

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.009

参仙片治疗骨质疏松症作用机制的网络药理学研究*

申丽莎¹, 杨 堃², 蒋成英¹, 张安琪¹, 杨巧虹^{3△}

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400061; 2. 重庆市食品药品检验检测研究院·重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121; 3. 重庆医疗器械质量检验中心, 重庆 401147)

摘要:目的 探讨参仙片治疗骨质疏松症的作用机制。方法 通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)检索参仙片中各味中药的活性成分,把筛选后的成分导入 PubChem 及 SwissTargetPrediction 数据库预测活性成分的潜在靶点,利用 GeneCards 数据库检索骨质疏松症相关靶点,将两种方法所得靶点进行映射;构建“药物-成分-潜在靶点”网络,将潜在靶点导入 String 数据库,构建蛋白相互作用(PPI)网络,筛选关键靶点;利用 David 数据库将潜在靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。将排前 3 名的关键靶点与排前 3 名的关键化合物利用 PyMol 和 AutoDockVina 等软件进行分子对接。结果 筛选出有效活性成分 57 个、对应靶点 404 个、与骨质疏松症的共同靶点 259 个,其中关键靶点涉及 AKT1, IL-6, TP53 等。GO 功能富集分析得到 1 084 个生物学过程,KEGG 通路富集分析得到 121 条信号通路。分子对接结果表明,前 3 名关键靶点与排前 3 名关键活性成分具有较好的结合力。结论 参仙片可通过多种作用机制预防和治疗骨质疏松症。该研究可为参仙片的临床应用提供参考。

关键词:网络药理学;分子对接;参仙片;骨质疏松症;作用机制

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)18-0032-05

Mechanism of Shenxian Tablets in the Treatment of Osteoporosis Based on Network Pharmacology

SHEN Lisha¹, YANG Kun², JIANG Chengying¹, ZHANG Anqi¹, YANG Qiaohong³

(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing, China 400061; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control · Chongqing Engineering Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing, China 401121; 3. Chongqing Quality Testing and Inspection Center for Medical Devices, Chongqing, China 401147)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of Shenxian Tablets in the treatment of osteoporosis. **Methods** The active ingredients of each traditional Chinese medicine in Shenxian Tablets were obtained and screened through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform(TCMSP), and the screened ingredients were imported into the PubChem and Swiss Target Prediction database to predict the potential targets of active ingredients. The osteoporosis-related targets were searched through the GeneCards database, and the targets obtained by the two methods were mapped. The “drug-compound-potential target” network was constructed, the potential targets were imported into the String database, the protein-protein interaction(PPI) network was constructed, and the key targets were screened. Gene Ontology(GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway enrichment analysis of potential targets were performed by using the David database. The top three key targets were docked to the top three key active ingredients by PyMol, Auto DockVina and other software. **Results** A total of 57 active ingredients were obtained through screening, corresponding to 404 targets, and 259 common targets with osteoporosis, of which the key targets involved AKT1, IL-6, TP53, etc. A total of 1 084 biological processes were obtained by GO functional enrichment analysis and 121 signal pathways were obtained by KEGG pathway enrichment analysis. The results of molecular docking showed that the top three key targets had a good binding ability with the top three key active ingredients. **Conclusion** Shenxian Tablets can prevent and treat osteoporosis through a variety of mechanisms. This study can provide a reference for the clinical application of Shenxian Tablets.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Shenxian Tablets; osteoporosis; action of mechanism

骨质疏松症是以骨量低下、骨微结构破坏而导致骨脆性增加,易发生骨折的全身性骨病。该病属中医“骨痿”“骨痹”范畴,证候分布特点以“肾精亏损”为主^[1],临床多采用补肾益精类中药及其复方治疗。参仙片由淫羊藿、女贞子、仙茅、人参和制何首乌 5 味中药材组方,有温肾益精、补气养心功效^[2-3]。本研究中利用网络药理学与分子对接技术^[4],构建参仙片治疗骨质疏松症的

药物成分与靶点及调控的通路网络,为该药临床用于骨质疏松症的治疗提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 数据收集

有效成分筛选:利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/>),以人参、女贞子、仙茅、淫羊藿为关键词,检索其有效成分。以口服生物利

