

基于网络药理学探析黄精抗骨质疏松的机制及验证

麦嘉乐¹, 李建良¹, 肖嘉聪¹, 梁笃^{1,2}, 王海彬^{1,3*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州正骨医院, 广州 510030;

3. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] 目的: 基于网络药理学及分子对接方法分析黄精抗骨质疏松(OP)的潜在机制, 并通过实验进行验证。方法: 利用中药系统药理学数据库(TCMSP)2.3进行条件检索, 获取黄精的活性成分及其对应作用靶点, 并在疾病相关的基因与突变位点数据库(DisGeNET)7.0获取骨质疏松的治疗靶标, 两者交集即为黄精抗骨质疏松的潜在靶基因。并用Cytoscape 3.7.1构建“黄精-活性成分-潜在靶点”网络, 借助STRING数据库11.0进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析, 构建PPI网络。此外, 采用Metascape数据库3.5分析其参与的基因本体(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。选取黄精重要活性成分与靶点通过AutoDock Vina 1.1.2进行分子对接验证, 最后借助小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(MC3T3-E1)观察 β -谷甾醇对成骨分化的影响。结果: 黄精活性成分有12个, 其作用靶点与骨质疏松治疗靶点相映射得到潜在靶点32个。Cytoscape 3.7.1拓扑分析得到黄芩素、 β -谷甾醇等6个主要成分, 蛋白激酶B1(Akt1)、肿瘤蛋白p53(TP53)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、JUN原癌基因(JUN)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、原癌基因c-FOS(FOS)等关键靶点。GO和KEGG富集分析中, 共获得995个GO条目, 涉及活性氧调节、生长调节等181条信号通路。分子对接显示黄精中核心成分与各自的靶点表现出良好的对接活性。细胞实验结果显示 β -谷甾醇在2.5, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时具有显著促进成骨分化的作用。结论: 黄精可通过调节炎症、氧化应激、凋亡、代谢等作用, 发挥治疗骨质疏松的效果, 其中 β -谷甾醇可促进MC3T3-E1细胞成骨分化。

[关键词] 黄精; 骨质疏松; 网络药理学; 分子对接; 机制

[中图分类号] R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)12-0210-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220519

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220228.1709.003.html>

[网络出版日期] 2022-03-01 16:54

Mechanism of Polygonati Rhizoma on Treating Osteoporosis Based on Network Pharmacology and Preliminary Verification

MAI Jia-le¹, LI Jian-liang¹, XIAO Jia-cong¹, LIANG Du^{1,2}, WANG Hai-bin^{1,3*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Guangzhou Orthopedic Hospital, Guangzhou 510030, China;

3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential mechanism of Polygonati Rhizoma on the treatment of osteoporosis (OP) based on network pharmacology and molecular docking method and to verify the mechanism by experiments. **Method:** The main active ingredients and corresponding targets of Polygonati Rhizoma were screened out from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) 2.3 by conditional searching. The treatment targets were obtained from the genes related to OP and DisGeNET 7.0. The potential target genes of Polygonati Rhizoma for treating OP were obtained by the crossing of the corresponding targets and the treatment targets. Cytoscape 3.7.1 was used to construct the “Polygonati

[收稿日期] 2021-12-02

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81774339, 82074462)

[第一作者] 麦嘉乐, 在读硕士, 从事骨与关节疾病的防治研究, E-mail: smumajiale@163.com

[通信作者] *王海彬, 主任中医师, 博士生导师, 从事骨与关节疾病的防治研究, E-mail: hipknee@163.com

Rhizoma-active ingredient-potential target” network. The protein-protein interaction (PPI) analysis was carried out by STRING 11.0, and the PPI network was constructed. Metascape 3.5 was used to conduct Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses of the key targets. The core ingredients and key targets of Polygonati Rhizoma were selected for molecular docking by AutoDock Vina 1.1.2. Finally, the effect of β -sitosterol on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells in rats was observed. **Result:** Twelve active ingredients and 32 potential targets of Polygonati Rhizoma for OP treatment were screened out. Six active ingredients including baicalein and β -sitosterol and key targets including protein kinase 1 (Akt1), tumor suppressor p53 (TP53), vascular endothelial growth factorA (VEGFA), proto-oncogene Jun (JUN), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and proto-oncogene c-Fos (FOS) were obtained by Cytoscape 3.7.1 topological analysis. A total of 995 GO entries and 181 signaling pathways involving the response to reactive oxygen species and regulations of growth were obtained from GO and KEGG enrichment analyses. The results of molecular docking showed that the core active ingredients possessed good binding activities with the respective key targets. The results of cell experiments showed that β -sitosterol promoted the osteogenic differentiation at the concentration of $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. **Conclusion:** Polygonati Rhizoma had the therapeutic effect on treating OP by regulating inflammation, oxidative stress, apoptosis, and metabolism. The β -sitosterol significantly promoted the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells.

[**Keywords**] Polygonati Rhizoma; osteoporosis; network pharmacology; molecular docking; mechanism

骨质疏松是一种常见的、多发的,影响众多老年人口尤其是绝经后妇女的一种全身性骨代谢疾病^[1]。骨质疏松的发病特点是以随着患者年龄的增高,四肢及躯干骨量缓慢减少,骨小梁缓慢流失为特征,具体临床表现为骨密度减少,致使骨骼脆性增加,日常生活中容易导致骨质疏松性骨折,如老年人摔倒导致的股骨颈骨折、股骨转子间骨折和胸腰椎压缩骨折,从而严重影响老年人的生活质量^[2]。骨质疏松是继心脑血管疾病、糖尿病、肿瘤之后在引起社会关注的老年疾病。随着全球人口老龄化,骨质疏松已经成为备受关注的公共健康问题。美国50岁以上人群有大约1 000万骨质疏松患者,另有3 400万人存在患骨质疏松的风险^[3]。我国50岁以上人群19.2%患有骨质疏松,而65岁以上甚至达到32.0%^[4]。目前针对骨质疏松的中医药研究不断深入,发现具有补肝肾、强筋骨功效的中药可以用于治疗老年性骨质疏松和绝经后骨质疏松的患者,可以增加患者骨密度,缓解临床症状,减轻疼痛,改善病人生活质量,具备温和安全、双向调控等优点,同时避免一些抗骨吸收药物的潜在致癌风险,具有一定的优势。

黄精为百合科属植物,以其根茎入药,是一种药食同源的中药材,性甘、平,归脾、肺、肾经。其具有益气养阴、润肺、健脾、益肾的作用^[5],主要适用于精血不足、腰膝酸软、须发早白、筋骨痿软等^[6]。现代药理学发现,其提取物黄精多糖、黄精皂苷、黄精

黄酮等化学成分对保护心脑血管、肝脏、肾脏、骨骼及抗阿尔兹海默症、糖尿病等药理作用^[7-14]。研究发现黄精提取物能通过多种途径发挥抗骨质疏松的作用,据报道黄精多糖在成骨分化过程中可上调小鼠骨髓间充质干细胞(mBMSCs)中碱性磷酸酶(ALP)、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)、骨钙素(OC)、I型前胶原氨基端前肽(PINP)的表达,促进mBMSCs增殖和活性^[15],并能有效抑制去势大鼠骨量丢失^[16]。黄精多糖不仅具有促进成骨细胞形成的作用^[17-18],而且能够通过多种通路抑制骨髓来源的巨噬细胞(BMM)分化为破骨细胞^[19]。然而中药发挥效用往往是多成分与多靶点相互作用的整体结果,由于中药成分的复杂性及现有研究方法的局限性,黄精治疗骨质疏松的具体物质基础及作用机制尚不明确。HOPKINS在2007年首次发表“网络药理学”这个概念^[20],将药物作用网络映射到人类疾病-基因网络上,探索药物对疾病的相互作用。因此本研究应用网络药理学和分子对接技术,对黄精抗骨质疏松的潜在作用机制进行系统解析,并利用细胞实验进行验证,为研究黄精抗骨质疏松的机制提供思路。

1 材料

β -谷甾醇(四川省维克奇生物科技有限公司,批号CAS83-46-5,纯度 $\geq 98\%$); α -MEM培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素混合液(美国Gibco公司,货号分别为12571063、1099141、15140122);TRIzol®试剂

(美国 Ambion 公司,批号 260710);小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(MC3T3-E1)受赠于广州中医药大学江晓兵教授团队;细胞增殖与活性检测试剂盒(CCK-8,弗德生物科技有限公司,货号 FD3788);地塞米松、抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠(美国默克公司,货号分别为 50-02-2、50-81-7、13408-09-8);BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号 C3206);Evo M-MLV 反转录试剂盒 II、SYBR Green Pro Taq HS 预混型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,货号分别为 AG11711、AG11701)。引物序列由北京擎科生物科技有限公司合成,包括 I 型胶原蛋白 α 1 链(COL1A1)、骨桥蛋白(OPN)、Runt 相关转录因子 2(RUNX2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
ALP	上游 CCTGAAGTCTGCACCAAGTCCT	125
	下游 TCATCTGGCTCAGATAGGAGGG	
OPN	上游 GCGCTCTGTCTCTCTGACCT	89
	下游 ACCTTATTGCCCTCCTGCTT	
COL1A1	上游 CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC	115
	下游 CAGAAGGACCTTGTTTGCCAGG	
GAPDH	上游 ACCCAGAAGACTGTGGATGG	125
	下游 TTCAGCTCAGGGATGACCTT	

2 方法

2.1 黄精活性成分的收集及筛选 利用中药系统药理学数据库(TCMSP)2.3 检索得到黄精的活性成分。中药多为口服制剂,需经过吸收、分布、代谢、排泄(ADME)过程到达靶器官、组织发挥作用,ADME 为药物筛选及开发的重要步骤^[21]。本研究以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 作为筛选条件。

2.2 黄精作用靶点预测 基于 TCMSP 2.3,将黄精的多个活性成分与潜在作用靶点逐个配对,筛选结束后,在 UniProt 蛋白数据库(<https://www.uniprot.org>)将黄精活性成分作用的蛋白质靶点进行标准化,得到靶点蛋白的官方名称,以此预测黄精活性的作用靶点。

2.3 骨质疏松疾病靶点的获取 以“osteoporosis”为关键词,在 DisGeNET 数据库 7.0(<http://www.DisGeNET.org/home/>)中进行检索,得到骨质疏松的

治疗靶点。与上述黄精活性成分预测作用靶点相映射,获得黄精治疗骨质疏松的作用靶点。

2.4 黄精活性成分与作用靶点网络构建 利用可视化软件 Cytoscape 3.7.1 将获得的黄精活性成分和作用靶点关系以“黄精-活性成分-作用靶点”网络图形式展现。其中,黄精、活性成分和作用靶点以节点(node)表示,边(edge)反映了三者之间的联系。应用“Network Analyzer”功能进行网络拓扑分析,根据节点连接度(degree)设置网络样式,节点在网络中的重要性通过 degree 值,节点大小,颜色深浅反映。

2.5 黄精对骨质疏松作用靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将黄精治疗骨质疏松的作用靶点导入 STRING 数据库 11.0(<http://string-db.org/>)中,获得 PPI 网络信息,把 node1、node2 和 Combine score 信息导入 Cytoscape 3.7.1 绘制 PPI 网络并进行拓扑分析。

2.6 基因本体(GO)生物学过程和京都基因与基因组百科(KEGG)信号通路富集分析 Metascape 数据库 3.5(<http://metascape.org/gp/#/main/step1>)可进行基因功能注释和通路富集分析。将筛选出的作用靶点导入 Metascape 数据库 3.5 中,进行 GO 功能富集分析及分析其可能参与的信号通路,筛选 $P < 0.01$ 的条目,并对数据进行可视化处理。

2.7 分子对接验证 根据活性成分-靶点网络,将重要的活性成分及其对应的关键靶点蛋白进行分子对接。活性成分的二维结构从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取并使用 Chem3D 17.0 软件进行结构优化后保存为三维结构,靶点的蛋白结构从 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取。通过 AutoDockTools 1.5.6 和 AutoDockVina 1.1.2 软件对二者进行分子结构处理和分子对接。对接结果通过 PyMOL 2.5.1 和 Discovery Studio 2021 进行可视化处理。

2.8 细胞实验验证

2.8.1 MC3T3-E1 细胞培养及干预 M3T3-E1 细胞以 α -MEM 完全培养基(含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素混合液),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养^[22],观察细胞密度达到 80%~90% 后传代,用于后续实验。使用 CCK-8 检测 β -谷甾醇对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响,借鉴文献^[23]报道配制成骨诱导液(OIM,含 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗坏血酸、20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -甘油磷酸钠),加入诱导 MC3T3-E1 细胞成骨分化的同时分别给予不同浓度

的 β -谷甾醇($2.5, 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行干预,每3 d更换1次培养基,诱导7 d后分别进行实时 Real-time PCR 检测成骨相关基因表达和碱性磷酸酶染色,观察 β -谷甾醇对成骨分化的影响。

2.8.2 CCK-8法检测 β -谷甾醇对MC3T3细胞增殖的影响 将MC3T3-E1细胞以 5×10^3 个/孔接种于96孔板中,给予不同浓度的 β -谷甾醇($0, 0.5, 1, 2.5, 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)分别处理24、48、72 h后,依照CCK-8试剂盒操作步骤,每孔加入CCK-8试剂10 μL ,使用酶标仪测定在450 nm处的吸光度A。根据公式细胞活力 $=\frac{(A_{\text{加药细胞}}-A_{\text{溶剂}})}{(A_{\text{空白细胞}}-A_{\text{溶剂}})}\times 100\%$ 。

2.8.3 Real-time PCR检测 β -谷甾醇干预MC3T3细胞后成骨相关基因表达 使用TRIzol法提取细胞总RNA,检测RNA浓度后,以1 μg 总RNA根据Evo M-MLV反转录试剂盒II进行逆转录,将反转录体系稀释10倍后进行Real-time PCR反应。检测促进成骨标志物COL1A1、OPN及RUNX2 mRNA的

表达,以GAPDH作为内参,最后表达水平的差异倍数用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析。

2.8.4 碱性磷酸酶(ALP)染色检测 β -谷甾醇对MC3T3细胞成骨分化影响 在使用成骨诱导液及 β -谷甾醇($2.5, 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)干预的第7天,按照BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒操作步骤进行染色,并通过倒置显微镜进行观察拍照记录。

