

“杜仲-牛膝”治疗骨关节炎的网络药理学研究

唐武林

广西中医药大学附属瑞康医院 广西南宁

【摘要】目的 “杜仲-牛膝”治疗骨关节炎的网络药理学研究。**方法** TCMSP 数据库获取“杜仲-牛膝”的活性成分及靶点,再用 GEO 芯片数据库分析 OA 相关靶点, Venny 平台交集得到治疗靶点。Cytoscape3.9.1 软件绘制“杜仲牛膝活性成分-作用靶点”网络。靶点导入 STRING 数据库分析 PPI 互作, 导入 DAVID 进行 GO 和 KEGG 富集分析。**结果** 得到“杜仲-牛膝”48 个有效活性成分和药物靶点蛋白 211 个, OA 相关基因 883 个, 共有靶点 32 个。PPI 网络发现 JUN、MAPK8、PTGS2、MMP9、EGFR 等可能是关键靶点。KEGG 分析获得 99 条通路, 其中包括 TLR 信号通路和 TNF 信号通路。**结论** “杜仲-牛膝”有效成分通过多靶点、多信号通路起协同治疗 OA 作用。

【关键词】 骨关节炎; 杜仲; 牛膝; 网络药理学

【收稿日期】 2023 年 2 月 17 日 **【出刊日期】** 2023 年 4 月 13 日 **【DOI】** 10.12208/j.ircm.20230009

Network pharmacological study on the treatment of osteoarthritis with "Eucommia Bidentata"

Wulin Tang

Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi

【Abstract】Objective To study the network pharmacology of "Eucommia ulmoides - Achyranthes bidentata" in the treatment of osteoarthritis. **Methods** The active components and targets of "Eucommia ulmoides - Achyranthes bidentata" were obtained from the TCMSP database, and the relevant targets of OA were analyzed using the GEO chip database. The Venny platform was intersected to obtain the treatment targets. Cytoscape 3.9.1 software draws a network of "active ingredients of Eucommia ulmoides and Achyranthes bidentata - action targets". The target was imported into the STRING database to analyze PPI interactions, and DAVID was imported for GO and KEGG enrichment analysis. **Results** 48 effective active components, 211 drug target proteins, and 883 OA related genes were obtained from "Eucommia ulmoides - Achyranthes bidentata", with a total of 32 targets. PPI network discovery JUN, MAPK8, PTGS2, MMP9, EGFR, etc. may be key targets. KEGG analysis obtained 99 pathways, including TLR signaling pathways and TNF signaling pathways. **Conclusion** The effective components of "Eucommia ulmoides Oliv. - Achyranthes bidentata" have synergistic therapeutic effects on OA through multiple targets and multiple signal pathways.

【Keywords】 Osteoarthritis; Eucommia ulmoides; Achyranthes bidentata; Network pharmacology

骨关节炎 (Knee osteoarthritis, KOA) 是一种以关节软骨退化、骨赘形成、肌肉无力和炎症等为特征的慢性退行性关节疾病。KOA 发病后, 局部关节所有结构, 包括关节软骨、软骨下骨 (板和小梁)、滑膜组织和关节囊等都会受到影响^[1]。KOA 是好发于老年人群, 随着老龄化进程, KOA 将成为全球第四大致残原因^[1]。中医临床治疗 KOA 的组方中, “杜仲-牛膝”为常用药对和复方配伍核心。杜仲和牛膝

皆归肝、肾两经, 均有补肝肾, 强筋骨的功用, 两药通常相须为用, 主治肝肾不足、腰膝骨痛、筋骨痿软等疾病^[2]。两者配伍治疗 KOA 的临床应用广泛且疗效显著, 但由于杜仲、牛膝所含化学成分较为复杂。本文利用网络药理学查找出牛膝、杜仲的有效物质, 并对其治疗 KOA 作用靶点及内在的机制探索。

1 材料和方法

1.1 “杜仲-牛膝”活性成分的筛选在 TCMSP

检索“杜仲-牛膝”2味中药的化学成分。采用 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 作为筛选指标。

1.2 “杜仲-牛膝”活性成分靶点的预测 TCMSP 数据库查询获取上一步得到的活性成分与之对应的靶点,并通过 UniProt 数据库对靶点名称标准化及合并去重。

