

摘要: 目的 基于网络药理学研究续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的分子作用机制。方法 采用中药系统药理学分析平台(TCMSP)等数据库寻找与续断-补骨脂药对相关的化学成分以及靶点; 利用 OMIM 数据库、DrugBank 数据库以及 GeneCards 数据库查找与骨关节炎相关的靶点。通过 Cytoscape 3.7.1 软件构建续断-补骨脂药对主要化学成分-潜在靶点网络。将续断、补骨脂以及续断-补骨脂药对治疗的潜在靶点与疾病靶点在相互作用基因/蛋白搜索工具平台 STRING V10.5 分别构建其蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络。应用网络拓扑参数筛选出药物治疗疾病的关键靶点, 并采用 R 中的 Clusterprolifer 对关键靶点进行 Gene Ontology(GO)分析和 KEGG 通路富集分析。结果 选择口服利用度 $\geq 30\%$ 作为化合物分子的筛选条件, 并通过文献挖掘进行补充, 共筛选出续断-补骨脂药对的 20 个潜在活性成分和 473 个潜在靶点; 通过度、介数中心度、接近度等网络拓扑特征参数评价筛选出与续断-补骨脂药对治疗骨关节炎相互作用的关键靶点 19 个, GO 分析包含 121 条富集结果, 其中生物过程 67 条, 分子功能 45 条, 细胞组件 9 条; 得到 KEGG 富集通路 89 条。结论 续断-补骨脂药对与单味药材相比, 具有更多成分, 更多途径, 更多靶点协同作用的特点, 为后续从续断-补骨脂药对中开发出治疗骨关节炎的新药提供依据。

关键词: 网络药理学; 骨关节炎; 续断; 补骨脂; 药对; 靶蛋白相互作用

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)10-1157-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.10.002

引用本文: 祝乃强, 侯静怡, 刘金欣, 等. 基于网络药理学的续断-补骨脂药对治疗骨关节炎作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(10): 1157-1165.

Study on Osteoarthritis Mechanisms of Couplet Medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus Based on Network Pharmacology

ZHU Naiqiang¹, HOU Jingyi², LIU Jinxin², MA Guiyun¹ (1.Second Department of Spinal Surgery, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2.Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the molecular mechanism of couple medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus for the treatment of osteoarthritis(OA) based on network pharmacology. **METHODS** The Chinese Medicine System Pharmacology Analysis Platform(TCMSP) was used to search for all chemical constituents and related targets. The OMIM database, DrugBank database and GeneCards database were used to find OA-related targets. The bioactive compound-target network was established by Cytoscape 3.7.1 software. The screened targets were used to construct the protein-protein interaction(PPI) network of Dipsaci Radix, Psoraleae Fructus and couple medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus treating OA on the STRING V10.5 platform. The network topological parameters were used to screen out the hub genes and Clusterprolifer in R was employed to perform Gene Ontology(GO) analysis and KEGG pathway enrichment analysis on hub targets. **RESULTS** Used the oral bioavailability $\geq 30\%$ as screening condition for the compounds, combined with supplement literatures searched, 20 active components and 473 corresponding potential targets of couplet medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus. The network topological characteristic parameters, such as Degree, Betweenness, and Closeness were used to screen out 19 hub targets for the treatment of OA. A total of 121 enrichment results were obtained from 19 hub genes of couplet medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus in OA, included 67 biological processes, 45 molecular functions, and 9 cell compositions. The hub genes were enriched by KEGG and 89 pathways played an important role in OA were screen out. **CONCLUSION** Compared with the single traditional Chinese medicine, the synergetic effect of couplet medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus with more multi-component, more multi-target, more multi-pathway is confirmed by network pharmacology, which lay a foundation for developing a new drug for the treatment of OA from the couplet medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus.

KEYWORDS: network pharmacology; osteoarthritis; Dipsaci Radix; Psoraleae Fructus; couplet medicine; target protein interaction

基金项目: 国家自然科学基金项目(81641136, 81703659)

作者简介: 祝乃强, 男, 博士, 主治医师 Tel: (0314)2270312 E-mail: zhunq2010@163.com

骨关节炎是一种严重影响中老年人生活质量的关节退变性疾病,其临床的主要特点为关节软骨退化、滑膜炎、关节间隙变窄,表现为关节疼痛肿胀、活动受限及畸形改变^[1-4]。肥胖、年龄、过度运动、炎症、遗传以及某些关节损伤或疾病(半月板损伤、关节内或关节周围骨折、关节感染)等多种因素均与骨关节炎的发生及发展有着密切联系^[5],早期的诊断及治疗可以减慢骨关节炎的进展^[6-7]。目前临床上治疗早期骨关节炎以口服药物为主,如糖皮质激素类、非甾体类抗炎药、阿片类镇痛药和对乙酰基酚类药物^[8-10]。而这些药物的治疗仅仅针对疾病的症状,并没有从根本上改变骨关节炎的病理状况,且伴随一系列药物的不良反应,如胃肠毒性、肝肾损伤和心血管损伤等^[11-12]。因此,寻找一种更安全、更有效的治疗骨关节炎的药物,具有重要的现实意义。

药对是中药复方“配伍”用药的核心和重要组成部分,虽组成简单但不同于单味药,同时体现中医药配伍特色,即可增加药效(减轻毒副)作用^[13]。续断-补骨脂是治疗骨关节炎的经典配伍药对,皆归于肝、肾经,两者均具有滋补肝肾,强盘壮骨,通络止痛的功效,主治症多见于肝肾不足,筋骨无力等疾病。其中,续断来源于多年生草本植物川断续的干燥根,因能“续折接骨”而得名,具有补肝肾、强筋骨、安胎、止崩漏等功效^[14],是一种常用于治疗骨关节炎的中药材^[15];补骨脂来源于豆科植物补骨脂的干燥成熟果实,始载于《开宝本草》,具有补肾助阳、固精缩尿、温中止泻作用^[16]。续断与补骨脂中药性味相近,归经相似,均具有促进骨骼再生,且有经络疏通关节的作用,对风湿痹通具有较好的临床疗效^[17-18],其合用优势互补,协同增强疗效,但具体配伍药对治疗骨关节炎疾病的作用机制仍缺乏相关的认识及分析。

网络药理学是基于“化合物-靶点-疾病”相互作用网络等多学科融合理论发展形成的一种新的方法,立足于系统的角度探索药物对疾病的网络干预与影响,其研究策略的整体性、系统性与中医药学的整体观念和辨证论治理论不谋而合,为中医药复杂体系的现代化医学诠释提供新的途径^[18-19]。因此,本研究旨在利用网络药理学从分子水平来探讨“续断-补骨脂”单味药及药对治疗骨关节炎的网络药理差异,以期明确“续断-补骨

脂”药对治疗骨关节炎疗效的作用机制,为揭示药对的科学内涵奠定基础,并进一步深入挖掘其他临床应用。

1 材料与方法

1.1 网站数据库和分析软件

本研究依托中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)数据库(<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>); DrugBank 数据库(<http://www.drugbank.ca/>); UniProt KB 数据库(<http://www.uniprot.org/>); GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>); SEA Search Server 数据库(<http://sea.bsclab.org/>); STRING 数据库(<http://string-db.org/>); OMIM 数据库(<http://www.omim.org/>); R 中的 ClusterProfiler 软件包(<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html>); Cytoscape 平台(<https://cytoscape.org>)及插件 cyto Hubba(<http://apps.cytoscape.org/apps/cytohubba>)。

1.2 续断-补骨脂药对活性化学成分收集与筛选

本研究主要依托西北农林科技大学生命科学院创建的 TCMSP,中国中医科学院中药研究所创建的中医药百科全书(ETCM)和北京中医药大学中药学院创建的 SymMap 对续断-补骨脂化学成分进行查询汇总。再通过数据库中 ADME 模块,设置参数口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%进行化合物潜在活性成分筛选,并通过文本挖掘的方法补充不在筛选范围内,但已有研究证明具有治疗骨关节炎的成分。

1.3 活性成分-预测靶点网络的构建

为了更合理地阐述续断-补骨脂药对中化学成分与骨关节炎靶点之间的关系。通过 TCMSP 数据库、ETCM 数据库、SymMap 数据库和 PubMed 数据库已知的包含生物活性及靶点注释信息的药物分子,再应用三维分析相似方法,通过 SEA 数据库预测查询分子的潜在靶点。将候选活性化学成分与其潜在靶点蛋白上传至 Cytoscape 3.7.0 平台,构建活性化学成分-靶点网络图。Cytoscape 3.7.0 平台的核心架构是网络,每个节点(node)是基因、蛋白质或分子,节点与节点之间的连接(edge)代表这些生物分子之间的相互作用,节点的度值(degree)代表网络中节点与节点相连接的数目,度值越大,这个靶点越有可能成为化合物的关键作用靶点^[20]。

1.4 骨关节炎相关靶点蛋白的搜集

本研究以“Osteoarthritis”为关键词进行检索,从以下数据库中收集与骨关节炎相关的蛋白信息:①DrugBank 数据库是一个综合的在线数据库,可提供与药物有关的生化和药理学信息及其作用机制,从该数据库中找到与骨关节炎相关的靶点 78 个;②GeneCards 数据库系统包含其所有的注释和预测基因,筛选到了 46 个靶点基因;③OMIM 数据库是人类基因和遗传表型的综合性与权威性研究资源,筛选得到靶点 65 个。去除重复基因,共 187 个骨关节炎相关靶点。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI)网络构建

分别整合续断的活性成分靶点与治疗骨关节炎的靶点的筛选结果,补骨脂的活性靶点与治疗骨关节炎的靶点的筛选结果,以及续断-补骨脂药对的活性成分靶点与治疗骨关节炎靶点的筛选结果,进一步分别得到续断治疗骨关节炎的靶点,补骨脂治疗骨关节炎的靶点,以及续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的靶点,将得到的靶点蛋白导入到 STRING 数据库中,进行蛋白相互分析,并建立 PPI 网络图;并对节点进行网络分析,将节点大小和颜色设置为反映度值的大小,边的粗细设置用于反映结合律评分的大小,获得最终的蛋白相互作用网络。

1.6 Hub 基因获取及作用靶点类型归属

将所得到的 PPI 数据导入到 Cytoscape 进行可视化分析,并利用插件 cytoHubba 寻找到续断-补骨脂药对映射到骨关节炎的关键基因。DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu>, Version 5.0)^[21]是包含与人类疾病相关的基因和变体的平台之一。在 DisGeNET 数据库中选择基因进行检索,将上述靶点依次导入到数据库中,获取靶点类型信息。

1.7 基因本体(Gene Ontology, GO)和 KEGG 通路富集分析

GO 包括分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)、细胞组件(cellular component, CC),可用于高通量基因组或转录组数据鉴定的生物学机制^[22]。KEGG 数据库是一个用于识别候选目标的功能及生物相关性^[23]。本研究中,应用 R 中的 ClusterProfiler 软件包进行 GO

功能注释和 KEGG 通路分析^[24],并对其富集分析结果进行可视化处理。

2 结果

2.1 续断-补骨脂药对活性成分筛选

基于 TCSP、ETCM 和 SymMap 数据库搜索“续断”与“补骨脂”的活性成分,共得到 61 种,其中续断含有 31 种,补骨脂 30 种。进一步经 $OB \geq 30\%$ 条件筛选,得到 15 种 ADME 性质较好的活性成分进行后续研究,其中续断符合此要求的活性成分为 9 种,补骨脂为 6 种。除此之外,研究发现续断和补骨脂中可能含有一些潜在的活性成分,因其 OB 值小于筛选条件而删除。故根据已有文献报道进一步分析,发现续断中的乌索酸、马钱子苷,补骨脂中的补骨脂乙素、黄芪苷、异补骨脂素。故纳入乌索酸、马钱子苷、异补骨脂素、黄芪苷和补骨脂乙素 5 个活性成分。纳入的续断-补骨脂药对 20 个活性成分基本信息见表 1。

2.2 续断-补骨脂药对化合物-靶点相互作用网络

利用 20 个活性成分与药物靶点的关系构建化合物-靶点网络见图 1。在活性成分-靶点相互作用的网络中,共包括 493 个节点(20 个化合物节点和 473 个靶点节点)和 845 条相互作用边,其圆形节点表示续断的活性成分,三角形节点表示补骨脂的活性成分,长方形代表化合物靶点。在网络中,每条边(edge)表示化合物分子与靶点之间的相互作用,而度(degree)则表示化合物分子与靶点之间的相互作用关系。表 1 已列出了化合物-靶点网络中化合物的度值,从表 1 可以看出,乌索酸有最多的潜在靶标(159 个),其次是豆甾醇有 124 个潜在靶标,亚油酸、黄芪苷各有 78 个潜在靶标,表明这些度值较高的药物分子有可能在“续断-补骨脂”药对的药理作用中发挥着相对重要的作用。除此之外,网络中的靶点如 ATP-结合 G 家族-2 (ABCG2)、雌激素受体-1(ESR1)、雌激素受体-2 (ESR2)拥有最多的相互作用靶点,分别为 11, 9 和 8 个。同时,根据表 1 中候选的化合物分子度值可以发现,网络中每个候选化合物都至少与 2 个靶标连接,也表明续断-补骨脂药对中含有的候选化合物分子可能作用于整个生物网络系统,体现了续断-补骨脂药对多成分与多靶点之间共同的机制,同时符合中药复杂体系的作用特点。

表1 续断-补骨脂药对主要活性成分参数

Tab. 1 Main active material parameters of couplet medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus

中药名称	活性成分	分子量	OB/%	度	分子结构式	中药名称	活性成分	分子量	OB/%	度	分子结构式
续断	β -谷甾醇/谷甾醇 (β -sitosterol/ sitosterol)	414.79	36.91	41		续断	马钱子苷 (loganin)	390.43	5.90	29	
续断	獐牙菜苷 (sweroside aglycone)	196.22	68.68	4		补骨脂	亚油酸 (linoleic acid)	280.45	45.01	78	
续断	喜树次碱 (venoterpine)	146.21	68.97	3		补骨脂	豆甾醇 (stigmasterol)	412.70	43.83	124	
续断	龙胆根素 (gentisin)	258.24	64.07	74		补骨脂	补骨脂素 (psoralen)	186.17	33.06	31	
续断	常山宁 (japonine)	295.36	44.11	47		补骨脂	花椒毒素 (xanthotoxin)	216.19	35.3	32	
续断	(E,E)-3,5-di-O-caffeoylquinic acid	516.49	48.14	23		补骨脂	异补骨脂黄酮 (isobavachin)	324.38	54.44	23	
续断	莱酚 (mesitol)	136.21	65.67	6		补骨脂	补骨脂乙素 (corylifolinin)	324.38	1.04	15	
续断	坎特莱因碱 (cantleyine)	207.25	70.62	1		补骨脂	异补骨脂素 (isopsoralen)	186.17	19.60	12	
续断	林生续断苷 (sylvestroside)	686.83	48.02	6		补骨脂	黄芪苷 (astragalin)	448.38	14.03	78	
续断	乌索酸 (ursolic acid)	456.78	16.77	159		补骨脂	花翠素 (delphinidin)	500.84	40.63	59	