2.9 统计学方法 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用Graphpad Prism 7软件进行单因素方差分析并绘图, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 筛选黄精活性成分及潜在靶点 检索得到黄精化学成分38个;根据OB $\geq 30\%$ 和DL ≥ 0.18 分析,选出12个活性成分。将得到的活性成分逐一配对潜在靶点,删除重复值后,将蛋白质靶点导入UniProt数据库进行标准化,得到靶点蛋白的官方名称,即为黄精活性成分的预测作用靶点,见表2。

表2 黄精中主要化合物的基本信息

Table 2 Basic information of main compounds in Polygonati Rhizoma

MOL ID	化学名称	中文名称	分子式	OB/%	DL
MOL000546	diosgenin	薯蓣皂素	$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$	80.88	0.81
MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	新甘草苷	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	71.12	0.18
MOL002959	3'-methoxydaidzein	3'-甲氧基大豆苷元	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	48.57	0.24
MOL006331	4',5-dihydroxyflavone	5,4'-二羟基黄酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	48.55	0.19
MOL009763	(+)-syringaresinol-O-beta-D-glu beta-sitosterol coside	-	$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{13}$	43.35	0.77
MOL000358	beta-sitosterol	β -谷甾醇	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$	36.91	0.75
MOL000359	sitosterol	豆甾醇	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$	36.91	0.75
MOL009760	sibiricoside A_qt	-	$\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{O}_{28}$	35.26	0.86
MOL003889	methylprotodioscin_qt	甲基原薯蓣皂苷_qt	$\text{C}_{52}\text{H}_{86}\text{O}_{22}$	35.12	0.86
MOL009766	zhonghualiaoine 1	-	-	34.72	0.78
MOL002714	baicalein	黄芩素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	33.52	0.21
MOL001792	DFV	甘草素	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	32.76	0.18

3.2 黄精抗骨质疏松的潜在靶点 在DisGeNET数据库7.0中共检索获得骨质疏松疾病靶点1 098个,与黄精活性成分靶点取交集,并通过Venny 2.1.0绘制韦恩图,见增强出版附加材料。相映射得到黄精抗骨质疏松的潜在靶点基因转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、雌激素受体(ESR1)、雌激素受体 β (ESR2)、雄激素受体(AR)、丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14)、胰岛素样生长因子2(IGF2)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)、Bcl-2、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、原癌基因c-Fos(FOS)、T细胞核因子c1(NFATC1)、磷脂酰肌醇-4,

5-双磷酸3-激酶催化亚基 γ (PIK3CG)、蛋白激酶B1(Akt1)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、基质金属肽酶-9(MMP-9)、肾上腺素能 $\alpha 1\text{A}$ 受体(ADRA1A)、 β_2 -肾上腺素受体(ADRB2)、二肽酶1(DPEP1)、二肽基肽酶-4(DPP4)、花生四烯酸12-脂加氧酶(ALOX12)、低氧诱导因子1 α (HIF1A)、JUN原癌基因(JUN)、对氧磷酶1(PON1)、过氧化氢酶(CAT)、芳香烃受体(AHR)、脂肪酸合成酶(FASN)、雷帕霉素靶蛋白(MTOR)、细胞核转录因子- κB p65蛋白(RELA)、超氧化物歧化酶1(SOD1)、肿瘤蛋白p53(TP53)等共32个,见表3。

表 3 黄精抗骨质疏松的活性成分及作用靶点

Table 3 Active ingredients and key targets of Polygonati Rhizoma in treating osteoporosis

活性成分	潜在靶点
DFV	PIK3CG、ESR1、DPEP1、ADRB2
baicalein	PIK3CG、TP53、NFATC1、VEGFA、RELA、MMP-9、IGF2、HIF-1 α 、FOS、DPP4、Caspase-3、Bcl-2、Bax、AR、ALOX12、Akt1、AHR
3'-methoxydaidzein	AR、ESR1、MAPK14、PPARG
beta-sitosterol	ADRA1A、ADRB2、Bax、Bcl-2、Caspase-3、ESR2、JUN、PIK3CG、PON1、TGF- β_1
(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	PIK3CG、ESR1、DPEP1、ADRB2
diosgenin	VEGFA、TP53、SOD1、RELA、NR1I2、MTOR、HIF1A、FASN、CAT、Akt1
4',5-dihydroxyflavone	AR、DPP4、PIK3CG

3.3 构建“黄精-活性成分-骨质疏松靶点网络图

将活性成分和潜在靶点导入 Cytoscape 3.7.1,得到“黄精-活性成分-潜在作用靶点”网络,见增强出版附加材料。黄芩素、 β -谷甾醇、薯蓣皂素能与 5 个以上的靶点相连接,是黄精治疗骨质疏松的主要活性成分,靶点 PIK3CG 与活性成分连接次数为 5 次,在黄精抗骨质疏松中具有重要意义;ESR1、Bcl-2、AR、ADRB2 均为 3 次,在黄精抗骨质疏松中具有较大意义。

3.4 蛋白相互作用网络分析 将 STRING 数据库 11.0 得到的蛋白相互作用信息 (node1、node2 和 Combine score) 导入 Cytoscape 3.7.1 得到 PPI 网络图,见增强出版附加材料。该网络共包括 32 个节点,210 条边。蛋白拓扑结构分析结果显示,蛋白 Akt1、TP53、VEGFA、JUN、MMP-9、FOS、PPARG、MAPK14、Caspase-3、ESR1、HIF1 α 、CAT、MTOR、AR、RELA、SOD1 的 degree 值大于中位数 14.5,见表 4,说明在治疗骨质疏松中存在重要作用。

3.5 GO 生物过程和 KEGG 通路富集分析 为了进一步了解黄精在治疗骨质疏松的靶点在生物体中发挥的作用,将 32 个作用靶点导入 Metascape 数据库 3.5 中进行生物信息学分析,结果包括生物过程 (BP)923 条,细胞组成 (CC)23 条,分子功能 (MF)49 条。根据 P 进行排序,每个种类选择排名前 10 性的条目进行可视化分析,见增强出版附加材料。结果显示,黄精治疗骨质疏松在生物过程中,主要包括对活性氧的反应、生长调控等;对细胞组成,主要包括转录因子复合体、RNA 聚合酶 II 转录因子复合物、核转录因子复合体等,分子功能包括转录因子结合、RNA 聚合酶 II 转录因子结合、核受体活性、转录因子活性等。

KEGG 信号通路富集共获得 181 条信号通路,

表 4 16 个主要靶点拓扑学性质

Table 4 Topological properties of 16 main targets

序号	潜在靶点	介度中心性	中心接近度	degree
1	Akt1	0.132 405 52	0.885 714 29	27
2	TP53	0.066 097 27	0.815 789 47	25
3	VEGFA	0.073 055 56	0.794 871 79	23
4	JUN	0.015 994 63	0.738 095 24	21
5	MMP-9	0.056 453 76	0.756 097 56	21
6	FOS	0.084 769 87	0.720 930 23	20
7	PPARG	0.067 749 48	0.738 095 24	20
8	MAPK14	0.024 458 38	0.720 930 23	20
9	Caspase-3	0.013 975 98	0.720 930 23	20
10	ESR1	0.011 229 50	0.704 545 45	19
11	HIF-1 α	0.014 389 02	0.704 545 45	19
12	CAT	0.028 845 75	0.688 888 89	18
13	MTOR	0.017 934 67	0.688 888 89	18
14	AR	0.006 814 82	0.659 574 47	16
15	RELA	0.002 180 79	0.645 833 33	15
16	SOD1	0.020 090 10	0.632 653 06	15

见增强出版附加材料。根据 $P<0.01$,依据 P 进行排序,选择前 20 个具有代表性的通路作为重要通路进行可视化分析,结果显示通路主要涉及癌症通路、癌症中的蛋白多糖通路、内分泌抵抗相关信号通路、(晚期糖基化终末产物)AGE/RAGE 信号通路、MAPK 信号通路以及凋亡通路等。

3.6 分子对接结果 基于活性成分及其靶点的对应关系,使用 AutoDock Vina 1.1.2 将上述分析得到的与靶点相连最多的活性成分黄芩素、 β -谷甾醇和各自对应的连接度靠前的关键靶点包括 PIK3CG、Bcl-2、AR、ADRB2 分别进行分子对接,对接结果见表 5 和增强出版附加材料。结合自由能数值越小,则结合所需的能量越低,越有利于配体与蛋白的结

合。这些作用力使结合能降低,亲和力增加,在化合物配体分子与靶点蛋白结构的残基结合中起到辅助作用。

表5 活性化合物与靶点蛋白的对接

Table 5 Docking results of active compounds and target proteins

化合物	靶点蛋白	PDB ID	结合自由能/ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
黄芩素	PIK3CG	1E8Y	-8.6
黄芩素	Bcl-2	6GL8	-6.7
黄芩素	AR	4OHA	-9.4
β -谷甾醇	PIK3CG	1E8Y	-7.5
β -谷甾醇	Bcl-2	6GL8	-8.0
β -谷甾醇	ADRB2	1GQ4	-6.5

3.7 β -谷甾醇对MC3T3-E1增殖的影响 CCK-8实验结果显示,与空白组相比, β -谷甾醇(0、0.5、1、2.5、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)干预24、48、72 h对MC3T3细胞无不良反应,而10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素在干预48、72 h时,对细胞生长具有明显抑制作用($P<0.05$),因此选择2.5、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度进行后续实验。见图1。

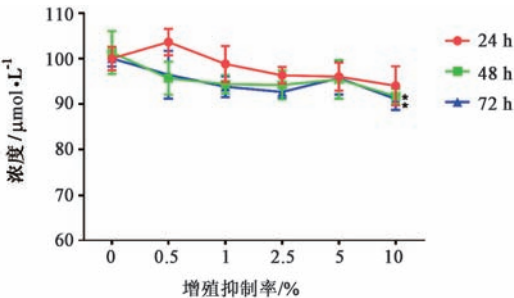


图1 24、48、72 h检测检测不同浓度 β -谷甾醇对MC3T3细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 1 Effects of beta-sitosterol on MC3T3 cell viability were detected at 24, 48 and 72 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.8 β -谷甾醇对MC3T3-E1成骨相关基因表达的影响 Real-time PCR结果显示,与成骨诱导液组相比,2.5、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -谷甾醇干预组促进成骨标志物COL1A1、OPN及RUNX2 mRNA表达($P<0.05$),见表6。

3.9 β -谷甾醇促进MC3T3-E1的成骨分化 碱性磷酸酶染色显示 β -谷甾醇干预组着色更深,证明 β -谷甾醇可增加MC3T3-E1细胞的ALP活性,2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞的ALP活性最强,见图2。

4 讨论

骨质疏松治疗目标包括减少疼痛症状,增加骨量,降低骨折发生率;其中降低骨折的发生率是治疗骨质疏松最重要目的。目前常用于治疗骨质疏

表6 Real-time PCR检测 β -谷甾醇对MC3T3细胞COL1A1、RUNX2、OPN mRNA表达的影响

Table 6 Effects of beta-sitosterol on mRNA expression levels of COL1A1, RUNX2, OPN in MC3T3 cells

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	COL1A1	RUNX2	OPN
空白组	-	0.89 $\pm$ 0.966	0.96 $\pm$ 0.076	0.08 $\pm$ 0.042
成骨诱导组	-	1.05 $\pm$ 0.038	1.19 $\pm$ 0.108 ¹⁾	1.11 $\pm$ 0.126
β -谷甾醇组	2.5	1.86 $\pm$ 0.132 ²⁾	1.42 $\pm$ 0.022 ¹⁾	1.96 $\pm$ 0.235 ²⁾
	5.0	1.54 $\pm$ 0.172 ²⁾	1.68 $\pm$ 0.042 ²⁾	2.88 $\pm$ 0.074 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

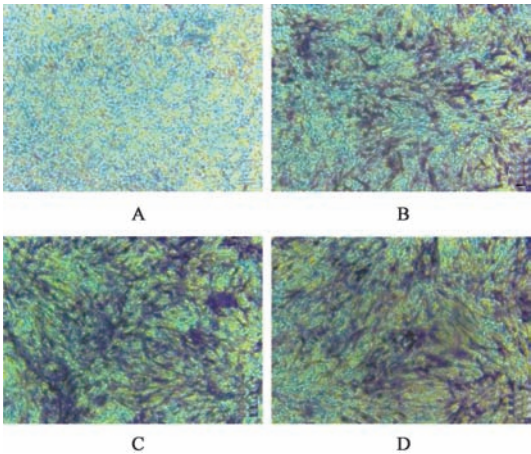


图2 β -谷甾醇对MC3T3细胞成骨分化局部观察(ALP, $\times 50$)

Fig. 2 Local observation of beta-sitosterol on osteogenic differentiation of MC3T3 (ALP, $\times 50$)

松主要有以双磷酸盐类、降钙素类为代表的抗骨吸收药物。还有以甲状旁腺激素PTH、维生素D为代表的抗骨质疏松的药物以及雌激素类药物的替代疗法以及目前新型的RANKL(核转录因子- κ B受体活化因子配体)特异性单克隆抗体药物。双磷酸盐类药物的长期使用,会增加患者的胃肠道的负担,增加下颌骨骨坏死的发生率^[24]。应用雌激素能有效缓解绝经后骨质疏松,但也会增加患乳腺癌、子宫内膜癌的危险^[25]。甲状旁腺激素PTH为代表的药物如特立帕肽,虽然能延缓骨质疏松的进展,但连续用药时间不能超过2年,且会伴有恶心、肢体疼痛等不良反应。新型RANKL特异性单克隆抗体药物地舒单抗,能够作用于与RANKL靶点,减少破骨细胞的形成,但长期的用药仍会有非典型股骨骨折,典型下颌骨坏死,低钙血症,过度抑制骨吸收的风险。按照祖国传统医学理论认为,骨质疏松属于中医学“骨痿”“骨枯”“骨痹”的范畴。清代医家黄元御在《四圣心源·形体结聚》提出:“髓骨者,肾水

之所生也,肾气盛则髓骨坚凝而轻利”,说明人肾气的充足与否,是一个人体骨骼强健的根源。黄精具有益气养阴、润肺、补脾、益肾的功效,是临床上治疗气阴两虚型肾虚,强筋健骨的要药。

本次研究共筛选出黄精的活性成分12个、潜在靶点32个和相互关系210个,共涉及181条主要的通路以及995个生物过程。“黄精-活性成分-潜在靶点”网络显示黄精的主要成分等有效成分黄芩素、 β -谷甾醇、薯蓣皂素、甘草素、3'-甲氧基异黄酮和4,5'-二羟基黄酮能协同作用于多个靶点,现代药理学研究,研究表明,黄芩素能激活Wnt信号通路从而促进人牙周膜细胞的成骨效应^[19]。ZHANG等^[26]研究发现薯蓣皂素的抗骨质疏松作用可能与通过增加无翅(Wnt)和骨形态发生蛋白(BMP)途径的信号传导促进骨形成过程以及通过减少破骨细胞生成刺激因子抑制骨吸收过程有关。此外,UCHINO等^[27]研究发现甘草素可提高小鼠胚胎成骨细胞前体细胞的碱性磷酸酶活性,同时抑制破骨细胞分化并抑制其骨吸收活性。 β -谷甾醇是一种植物甾醇,现代药理学发现其具有抗氧化、抗炎、镇痛、降血糖、免疫调节等作用^[28],而目前关于 β -谷甾醇治疗骨质疏松作用机制的相关研究报道尚少,因此选择 β -谷甾醇作进一步研究。

PPI网络是一个互相交错的网络,这些靶点之间相互调节、共同作用。黄精治疗骨质疏松主要包括Akt1、TP53、VEGFA、JUN、MMP-9、FOS等16个关键靶点。Akt1是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族(Akt1、Akt2、Akt3)之一,激活Akt可发挥多种生物效应包括细胞增殖、代谢及血管生成等^[29],MUKHERJEE等^[30]证明Akt1可同时调控成骨分化和破骨分化。下调TP53的表达可促进骨髓间充质干细胞成骨分化,预防小鼠骨质疏松。VEGFA是一种促血管生成因子,可诱导血管内皮细胞增殖和迁移,WANG等^[31]发现右美托咪定可通过抑制miR-361-5p从而增加VEGFA表达,促进成骨-成血管效应。IL-7可通过激活c-Fos/c-Jun途径调节NFATc1、MMP-9的表达以及p38 MAPK蛋白和Akt的磷酸化,从而增加Rankl刺激的巨噬细胞中的破骨细胞数量和骨吸收^[32]。MMP-9、MMP-13等参与骨骼的发育、重塑和修复,在破骨细胞分化期间MMP-9表达增高,刺激骨吸收^[33]。以上与本研究的靶点预测基本一致,说明黄精通过多成分、多靶点治疗骨质疏松的特点。从KEGG通路富集分析表明,黄精可调控Akt1、MAPK14、Caspase-3、HIF1 α 、

MTOR等参与的炎症、氧化应激、凋亡、代谢等多种信号通路。

既往研究发现,激活ADRB2/PI3K/Akt通路可以抑制心肌细胞凋亡^[34]。除细胞凋亡外,Bcl-2蛋白家族在其他细胞过程如例如能量代谢、线粒体功能、自噬、细胞周期的调节中同样发挥重要作用^[35]。如上所述,笔者发现 β -谷甾醇可能通过调节Bcl-2来治疗骨质疏松,并通过分子对接实验初步证实了这一观点。此外,通过体外实验验证 β -谷甾醇具有促进MC3T3-E1细胞成骨分化的作用,本研究的局限性在于预测结果主要通过细胞实验验证,尚未开展相关动物与临床试验,对于黄精治疗骨质疏松的作用机制仍需深入探究,使研究结论更具说服力。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 夏维波,章振林,林华,等.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(3):281-309.
- [2] MILLER P D. Management of severe osteoporosis[J]. Expert Opin Pharmacother,2016,17(4):473-488.
- [3] CLYNES M A, HARVEY N C, CURTIS E M, et al. The epidemiology of osteoporosis[J]. Br Med Bull, 2020,133(1):105-117.
- [4] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2019,12(4):317-318.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:319-320.
- [6] 陈宇,周芸涓,李丹,等.黄精的现代药理作用研究进展[J].中药材,2021(1):240-244.
- [7] 方欢乐,李瑶瑶,陈晶晶,等.黄精多糖通过调节JAK2/STAT3通路改善异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌肥厚[J].实用药物与临床,2019,22(4):354-358.
- [8] 张娇,王元忠,杨维泽,等.黄精属植物化学成分及药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2019,44(10):1989-2008.
- [9] 杨兴鑫,王曦,董金材,等.滇黄精对非酒精性脂肪肝大鼠的保护作用及机制研究[J].中国药学杂志,2018,53(12):975-981.
- [10] 彭静.黄精皂苷对糖尿病肾病大鼠肾损伤的保护作用及Wnt/ β -catenin信号通路的影响[J].中成药,2019,41(10):2518-2521.
- [11] 任洪民,邓亚玲,张金莲,等.药用黄精炮制的历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(17):4163-4182.
- [12] 唐伟,王威,谭丽阳,等.黄精多糖对慢性脑缺血大鼠

- 学习记忆能力及脑组织超微结构影响[J]. 中国中医药科技, 2017, 24(2): 173-176.
- [13] 陆连第, 段伟松, 赵玉, 等. 黄精多糖对血管性痴呆模型大鼠干预作用的实验研究[J]. 中药材, 2018, 41(9): 2212-2215.
- [14] 赵宏丽, 许燕, 赵红岩, 等. 黄精多糖对2型糖尿病大鼠SREBP-1c和SCD-1蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 106-109.
- [15] ZONG S, ZENG G, ZOU B, et al. Effects of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide on the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells in mice [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 6169-6180.
- [16] ZENG G F, ZHANG Z Y, LU L, et al. Protective effects of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide on ovariectomy-induced bone loss in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(1): 224-229.
- [17] PENG X, HE J, ZHAO J, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharide promotes osteoblastic differentiation through the ERK/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway *in vitro* [J]. Rejuvenation Res, 2018, 21(1): 44-52.
- [18] DU L, NONG M N, ZHAO J M, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharide inhibits osteoporosis by promoting osteoblast formation and blocking osteoclastogenesis through Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6: 32261.
- [19] LI B, WU P, FU W, et al. The Role and Mechanism of miRNA-1224 in the *Polygonatum sibiricum* polysaccharide regulation of bone marrow-derived macrophages to osteoclast differentiation [J]. Rejuvenation Res, 2019, 22(5): 420-430.
- [20] HOPKINS A L. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [21] XU J, LIU X, LUO L, et al. A metabonomics investigation into the therapeutic effects of BuChang NaoXinTong capsules on reversing the amino acid-protein interaction network of cerebral ischemia [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 7258624.
- [22] ZHONG X, XIU L L, WEI G H, et al. Bezafibrate enhances proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMPK and eNOS activation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(5): 591-600.
- [23] WANG P, WANG M, ZHUO T, et al. Hydroxysafflor yellow A promotes osteogenesis and bone development via epigenetically regulating β -catenin and prevents ovariectomy-induced bone loss [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2021, 137: 106033.
- [24] BONE H. Future directions in osteoporosis therapeutics [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2012, 41(3): 655-661.
- [25] KOMM B S, MORGENSTERN D, A YAMAMOTO L, et al. The safety and tolerability profile of therapies for the prevention and treatment of osteoporosis in postmenopausal women [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2015, 8(6): 769-784.
- [26] ZHANG Z, CHEN Y, XIANG L, et al. Diosgenin protects against alveolar bone loss in ovariectomized rats via regulating long non-coding RNAs [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(5): 3939-3950.
- [27] UCHINO K, OKAMOTO K, SAKAI E, et al. Dual effects of liquiritigenin on the proliferation of bone cells: Promotion of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast differentiation [J]. Phytother Res, 2015, 29(11): 1714-1721.
- [28] BIN SAYEED M, KARIM S, SHARMIN T, et al. Critical analysis on characterization, systemic effect, and therapeutic potential of beta-sitosterol: A plant-derived orphan phytosterol [J]. Medicines (Basel), 2016, 3(4): 29.
- [29] HERS I, VINCENT E E, TAVARÉ J M. Akt signalling in health and disease [J]. Cell Signal, 2011, 23(10): 1515-1527.
- [30] MUKHERJEE A, ROTWEIN P. Selective signaling by Akt1 controls osteoblast differentiation and osteoblast-mediated osteoclast development [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(2): 490-500.
- [31] WANG Z, GE X, WANG Y, et al. Mechanism of dexmedetomidine regulating osteogenesis-angiogenesis coupling through the miR-361-5p/VEGFA axis in postmenopausal osteoporosis [J]. Life Sci, 2021, 275: 119273.
- [32] ZHAO J J, WU Z F, YU Y H, et al. Effects of interleukin-7/interleukin-7 receptor on RANKL-mediated osteoclast differentiation and ovariectomy-induced bone loss by regulating c-Fos/c-Jun pathway [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 7182-7194.
- [33] KIM Y, KIM J, LEE H, et al. Tetracycline analogs inhibit osteoclast differentiation by suppressing MMP-9-mediated histone H3 cleavage [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(16): 4038.
- [34] WU M P, ZHANG Y S, ZHOU Q M, et al. Higenamine protects ischemia/reperfusion induced cardiac injury and myocyte apoptosis through activation of β_2 -AR/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Pharmacol Res, 2016, 104: 115-123.
- [35] SIDDIQUI W A, AHAD A, AHSAN H. The mystery of Bcl-2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: An update [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(3): 289-317.

[责任编辑 顾雪竹]