1.3 KOA 疾病靶点的预测以“膝骨关节炎”的英文“Knee osteoarthritis”为关键词从 GEO 数据库下载编号为: GSE55235 的芯片数据,该芯片包含 10 例 KOA 患者和 10 名健康人群的关节滑膜组织标本的基因测序数据,使用 R 语言对原始数据再次解析,其中差异基因的筛选条件为: $P < 0.01$, \log_2FC filter = 1。

1.4 潜在作用靶点预测将“杜仲-牛膝”中活性成分的靶点和骨关节炎的相关靶点经 Venny 软件取交集,获得“杜仲-牛膝”治疗 KOA 的关键靶点。

1.5 “杜仲牛膝-活性成分-作用靶点”网络根据根据上一步获得的关键靶点,整合对应有效成分,使用 Cytoscape3.9.1 软件构建网络拓扑图。

1.6 PPI 网络将在 STRING 数据库以 Confidence > 0.7 为筛选参数;分析靶点之间的相互作用关系,再用 Cytoscape3.9.1 软件构建调控网络,并分析网络中各个节点度值,根据度值确定核心靶点。

1.7 GO 和 KEGG 富集分析 利用 DAVID 数据库对潜在靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 富集通路分析。

2 结果

2.1 活性化合物的共收集得到“杜仲-牛膝”的化学成分 324 个,经筛选得到 48 个活性化学成分,杜仲 28 个、牛膝 20 个。

2.2 OA 相关靶点筛选根据筛选条件,获得 883 个差异表达基因,绘制火山图和聚类图,见图 1。

2.3 “杜仲-牛膝”治疗 KOA 靶点预测筛选有效活性成分 48 个,UniProt 数据库标准化后得到作用靶点 211 个;GEO 差异分析获得 KOA 的靶点 883 个,通过 Venny 平台找交集获得靶点 32 个。

2.4 “杜仲牛膝-活性成分-作用靶点”网络 Cytoscape3.9.1 软件构建“杜仲牛膝-活性成分-作用靶点”网络,见图 2。关键活性成分信息表,见表 1。网络总共包括个 63 节点和 113 条边,绿色节点代表杜仲相关化合物,黄色节点代表牛膝相关化合物,蓝色节点代表靶点,线条代表活性成分与靶点的联系。

2.5 PPI 网络及网络拓扑分析 获取 74 对互作关系,涉及 26 个靶点。Cytoscape3.9.1 软件构建 PPI 互作网络。插件分析节点的 DC 和 BC 值,DC 均值 5.6,BC 均值 37,将 $DC \geq 6$ 且 $BC \geq 40$ 的靶点有大到小排序。度值排名前 5 的靶点 JUN、MAPK8、PTGS2、MMP9、EGFR。

2.6 GO 和 KEGG 分析 GO 功能分析得到共 444 个条目 ($P < 0.05$);生物学过程 (BP) 的相关条目主要包括对 Oxidative stress response、Cell proliferation and apoptosis、Immune cells and immune reactions;共得到 99 条通路,主要涉及 TLR 信号通路和 Toll 样受体信号通路等。