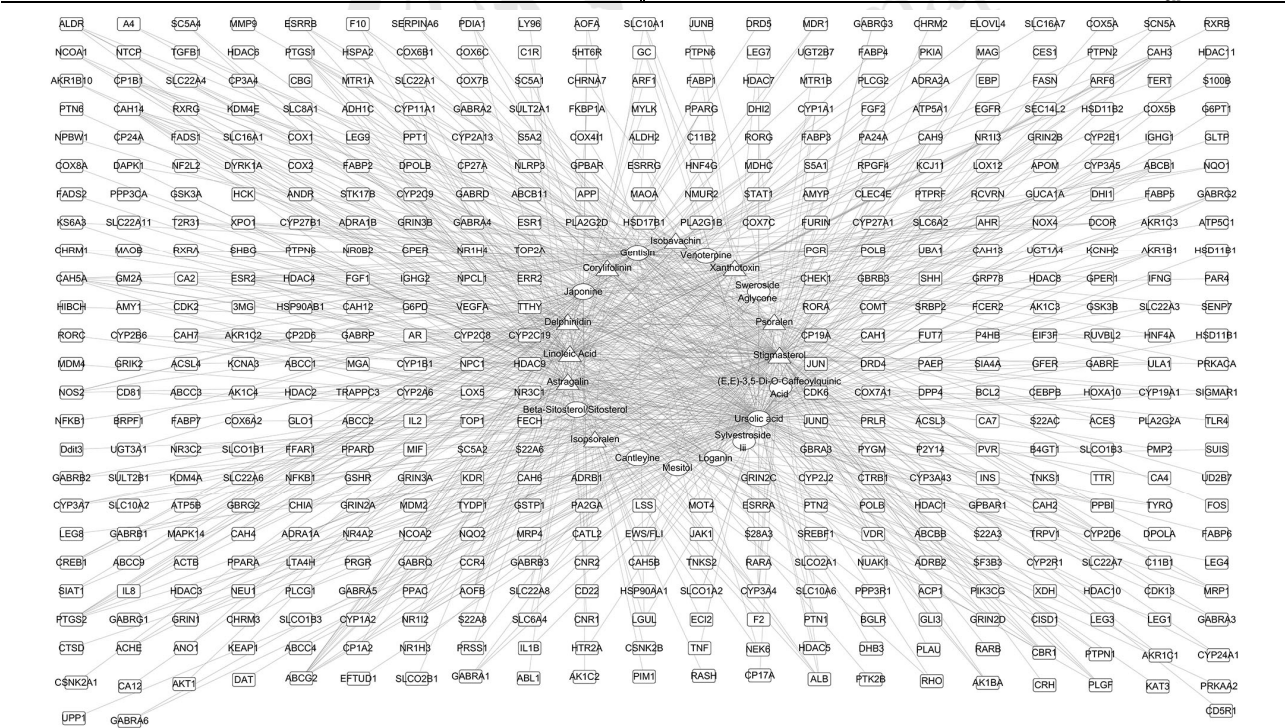


图1 活性化学成分-靶点网络图

圆形-续断；三角形-补骨脂；长方形-靶点。

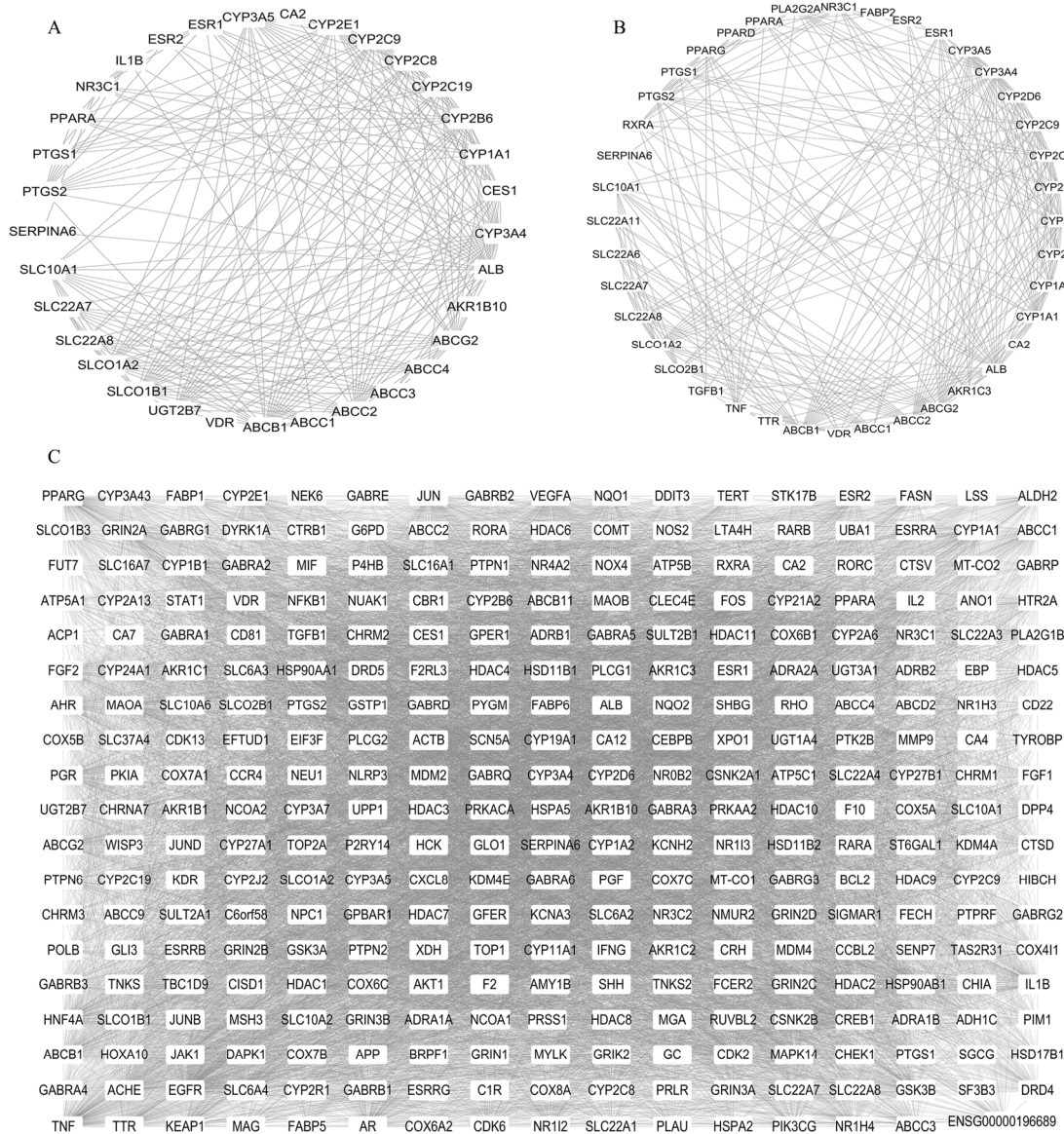
Fig. 1 Compounds-targets network

Round-Dipsaci Radix; triangle-Psoraleae Fructus; rectangle-target.

2.3 PPI 网络及 Hub 基因

续断治疗骨关节炎的 PPI 网络中包含 33 个作用节点和 213 条相互作用边, 见图 2, 图中节点表示蛋白, 边表示蛋白之间的关联; 补骨脂治疗骨关节炎的 PPI 网络中包含 40 个作用节点和 244 条相互作用边; 而续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的 PPI 网络中包含 322 个作用节点和 12 186 条相互作用边, 这表明续断-补骨脂药对与续断或者补骨脂单味药材治疗骨关节炎的 PPI 网络相比, 具有更多作用靶点及相互作用关系, 体现出中药药对“配伍”中用药优势互补, 协同增强疗效的作用。网络拓扑分析表示, 度值越大, 节点越大, 所在整个网络中占的地位越大。在续断-补骨脂药对治疗

骨关节炎的 PPI 网络中, 可通过计算每个节点的拓扑性质探究续断-补骨脂药对治疗骨关节炎作用的关键靶点, 其在 PPI 网络中筛选出的度值排名靠前的蛋白表明续断-补骨脂药对治疗骨关节炎过程中发挥着重要作用。依据网络拓扑分析中位数原则, 同时满足度值 ≥ 15 , 中心接近度 ≥ 30.58 , 介数中心性 ≥ 18.67 的网络作为续断-补骨脂治疗骨关节炎 PPI 核心网, 见图 3, 其靶点作为其关键靶点, 并将关键靶点依次导入 DisGeNET 数据库, 获取靶点对应的类型, 见表 2。结果表明, 续断-补骨脂药对治疗骨关节炎过程中有信号转导分子、转录因子、蛋白(细胞色素、转运蛋白、载体蛋白、调控蛋白、转运蛋白)、酶(氧化还原酶、水解蛋白酶)。



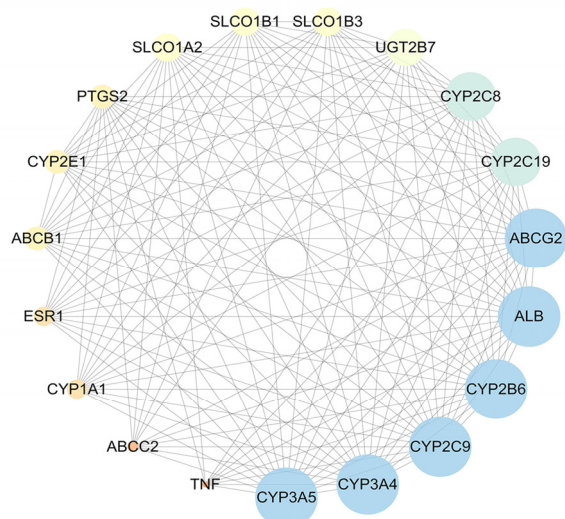


图 3 续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的蛋白-蛋白相互作用核心网络

Fig. 3 Protein-protein interaction key network of couplet medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus for osteoarthritis

2.4 基因功能与通路分析

对筛选得到的 19 个关键靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。GO 富集分析包括 BP、MF 和 CC 3 个分支。设定阈值 $P\text{-value} < 0.05$, $q\text{-value} < 0.05$, 根据 $p\text{-adjust}$ 列出前 10 个, 结果见表 3。

关键靶点主要涉及类固醇代谢过程(steroid

metabolic process)、环氧化酶 P450 途径(epoxygenase P450 pathway)、花生四烯酸代谢过程(arachidonic acid metabolic process)、外源性药物分解代谢过程(exogenous drug catabolic process)、长链脂肪酸代谢过程(long-chain fatty acid metabolic process)、细胞对异生素刺激的反应(cellular response to xenobiotic stimulus)、不饱和脂肪酸代谢过程(unsaturated fatty acid metabolic process); CC 分析, 其关键靶点主要涉及细胞质(cytoplasm)、细胞核(nucleus)、细胞膜(membrane)、转录活性染色体(transcriptionally active chromatin); 基于 MF 分析中可以看出其关键靶点主要涉及氧化还原作用(oxidoreductase activity)、类固醇羟化酶活性(steroid hydroxylase activity)、血红素结合(heme binding)、氧结合(oxygen binding)、铁离子结合(iron ion binding)、花生四烯酸活性(arachidonic acid activity)等。

KEGG 通路富集分析结果通过气泡图进行可视化处理, 其中, Y 轴代表 pathway 名称, X 轴代表富集因子(Generatio, 即目标基因中属于这个 pathway 的基因的数量/背景基因集中这个 pathway 所有基因的数量), 气泡大小代表目标基因中属于这个 pathway 的基因数量, $p\text{-adjust}$ 代表富集显著

表 2 续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的关键靶点及拓扑性质

Tab. 2 Hub gene of treating osteoarthritis of couplet medicine of Dipsaci Radix-Psoraleae Fructus and its topological properties

基因	蛋白	蛋白分类	度	介数中心性	中心接近度
CYP3A4	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4	Oxidoreductase	34	207.48	41.5
ALB	Albumin	Transfer/carrier protein	33	342.02	41
ABCG2	ATP binding cassette subfamily G member 2	Transporter	30	148.51	39.17
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1	Hydrolase; Protease	29	105.01	38.83
CYP2B6	Cytochrome P450 family 2 subfamily B member 6	None	27	88.53	38
ABCC2	ATP binding cassette subfamily C member 2	Transporter	26	66.12	37.17
CYP2C9	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9	None	26	67.31	37.33
SLCO1B1	Solute carrier organic anion transporter family member 1B1	Enzyme modulator; Transporter	25	52.65	36.67
CYP2E1	Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	None	24	113.37	36.5
CYP1A1	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	Oxidoreductase	23	54.63	36
CYP3A5	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5	Oxidoreductase	22	23.40	35.17
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Oxidoreductase	21	120.98	35
SLCO1B3	Solute carrier organic anion transporter family member 1B3	Enzyme modulator; Transporter	20	25.05	33.5
SLCO1A2	Solute carrier organic anion transporter family member 1A2	Enzyme modulator; Transporter	20	33.12	34.17
CYP2C8	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8	None	20	30.71	34
UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	None	20	30.47	33.83
CYP2C19	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19	None	20	19.12	34.33
ESR1	Estrogen receptor 1	Nucleic acid binding; Receptor; Transcription factor	16	29.52	32.33
TNF	Tumor necrosis factor	Signaling molecule	16	41.83	32.33

表 3 关键靶点的 GO 条目

Tab. 3 GO entries of hub genes

类别	GO 编号	名称	基因数	-log(p.adjust)
生物过程	0008202	steroid metabolic process	11	11.64
生物过程	0019373	epoxygenase P450 pathway	6	11.01
生物过程	0019369	arachidonic acid metabolic process	7	10.87
生物过程	0042738	exogenous drug catabolic process	6	10.81
生物过程	0001676	long-chain fatty acid metabolic process	8	10.81
生物过程	0006805	xenobiotic metabolic process	8	10.60
生物过程	0042759	long-chain fatty acid biosynthetic process	6	10.47
生物过程	0071466	cellular response to xenobiotic stimulus	8	9.393
生物过程	0033559	unsaturated fatty acid metabolic process	7	9.162
生物过程	0006690	icosanoid metabolic process	7	9.031
细胞组件	0016324	apical plasma membrane	3	1.201
细胞组件	0045177	apical part of cell	3	1.201
细胞组件	0016323	basolateral plasma membrane	2	1.008
细胞组件	0001891	phagocytic cup	1	1.008
细胞组件	0035327	transcriptionally active chromatin	1	1.008
细胞组件	0005788	endoplasmic reticulum lumen	2	1.008
细胞组件	0045121	membrane raft	2	1.008
细胞组件	0098857	membrane microdomain	2	1.008
细胞组件	0098589	membrane region	2	1.008
分子功能	0016712	oxidoreductase activity, incorporation of one atom of oxygen	8	15.49
分子功能	0008395	steroid hydroxylase activity	8	15.44
分子功能	0020037	heme binding	9	12.84
分子功能	0046906	tetrapyrrole binding	9	12.67
分子功能	0016705	oxidoreductase activity, with incorporation or reduction of molecular oxygen	9	12.24
分子功能	0004497	monooxygenase activity	8	12.11
分子功能	0019825	oxygen binding	6	10.77
分子功能	0005506	iron ion binding	8	10.67
分子功能	0008391	arachidonic acid monooxygenase activity	5	10.47
分子功能	0008392	arachidonic acid epoxygenase activity	5	10.47

性，即 p.adjust 值的大小，见图 4。续断-补骨脂药对治疗骨关节炎主要涉及药物代谢-细胞色素 P450 通路(8 个靶点/42.1%)、花生四烯酸代谢通路(6 个靶点/31.6%)、类固醇激素生物合成通路(5 个靶点/26.3%)、亚油酸代谢通路(5 个靶点/26.3%)等信号通路。说明续断-补骨脂药对的主要活性成分的作用靶点分布在不同的代谢通路，其“多成分-多靶点-多通路”相互调节是治疗骨关节炎的可能作用机制。

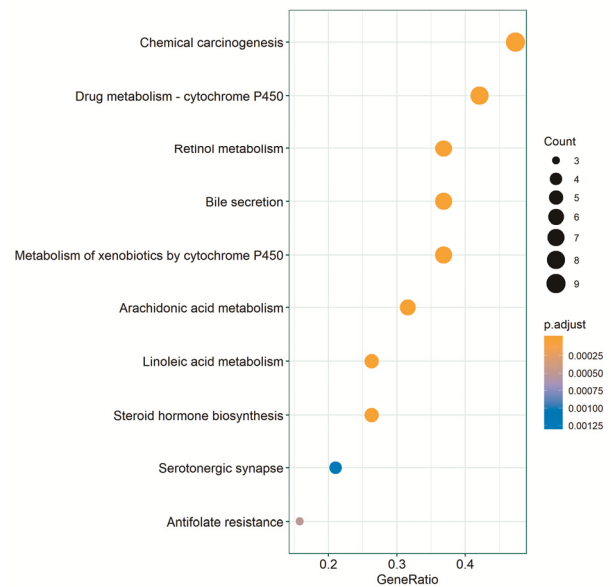


图 4 关键靶点的 KEGG 机制分析

Fig. 4 Mechanism analysis by KEGG of hub genes

3 讨论

骨关节炎是以关节软骨进行性退化伴随软骨下骨的硬化重塑为特征的关节性病变，构成影响个体生活质量的慢性疼痛病症^[25-26]。迄今为止，骨关节炎的治疗策略主要包括手术治疗和药理学策略，其主要用于控制其症状，而不是治疗其根本源头^[27]。中医学认为，骨关节炎属于“骨痹”的范畴，因肾为先天之本，主骨生髓；肝主疏泄，藏血主筋。骨关节炎乃本虚标实之证，系肝肾亏虚、精血不足、筋骨失养，临床治法多以补肝肾，强筋骨为主^[28]。续断与补骨脂作为临床中常用中药药对，临床用药历史悠久^[29]，且具有价格低廉、剂型丰富、不良反应小、依从性好等优势，在治疗早中期骨关节炎方面发挥着不可替代的作用。

续断与补骨脂的主要化学成分为皂苷、黄酮、蒽醌以及挥发油类等^[16,30]。其中，乌索酸(OB=16.77, 靶点 159 个)是一种广泛存在于植物的五环三萜类化合物，具有抗氧化、抗菌、抗炎、肝保护、免疫调节、抗肿瘤等活性^[31]。Lim 等^[32]研究表明，乌索酸可下调软骨细胞 SW1353 的 MMP-13 表达，从而维持关节软骨细胞外基质的完整性来缓解骨关节炎。豆甾醇(OB=43.83, 靶点 124 个)分布广泛，是一种多功能活性因子，具有抗炎、抗肿瘤、降低胆固醇和抗氧化等功效^[33]。研究表明，豆甾醇通过抑制 NF- κ B 通路且显著降低骨关节炎的炎症因子(IL-1 β 、IL-6 以及 PGE₂)以及基质降解介质^[34-35]。此外，亚油酸(OB=45.01, 靶点 78

个)能通过调控免疫应答、免疫细胞、免疫细胞因子以及 PPAR γ 途径影响免疫调节,延缓机体免疫能力的衰退^[36-37]。黄芪苷(OB=14.03,靶点 78 个)具有多重药理作用,如降压、镇惊、镇痛作用,且能促进胰岛素的分泌,抑制炎症反应^[38]。续断-补骨脂药对的有效成分之间不仅存在紧密的协同关系,而且其作用的靶点在治疗疾病的过程中也发挥着重要作用。

PPI 网络分析结果表明,续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的 PPI 网络中包含了 322 个作用节点以及 12 186 相互作用边,其中涵盖了所有的续断/补骨脂单味药材治疗骨关节炎的 PPI 网络中作用节点和相互作用边(续断:33 个作用节点和 213 条作用边;补骨脂:40 个作用节点和 244 条相互作用边)以及续断-补骨脂药对“配伍”过程中潜在的作用节点以及相互作用边,如基质金属蛋白酶-9(MMP-9),白介素-2(IL-2),一氧化氮合酶-2(NOS₂)等。有研究报道称^[39],MMP-9 作为 MMPs 家族中的重要一员,与骨关节炎软骨的退变关系密切,且细胞炎症因子如 IL-1 或者 IL-2^[40]通过刺激软骨细胞退变,引起 MMPs 家族的产生,抑制 II 型胶原的合成。NOS₂ 可在病理条件下产生大量的 NO,NO 作为一种炎性介质和细胞毒性因子,即可引起滑膜炎,诱导并可直接引起滑膜以及软骨细胞的杀伤和凋亡,从而导致软骨基质降解,最终导致骨关节炎的发生,其作用类似于细胞因子 IL-1、TNF- α 的作用^[41]。这些潜在的靶点在治疗骨关节炎疾病中起到至关重要的作用,表明续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的作用远远大于单味药材治疗骨关节炎,体现中药复方“配伍”中优势互补,协同增加疗效的作用。

基于续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的 PPI 核心网络,共筛选出关键靶点 19 个,其包括 CYP3A4、ALB、ABCG2、ABCB1、CYP2B6、ABCC2、CYP2C9、SLCO1B1、CYP2E1、CYP1A1、CYP3A5、PTGS2、SLCO1B3、SLCO1A2、CYP2C8、UGT2B7、CYP2C19、ESR1 和 TNF。其中, TNF 分子在保护骨关节炎方面起着关键作用,其 TNF- α 水平与骨关节炎之间的相关性已得到证实^[42-43]。关键节点的 KEGG 通路分析显示,续断-补骨脂药对治疗骨关节炎主要涉及药物代谢 CYP450 代谢通路、花生四烯酸代谢通路、类固醇激素生物合成通路等信号通路。其中,细胞色素 P450 家族中的

CYP3A4、CYP2C9、CYP1A1、CYP3A5 和 CYP2C8、CYP2C19 与药物代谢密切相关。例如 CYP2D6 参与骨关节炎治疗期间阿片受体激动剂及去甲肾上腺素-血清素再摄取的代谢过程^[44]。CYP2C9 参与多种非甾体类抗炎药代谢,且有助于广泛药动学变异^[45-46]。花生四烯酸作为炎症反应的一条重要调控通路,可以介导骨关节炎中的炎症反应;其 PTGS2 在本研究中为续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的关键靶点是基于花生四烯酸通路调控白三烯及过敏介质和炎症反应^[47]。

综上所述,本研究结果显示,续断-补骨脂药对的 20 个活性成分作用于 473 个作用靶点;与单味药材治疗骨关节炎的 PPI 网络相比,续断-补骨脂药对治疗骨关节炎的 PPI 网络包含更多的作用靶点以及相互作用关系,且涉及多种过程、分子和通路,体现了“续断-补骨脂”药对“配伍”优势互补,疗效叠加的治疗效果,以及“多成分-多靶点-多途径”的作用特点。

REFERENCES

- [1] GLYN-JONES S, PALMER A J, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2015, 386(9991): 376-387.
- [2] MEULENBELT I, KLOPPENBURG M, KROON H M, et al. Clusters of biochemical markers are associated with radiographic subtypes of osteoarthritis(OA) in subject with familial OA at multiple sites. The GARP study [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, 15(4): 379-385.
- [3] PEREIRA D, RAMOS E, BRANCO J. Osteoarthritis [J]. *Acta Med Port*, 2015, 28(1): 99-106.
- [4] SINUSAS K. Osteoarthritis: diagnosis and treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2012, 85(1): 49-56.
- [5] 尹若峰, 邱贵兴. 骨关节炎发生发展的分子机制[J]. *中国骨与关节外科*, 2009, 2(1): 71-73.
- [6] WOOLF A D, ERWIN J, MARCH L. The need to address the burden of musculoskeletal conditions [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2012, 26(2): 183-224.
- [7] HILIGSMANN M, COOPER C, ARDEN N, et al. Health economics in the field of osteoarthritis: an expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis(ESCEO) [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2013, 43(3): 303-313.
- [8] NELSON A E. Osteoarthritis year in review 2017: clinical [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(3): 319-325.
- [9] ZHANG W, OUYANG H, DASS C R, et al. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis [J]. *Bone Res*, 2016(4): 15040.
- [10] HE S, ZHOU Y W, DU H W. Comparison of efficacy of platelet-rich plasma vs. corticosteroid intra-articular injection on advanced knee osteoarthritis [J]. *Her Med(医药导报)*, 2018, 37(8): 960-963.
- [11] BROSSEAU L, WELLS G A, KENNY G P, et al. The implementation of a community-based aerobic walking program for mild to moderate knee osteoarthritis(OA): a knowledge translation(KT) randomized controlled trial(RCT):

- Part I: The Uptake of the Ottawa Panel clinical practice guidelines(CPGs) [J]. BMC Public Health, 2012(12): 871.
- [12] REGINSTER J Y, NEUPREZ A, LECART M P, et al. Role of glucosamine in the treatment for osteoarthritis [J]. Rheumatol Int, 2012, 32(10): 2959-2967.
- [13] 高伟. 中药配伍中的药对配伍原则及依据[J]. 名医, 2018, 65(10): 59.
- [14] GUO X Z, YU C N. Herbal textual study on the flavour of Radix Dipsaci [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2018, 14(11): 95-96.
- [15] 高清婉. 续断接骨汤治疗四肢骨折 48 例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(17): 32-33.
- [16] WEI M M, WANG S Y, YANG W, et al. Chemical constituents of Psoraleae Fructus and its main toxic ingredients [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(7): 207-219.
- [17] HAN T, XIE Y M, LIU H. Metrological analysis of Xianling Gubao capsule in treating osteoarthritis [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2019, 15(1): 161-164.
- [18] JIANG W Y, BAO Y Y, DU G L. Research progress of network Chinese pharmacology [J]. Inform Tradit Chin Med(中医药信息), 2018, 35(5): 122-126.
- [19] LIU Z H, SUN X B. Network pharmacology: new opportunity for the modernization of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2012, 47(6): 696-703.
- [20] SU G, MORRIS J H, DEMCHAK B, et al. Biological network exploration with Cytoscape 3 [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2014(47): 1-24.
- [21] PIGNERO J, BRAVO A, 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): D833-D839.
- [22] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium [J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 25-29.
- [23] CHEN J, LI C, ZHU Y, et al. Integrating GO and KEGG terms to characterize and predict acute myeloid leukemia-related genes [J]. Hematology, 2015, 20(6): 336-342.
- [24] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284-287.
- [25] MURPHY G, NAGASE H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008, 4(3): 128-135.
- [26] ZHU N, HOU J, WU Y, et al. Identification of key genes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis based on bioinformatics analysis [J]. Medicine(Baltimore), 2018, 97(22): e10997.
- [27] XIAO K, XIA Z, FENG B, et al. Circular RNA expression profile of knee condyle in osteoarthritis by illumina HiSeq platform [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10): 17500-17511.
- [28] 张诗怡, 刘春景. 骨关节炎中医外治研究进展[J]. 新疆中医药, 2019, 37(2): 145-148.
- [29] 李贤让. 续断总皂苷治疗骨关节炎及其机制的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [30] TAO Y, JIANG Y H, TANG K E J, et al. Comparisons on chemical constituents of crude and wine-processed Dipsacus asper by using UPLC-Q-TOF/MS [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(4): 672-676.
- [31] 崔宏伟, 苏秀兰. 鸟氨酸调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在结直肠癌中的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(10): 1882-1888.
- [32] LIM H, MIN D S, KANG Y, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-13 expression in IL-1 β -treated articular chondrocytes by a steroidal saponin, spicatoside A, and its cellular mechanisms of action [J]. Arch Pharm Res, 2015, 38(6): 1108-1116.
- [33] 张晓凤, 薛延团, 张得钧. 植物甾醇保护胃黏膜及抗消化道肿瘤的研究进展[J/OL]. 基因组学与应用生物学. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20190522.0849.002.html>.
- [34] CHEN W P, YU C, HU P F, et al. Stigmasterol blocks cartilage degradation in rabbit model of osteoarthritis [J]. Acta Biochim Pol, 2012, 59(4): 537-541.
- [35] GABAY O, SANCHEZ C, SALVAT C, et al. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(1): 106-116.
- [36] 金磊, 王立志. 共轭亚油酸的抗炎机制和对炎症疾病调节研究进展[J]. 农业科学研究, 2018, 39(4): 58-63.
- [37] LAIRON D, BERTRAIS S, VINCENT S, et al. Dietary fibre intake and clinical indices in the French Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants(SU. VI. MAX) adult cohort [J]. Proc Nutr Soc, 2003, 62(1): 11-15.
- [38] 冒有平. 高效液相色谱法测定复方黄芪颗粒中黄芪苷的含量[J]. 陕西中医, 2015, 36(1): 107-109.
- [39] ZHANG T F, LI J F. Expression and significance of cytokine IL- β and TNF- α mRNA in osteoarthritis cartilage [J]. Chin Mod Doc(中国现代医师), 2008, 46(15): 116-117.
- [40] 赵紫琴, 徐瑾, 王瑞琳, 等. 类风湿性关节炎滑膜组织中 NLRP3 炎性小体及下游因子 IL-1 β /IL-18 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019, 35(5): 534-538.
- [41] CHEN N J, XU D T, HOU B, et al. The expression of TGF- β 1 and NOS2 in the synovial membrane of osteoarthritis and their relationships [J]. J Clin Orthopaedics(临床骨科杂志), 2008, 11(4): 363-366.
- [42] ZHAO Y P, LIU B, TIAN Q Y, et al. Progranulin protects against osteoarthritis through interacting with TNF- α and β -Catenin signalling [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(12): 2244-2253.
- [43] LI H, XIE S, QI Y, et al. TNF- α increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6): 4737-4744.
- [44] HU G, GU W, SUN P, et al. Transcriptome analyses reveal lipid metabolic process in liver related to the difference of carcass fat content in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Int J Genomics, 2016(2016): 7281585.
- [45] BALMACEDA C M. The impact of ethnicity and cardiovascular risk on the pharmacologic management of osteoarthritis: a US perspective [J]. Postgrad Med, 2015, 127(1): 51-56.
- [46] DAI D P, WANG S H, LI C B, et al. Identification and functional assessment of a new CYP2C9 allelic variant CYP2C9*59 [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(8): 1246-1249.
- [47] KOROTKYI O H, VOVK A A, DRANITSINA A S, et al. The influence of probiotic diet and chondroitin sulfate administration on Ptg2, Tgfb1 and Col2a1 expression in rat knee cartilage during monoiodoacetate-induced osteoarthritis [J]. Minerva Med, 2019, 110(5): 419-424.

收稿日期: 2019-05-27

(本文责编: 沈倩)