*基金项目:重庆市基础科学与前沿技术研究项目[cstc2017jcyjAX0112]。

第一作者:申丽莎,女,大学本科,工程师,研究方向为中药质量控制,(电子信箱)shenlisa@163.com。

△通信作者:杨巧虹,女,大学本科,副主任药师,副编审,研究方向为医疗器械检验检测实验室质量监管管理及药学科科技论文的设计编撰,(电话)023-67786713(电子信箱)87831702@qq.com。

用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18作为筛选条件,参考国内外文献,查找制何首乌的活性成分,利用 PubChem 网站(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取各活性成分的 SMILES 式,导入 SwissADME 平台(<http://www.swissadme.ch/>),最终收集得符合条件的有效成分。

有效成分相关靶点收集:利用 TCMSP 数据库中的 Related Targets, PubChem, Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)对有效成分相关靶点进行预测,筛选出每味中药有效成分的潜在靶点,再通过蛋白数据库 Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)将靶点转换为统一基因名称。

潜在靶点获取:利用 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>),以“Osteoporosis”为关键词进行检索并汇总,得到骨质疏松症的相关靶点,再通过微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)在线作图工具,将参仙片与骨质疏松症靶点进行映射,获得潜在作用靶点。

1.2 网络模型的构建与分析

利用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“药物-成分-潜在靶点”的网络,并分析其网络拓扑参数,得到主要有效成分及靶点关系。将参仙片的潜在靶点输入 String 数据库(<https://string-db.org/>),以物种 homo sapiens, combined score > 0.4 为标准进行筛选,得到潜在靶点的蛋白相互作用(PPI)网络。

1.3 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析

利用 David 6.8.0 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>),对参仙片治疗骨质疏松症的潜在靶点进行 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析。

1.4 成分-靶点分子对接

从 Rcsb 数据库(<http://www.rcsb.org/>)中下载 PPI 网络中排名前三的关键靶点的晶体结构:AKT1 (PDB ID:6HHH),白细胞介素 6(IL-6, PDB ID:1ALU),

TP53(PDB ID:2VUK),综合运用 PyMol 和 AutoDock Tools 1.5.6 软件完成分子对接及相关的可视化处理。

2 结果

2.1 有效成分筛选与作用靶点确定

共筛选出参仙片有效成分 68 个,其中有 57 个化学成分在 TCMSP 数据库及 Swiss Target Prediction 数据库中匹配到 404 个靶点(删除重复值后)。

2.2 潜在作用靶点预测

通过 GeneCards 数据库得到骨质疏松靶点 4441 个,将参仙片中的作用靶点与骨质疏松症靶点进行映射,获得共同靶点 259 个(见图 1)。表明参仙片可能通过多个潜在作用靶点协同治疗骨质疏松症。



图 1 参仙片活性成分靶点与骨质疏松症靶点映射

Fig.1 Mapping between targets of active ingredients in Shenxian Tablets and osteoporosis-related targets

2.3 “中药-有效成分-潜在靶点”网络构建

利用 Cytoscape 3.8.2 软件将 5 种中药、57 个化学成分和 259 个潜在靶点进行可视化处理(见图 2)。该网络共有 409 个节点、1576 条边,该网络节点的平均 degree 为 7.7066,接近中心值(BC)平均值 0.0056,紧密度中心性(CC)平均值为 0.3087。其中,有 23 个活性成分的 degree, BC, CC 均高于平均值。排名前三的化合物分别为 quercetin, moupinamide, citreorosein, 推测这 3 个成分是参仙片防治骨质疏松症的主要活性成分。

2.4 PPI 网络构建

将参仙片与骨质疏松症的 259 个共同靶点输入 String 数据库,物种限定为“homo sapiens”,选取 minimum

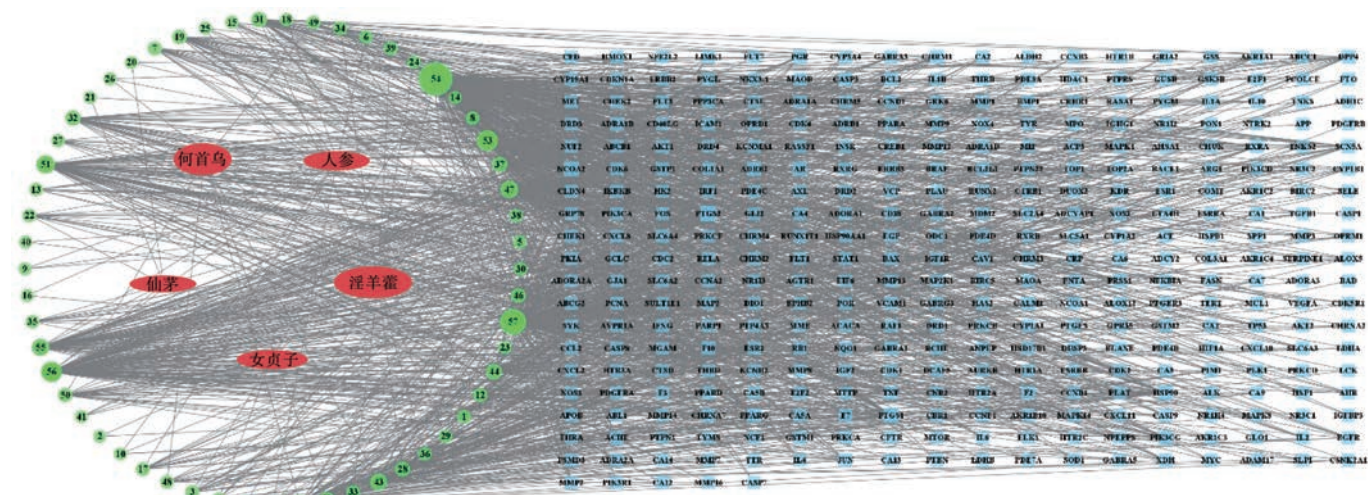


图 2 参仙片治疗骨质疏松症的“药物-成分-潜在靶点”网络

Fig.2 "Drug-component-potential target" network of Shenxian Tablets in the treatment of osteoporosis

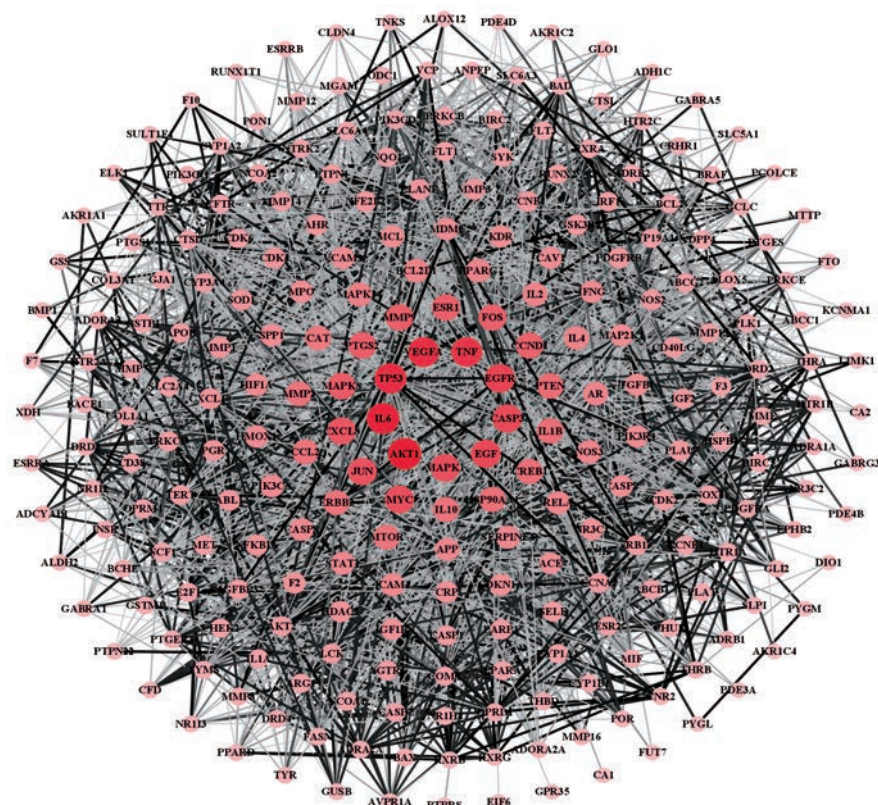


图3 参仙片治疗骨质疏松症相关靶点的 PPI 网络

Fig.3 PPI network of Shenxian Tablets in the treatment of osteoporosis - related targets

required interaction score > 0.4, 探寻靶基因相互作用间的作用关系(见图3)。该网络涉及257个节点、5408条边, 其中节点表示靶基因, 边表示靶基因间的相互作用关系。网络拓扑分析结果表明, 节点 degree 均值为42.25。根据节点数值高于2倍 degree 平均值筛选出29个关键靶点(见图4), 并认为这些靶点对参仙片防治骨质疏松症起到了关键作用。按 degree 排列, 排名前三的靶点分别为 AKT1, IL-6, TP53, 可认为这是核心靶点。

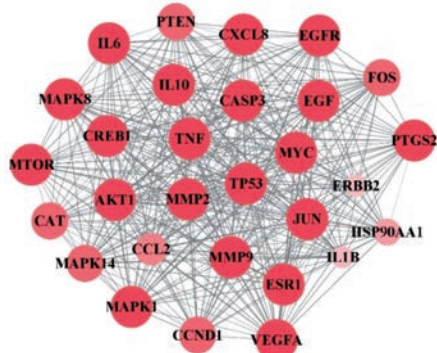


图4 关键靶点的 PPI 网络

Fig.4 PPI network of key targets

2.5 靶点的 GO 功能富集分析

将参仙片的259个潜在靶点录入 David 数据库, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 共得到 GO 富集条目1084个, 其中包括819个生物过程(BP)、87种细胞组分(CC)和178种

分子功能(MF)。各选取排前10名的GO条目绘制柱状图(见图5)。结果表明, RNA聚合酶II启动子转录、细胞增殖、DNA模板转录、基因表达的正调控, 药物应答, 信号转导, 凋亡过程的负调控等生物过程均在参仙片防治骨质疏松症过程中发挥了重要作用。

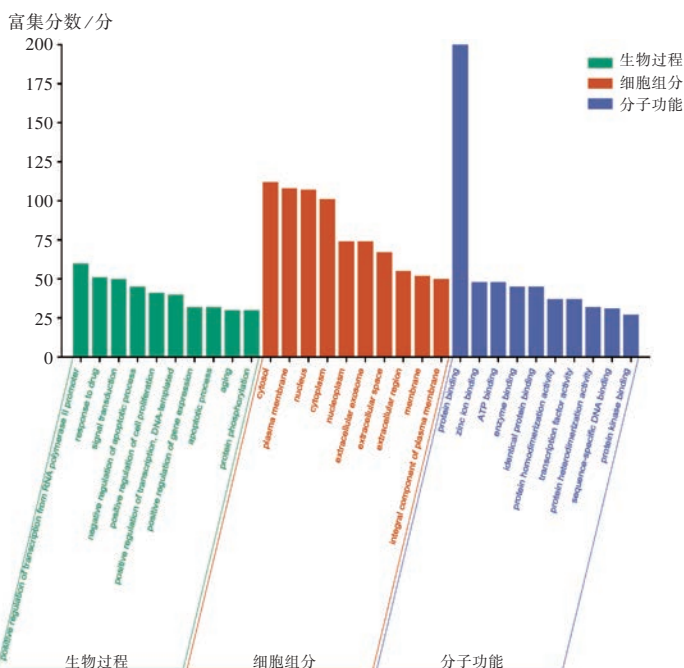


图5 GO 功能富集分析结果

Fig.5 Results of GO functional enrichment analysis

2.6 靶点的 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集分析中有 121 条信号通路($P < 0.05$), 取排前 20 名的条目绘制气泡图(见图 6), 与骨质疏松症相关的通路主要有细胞凋亡、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、甲状腺激素信号通路等。

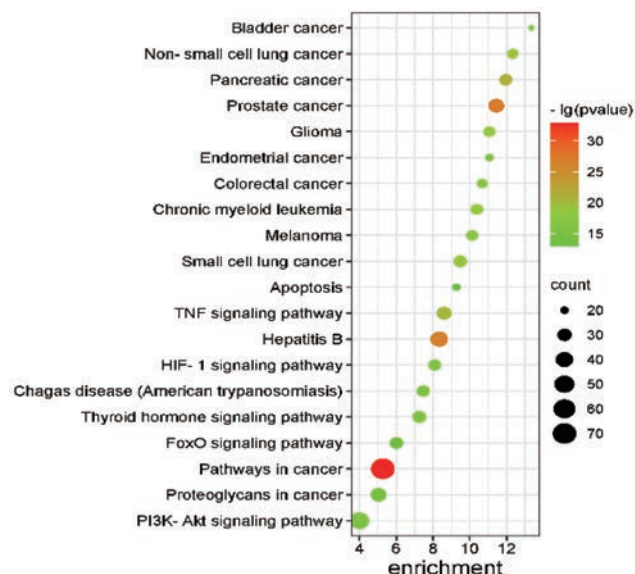


图 6 KEGG 通路富集分析结果

Fig. 6 Results of KEGG pathway enrichment analysis

2.7 分子对接

根据“药物-成分-潜在靶点”网络的 23 个主要活性成分, 选择 degree 大于均值的前 3 名的活性成分。与 PPI 网络拓扑分析后所得的 29 个关键靶点的前 3 个靶点蛋白进行分子对接, 分子对接结合自由能越小, 则表示受体与配体之间的亲和力越大(见表 1)。将这 3 个化合物分别与 3 个靶点蛋白的结合进行可视化处理(见图 7)。结果显示, 各活性成分与 AKT1, IL-6, TP53 均有很好的亲和力。

表 1 活性成分与靶点蛋白的结合能

Tab. 1 Binding ability between active ingredients and target proteins

活性成分	化学式	分子质量	CAS 号	结合能(kcal/mol)		
				AKT1	IL-6	TP53
quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.24	117-39-5	-4.50	-2.14	-3.39
moupinamide	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313.30	66648-43-9	-4.74	-2.69	-3.74
citreoesein	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	481-73-2	-4.96	-3.45	-4.17

3 讨论

正常的骨代谢过程是骨吸收和骨形成的动态平衡。骨吸收由破骨细胞介导, 骨形成则由成骨细胞介导^[5]。当骨代谢出现异常, 骨吸收超过骨形成时, 则引起骨质疏松症。遗传、激素、局部细胞因子、营养摄入、运动、药物等因素均会影响骨代谢过程^[6]。

参仙片中的 5 味中药均属补益类药物, 对骨质疏松

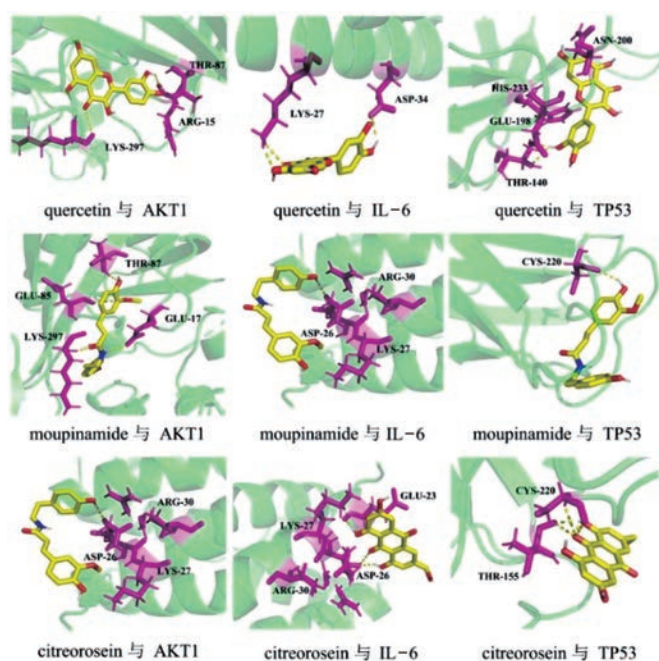


图 7 主要活性成分与关键靶点分子对接模拟图

Fig. 7 Molecular docking simulation of main active ingredients and key targets

症具有较好的药理活性^[7-15]。本研究中筛选出参仙片中的关键化学成分 57 个, 关键靶点 29 个, 以及相关信号通路 121 条。其中, 排前 3 名的化学成分分别为 quercetin, moupinamide, citreoesein (quercetin 为女贞子和淫羊藿的共有成分^[16-17], moupinamide 和 citreoesein 为何首乌的活性成分^[18]), 而排前 3 名的靶点分别为 AKT1, IL-6, TP53。已有研究发现, quercetin 不仅可上调 BMP2 和 Smad4 的表达, 促进成骨细胞分化进而改善骨质疏松症^[19]; 还能降低骨内 SIPS 相关 p21, TP53, SASP 的水平, 使成骨细胞水平不受影响, 进而延缓骨细胞衰老, 挽救由雌激素缺乏导致的骨丢失^[20]。还有研究发现, quercetin 通过抑制 ERK1/2 与 MAPK mRNA 和蛋白的表达, 进一步抑制 ERK1/2-MAPK 信号通路的传导, 从而改善骨小梁结构数量, 增加骨密度^[21]。moupinamide 能抑制环氧合酶(COX)1 和 COX2 的活性, 发挥抗炎、抗氧化的药理作用, 保护成骨细胞^[22]。citreoesein 通过抑制 MAPK 和 AKT 介导的 IKK 磷酸化进而抑制转录因子 NF- κ B 活化来抑制促炎细胞因子的产生^[23]。除了“药物-成分-靶点”的信息, “靶点-信号通路”在骨质疏松症的作用机制方面也有大量文献报道, 如 AKT1 可控制 Akt1/forkhead box class O (FoxO) 3a/Bim 信号通路, 首先使 FoxO3a 发生磷酸化, 以防止其核定位, 从而抑制下游 bim 基因的激活, 最终抑制成骨细胞的凋亡^[24]。IL-6 与人体内的激素水平有密切关系, 雌激素和雄激素均可通过激活 IL-6 基因启动子转录活性的受体介导作用, 抑制成骨细胞增殖^[25];

反之,雌激素缺失引起的骨质疏松模型动物的骨髓细胞中 IL-6 水平则显著升高^[26]。在骨质疏松症的患者和模型动物中,TP53 基因表达和血清 p53 水平均明显上调,说明 p53 水平升高与骨量减少相关,提示科研人员可通过抑制 p53 来逆转骨质疏松症^[27]。本研究中不仅采用网络药理学筛选出参仙片中防治骨质疏松症的活性成分、相关靶点及分子通路,还对关键成分与靶点分子对接所展现出的良好亲和力和稳定构象进行了验证。

本研究中以参仙片为对象,对其中所含活性成分、作用靶点及生物过程和相关通路进行了系统分析,发现参仙片主要化学成分及关键靶点可能通过多种信号通路作用于成骨细胞,刺激成骨细胞增殖,抑制破骨细胞,进一步调节骨细胞代谢,从而达到防治骨质疏松症的目的,体现了中药复方多成分、多靶点、多途径相互作用的结果。本研究为临床将参仙片用于骨质疏松症的防治提供了理论基础,但所收集的疾病和药物所涉及的靶点可能与目前的热点研究及报道的侧重点相关,导致数据库中的数据收集不全面,尚需进一步深入研究和验证。

参考文献

- [1] 申浩,丁品胜,魏戌,等. 基于文献的骨质疏松症中医证候特征研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2018,24(12):1676-1679.
- [2] 杨清林,王贤英,谢香菊,等. 参仙片的质量标准研究[J]. 中成药,2009,31(7):1150-1153.
- [3] 谢香菊,杨清林,王贤英,等. HPLC 测定参仙片中淫羊藿苷的含量[J]. 中国中药杂志,2009,34(15):1984-1985.
- [4] 刘志华,孙晓波. 网络药理学:中医药现代化的新机遇[J]. 药科学报,2012,47(6):696-703.
- [5] 陈德才,卢春燕. 原发性骨质疏松症[J]. 现代临床医学,2005,31(2):129-133.
- [6] MELTON LJ 3RD, ATKINSON EJ, O'CONNOR MK, et al. Bone density and fracture risk in men[J]. J Bone Miner Research, 1998,13(12):1915-1923.
- [7] 贾强强,陈贝贝,朱如愿,等. 女贞子对去卵巢大鼠抗骨质疏松作用及其对 GH/IGF-1 信号通路的影响[J]. 中草药,2019,50(16):3852-3858.
- [8] 殷晓雪,陈仲强,党耕町,等. 淫羊藿苷对成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中国中药杂志,2005,30(4):50-52.
- [9] 李晓曦,陈宇恒,唐秀凤,等. 淫羊藿和女贞子配伍对绝经后骨质疏松症大鼠 TGF- β_1 /Smads 信号通路的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2019,25(12):1685-1690.
- [10] 郭军鹏,张兆鹏,孟庆楠,等. 人参皂苷对老年性骨质疏松大鼠血清吡啶酚和骨钙素水平的影响[J]. 中国老年学杂志,2020,40(3):614-615.
- [11] 朱恒杰,陈扬平,姚江凌. 人参皂苷 Rh2 通过 OPG/RANKL 信号通路介导对老年大鼠骨量流失的保护作用[J]. 中国骨质疏松杂志,2020,26(10):1446-1450.
- [12] 柳嘉伟,苏柯,黄鑫,等. 人参皂苷 Rh2 体内抑制破骨细胞的作用及其机制研究[J]. 中国骨与关节杂志,2020,9(4):293-298.
- [13] 曹大鹏. 仙茅抗骨质疏松化学成分及品质评价研究[D]. 长春:吉林农业大学,2008.
- [14] 张乃丹,蒋益萍,薛黎明,等. 仙茅酚苷类成分促进成骨细胞骨形成和抑制破骨细胞骨吸收[J]. 第二军医大学学报,2016,37(5):562-568.
- [15] 程孟春,刘艳秋,王莉,等. 何首乌和菟丝子对破骨细胞和成骨细胞增殖及分化的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(19):2737-2740.
- [16] 赵丽敏,石任兵,卢广英,等. 基于酚类成分特征图谱的女贞子质量表征研究[J]. 北京中医药大学学报,2016,39(6):480-488.
- [17] 孟宁,孔凯,李师翁. 淫羊藿属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 西北植物学报,2010,30(5):1063-1073.
- [18] 颜世伦. 制何首乌的化学成分研究[D]. 天津:天津大学,2014.
- [19] 郑红,唐薇,角建林,等. 槲皮素通过促进成骨分化治疗去势骨质疏松症大鼠的分子机制[J]. 中药药理与临床,2017,33(5):16-20.
- [20] 顾艺婧,傅稼耀,武文婧,等. 槲皮素通过抗骨相关细胞衰老作用治疗雌激素缺乏骨质疏松症的初步研究[J]. 同济大学学报(医学版),2019,40(3):274-280.
- [21] 王鹏,夏晓枫,左斌,等. 槲皮素对大鼠废用性骨质疏松的预防作用及 ERK1/2-MAPK 信号通路的影响[J]. 解放军医药杂志,2020,32(11):6-10.
- [22] ASWAD M, RAYAN M, ABU-LAFI S, et al. Nature is the best source of anti-inflammatory drugs: indexing natural products for their anti-inflammatory bioactivity[J]. Inflammation Research, 2018,67(1):67-75.
- [23] LU Y, SUH SJ, LI X, et al. Citreorosein inhibits production of proinflammatory cytokines by blocking mitogen activated protein kinases, nuclear factor- κ B and activator protein-1 activation in mouse bone marrow-derived mast cells[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2012,35(6):938-945.
- [24] KAWAMURA N, KUGIMIYA F, OSHIMA Y, et al. Akt1 in Osteoblasts and Osteoclasts Controls Bone Remodeling[J]. PLoS One, 2007,2(10):e1058.
- [25] BELLIDO T, JILKA RL, BOYCE BF, et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor[J]. J Clinical Investigation, 1995,95(6):2886-2895.
- [26] PASSERI G, GIRASOLE G, JILKA RL, et al. Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal[J]. Endocrinology, 1993,133(2):822-828.
- [27] YU T, YOU XM, ZHOU HC, et al. p53 plays a central role in the development of osteoporosis[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(11):10473-10487.

(收稿日期:2021-03-12)