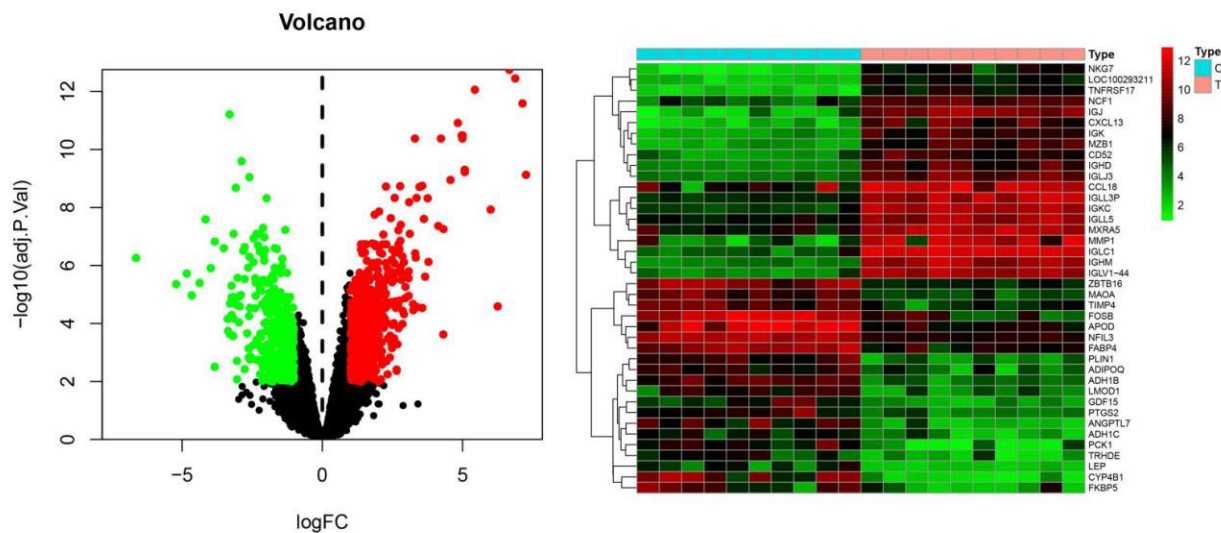


图 1 OA 相关芯片的差异表达基因

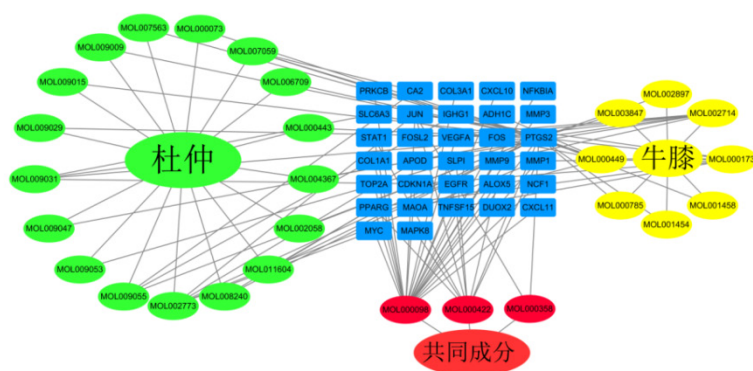
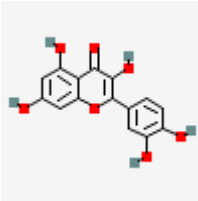
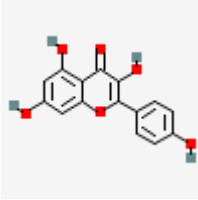
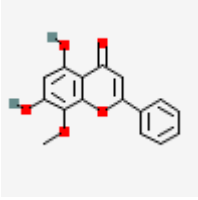
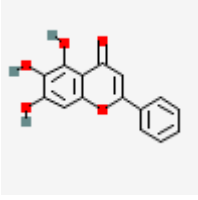
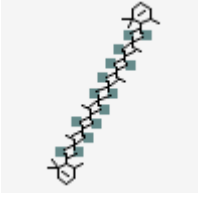


图2 活性成分-作用靶点网络

表1 关键活性成分的基本信息

MOLID	化学成分	度值	化学式	结构	来源
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	10	$C_{15}H_{10}O_7$		杜仲、牛膝
MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	24	$C_{15}H_{10}O_6$		杜仲、牛膝
MOL000173	汉黄芩素 (wogonin)	7	$C_{16}H_{12}O_5$		牛膝
MOL002714	黄芩素 (baicalein)	7	$C_{15}H_{10}O_5$		牛膝
MOL002773	β -胡萝卜素 (beta-carotene)	6	$C_{40}H_{56}$		杜仲

3 讨论

中医将 KOA 归属于“痹症”“骨痹”范畴，并提出其病因多为肝肾不足，脾气虚弱，以致运化失职所致，再加上外邪入侵，寒湿久郁，化热成痹，致经脉痹阻而筋骨失于濡养，因而致病。故临床上多以补益肝肾，强筋壮骨等为治论^[3]。孔德忠等人运用数据挖掘技术分析文献中治疗膝骨关节炎方剂的用药配伍规律发现牛膝、杜仲的使用频次较高^[4]。本研究通过网络药理学从微观角度初步挖掘、分析杜仲-牛膝治疗骨关节炎的分子机制。

