

基于网络药理学和分子对接技术分析六味地黄丸治疗骨质疏松症的作用机制

刘兴兴¹,郭怡鲲²,艾奇^{1*},李彦¹,王立锁¹,赵传伟¹,潘丽¹

¹中国中医科学院望京医院,北京 100102;²北京中医药大学第一临床医学院,北京 100029

摘要:基于网络药理学和分子对接技术分析六味地黄丸治疗骨质疏松症(osteoporosis, OP)的作用机制。通过TCMSP数据库进行六味地黄丸潜在化学成分获取和靶点预测,运用TTD、Disgenet、GeneCards数据库预测筛选与骨质疏松症相关的基因,利用Cytoscape 3.7.0软件建立中药-化合物-靶点-疾病可视化网络,借助String数据平台进行蛋白互作网络构建,运用Metascape数据库进行GO及KEGG作用通路分析。利用AutoDock 4.2.6软件对筛选所得化学成分与核心靶点进行分子对接验证。结果表明:六味地黄丸治疗骨质疏松症的有效成分69个,靶点125个,潜在有效成分主要包括槲皮素、豆甾醇、山柰酚、薯蓣皂苷元等,核心靶点有AKT1、IL6、VEGFA、TP53、TNF等32个;六味地黄丸通过关键靶点活化缺氧诱导因子1信号通路(HIF-1)、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、磷酸肌醇3激酶(PI3k-Akt)信号通路、Toll样受体信号通路等通路,涉及RNA聚合酶II启动子转录的调控以及细胞凋亡的调控,细胞对缺氧、脂多糖、肿瘤坏死因子的反应、炎症应答等生物过程来治疗OP。分子对接结果显示,槲皮素、谷甾醇、山柰酚等与AKT1、TP53、IL6等关键靶点有着较好的结合活性。六味地黄丸通过调节骨代谢、调控炎症反应、细胞增殖分化等来预防和治疗OP,具有多成分、多靶点、多通路的作用特征,为进一步的基础研究及临床应用提供了新的思路和线索。

关键词:六味地黄丸;骨质疏松;网络药理学;分子对接

中图分类号:R274.9

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)9-1593-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.9.017

Study on the mechanism of Liuwei Dihuang Pills in the treatment of osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking

LIU Xing-xing¹, GUO Yi-kun², AI Qi^{1*}, LI Yan¹, WANG Li-suo¹, ZHAO Chuan-wei¹, PAN Li¹

¹ Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;

² The First Clinical Medical College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: To analyze the mechanism of Liuwei Dihuang Pills in treating osteoporosis (OP) based on the network pharmacology and molecular docking. The acquisition of potential chemical component and target prediction of Liuwei Dihuang Pills was carried out through the TCMSP database. TTD, Disgenet, and GeneCards database were adopted to forecast and filtrate the gene related to osteoporosis, and Cytoscape 3.7.0 software was used to build TCM-chemical compound - targets - disease visualization network. The construction of protein interaction network was carried out in virtue of the String data platform, and Metascape database was used to analyze the role access of GO and KEGG. Finally, the AutoDock4.2.6 software was used to verify the molecular docking between the selected chemical component and the core target spots. In the end, the results showed that the effective constituents of Liuwei Dihuang Pills in treating the osteoporosis are 69, the target spots are 125; the potential effective constituents mainly include quercetin, stigmasterol, kaempferol, diosgenin, etc., and there are 32 core targets, such as AKT1, IL6, VEGFA, TP53, TNF, etc.; Liuwei Dihuang Pills activates hypoxia-inducible factor 1 signaling pathway (HIF-1), tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, phosphatidylinositol-3 kinase (PI3k-Akt) signaling pathway, Toll-like receptors signaling pathway and other signaling pathways through the key target spots, which involve the adjustment

and control of RNA polymerase II promoter transcription and the cell apoptosis, the response and inflammatory response of cells to oxygen deficit, lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and other biological processes, to treat OP. The results of molecular docking show that quercetin, sitosterol and kaempferol, etc. have good binding activity with the key target spots such as AKT1, TP53 and IL6, etc. Liuwei Dihuang Pills prevents and treats OP by adjusting the bone metabolism, inflammatory response, cell proliferation and differentiation, etc. It has the characteristics of multi-component, multiple-targets and multi-pathway, which provide the new mentalities and threads for the further fundamental research and clinical application.

Key words: Liuwei Dihuang Pills; osteoporosis; network pharmacology; molecular docking

骨质疏松症(osteoporosis, OP)(以下简称OP)是一种全身性骨骼疾病,疾病特征是低骨量和骨组织微结构的损伤和破坏^[1]。随着我国人口老龄化程度的加剧,骨质疏松和并发骨折的发生率也在增加。流行病学数据统计显示,目前全球已有超过2亿的OP患者。在中国,约有1.12亿人受到该疾病带来的困扰,主要集中在40岁以上的人群中,骨质疏松症已经成为严重的公共卫生健康问题^[2]。目前,现代医学主要治疗方法是补充钙剂与维生素D,在此基础上从骨吸收和骨生成两方面着手,通过抑制和促进等手段进行抗OP的治疗。虽然疗效显著,但是药物治疗的毒副反应和长期依从性差的问题未得到有效解决。中医药在防治骨质疏松症方面有着更大的优势。中药复方和单药均具有多靶点、多系统的调节作用,但具体的分子机制尚不清楚。

OP在中医学中属于“骨痿”“骨痹”“腰背痛”等范畴,它的发生与肾脏亏虚有着密切相关的联系。《素问·痿论》记载:“肾气热,则腰脊不举,骨枯而髓减,发为骨痿”。《灵枢·经脉》载有:“足少阴气绝,则骨枯”。宋代钱乙在《小儿药证直诀》中记载了后世广为流传的六味地黄丸,其具有滋阴补肾、阳中求阴之功效。六味地黄丸作为治疗OP的推荐用药^[3],对于OP有较好的治疗效果。Lu等^[4]通过生信分析发现六味地黄丸可以通过下调XRN1基因和ZNF家族基因的表达促进雌激素的分泌和上调MAP3K10基因的表达并下调XPO1基因和NUP54基因的表达来平衡免疫应答从而促进骨组织的形成;Wu等^[5]发现六味地黄丸能提高骨密度和外周血清骨钙素增加OP患者的骨量;Yu等^[6]研究表明六味地黄丸在常规补钙的基础上明显提高OP患者的临床显效率和有效率。六味地黄丸治疗OP的作用已经在临幊上得到了验证,因此对其具体作用机理的研究有着非常重要的现实意义。网络药理学能够揭示中药及复方的多成分、多靶点、多途径协同作用的机理^[7],所以本文运用网络药理学方法对六味地黄丸化学成分、靶蛋白、靶点和所涉及的信号通

路、生物学过程进行分析,探讨药物治疗疾病的作用机制,为OP的进一步治疗提供新的研究思路和数据参考。

1 资料与方法

1.1 有效化合物及作用靶点的遴选

六味地黄丸由熟地、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、丹皮6味药组成。口服生物利用度(oral bioavailability, OB)是指经口服的药物到达血液循环系统所占口服剂量的比例,它是药物吸收、分布、代谢和排泄特性中最重要的药动学参数之一^[8]。类药性(drug-likeness, DL)是指化合物与已知药物的相似性。二者是评价一个化合物是否可发展为一个药物的重要指标^[9]。本研究运用中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcm-sp.php>),将口服生物利用度(OB)≥30%,药物相似性(DL)≥0.18两个关键指标作为筛选药物有效成分的标准,查询与筛选后得到熟地、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、丹皮的化学成分。

1.2 “中药—化合物—靶点”网络的构建

将六味地黄丸筛选后的活性成分及靶标导入至Cytoscape 3.7.0软件中,构建“中药—化合物—靶点”网络,以探究六味地黄丸治疗OP的药理学作用机制。

1.3 OP相关疾病的靶点遴选

运用TTD数据库、Disgenet数据库、GeneCards数据库(通过相关性得分(relevance score)选取score≥1.5进行筛选^[10]),以“osteoporosis”为关键词进行检索,记录其靶点的名称。

1.4 药物靶点与骨质疏松靶点的Venn分析

将六味地黄丸化学成分的基因靶点与OP的基因靶点进行Venn分析,得到两者的共有基因,共有基因即为六味地黄丸治疗OP的作用靶点。

1.5 构建蛋白质相互作用关系网络(PPI)

将上述“1.4”得到的交集靶点导入String数据库,蛋白种类设置为“Homo sapiens”(智人),其余参数均保持默认,进行蛋白质相互作用PPI网络图的

构建,将其结果导入至 Cytoscape 3.7.0 中,对蛋白相互作用网络做进一步的分析及优化。

1.6 “中药-化合物-核心靶点”图绘制

将上述从 String 中所得数据结果保存为 TSV 格式，并导入 Cytoscape 3.7.0 软件，运用其“Network Analysis”功能进行网络拓扑属性分析。根据节点度值分布 (node degree distribution)、介度中心度 (betweenness centrality) 和接近中心度 (closeness centrality) 3 个重要网络拓扑参数进行筛选，选取三者同时在平均值之上的靶点作为六味地黄丸的关键核心靶点。通过 Cytoscape 3.7.0 软件将中药、化合物成分及核心靶点相连，绘制出“中药-化合物-核心靶点”相互作用网络图。

1.7 GO 富集及 KEGG 通路富集

将 1.6 所得到的核心靶点信息输入 Metascape 在线分析平台进行选择 GO 富集及 KEGG 通路富集分析功能, 得到结果并将其导出。通过 OmicShare Tools 对 GO 富集及 KEGG 通路富集分析中筛选出来的信号通路构建气泡图。

1.8 分子对接验证

选取中药-化合物-核心靶点网络中 degree 值排

名前 3 的六味地黄丸化学成分,从 ZINC 数据库中取得六味地黄丸化学成分的分子结构 mol2 格式文件。从核心靶点 PPI 网络中筛选 degree 值排名前 3 的靶点基因,从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 获取适合化合物的蛋白晶体结构的 3D 分子结构 pdb 格式文件,通过考虑物种选择、配体与目标化合物之间的结构相似性以及分辨率高低得出,即选择智人, resolution < 2^[11]。上述两者的分子结构文档均使用 Auto Dock Tools 1.5.6 软件转换为 pdbqt 格式,利用 Auto Dock 4.2.6 软件进行分子对接。通过 Pymol 2.4.0 软件将对接得分最高且构象较稳定的化合物与靶点蛋白进行分子对接可视化分析。

2 结果

2.1 六味地黄丸化合物成分的筛选

在TCMSP数据库里对六味地黄丸成分根据OB $\geq 30\%$, DL ≥ 0.18 的标准进行检索和筛选,一共得到69种化合物成分,其中熟地2种、山药16种、山茱萸20种、泽泻6种、茯苓15种、丹皮10种。根据这69种活性化合物成分,找到其对应的靶点蛋白共198个,将蛋白输入Uniprot数据库进行对比,删除重复及无效靶点,最终得到171个靶点。将化合物

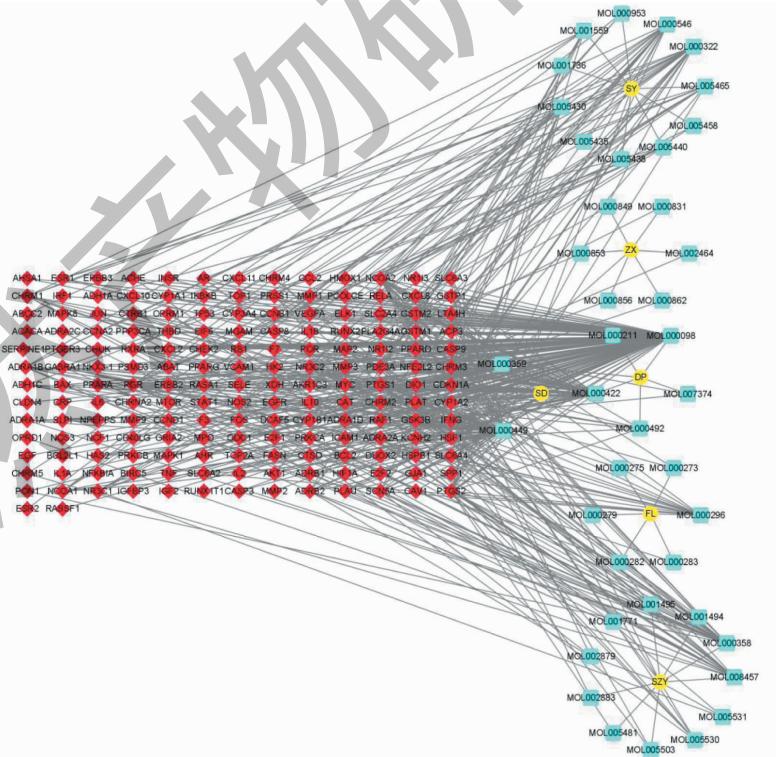


图 1 中药—化合物—靶点网络图

Fig. 1 Network diagram of traditional Chinese medicine-compound-target

注:SD:生地;SY:山药;ZX:泽泻;DP:丹皮;FL:茯苓;SZY:山茱萸。Note:SD:Rehmanniae Radix;SY:Dioscorea Panthaicae Rhizoma;ZX:

Alismatis Rhizoma; DP; Moutan Cortex; FL; Poria; SZY; Corni Fructus

成分及靶点导入至 Cytoscape 3.7.0 中, 构建“中药—化合物—靶点”网络, 如图 1 所示, 图中圆形为六味地黄丸中药成分, 四边形为化合物成分, 菱形为靶点。

2.2 疾病靶点获取结果

从 TTD、Disgenet、GeneCards3 个数据库中分别检索到 42、49、4 273 个骨质疏松相关靶点, 经过相

关性得分筛选, 除去重复靶点, 一共得到 4 311 个骨质疏松相关靶点。

2.3 药物与疾病靶点的 Venn 图建立

将上述得到的 4 311 个疾病相关靶点与 171 个有效药物靶点进行 Venn 分析, 共得到六味地黄丸潜在作用于 OP 的 125 个靶点, 如图 2 所示。

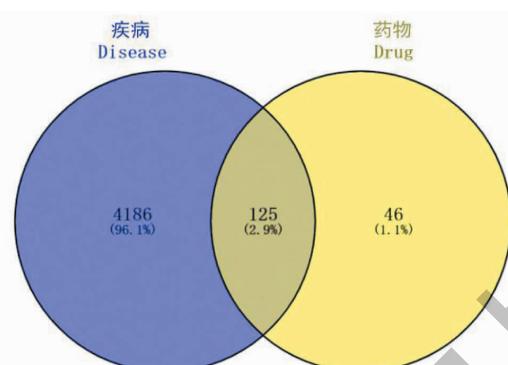


图 2 六味地黄丸治疗 OP 潜在靶点 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of potential targets for treatment of OP with Liuwei Dihuang Pills

2.4 蛋白相互作用网络的构建

运用 String 在线数据库的 Multiple proteins 工具, 输入交集靶标基因名, 限定物种为 Homo sapiens, 获得初步的 PPI 蛋白相互作用网络, 如图 3 所示。将下载的数据导入 Cytoscape 3.7.0, 绘制高级 PPI 网络图, 如图 4 所示。该 PPI 网络删掉 2 个未参与蛋白互作的靶点, 由 123 个节点和 2 201 条边构

成, 节点越大, 颜色越深, 连线越密集, 则地位越重要。初步 PPI 网络图靶点信息复杂, 靶点之间相互作用关系和靶点重要程度模糊不清, 高级 PPI 网络在靶点相互作用的基础上, 通过 Cytoscape 软件将靶点重要性和相互作用关系按照 degree 值大小显示出来, 更加清晰显示出处于网络图核心地位的关键靶点信息。

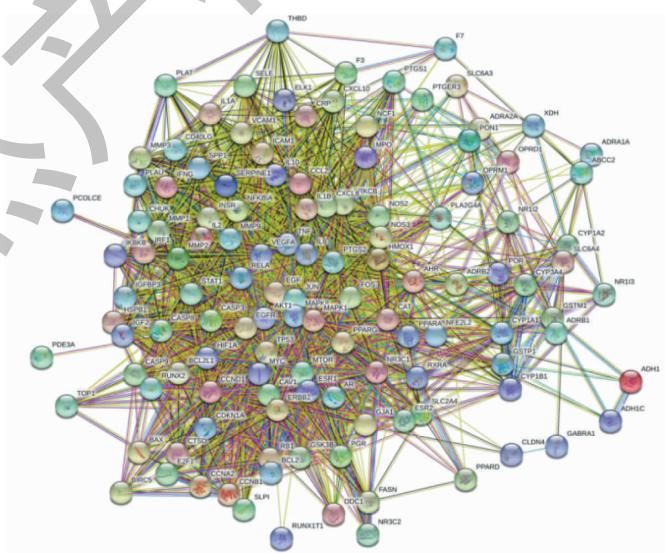


图 3 六味地黄丸初步 PPI 网络图

Fig. 3 Preliminary PPI network diagram of Liuwei Dihuang Pills

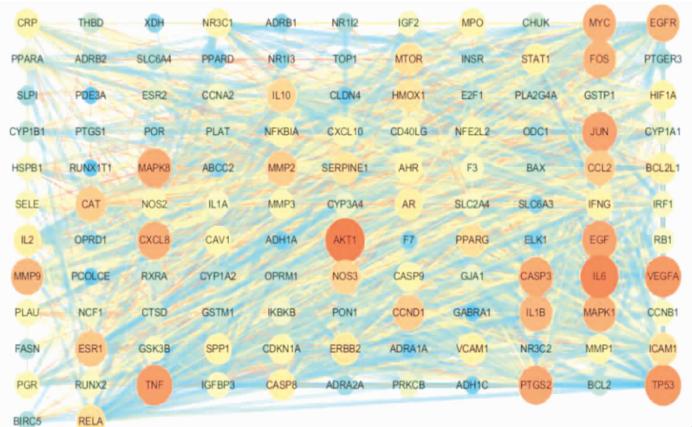


图 4 六味地黄丸高级 PPI 网络图

Fig. 4 Advanced PPI network diagram of Liuwei Dihuang Pills

2.5 核心靶点筛选

通过将上述 PPI 网络的 TSV 格式文件导入 Cytoscape 3.7.0 软件, 经过网络拓扑属性分析, 选取满足 degree 和 betweenness、closeness 三项数据同时在平均值之上的标靶基因作为六味地黄丸的核心靶点。如图 5~7 所示, 其平均度值为 8, 介度中心度的均值为 11.7×10^{-3} , 近中心度的均值约为 0.375, 度越大则表示该节点在为网络图中越重要。通过筛选, 以上数值在均值以上的靶点共有 32 个(具体见表 1), 度值较高的前 5 位分别为 AKT1(94)、IL6(90)、TP53(83)、VEGFA(83)、TNF(81), 这些靶点在 PPI 网络中处于关键位置, 可能是六味地黄丸发挥作用的关键所在, 其相互作用关系如图 8 所示。同时将核心靶点及所映射的化合物及中药数据导入 Cytoscape 3.7.0, 构建“中药—化合物—核心靶点”网络, 如图 9 所示, 每条边表示疾病-中药所对应靶点, 中药对应化学成分以及药物化学成分与潜在作用靶点的相互作用关系, 图中圆形为六味地黄丸中药成分, 四边形为化合物成分, 菱形为核心靶点。其中靶点数目排名前四的是槲皮素(quercetin)、豆甾醇(stigmasterol)、薯蓣皂苷元(diosgenin)、山柰酚(kaempferol), 这 4 种活性成分所对应的靶点数目从高到低依次是 29、12、8、5。

2.6 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析

将六味地黄丸治疗骨质疏松的 32 个核心靶点导入 METASCAPE 数据库进行生物学过程分析和信号通路分析, 经过校正 P 值, $P < 0.05$ 后, 得到 10 个分子功能类别, 其中包括 RNA 聚合酶 II 转录因子结合、细胞因子受体结合、磷酸酶结合等; 得到 10

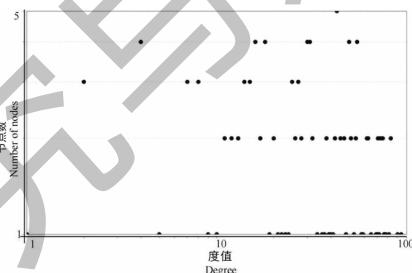


图 5 度值

Fig. 5 Degree value

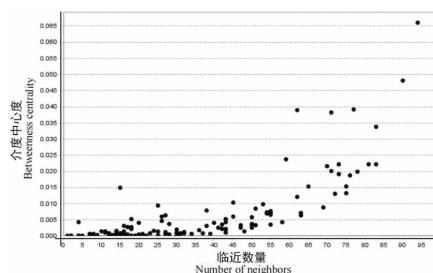


图 6 介度中心度

Fig. 6 Betweenness centrality

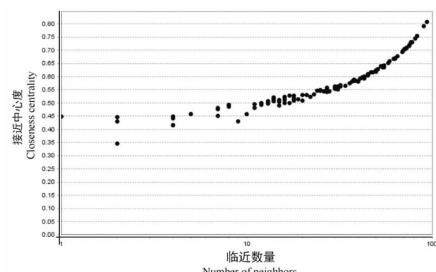


图 7 接近中心度

Fig. 7 Closeness centrality

表 1 核心靶点信息表
Table 1 Core target information table

序号 No.	基因 Gene	名称 Name	度值 Degree	介度中心度 Betweenness centrality	接近中心度 Closeness centrality
1	AKT1	蛋白激酶 1	94	0.066 054 3	0.807 947 02
2	IL6	白介素 6	90	0.048 042 46	0.792 207 79
3	TP53	肿瘤蛋白 p53	83	0.033 756 17	0.753 086 42
4	VEGFA	血管内皮生长因子 A	83	0.022 155 73	0.753 086 42
5	TNF	肿瘤坏死因子	81	0.022 154 3	0.743 902 44
6	JUN	JUN 基因	78	0.019 899 65	0.730 538 92
7	EGF	表皮细胞生长因子	77	0.039 240 61	0.730 538 92
8	PTGS2	前列腺素内过氧化物合酶	76	0.018 740 12	0.721 893 49
9	MAPK8	丝裂原激活蛋白激酶 8	75	0.0153 990 6	0.717 647 06
10	CASP3	胱天蛋白酶 3	75	0.013 247 88	0.717 647 06
11	MAPK1	丝裂原激活蛋白激酶 1	73	0.022 134 44	0.709 3023 3
12	CXCL8	人白介素 8	73	0.019 142 29	0.709 302 33
13	MYC	原癌基因	72	0.013 092 04	0.705 202 31
14	FOS	低聚果糖	71	0.038 291 28	0.705 202 31
15	EGFR	表皮生长因子受体	71	0.020 064 64	0.705 202 31
16	IL1B	白介素 1 β	70	0.021 572 66	0.701 149 43
17	MMP9	基质金属蛋白酶 9	69	0.008 807 63	0.693 181 82
18	ESR1	雌激素受体 1	65	0.015 278 5	0.677 777 78
19	CCND1	CCND1 型基因	63	0.007 119 75	0.666 666 67
20	CCL2	趋化因子 2	63	0.006 456 01	0.670 329 67
21	MMP2	基质金属蛋白酶 2	62	0.012 184 09	0.666 666 67
22	CAT	过氧化氢酶	62	0.038 958 93	0.666 666 67
23	NOS3	内皮型一氧化氮合成酶	59	0.023 782 43	0.659 459 46
24	MTOR	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白	55	0.007 711 38	0.642 105 26
25	RELA	网状内皮细胞过多症病毒癌基因同源物 A	55	0.006 660 74	0.635 416 67
26	PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体	55	0.007 080 99	0.642 105 26
27	SERPINE1	丝氨酸蛋白酶 1	54	0.007 384 1	0.635 416 67
28	HMOX1	血红素加氧酶 1	54	0.006 987 2	0.638 743 46
29	ERBB2	酪氨酸激酶受体 2	53	0.009 801 66	0.638 743 46
30	AR	醛糖还原酶	51	0.008 458 48	0.628 865 98
31	AHR	芳香烃受体	45	0.010 314 4	0.603 960 4
32	NFE2L2	红细胞衍生核因子 2 样蛋白	38	0.007 871 04	0.589 371 98

个生物学过程,其中包括对氧化应激的反应、对脂多糖的反应、积极调控细胞迁移、对活性氧的反应等;得到 10 个细胞成分,其中包括膜筏、RNA 聚合酶 II 转录因子复合物、囊泡腔、内吞小泡等。 P 值越小代表富集程度越高,筛选出每个部分富集程度最高的 10 个结果,绘出气泡图如图 10A、10B、10C 所示。KEGG 分析得到 168 条信号通路,其中根据阈值 P

< 0.01 ,最小计数为 3,富集因子 > 1.5 ,取排名前 20 的通路建立气泡图,如图 11 所示。

2.7 活性成分与核心靶点的分子对接

中药物-化合物-核心靶点网络图中 degree 值前四的化合物分别为槲皮素 (quercetin)、豆甾醇 (stigmasterol)、薯蓣皂苷元 (diosgenin)、山柰酚 (kaempferol),核心靶点 PPI 网络中 degree 值前三的

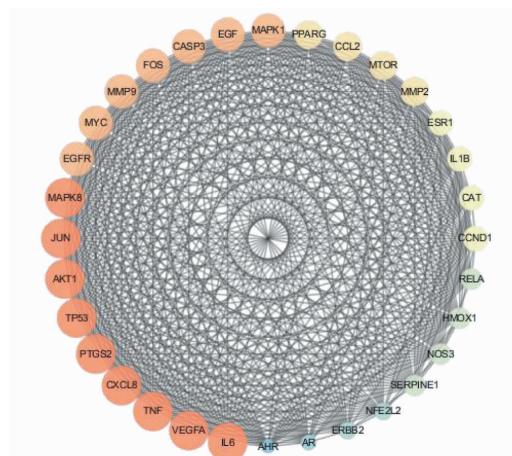


图 8 核心靶点 PPI 网络图

Fig. 8 PPI network diagram of core targets

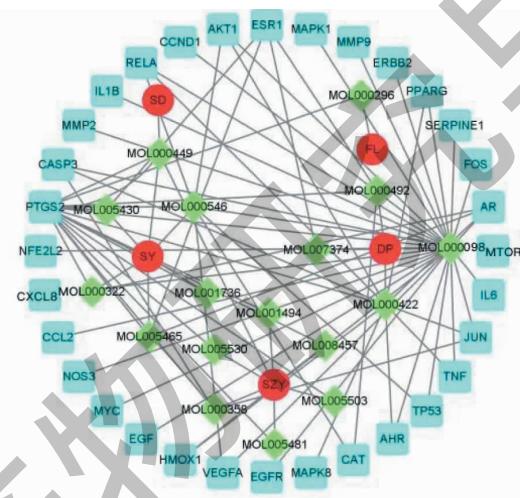


图9 药物—化合物—核心靶点网络图

Fig. 9 Drugs-Compounds-Core Targets network diagram

注:SD:生地;SY:山药;DP:丹皮;FL:茯苓;SZY:山茱萸。Note:SD:Rehmanniae Radix;SY:Dioscorea Panthaicae Rhizoma;ZX:Alismatis Rhizoma;DP:Moutan Cortex;FL:Poria;SZY:Corni Fructus.

靶点分别是 IL6、AKT1、TP53。运用 Auto Dock 4.2.6 软件将所筛选的化合物以及核心靶点分别进行分子对接。一般认为,就分子对接而言,结合能(binding energy, kcal/mol)越小,表明活性物质与蛋白质之间结合的越牢固,其数值小于-4.25 kcal/mol 时表示活性物质与蛋白质之间有一定结合活性,小于-5.0 kcal/mol 时有较好的结合活性,小于-7.0 kcal/mol 时有强烈的结合活性^[12]。由分子对接结果(见表 2)可知所有对接能都小于-4.25 kcal/mol,说明小分子化合物与靶蛋白之间均有结合活性。其中薯蓣皂苷元在 Auto Dock 系统进行处理时没有可以旋转的

氢键，即无法发出可与受体蛋白氨基酸结合的氢键，所以没有做分子对接处理。选取槲皮素与 TP53 (PDB ID:5mhc)、山柰酚与 IL6 (PDB ID:1ALU)、豆甾醇与 AKT1 (PDB ID:1UNQ)，借助 Pymol 2.4.0 软件分别进行分子对接可视化分析(图 12)。分子对接虚拟技术发现，化合物均稳定地位于口袋状的对接口袋内。槲皮素与活性位点附近的 Glu-86、Lys-87 这 2 个氨基酸形成氢键结合到 TP53；山柰酚与活性位点附近的 Leu-64、Glu-172 这 2 个氨基酸形成氢键结合到 IL6；豆甾醇与活性位点附近的 Glu-49 这 1 个氨基酸形成氢键结合到 AKT1。

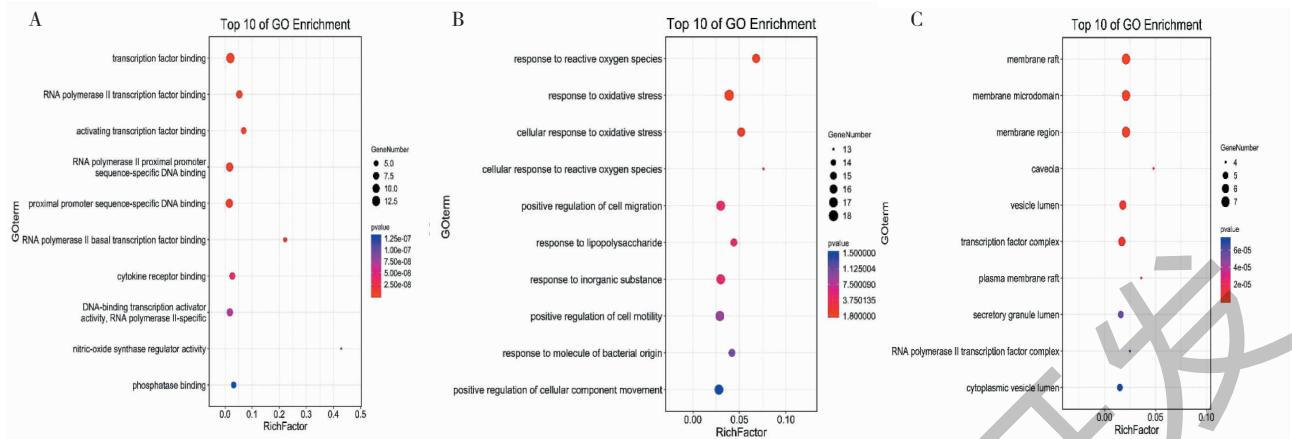


图 10 核心靶点 GO 功能富集

Fig. 10 Enrichment analysis of the core target GO pathway

注:A:分子功能类别;B:生物过程;C:细胞成分。圆圈大小表示所占比例,颜色深浅表示P值大小。Note:A: Molecular function categories; B: Biological process; C: Cell composition. The size of the circle represents the proportion, and the color depth represents the P value.

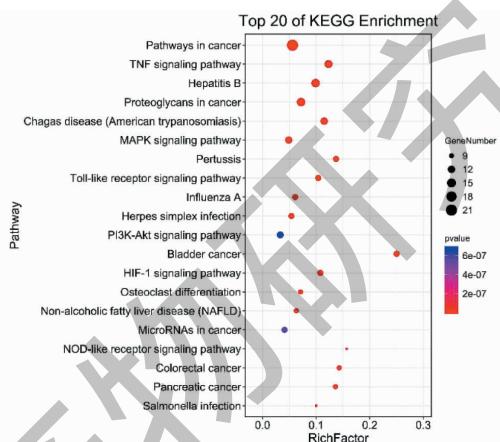


图 11 核心靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 11 Enrichment analysis of the core target KEGG pathway

注:圆圈表示信号通路,圆圈大小表示所占比例,颜色深浅表示P值大小。Note:the circle indicates the signal path, the size of the circle indicates the proportion, and the color depth indicates the P value.

表 2 分子对接结果

Table 2 Molecular docking results

序号 No.	有效成分 Active ingredient	结合能 Binding energy (kcal/mol)		
		IL6 (1ALU)	AKT1 (1UNQ)	TP53 (5MHC)
1	Quercetin	-5.82	-5.11	-7.06
2	Stigmasterol	-6.2	-6.81	-6.86
3	Diosgenin	-6.81	-7.66	-8.29
4	Kaempferol	-5.55	-6.81	-6.55

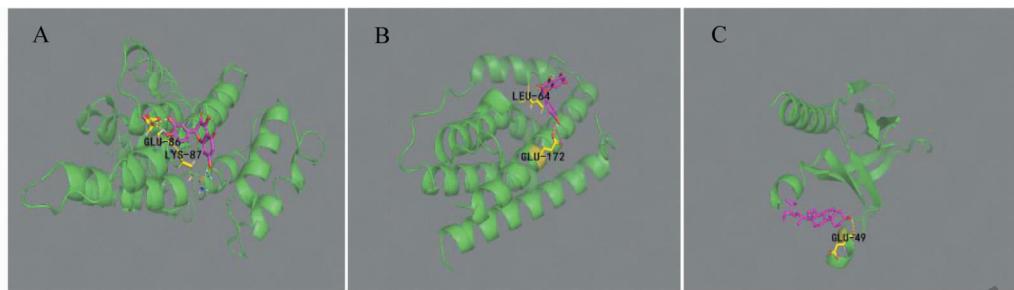


图 12 分子对接模式图

Fig. 12 Molecule docking mode diagram

注:A:槲皮素-TP53 (PDB ID:5mhc);B:山柰酚-IL6 (PDB ID:1ALU);C:豆甾醇-AKT1 (PDB ID:1UNQ) Note:A:Quercetin-TP53 (PDB ID:5mhc);B:Kaempferol-IL6 (PDB ID:1ALU);C:Stigmasterol-AKT1 (PDB ID:1UNQ).

3 讨论与结论

本研究发现,六味地黄丸发挥疗效的主要活性成分包括槲皮素、豆甾醇、山柰酚、薯蓣皂苷元、 β -谷甾醇等。其中,槲皮素、豆甾醇、山柰酚对骨代谢过程起着关键作用。Gu 等^[13]证实发现槲皮素能有效抑制成骨细胞株 MC3T3-E1 的成熟前衰老,通过这一途径能有效减少去势骨质疏松小鼠模型的骨量丢失,发挥类雌激素样作用。有研究发现山柰酚能够激活雌激素受体活性,提高成骨细胞株 MG-63 的增殖分化能力,促进成骨细胞矿化^[14]。经过薯蓣皂苷元处理过的成骨细胞能显著上调细胞内护骨素/核因子 κ B 受体活化因子配体系统比值,进而减少骨吸收,达到抑制破骨细胞形成的目的^[15]。Zeng 等^[16]发现 β -谷甾醇通过提高成骨细胞护骨素/破骨细胞分化因子 (OPG/ODF) 比值和刺激卵巢颗粒细胞分化雌二醇的功能来促进和加强成骨作用。综上所述六味地黄丸中的一些潜在分子活性成分通过抑制破骨细胞的生成、减少骨量的丢失、促进成骨作用等方面对 OP 具有潜在治疗作用。

GO 通路富集分析显示六味地黄丸作用于疾病的过程中,主要涉及氧化应激反应、脂多糖反应、积极调控细胞迁移、活性氧反应等多种生物学过程,多个生物学进程涉及 AKT1、IL6、TP53、VEGFA、TNF 等核心靶点。其中,AKT1 可通过激活下游效应蛋白 mTORC1/S6K1 调控成骨细胞 (osteoblast, OB) 分化及破骨细胞 (osteoclast, OC) 的生长。有研究证实 AKT1 基因敲除的小鼠骨化延迟,严重破坏骨的生长发育^[17]。近来研究发现,骨质疏松的发生和发展都与免疫系统功能失常而产生炎症反应直接关联^[18]。在炎症反应中起关键作用的炎性细胞因子如 IL6、TNF 通过增加破骨细胞的骨吸收或降低成

骨细胞的骨形成来打破骨转换平衡,参与骨质疏松症的发生和发展^[19]。VEGFA 能够促进内皮细胞增殖及新血管生成,加速骨形成及重建过程,直接促进骨髓间充质干细胞及增加 OB 的成骨活性,降低 OC 溶骨活性来促进骨形成及增加骨密度,在骨质疏松的发生发展中起到重要的作用^[20]。

KEGG 分析得到的通路主要涉及 TNF 信号通路、MAPK 通路、HIF-1 信号通路、PI3K/Akt 通路、Toll 样受体信号通路等,说明六味地黄丸化学成分可干预某些通路来达到治疗 OP 的目的。肿瘤坏死因子信号通路 (TNF) 介导的慢性炎症相关骨重建过程是骨质疏松症治疗的重要途径^[21],研究发现 TNF- α 可以导致绝经后骨质疏松症的发生,其作用机制是促进 RANKL 诱导的破骨细胞的形成。核心基因 TNF、IL-6 通过沟通 TNF 与 RANK/RANKL/OPG 信号通路的信号转导,调控骨吸收-骨重建平衡^[22]。MAPK 通路可以通过调控 OC 的分化影响 OP 的进展。有研究证实 MAPK 在激活后直接参与 OC 前体细胞分化成为成熟 OC,并通过自噬参与 OC 的分化^[23]。OP 发生的主要原因是重要的治疗靶点破骨细胞的过度激活。PI3K/Akt 通路与成骨和破骨通路紧密联系,调控着成骨细胞和破骨细胞存活、分化过程从而维持骨量和骨转换平衡。激活 PI3K/Akt 信号通路可以促进碱性磷酸酶 (ALP)、BMP-2 等成骨分化标志物的表达,促进成骨细胞增殖和分化。同时 PI3K/Akt 信号通路的存在对于破骨细胞的存活起到至关重要的作用。Toll 样受体是一类非特异性免疫受体,Toll-like 信号通路在骨代谢中扮演着重要角色。其中 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号途径可通过激活 ERK、p38、JNK 和 NF- κ B 通路与其他成骨相关通路相互联系,并影响成骨细胞分化、增

殖、矿化及凋亡^[24]。骨吸收-骨重建动态平衡是在成骨细胞-破骨细胞耦联的基础上形成的,对于OP的发生和治疗非常关键。缺氧诱导因子-1信号通路(HIF-1)对于成骨细胞、破骨细胞的增殖分化凋亡有着密切相关的关系。HIF-1具有活化破骨细胞的作用,骨质疏松症患者雌激素的缺乏可使机体降低抑制HIF-1活化破骨细胞的作用,加重骨质疏松症发展。因此,推测六味地黄丸通过TNF信号通路、MAPK通路、HIF-1信号通路、PI3K/Akt通路、Toll样受体信号通路等信号通路调控AKT1、IL6、TP53、VEGFA、TNF等关键靶点治疗OP。将六味地黄丸的潜在活性成分与关键靶点进行分子对接,结果发现槲皮素、豆甾醇、山柰酚等化合物与TP53、AKT1、IL6等对应靶点结合能均小于-5.0 kcal/mol,提示六味地黄丸中的潜在活性成分与关键靶点有着较好的结合活性,说明它们可能是治疗OP的潜在活性成分。说明通过网络药理学和分子对接手段预测出六味地黄丸治疗OP的潜在活性成分和关键靶点是具有一定的科学依据和理论支撑的。

本文通过网络药理学和分子对接验证提示,六味地黄丸通过调节骨代谢、调控炎症反应、细胞增殖分化等来预防和治疗OP,具有多成分、多靶点、多通路的作用特征。同时为中医药防治OP的具体作用机制提供多维化视角,更有利于中医药的传承、创新与发展,有利于后续实验研究的深入化和临床思路的拓展,也为今后药物研发等方面提供基础理论支撑。但是由于该研究主要依托于数据库信息,考虑中药煎煮及在体内活性成分可能发生变化的复杂性,药物具体作用机制的确认仍需通过进一步的实验来验证。

参考文献

- Ensrud KE, Crandall CJ. Osteoporosis [J]. Ann Intern Med, 2017, 167(3): ITC17-ITC32.
- Qaseem A, Forciea MA, McLean RM, et al. Treatment of low bone density or osteoporosis to prevent fractures in men and women: A clinical practice guideline update from the American college of physicians [J]. Ann Intern Med, 2017, 166: 818-839.
- Ge JR, Zheng HX, Wan XM, et al. Expert consensus on the prevention and treatment for primary osteoporosis with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Osteoporosis (中国骨质疏松杂志), 2015, 21: 1023-1028.
- Lu YW, Lin GC, Liu QQ, et al. Analysis of the effect of rehmanniae bolus on the regulation of gene expression in postmenopausal osteoporosis with Kidney-Yin Deficiency [J]. Chin J Osteoporosis (中国骨质疏松杂志), 2017, 23: 350-356.
- Wu RF, Ma SL, Yu L. The impact of six-ingredient rehmanniae pill on osteocalcin and bone mineral density in patients with kidney yin deficiency type senile osteoporosis [J]. World Chin Med (世界中医药), 2016, 11: 2043-2046.
- Yu JW, Ou ZC. Effect of Liuwei Dihuang pill on osteoporosis bone metabolism and quality of life [J]. Guangming J Chin Med (光明中医), 2016, 31: 2157-2159.
- Liu CC, Yang C, Yang T, et al. Exploring the potential mechanism of Ginkgo biloba leaves in the treatment of hypertension based on network pharmacology and molecular docking [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 468-478.
- Jia SS, Wu JR, Zhou W, et al. Study on mechanism of renqingmangjue capsules in treatment of metabolic disease based on network pharmacology [J]. Eval Anal Drug-Use Hosp Chin (中国医院用药评价与分析), 2019, 19(3): 272-276.
- Ahmed SS, Ramakrishnan V. Systems biological approach of molecular descriptors connectivity: optimal descriptors for oral bioavailability prediction [J]. PLoS One, 2012, 7: e40654.
- Rebhan M, Chalfa-Caspi V, Prilusky J, et al. Gene cards: Integrating information about genes, proteins and diseases [J]. Trends Genet, 1997, 13(4): 163-166.
- Yang X, Liu H, Liu J, et al. Rational selection of the 3D structure of biomacromolecules for molecular docking studies on the mechanism of endocrine disruptor action [J]. Chem Res Toxicol, 2016, 29: 1565-1570.
- Hsin KY, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. PLoS One, 2013, 8: e83922.
- Gu YQ, Fu JY, Wu WQ, et al. Quercetin alleviates estrogen deficiency-induced osteoporosis through anti-senescence effect on bone cells [J]. J Tongji Univ: Med Sci (同济大学学报, 医学版), 2019, 40(3): 274-280.
- Zeng YR, Zeng JC, Fan YG, et al. Effect of kaempferol on proliferation and differentiation of osteoblast MG-63 [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2012, 23: 1463-1465.
- Jiang YZ, Wang JJ, Liang JC, et al. Effects of diosgenin on cell proliferation, differentiation and OPG/RANKL mRNA expression of rat osteoblasts cultured *in vitro* [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2010, 25(1): 134-136.