

基于网络药理学和体外实验探讨羌活醇通过 COX2/WNT/ β -catenin 轴促进成骨细胞分化的机制

邹文静^{1,3}, 刘黄兴¹, 樊晨², 叶本贵^{1,3*}

¹ 西藏大学医学院, 拉萨 850000; ² 西藏自治区人民政府驻成都办事处医院; ³ 四川大学华西药学院, 成都 610000

摘要: 本研究基于网络药理学与体外实验探讨羌活醇促进成骨细胞分化的作用机制。通过 PubChem、SwissTargetPrediction 等数据库预测羌活醇作用靶点, 结合 GeneCards、OMIM、CTD 数据库获取骨质疏松相关靶点, 利用 Venny、STRING、Cytoscape 等工具构建药物-疾病共同靶点网络, 并进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析; 以小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14 (MC3T3-E1) 和小鼠骨髓间充质干细胞为模型, 采用 CCK-8 法确定羌活醇的安全浓度范围, 通过碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测、茜素红染色、RT-qPCR、Western blot 以及使用无翅型 MMTV 整合位点家族/ β -连环蛋白 (wingless-type MMTV integration site family/ β -catenin, WNT/ β -catenin) 信号通路抑制剂 XAV-939 进行验证, 评估羌活醇的促成骨分化效应及机制。结果显示, 网络药理学筛选出羌活醇与骨质疏松的 61 个共有靶点, 核心靶点包括前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) (编码环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX2) 蛋白)、钾电压门控通道亚家族 A 成员 2 (potassium voltage-gated channel subfamily A member 2, KCNA2)、缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF1A) 等; KEGG 分析提示其可能通过 WNT/ β -catenin 信号通路发挥作用, 分子对接表明羌活醇与核心靶点 COX2 蛋白结合最为稳定 (结合能为 -8.5 kcal/mol); 体外实验证实, 在安全浓度 (5、10、20 μ mol/L) 下, 羌活醇可显著增强 ALP 活性、促进钙结节形成, 并上调成骨相关基因 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2)、骨特异性转录因子 (specificity protein 7, Sp7) 和远端缺失同源框 5 (distal-less homeobox 5, Dlx5) 的 mRNA 表达, Western blot 实验进一步表明羌活醇通过上调 COX2 表达激活 WNT/ β -catenin 通路, 促进 β -catenin 核转位及下游 G1/S-特异性周期蛋白-D1 (G1/S-specific cyclin-D1, Cyclin D1)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma 2, BCL-2) 蛋白表达, 该效应可被 XAV-939 逆转。以上结果提示, 羌活醇可能通过调控 COX2/WNT/ β -catenin 信号轴促进成骨细胞分化, 为羌活醇在骨质疏松治疗中的应用提供理论依据。

关键词: 羌活醇; 成骨分化; 网络药理学; WNT/ β -catenin 信号通路; 骨质疏松

中图分类号: R996

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880 (2026) 8-1816-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.8.019

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.8.019

Mechanism of notopterol in promoting osteoblast differentiation via the COX2/WNT/ β -catenin axis based on network pharmacology and *in vitro* experiments

ZOU Wen-jing^{1,3}, LIU Huang-xing¹, FAN Chen², YE Ben-gui^{1,3*}

¹ School of Medicine, Xizang University, Lhasa 850000, China; ² The Hospital of Chengdu Office of the People's Government of Tibet Autonomous Region; ³ West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610000, China

Abstract: This study aims to investigate the mechanism by which notopterol promotes osteoblast differentiation using network pharmacology and *in vitro* experiments. The potential targets of notopterol were predicted using databases including PubChem and SwissTargetPrediction. Disease targets related to osteoporosis were retrieved from the GeneCards, OMIM, and CTD databases. The Venny, STRING, and Cytoscape tools were utilized to construct a drug-disease common target network and to perform GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment analyses. Mouse calvarial preosteoblast subclone 14 (MC3T3-

收稿日期: 2025-07-03 接受日期: 2025-12-12

基金项目: 2023 年度西藏自治区高新社发领域“揭榜挂帅”项目 (XZ202303ZY0007G); 西藏自治区科技厅中央引导地方科技成果转化项目 (XZ202301YD0014C)

* 通信作者 Tel: 86-018380221794; E-mail: benguiye513@126.com

E1) cell and mouse bone marrow mesenchymal stem cell were used as models. The safe concentration range of notopterol was determined using CCK-8 assay. The osteogenic differentiation-promoting effects and underlying mechanisms were evaluated by assessing alkaline phosphatase (ALP) activity, Alizarin Red S staining, RT-qPCR, Western blot, and validation using the wingless-type MMTV integration site family/ β -catenin (WNT/ β -catenin) signaling pathway inhibitor XAV-939. The results showed that network pharmacology screening identified 61 common targets between notopterol and osteoporosis. Core targets included prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*PTGS2*) (which encodes the cyclooxygenase-2 (COX2) protein), potassium voltage-gated channel subfamily A member 2 (*KCNA2*), and hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (*HIF1A*). KEGG analysis suggested a potential role through the WNT/ β -catenin signaling pathway. Molecular docking indicated that notopterol exhibited the most stable binding with the COX2 protein (binding energy: -8.5 kcal/mol). *In vitro* experiments confirmed that at safe concentrations (5, 10, 20 μ mol/L), notopterol significantly enhanced ALP activity, promoted calcium nodule formation, and upregulated the mRNA expression of osteogenic-related genes Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), transcription factor Sp7 (*Sp7*), and distal-less homeobox 5 (*Dlx5*). Western blot analysis further demonstrated that notopterol activates the WNT/ β -catenin pathway by upregulating COX2 expression, promoting β -catenin nuclear translocation and the expression of downstream proteins G1/S-specific cyclin-D1 (Cyclin D1) and B-cell lymphoma 2 (BCL-2). These effects were reversed by XAV-939. The findings suggest that notopterol promotes osteoblast differentiation potentially by regulating the COX2/WNT/ β -catenin signaling axis, providing a theoretical basis for the application of notopterol in the treatment of osteoporosis.

Key words: notopterol; osteogenic differentiation; network pharmacology; WNT/ β -catenin signaling pathway; osteoporosis

骨质疏松症是全球最常见的骨骼疾病,发病主要是成骨细胞与破骨细胞共同介导的骨形成与骨吸收失去动态平衡关系所致^[1]。在骨质疏松症患者中,骨髓间充质干细胞向脂肪方向分化增多,向成骨方向分化减少^[2],无翅型 MMTV 整合位点家族/ β -连环蛋白 (wingless-type MMTV integration site family/ β -catenin, WNT/ β -catenin) 信号通路是调控骨形成的关键通路,其激活可促进间充质干细胞向成骨细胞分化^[3]。研究表明,前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, *Ptgs2*) (编码环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX2) 蛋白) 可通过前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 在骨损伤或炎症微环境中激活表皮生长因子受体/磷脂酰肌醇 3-激酶 (epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase, EGFR/PI3K) 通路以增强 β -catenin 稳定性,放大经典 WNT/ β -catenin 信号通路对成骨基因如 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, *Runx2*)、骨特异性转录因子 (specificity protein 7, *Sp7*) 和远端缺失同源框 5 (distal-less homeobox 5, *Dlx5*) 的转录激活^[4]。这为天然化合物调控骨代谢的靶点研究提供了重要思路。

伞形科羌活属植物羌活 (*Hansenia weberbaueriana* (Fedde ex H. Wolff) Pimenov & Kljuykov) 的提取物可能通过调节骨代谢相关通路影响成骨分化^[5], 这为探索羌活的抗骨质疏松作用提供了理论基础。羌活醇来源于羌活的干燥根茎,是羌活药材

中的主要活性成分,其具有抑制滑膜成纤维细胞异常增殖能力^[6]。现有研究表明,羌活醇能通过抑制 PI3K/蛋白激酶 B/谷胱甘肽过氧化物酶 4 (PI3K/protein kinase B/glutathione peroxidase 4, PI3K/AKT/GPX4) 介导的铁死亡信号通路有效缓解骨关节炎并减轻疼痛^[7], 展现了羌活醇作为羌活主要提取物在骨骼系统疾病中的潜在药用价值。尽管羌活醇前期已有骨研究领域相关文献报道,但其在羌活提取物抗骨质疏松作用中的角色尚未阐明^[8]。本研究通过整合网络药理学和体外实验,系统地探究羌活醇促进成骨细胞分化的分子机制,为其在骨质疏松治疗中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 细胞

小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14 (MC3T3-E1)、小鼠骨髓间充质干细胞 (BMSC) (批号: CL-0378、CP-M131, 购于武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.1.2 药物和试剂

羌活醇 (批号: MUST-24070115, 纯度: 98%, 成都曼斯特生物科技有限公司); 胎牛血清 (批号: ST30-3302, 潘生物科技 (德国) 有限公司); α -MEM 基础培养基、Trizol 试剂 (批号: C12571500BT、15596018CN 赛默飞世尔生化制品 (上海) 有限公司); 0.25% 胰蛋白酶 (批号: 211042, 无锡耐思生命科技股份有限公司); 小鼠成骨细胞诱导因子 (批

号;AI1001-004,杭州炆明生物技术有限公司);青链霉素混合液(100×)、茜素红染色试剂盒(批号:P1400、G3283,北京索莱宝科技有限公司);红细胞裂解液(批号:G2015-500ML,塞维尔生物);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、核质分离试剂盒(批号:P0321S、P0028,上海碧云天生物技术有限公司);Taq SYBR® Green qPCR Premix (Universal)(批号:EG20117M,百时美生物科技);CCK-8 试剂盒、 β -连环蛋白(β -catenin)、G1/S-特异性周期蛋白-D1(Cyclin D1)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma 2, BCL-2)抗体、RUNX2、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号:K1018、MA1461、PA1113、F1928、MA4990、MA5798,艾湃生物科技有限公司);COX2 抗体(批号:ab179800,艾博抗(上海)贸易有限公司);WNT/ β -catenin 信号通路抑制剂 XAV-939(批号:CM00854,武汉三鹰生物技术有限公司);引物(生工生物工程(上海)股份有限公司);PVDF 膜(批号:24937-79-9,密理博公司)。

1.1.3 仪器

XDS200 倒置生物显微镜(江西凤凰光学科技有限公司);MP60401 梯度 PCR 仪(莫纳生物科技有限公司);Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3&5 实时定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技公司);PowerPac HC 电泳电源、Trans-Blot Turbo 半干/湿式转印系统、ChemiDoc MP 化学发光成像仪(伯乐生命医学产品有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 网络药理学分析

通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)获取羌活醇的 SMILE 号,并利用 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch>)、SEA 数据库(sea.chem.tufts.edu)和 Super-pred 数据库(<https://prediction.charite.de>)进行靶点预测。将各平台预测结果汇总并去重,最终得到潜在靶点^[9]。以“osteoporosis”为检索词,在 GeneCards(<https://www.genecards.org>)、OMIM(<https://omim.org>)和 CTD(<http://ctdbase.org>)数据库中检索与骨质疏松相关的靶点基因,设置物种为人。合并各数据库结果并去重,共获得疾病靶点。将成分靶点与疾病靶点输入 Venny 2.1 软件,绘制韦恩图,筛选出共有靶点,作为羌活醇作用于骨质疏松的潜在靶点。将共有靶点输入 STRING 数据库([\[string-db.org\]\(https://string-db.org\)\)构建蛋白互作\(protein-protein interaction, PPI\)网络,设置中等置信度\(score \$\geq 0.4\$ \),物种为“Homo sapiens”。利用 Cytoscape 3.9.0 对网络进行拓扑分析,根据 degree 值筛选出关键靶点。以羌活醇、骨质疏松和共有靶点为基础,构建药物-靶点-疾病网络,并通过 Cytoscape 3.9.0\(<https://cytoscape.org>\)可视化,展示药物与疾病间的复杂作用关系。使用 DAVID 数据库\(<https://david.ncifcrf.gov>\)对共有靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析,筛选 \$P\$ 值 \$< 0.05\$ 的显著通路,共富集到 17 条信号通路,进一步揭示羌活醇的作用机制。从 PubChem 和 RCSBPDB 数据库\(<https://www.rcsb.org>\)分别获取羌活醇和关键靶点的 3D 结构,采用 AutoDock Vina 工具\(<https://vina.scripps.edu>\)进行分子对接。配体和受体\(靶蛋白\)经 AutoDock Tools 预处理后,计算结合能并分析相互作用,筛选结合能 \$< -5.0\$ kcal/mol 的稳定复合物。](https://</p></div><div data-bbox=)

1.2.2 体外细胞实验

1.2.2.1 羌活醇溶液制备

精密称量 2.00 mg 羌活醇,溶于 100 μ L DMSO,配制成浓度为 56.54 mmol/L 的药物母液。

1.2.2.2 成骨细胞的诱导和培养

MC3T3-E1 为贴壁细胞,37 $^{\circ}$ C 解冻复苏,离心后弃去冻存液,加入 α -MEM 完全培养基(90% α -MEM 基础培养基、10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液),于 10 cm 培养皿中培养,每皿 8 mL α -MEM 完全培养基,将其置于含有 5% CO_2 的 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中培养。在细胞培养基中加入 16 μ L/mL 的成骨诱导因子,对其进行成骨诱导。

1.2.2.3 细胞活性检测

将 MC3T3-E1 细胞按照 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μ L α -MEM 完全培养基,放入含有 5% CO_2 的 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中培养 24 h 后,设置对照组(成骨诱导)、羌活醇 + 成骨诱导组(羌活醇 5、10、20、40、60、80、100 μ mol/L),每组至少 6 个复孔,将其放入含有 5% CO_2 的 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中再培养 24 h 和 48 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,避光孵育 1.5 h,于 450 nm 波长处测定吸光度。

1.2.2.4 ALP 活性检测

将 MC3T3-E1 细胞按照 1×10^6 个/孔接种于 24 孔板中,每孔加入 1 mL α -MEM 完全培养基放入含有 5% CO_2 的 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中培养 24 h 后,设置对照组(成骨诱导)、羌活醇 + 成骨诱导组

(羌活醇 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)。每 3 d 更换 1 次相应的药物及培养基,经过 5 d 的培养,用 ALP 活性试剂盒进行 ALP 活性检测(37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min)。

1.2.2.5 茜素红染色

将 MC3T3-E1 细胞按照 1×10^6 个/孔接种于 24 孔板中,每孔加入 1 mL α -MEM 完全培养基,放入含有 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中培养 24 h 后,设置对照组(成骨诱导)、羌活醇 + 成骨诱导组(羌活醇 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)。每 3 d 更换 1 次培养基,经过 10 d 的培养,吸走细胞培养基,用 PBS 冲洗 1~2 次,每孔加入 2 mL 的 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min,吸走 6 孔板内 4% 多聚甲醛溶液,用 PBS 洗 2 次,每孔加入 1 mL 的茜素红染液,静置 10 min,吸走茜素红染液,用 PBS 洗 2 次,于显微镜下拍照。

1.2.2.6 RT-qPCR 检测成骨相关基因 mRNA 的表达

将 MC3T3-E1 和 BMSC 细胞按照 2×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,每孔加入 3 mL α -MEM 完全培养基,放入含有 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中培养 24 h 后,设置对照组(成骨诱导)、羌活醇 + 成骨诱导组(羌活醇 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$),再在培养箱中培养 48 h 后,弃去 6 孔板中培养基,用 PBS 冲洗 2 次,每孔加入 1 mL 的 Trizol 试剂裂解,将裂解后的液体吸入 EP 管中静置 5 min,按照总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,使用梯度 PCR 仪器将其逆转录为 cDNA。采用 RT-qPCR 扩增检测各组靶基因的表达水平。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *Runx2*、*Sp7*、*Dlx5* 的 mRNA 的相对表达量。具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列	
Table 1 Primers sequence	
基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')
<i>Runx2</i>	F:CGGACGAGGCAAGAGTTTC
	R:TGGCTCAGATAGGAGGGGTAA
<i>Sp7</i>	F:GCTGGCTGGGCTCTTGCCCCG
	R:CCATGGGCTGGCTGGGCTG
<i>Dlx5</i>	F:GCAAGATCACTAGACGGGAATCA
	R:GCATTGTCGAAGTCGGATACAGAG
<i>Gapdh</i>	F:ACTGAGGACCAGGTTGTC
	R:TGCTGTAGCCGTATTCATTG

1.2.2.7 Western blot 检测相关蛋白表达

将 MC3T3-E1 和 BMSC 细胞按照 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,每孔加入 3 mL α -MEM 完全培养

基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中培养,设置对照组(成骨诱导)、羌活醇 + 成骨诱导组(羌活醇 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)进行培养。每 3 d 更换 1 次培养基,培养 5 d 后,用 PBS 清洗 2 遍,加入 RIPA。裂解 10 min 后,用细胞刮刀将细胞从 6 孔板中刮下,离心 10 min(4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min),取上清,BCA 法测浓度。按蛋白上样量 20 μg 每孔,恒压 80 V 电泳 120 min。湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜(250 mA 恒流 45 min),5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,TBST 洗 3 次;二抗室温 1 h,再次洗涤,显影。

1.2.2.8 核质分离

将 MC3T3-E1 和 BMSC 细胞按照 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,每孔加入 3 mL α -MEM 完全培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中培养,设置对照组(成骨诱导)、羌活醇 + 成骨诱导组(羌活醇 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)进行培养并使用 WNT/ β -catenin 信号通路抑制剂 XAV-939^[10] 对成骨诱导伴或不伴羌活醇的 MC3T3-E1 进行处理。培养 5 d 后,依据厂家说明书使用核质分离试剂盒对细胞裂解液进行了核质分离,后续进行 Western blot 检测以评估 β -catenin 的核转位水平。

1.2.2.9 数据统计与分析

实验数据用 SPSS 与 Graphpad Prism 9.5 进行统计分析,数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析对多组间的差异进行比较分析,当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义,使用 GraphPad Prism 软件进行作图。

2 结果

2.1 网络药理学预测结果

2.1.1 羌活醇和骨质疏松疾病共有靶点筛选

按照“1.2.1”项下的方法,对药物靶点进行汇总去重后共预测到靶点 107 个,疾病靶点 34 385 个,将药物及疾病靶点输入软件 Venny 2.1,得到 61 个共有靶点,作为羌活醇作用于骨质疏松的预测靶点进行后续分析,如图 1 所示。

2.1.2 PPI 网络构建及核心靶点的筛选

将共有靶点输入 STRING 数据库进行药物和疾病的 PPI 网络的构建,将生物种类设定为“Homo sapiens”,得到 PPI 网络,设置置信度为 0.400。该网络中有 61 节点,146 条边,平均度值为 4.79。对 PPI 网络进行拓扑分析,根据 degree 值筛选出化合物的关键靶点基因,见下表。选取 degree 值排名前二十的关键靶点做图,具体如图 2 所示。

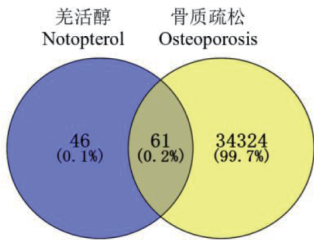


图1 羌活醇-骨质疏松共有靶点韦恩图

Fig. 1 Venn plots of of shared targets between notopterol and osteoporosis

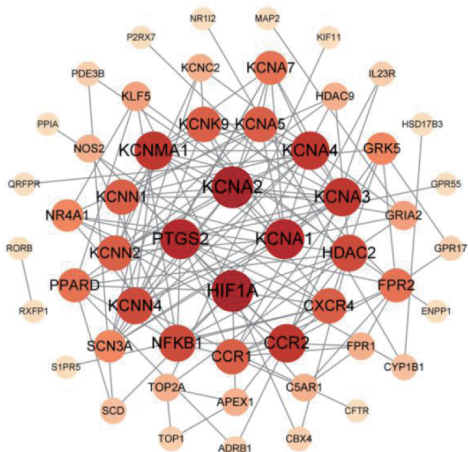


图2 羌活醇与 OP 靶点 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of notopterol and OP targets

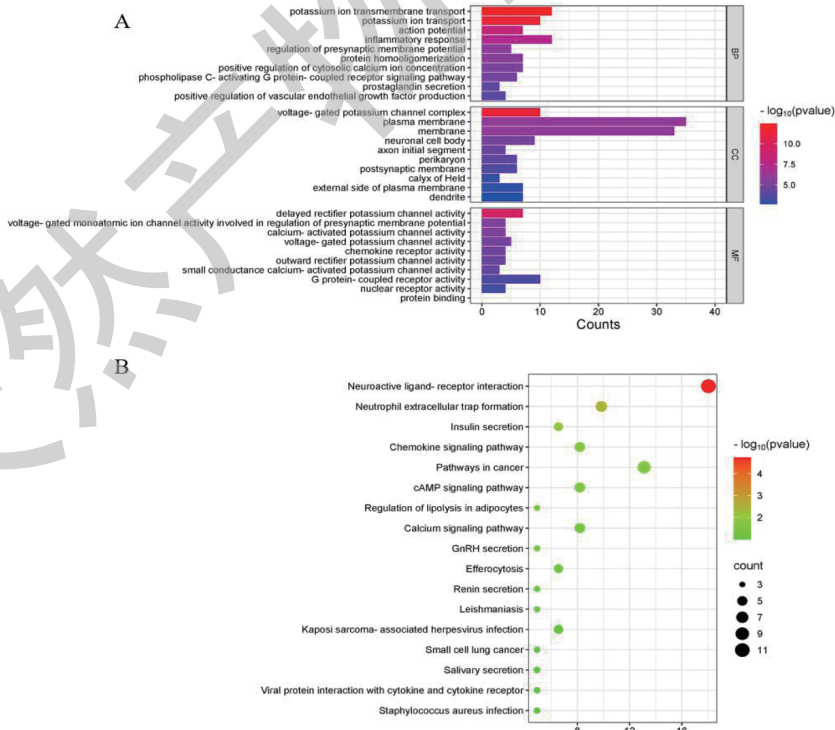


图3 GO(A)与 KEGG(B)通路富集分析

Fig. 3 GO(A) and KEGG(B) enrichment analysis

2.1.3 GO 功能富集和 KEGG 通路富集

通过对共有靶点的 DAVID 生物信息学分析,共富集到 155 个 GO 条目,包括 92 个生物学过程 (biological process, BP)、25 个细胞成分 (cellular component, CC) 和 38 个分子功能 (molecular function, MF)。BP 主要涉及钾离子跨膜转运、动作电位等过程;CC 主要分布于电压门控钾通道复合体、质膜等结构;MF 主要体现为延迟整流钾通道活性、电压门控离子通道活性等。选取 *P* 值排名前 10 的富集条目,运用微生信对结果进行可视化分析,如图 3A 所示。横坐标表示富集在其上的基因数目,纵坐标表示富集条目名称,颜色表示 *P* 值。

KEGG 通路富集分析共筛选出 17 条信号通路,主要涉及神经活性配体-受体相互作用、中性粒细胞胞外陷阱形成及胰岛素分泌等(见图 3B)。其中,PTGS2 在多个通路中频繁出现,提示其可能为羌活醇干预骨质疏松的关键靶点。尽管未直接富集到 WNT 通路,但 PTGS2 作为核心靶点可通过促进 PGE2 合成激活 WNT 信号^[7],与已知的 COX2/WNT 通路交叉机制相符。

2.1.4 分子对接

选取 degree 值排名靠前的目标核心靶点蛋白,如表 2 所示,包括钾电压门控通道亚家族 A 成员 2

(potassium voltage-gated channel subfamily A member 2, KCNA2)、缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF1A)、钾电压门控通道亚家族 A 成员 1 (potassium voltage-gated channel subfamily A member 1, KCNA1)、PTGS2 以及钾电压门控通道亚家族 A 成员 3 (potassium voltage-gated channel subfamily A member 3, KCNA3)。基于分子对接羌活醇和 KCNA2 的结合模式,羌活醇与 KCNA2 的靶点蛋白的 Arg-100、Leu-106 形成氢键相互作用,对接结合能为-6.6 kcal/mol。羌活醇与 HIF1A 的靶点蛋白的 Ser-274 形成氢键相互作用,对接结合能为-5.8 kcal/mol。羌活醇与 KCNA1 的靶点蛋白的 Gln-313、Arg-307 形成氢键相互作用,对接结合能为-6.3 kcal/mol。羌活醇与 PTGS2 的靶点蛋白的 Gln-241、Arg-333、Gly-235 形成氢键相互作用,羌活醇和 PTGS2 的对接结合能为-8.5 kcal/mol。羌活醇与 KCNA3 的靶点蛋白的 Lys-458、Trp-437 形成氢键相互作用,对接结合能为-6.4 kcal/mol。结果表明,

PTGS2 与羌活醇理论上具有最强的结合活性。分子对接结果见图 4。

表 2 羌活醇与核心靶点的分子对接结合能
Table 2 Molecular docking binding energy of notopterol and core targets

核心靶点 Core target	结合能 Binding energy (kcal/mol)
KCNA2	-6.6
HIF1A	-5.8
KCNA1	-6.3
PTGS2	-8.5
KCNA3	-6.4

2.2 CCK-8 测试增殖毒性

如图 5 所示,培养 24 h 和 48 h 后,MC3T3-E1 细胞在羌活醇 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力差异不大,而给药 40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 时,均呈现抑制,且和对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比具有统计学差异。因此,后续选择羌活醇 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 开展实验。

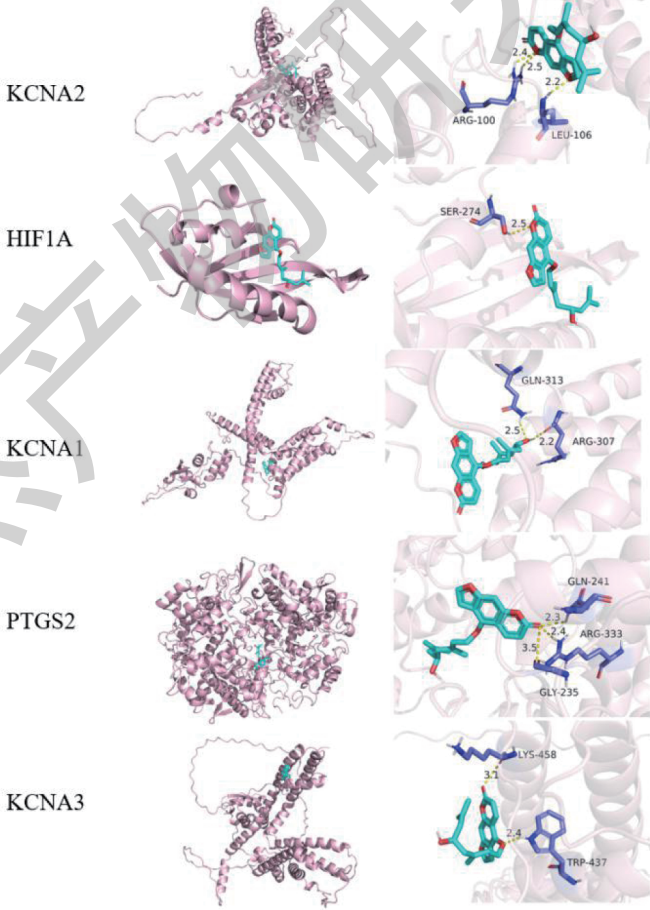


图 4 羌活醇与 KCNA2、HIF1A、KCNA1、PTGS2、KCNA3 分子对接图

Fig. 4 Molecular docking diagram of notopterol and KCNA2, HIF1A, KCNA1, PTGS2 and KCNA3

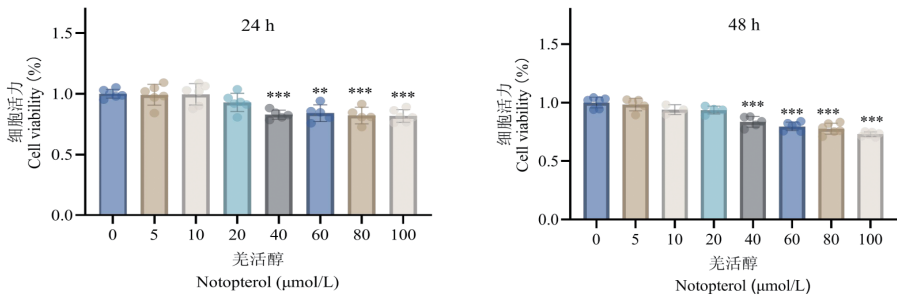


图5 羌活醇对 MC3T3-E1 活力影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effects of notopterol on the viability of MC3T3-E1 cell($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注:与0 μmol/L 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,下同。Note:Compared with 0 μmol/L group, * $P < 0.05$; * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, the same below.

2.3 ALP 活性检测结果

如图6所示,经过5 d 成骨诱导,羌活醇给药组与对照组(0 μmol/L)比较,羌活醇给药5、10、20 μmol/L 组的 ALP 活性(17.53、31.46、20.63 U/L)均显著高于对照组(10.13 U/L),提示羌活醇的处理具有增强 MC3T3-E1 细胞成骨分化时的 ALP 活性的作用。

2.4 钙结节的茜素红染色表现

为明确羌活醇对成骨钙化结节的影响,本实验对 MC3T3-E1 细胞进行成骨诱导 10 d 并同时给或不给予羌活醇处理。如图7所示,经成骨诱导 10 d 后,各个组别在茜素红染色下均可见红色的钙结节,对照组(0 μmol/L)可见少量红色钙结节。给药组钙结节数量显著增加,且高浓度组(20 μmol/L)沉

积量高于中(10 μmol/L)、低(5 μmol/L)浓度组。

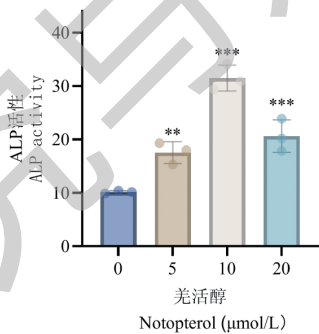


图6 羌活醇对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of notopterol on ALP activity in MC3T3-E1 Cell($\bar{x} \pm s, n = 6$)

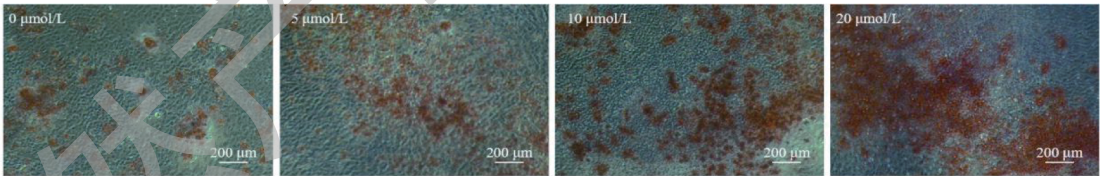


图7 羌活醇处理组 MC3T3-E1 细胞的茜素红染色增强

Fig. 7 Enhanced Alizarin Red staining in notopterol-treated MC3T3-E1 cell

2.5 成骨基因 Runx2、Sp7 和 Dlx5 mRNA 的表达

为明确羌活醇对成骨相关基因表达的影响,本实验对 MC3T3-E1 细胞和 BMSC 细胞进行成骨诱导 5 d 并同时给或不给予羌活醇处理。如图8所示,RT-qPCR 结果表明,给药组的 Runx2、Sp7 和 Dlx5 mRNA 表达均显著高于对照组。

2.6 信号通路关键蛋白的实验验证

2.6.1 羌活醇通过 WNT/ β -catenin 信号通路促进成骨

本研究首先对 MC3T3-E1 进行成骨诱导,并同

时给予5、10、20 μmol/L 的羌活醇处理,5 d 后提取细胞蛋白,通过 Western blot 检测了细胞内 β -catenin、Cyclin D1、BCL-2 和 COX2 的表达。 β -catenin 作为 WNT/ β -catenin 信号通路的核心效应分子,其表达和核转位水平直接反映 WNT/ β -catenin 通路活性状态^[10]。结果显示(见图9),在 MC3T3-E1 细胞在成骨诱导后,细胞内 COX2、 β -catenin、BCL-2 与 RUNX2 蛋白表达量上升,Cyclin D1 蛋白表达量下降,并且这种趋势被羌活醇的处理呈现浓度依赖性增强,提示羌活醇可能通过 COX2 激活 WNT/ β -cate

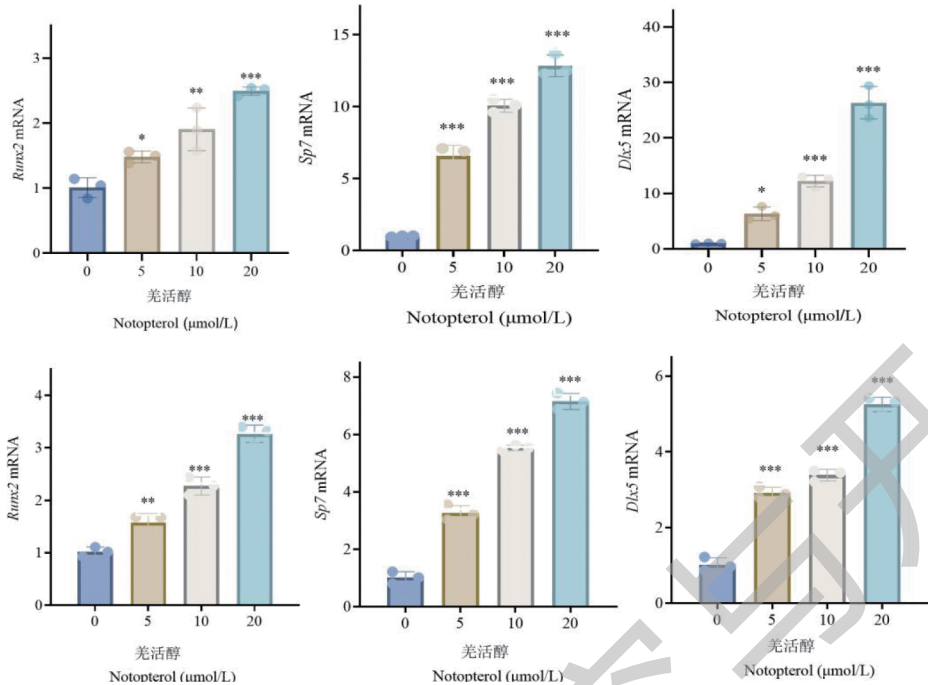


图 8 羌活醇对 MC3T3-E1 细胞 (A) 和 BMSC 细胞 (B) 成骨相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of notopterol on the expression of osteogenesis-related genes in MC3T3-E1 cell (A) and BMSC (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

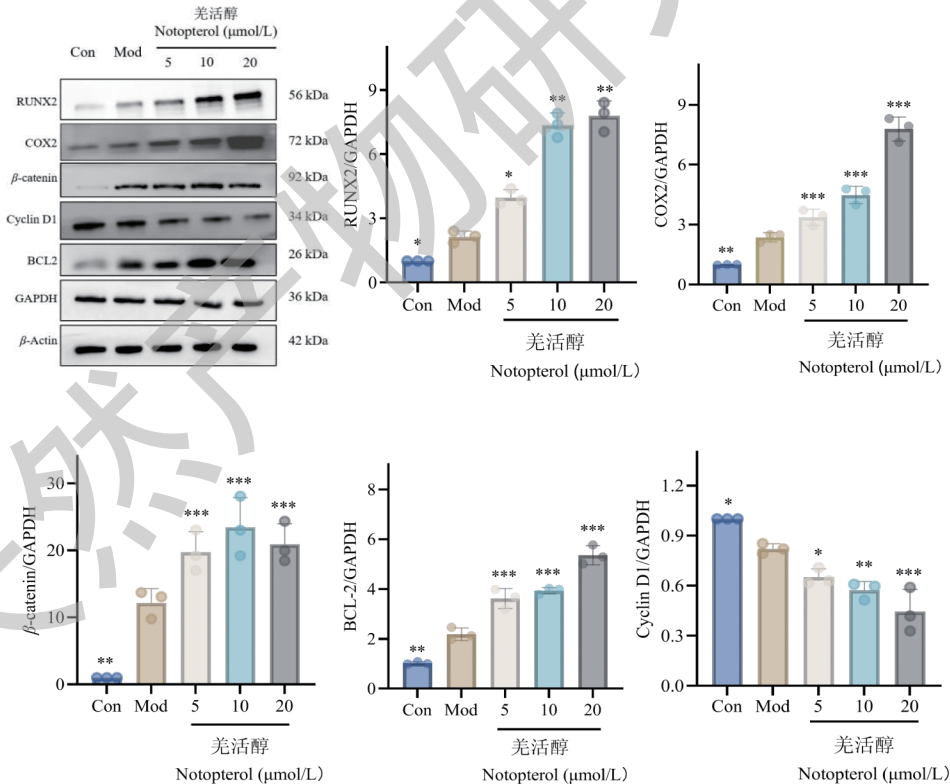


图 9 羌活醇对 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin、Cyclin D1、BCL-2 和 COX2 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effects of notopterol on the protein expression levels of β -catenin, Cyclin D1, BCL-2 and COX2 in MC3T3-E1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: Con: 对照组, 仅完全培养基培养 5 d; Mod: 模型组, 完全培养基和成骨诱导液培养 5 d。与 Mod 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 下同。Note: Con is control group, complete medium for 5 d; Mod is model group, complete medium and osteoblast induction reagent for 5 d.

Compared with Mod group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, the same below.

nin 通路,促进成骨细胞分化和抑制凋亡和细胞周 的结果(见图 10)。
期。BMSC 细胞的实验也获得了与 MC3T3-E1 一致

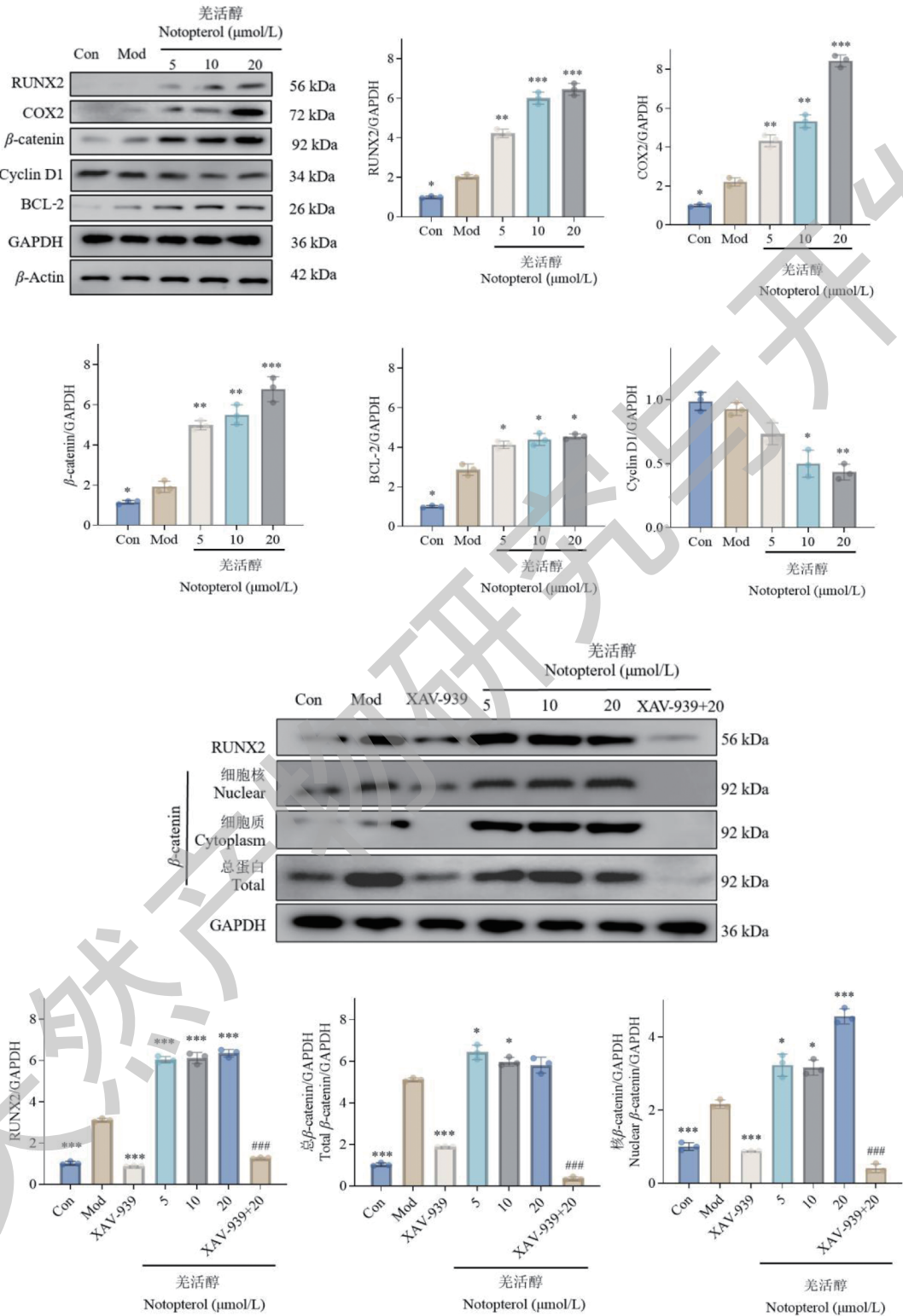


图 10 羌活醇和 XAV-939 对 BMSC 细胞蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effects of notopterol and XAV-939 on protein expression levels in BMSC cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 20 μmol/L 组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.01$,#### $P < 0.001$,下同。Note:Compared with 20 μmol/L group,* $P < 0.05$,*** $P < 0.01$,#### $P < 0.001$,the same below.

2.6.2 WNT/ β -catenin 抑制剂可以消除羌活醇的促成骨效应

Western blot 检测结果显示(见图 11),在成骨诱导条件下, β -catenin 蛋白的细胞核转位增加,并且增加趋势被羌活醇的处理呈现浓度依赖性增强,而抑制剂 XAV-939^[11]无论在羌活醇是否存在的情况

下,均几乎完全抑制了 MC3T3-E1 的 RUNX2 的成骨分化诱导表达,提示羌活醇的促进细胞成骨分化的作用高度依赖于 COX2 介导的 WNT/ β -catenin 通路激活。BMSC 细胞的实验也获得了一致的结果(见图 10)。

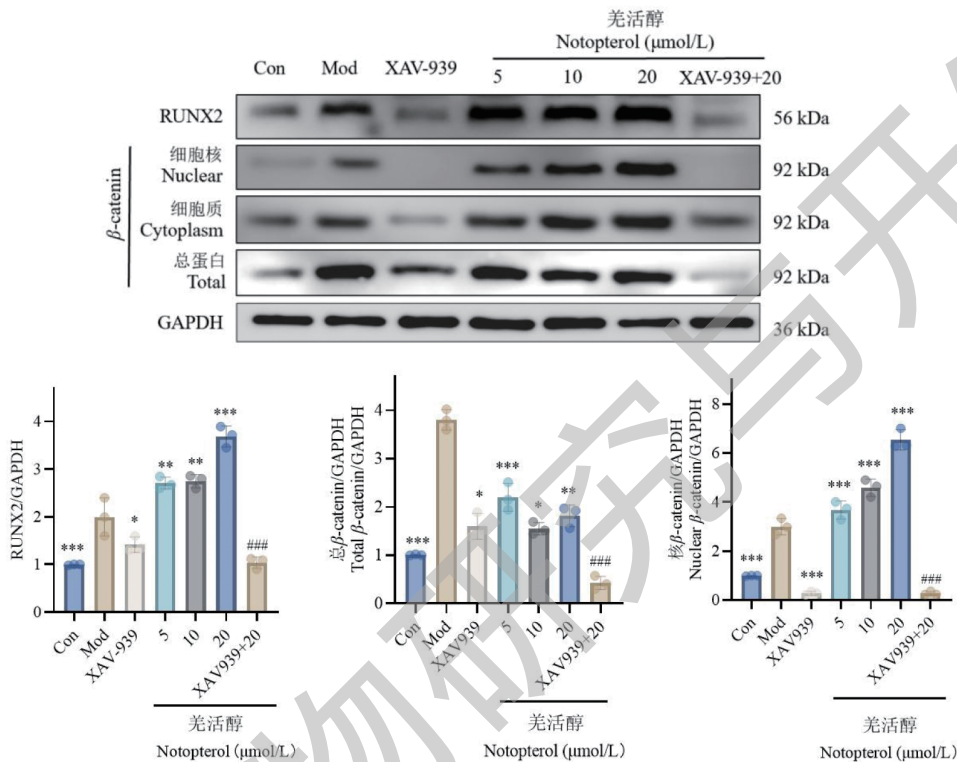


图 11 XAV-939 对 MC3T3-E1 细胞中 WNT/ β -catenin 通路总 β -catenin、核 β -catenin 和 RUNX2 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effects of XAV-939 on the protein expression levels of total β -catenin, nuclear β -catenin and RUNX2 in WNT/ β -catenin pathway in MC3T3-E1 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

尽管网络药理学未直接富集到 WNT 通路,但预测的 PTGS2 靶点与 WNT/ β -catenin 信号存在已知的调控关系^[12-14]。本研究选择 PTGS2-WNT 轴进行验证基于以下考量:(1) PTGS2 是 degree 值排名第 4 的核心靶点;(2) 分子对接显示羌活醇与 PTGS2 结合能最低(8.5 kcal/mol);(3) 文献明确报道 PTGS2/PGE2 可通过 EGFR/PI3K 通路稳定 β -catenin^[15];(4) KEGG 分析中,PTGS2 在诸多差异通路中均发生显著变化。这种网络预测 + 文献支持的策略有助于提高机制研究的可靠性。本研究通过 Western blot 检测发现,羌活醇引起的 COX2 的表达变化与 WNT/ β -catenin 信号通路激活趋势高度重合,结合骨质疏松的核心机制,我们重点关注了

WNT/ β -catenin 通路在羌活醇处理中的作用。本研究检测 β -catenin 的表达以及细胞核转位情况,可直接反映羌活醇对 WNT 信号通路的激活作用^[16]。Cyclin D1 作为 β -catenin 的下游靶基因,不仅参与细胞周期调控,还在成骨细胞增殖中发挥重要作用。通过同时检测 β -catenin 和 Cyclin D1,可以全面评估 WNT/ β -catenin 通路的活化状态及其对成骨细胞增殖的影响。RUNX2 是成骨细胞分化的主要调控因子,也是 WNT/ β -catenin 通路的重要下游效应分子。其表达水平直接反映成骨分化能力。在骨质疏松患者中,RUNX2 的表达常显著降低,导致骨形成障碍。本研究通过检测 RUNX2 的表达变化,可明确羌活醇对成骨分化的促进。BCL-2 作为重要的抗凋亡蛋白,在维持成骨细胞存活中发挥关键作用。骨质疏

松的特征之一就是成骨细胞凋亡增加。值得注意的是,WNT/ β -catenin 通路可以通过上调 BCL-2 表达来抑制细胞凋亡,因此 BCL-2 的检测结果可以与 WNT/ β -catenin 通路活性相互印证。本研究通过检测 BCL-2 的表达水平,提示羌活醇可通过抑制成骨细胞凋亡来改善骨代谢。

在进一步的功能抑制实验中,本研究选择的 XAV-939 是一种选择性 tankyrase 1/2 抑制剂,通过稳定 β -catenin 降解复合物的核心蛋白轴蛋白,促进 β -catenin 的泛素化降解,从而抑制 WNT/ β -catenin 信号通路的活性^[3]。 β -catenin 抑制剂的使用完全阻断了羌活醇的促成骨效应,与之前数据共同印证了羌活醇的促成骨功能与 WNT/ β -catenin 信号通路的密切联系。

本研究通过整合网络药理学和实验验证,初步揭示了羌活醇通过 WNT 通路和 PTGS2 抗骨质疏松的机制,但存在靶点-通路关联不明确、多靶点探索不足等局限。本研究存在以下局限性:首先,实验模型限于细胞层面,未来需在骨质疏松动物模型中验证羌活醇的疗效;其次,尽管网络药理学和分子对接提示 PTGS2 为关键靶点,但未直接检测 PGE2 及其受体表达,后续需补充相关实验以完善 COX2-PGE2-EP-WNT 信号轴的证据链。此外,预测的其他高分靶点(如 HIF1A、KCNA2)是否协同调控成骨分化,仍需进一步探索。这些工作将有助于全面阐明羌活醇的多靶点作用机制。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00408>) 中访问获取。

参考文献

1 Jin TX,Hu JH,Mao Y,et al. Active bone-targeting drug delivery system promotes osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells[J]. Chin J Osteoporos (中国骨质疏松杂志), 2025,31:789-798.

2 Chen X,Su JC. New focus on osteoporosis: differentiation fate of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Acad J Second Mil Med Univ(第二军医大学学报),2017,38:397-404.

3 Baron R,Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease[J]. Nat Med,2013,19:179-192.

4 Zheng C,Qu YX,Wang B,et al. COX-2/PGE2 facilitates fracture healing by activating Wnt/ β -catenin[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23:9721-9728.

5 Cao XY,Du HY,Lin PC,et al. Research progress on chemi-

cal constituents and pharmacological effects of *Notopterygium incisum*[J/OL]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊): 1-23 [2025-07-03]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250609.1446.006>.

6 Tang LH,Wu MR,Chen YY,et al. Active components and mechanism of *Notopterygii Rhizoma et Radix* in treating rheumatoid arthritis[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2024,55:3137-3145.

7 Zhou X,Pan Y,Li JL,Zhuang RJ,et al. Notopteronol mitigates osteoarthritis progression and relieves pain in mice by inhibiting PI3K/Akt/GPX4-mediated ferroptosis[J]. Int Immunopharmacol,2025,151:114323.

8 Guo LY,Wang T,Ma HX,et al. Synergistic effect of osthole and notopteronol combination against Alzheimer's disease and osteoporosis by applying zebrafish AD/OP comorbidity model[J]. Eur J Pharmacol,2024,979:176829.

9 Wu JY,Zhou ZL,Li ZS,et al. Mechanism of *Alpinia officinarum* Hance on gastric cancer based on network pharmacology and *in vitro* experiments[J/OL]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发): 1-21 [2025-07-03]. <https://link.cnki.net/urlid/51.1335.Q.20250610.1920.002>.

10 Gu JW,Niu GM,Ke ZW. Regulatory mechanisms of β -catenin nucleocytoplasmic distribution in the canonical Wnt signaling pathway and research progress on potential therapeutic targets[J]. Fudan Univ J Med Sci(复旦学报医学版), 2022,49:300-308.

11 He JS,Huang ZY,Weng JM,et al. Experimental study on proliferation inhibition of mantle cell lymphoma Jeko-1 cells by β -catenin specific inhibitor XAV-939[J]. J Exp Hematol(中国实验血液学杂志),2015,23:411-415.

12 Wu HY. Mechanism of berberine-induced osteosarcoma cell apoptosis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[D]. Yin-chuan:Ningxia Medical University(宁夏医科大学),2024.

13 Wang JL,He Y,Yang H,et al. 7,8-Dihydroxyflavone regulates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. J Shanxi Med Univ(山西医科大学学报),2023,54:1638-1646.

14 Maurice MM,Angers S. Mechanistic insights into Wnt- β -catenin pathway activation and signal transduction[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2025,26:371-388.

15 Wang D,Wang H,Shi Q,et al. Prostaglandin E2 promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor δ [J]. Cancer Cell, 2004,6:285-295.

16 Gao YG,Chen N,Fu Z,et al. Progress of Wnt signaling pathway in osteoporosis[J]. Biomolecules,2023,13:483.