药物活性成分-靶点网络和分子对接结果分析可知，槲皮素对应 JUN、PTGS2、MMP9、EGFR，山柰酚对应 JUN、MAPK8、PTGS2，汉黄芩素、 β -胡萝卜素对应 JUN、PTGS2，黄芩素对应 PTGS2、MMP9。总之，槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素是“杜仲-牛膝”药对中的重要成分，也是作用于 OA 的潜在靶点的关键成分。槲皮素能有效降低炎症因子（如 TNF- α 及 IL-1 β ）的表达水平，进而减轻炎症反应起到保护软骨的效果^[5]。可以认为，槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素、 β -胡萝卜素可能是杜仲、牛膝治疗 KOA 的关键有效成分。山柰酚具有抗炎作用，主要通过调节促炎酶的活性，如抑制核转录因子（NF- κ B）、细胞黏附分子（CAM）以及基质金属蛋白酶家族（MMPs）等^[6]。通过 PPI 蛋白互作网络，JUN、MAPK8、PTGS2、MMP9、EGFR 可能是核心作用靶点。JUN 是 AP-1 蛋白家族重要成员，JUN 表达的 JNK 对调节软骨细胞的凋亡有重要作用^[7]。MMP9 能促使关节软骨基质降解，使软骨发生损伤性改变^[8]。GO 分析可知，生物学过程和多条重要信号通路参与，免疫细胞及免疫反应、炎症因子及炎症反应、脂多糖的细胞反应等。KEGG 分析显示“杜仲-牛膝”治疗 OA 的主要信号通路有 IL-17 信号通路、TLR 信号通路和 TNF 信号通路等。IL-17 信号通路激活下游 NF- κ B 信号通路，诱导 MMPs 生成^[9]。TNF- α 与 KOA 的发生密切关联，能减少软骨胶原的合成^[10]。Toll 样受体（TLR）导致 NF- κ B 的激活和促炎细胞因子的产生，包括 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6，该受体所在的信号通路参与炎症相关疾病的发生^[11]。本研究利用网络药理学和分子对接技术对骨关节炎治疗靶点及对“杜仲-牛膝”有效部位及其作用靶点和作用机理进行初步筛

选和分析，以期为“杜仲-牛膝”在骨关节炎中药效物质基础和作用机理研究奠定基础。此外，由于条件有限，只能分析“杜仲-牛膝”中主要化合物，因此在一定程度上限制了研究结果。其次，通过网络药理学可以筛选很多目标和途径，但仍然需要实验验证。

参考文献

- [1] Intemann J, De Gorter DJJ, Naylor AJ, et al. Importance of osteocyte-mediated regulation of bone remodelling in inflammatory bone disease[J]. *Swiss Med. Wkly.* 2020, 150: w20187.
- [2] 李春娥. 基于数据挖掘研究骨关节炎用药规律及系统评价[D]. 山东中医药大学, 2020.
- [3] 中国中西医结合学会骨伤科专业委员会. 膝骨关节炎中西医结合诊疗指南[J]. *中华医学杂志*, 2018(45): 3653-3658.
- [4] 孔德忠, 欧梁, 郭礼跃, 等. 基于数据挖掘技术研究治疗膝骨关节炎肾虚血瘀型方剂的组方配伍规律[J]. *风湿病与关节炎*, 2020, 9(2): 12-17.
- [5] 刘兰宁, 唐焕珍, 李晓媛. 基于 ROS/TXNIP/NLRP3 通路探讨槲皮素对 Pg-LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子表达的影响[J]. *中成药*, 2022, 44(12): 4049-4052.
- [6] 丘志河, 谢卫勇, 黄刚, 廖小青, 李祥. 山柰酚通过调控 miR-21/SOX9 对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡的影响[J]. *中国药师*, 2022, 25(12): 2073-2078.
- [7] 应璞, 路通, 许岳等. 基于生物信息学挖掘骨关节炎潜在的关键生物标志物[J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(04): 406-411.
- [8] 周鑫淼, 叶超, 李祥, 等. 膝骨关节炎不同证候关节液 MMP-9、TIMP-1 含量相关性研究[J]. *辽宁中医药大学学报* 2019, 1-9.
- [9] Liu Y, Peng H, Meng Z, et al. Correlation of IL-17 Level in Synovia and Severity of Knee Osteoarthritis[J]. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* 2015, 21: 1732-1736.
- [10] 何启荣, 林伟文. 关节液中 TNF- α 、IL-1、MMPS 水平对膝骨性关节炎患者的预后的评估价值[J]. *中国医学创新*. 2016, 13(21): 1-4.

- [11] Pisani LP, Estadella D, Ribeiro DA. The Role of Toll Like Receptors (TLRs) in Oral Carcinogenesis[J]. Anticancer Res. 2017, 37(10):5389-5394.

版权声明: ©2023 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS