

中图分类号:R969.3 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2023)24-0061-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.24.014



补肾通络方治疗膝骨性关节炎机制网络药理学研究*

宋玉成, 欧国谊, 杨永强, 姚庆蓝, 区 泽, 纪科伟

(广东省人民医院南海医院, 广东 佛山 528200)

摘要:目的 探讨补肾通络方治疗膝骨性关节炎可能的作用机制。方法 通过 BATMAN-TCM 数据库筛选补肾通络方的活性成分及潜在靶点。通过 CTD 数据库、人类孟德尔遗传数据库、GeneCards 数据库检索膝骨性关节炎相关基因, 并通过 CoolGeN 数据库筛选; 将制剂潜在靶点与疾病相关基因相互映射, 得补肾通络方作用于膝骨性关节炎的靶点基因, 导入 String 数据库进行网络拓扑属性分析, 筛选重要靶点蛋白。将补肾通络方作用于膝骨性关节炎的靶点基因导入 DAVID 数据库分别进行基因本体论(GO)功能富集分析及京都基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。结果 筛选出 70 个活性成分, 其中熟地 2 个、杜仲 11 个、当归 16 个、山萸肉 2 个、怀牛膝 3 个、寄生 5 个、独活 9 个、秦艽 3 个、防风 4 个、细辛 6 个、地龙 3 个、甘草 16 个, 10 个成分为多种中药共有。共得到 46 个共有靶点, 其中重要蛋白靶点 10 个。共富集到 GO 条目 133 个, 包括生物过程 96 个、细胞组分 14 个、分子功能 23 个, 涉及细胞凋亡过程、胞质溶胶、乙酰胆碱结合等; KEGG 信号通路 76 条, 包括肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、破骨细胞分化通路等。结论 补肾通络方可能通过多活性成分、多靶点、多通路治疗膝骨性关节炎。

关键词: 补肾通络方; 膝骨性关节炎; 网络药理学; 活性成分; 作用机制

Mechanism of Bushen Tongluo Recipe in the Treatment of Knee Osteoarthritis Based on Network Pharmacology

SONG Yucheng, OU Guoyi, YANG Yongqiang, YAO Qinglan, OU Ze, JI Kewei

(Nanhai Hospital of Guangdong Provincial People's Hospital, Foshan, Guangdong, China 528200)

Abstract : Objective To investigate the mechanism of Bushen Tongluo Recipe in the treatment of knee osteoarthritis. **Methods** The active ingredients and potential targets of Bushen Tongluo Recipe were screened by the BATMAN-TCM database. The knee osteoarthritis-related genes were searched by the Comparative Toxicogenomics Database, Online Mendelian Inheritance in Man and GeneCards and screened by the CoolGeN database. The potential targets of the preparation were intersected with disease-related genes to obtain the target genes for the treatment of knee osteoarthritis with Bushen Tongluo Recipe, and the above target genes were imported into the String database for network topology attribute analysis to screen the important target proteins. The above target genes were imported into the DAVID database for gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis. **Results** Seventy active ingredients were obtained, two from *Rehmanniae Radix Praeparata*, eleven from *Eucommiae Cortex*, sixteen from *Angelicae Sinensis Radix*, two from *Corni Fructus*, three from *Achyranthis Bidentatae Radix*, five from *Visci Herba*, nine from *Angelicae Pubescentis Radix*, three from *Gentianae Macrophyllae Radix*, four from *Saposhnikovia Radix*, six from *Asari Radix et Rhizoma*, three from *Pheretima*, and sixteen from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. Among the above ingredients, ten were common to various traditional Chinese medicines. A total of 46 common targets were obtained, including 10 important protein targets. A total of 133 GO entries were collected, including 96 biological processes, 14 cellular components, and 23 molecular functions, involving cell apoptosis process, cytosol, acetylcholine binding and so on. A total of 76 KEGG signaling pathways were obtained, including tumor necrosis factor (TNF), mitogen-activated protein kinase (MAPK), osteoclast differentiation and other signaling pathways. **Conclusion** Bushen Tongluo Recipe may treat knee osteoarthritis through multiple active ingredients, targets and pathways.

Key words: Bushen Tongluo Recipe; knee osteoarthritis; network pharmacology; active ingredient; mechanism

目前临床对膝骨性关节炎的西医治疗手段包括手术、康复理疗、口服非甾体抗炎药、关节腔内药物注射、口服止痛药等, 但手术创伤较大, 而长期服药易引发出血、溃疡、消化道穿孔等不良反应, 进而影响疗效^[1]。故可考虑中医(中药)治疗。补肾通络方由多种中药组方,

可较好地改善膝骨性关节炎患者关节功能受限、疼痛的情况。网络药理学可清晰显示“药物-靶点-疾病-基因”的内在联系, 广泛用于中药复方配伍规律方面的研究。鉴于此, 本研究中基于网络药理学方法并结合中医对膝骨性关节炎的认识^[2-3], 分析了补肾通络方治疗该

*基金项目: 广东省中医药局科研项目[20222216]。

第一作者: 宋玉成, 男, 硕士研究生, 主任医师, 研究方向为关节外科学、运动医学, (电子信箱)songych272@163.com。

病可能的作用机制^[4-5], 以期为该病的治疗进一步提供理论依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 方剂组成与来源

补肾通络方(组方:熟地、杜仲、当归各12 g, 防风10 g, 山萸肉、怀牛膝、寄生、独活、秦艽各9 g, 地龙、甘草各6 g, 细辛3 g)。所有组方中药(饮片)及方剂均由我院中医科提供。

1.2 补肾通络方活性成分与潜在靶点筛选

检索BATMAN-TCM数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm>); 参数设置为 $P < 0.05$, Score cutoff = 20), 分别以熟地、杜仲、当归、山萸肉、怀牛膝、寄生、独活、秦艽、防风、细辛、地龙、甘草为关键词, 并参照ADME原理, 以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$, 类药性(DL) ≥ 0.18 为标准, 检索并筛选该方的活性成分及潜在靶点, 建立补肾通络方活性成分-靶点基因数据库。

1.3 补肾通络方治疗膝骨性关节炎潜在作用靶点预测

通过CTD数据库(<http://ctdbase.org/>)、人类孟德尔遗传数据库(<https://omim.org/>)、GeneCards数据库(<http://www.genecards.org>, Version 4.11.0)检索膝骨性关节炎相关基因并汇总, 去除重复基因, 并通过CooLGeN数据库(<http://ci.smu.edu.cn/CooLGeN/Home.php>)筛选。将补肾通络方活性成分靶点与膝骨性关节炎基因靶点相互映射, 获得补肾通络方治疗膝骨性关节炎的潜在作用靶点。

1.4 蛋白相互作用(PPI)网络构建与分析

将补肾通络方作用于膝骨性关节炎的靶点基因导入String数据库(<https://string-db.org>, Version 11.0), 限定物种为“Homo Sapiens”, 获取PPI关系并以.TSV格式保存, 导入Cytoscape 3.7.2软件, 利用其“Network analyzer”工具行网络拓扑属性分析, 筛选重要靶点蛋白。

1.5 富集分析

将补肾通络方作用于膝骨性关节炎的靶点基因导入DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), 限定物种为“Homo Sapiens”, $P < 0.05$, 所有靶基因名称矫正为官方名称, 并利用Omicshare云平台(<https://omicshare.com/>)进行基因本体论(GO)功能富集分析(包括生物过程、细胞组分、细胞功能3个方面)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。

2 结果

2.1 补肾通络方活性成分筛选

初步检索得补肾通络方中活性成分738个, 按要求进一步筛选后得到80个, 其中熟地2个、杜仲11个、当归16个、山萸肉2个、怀牛膝3个、寄生5个、独活9个、

秦艽3个、防风4个、细辛6个、地龙3个、甘草16个, 10个化学成分为多种中药共有。

2.2 补肾通络方作用靶点预测

初步检索共得到5 961个膝骨性关节炎的潜在靶点, 删除重复后得到5 524个, 与2.1项下70个靶点映射取交集, 得共有靶点46个, 即为补肾通络方治疗膝骨性关节炎的潜在靶点。维恩图见图1。补肾通络方治疗膝骨性关节炎“药物-活性成分-基因靶点”网络见图2。

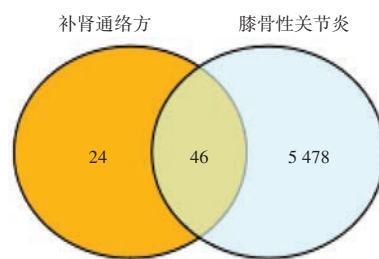


图1 药物-疾病靶点维恩图

Fig. 1 Venn diagram of drug - disease targets

2.3 PPI网络构建与分析

所得PPI网络中共包括79个节点、956条边, 靶点蛋白平均节点度(degree)值为24.2(其中有24个靶蛋白degree值 ≥ 24), 依据临床重要性筛选出的10个重要潜在靶点蛋白及其PPI网络见图3。

2.4 富集分析

共富集到GO条目133个, 其中生物过程96个、细胞组分14个、分子功能23个。选取富集数目排前10的功能进行可视化(见图4)。结果显示, 生物过程主要富集在凋亡过程、细胞增殖与代谢、信号传导、炎症反应等方面, 细胞组分主要富集在胞质溶胶、细胞外泌体基因等方面, 细胞功能主要富集在乙酰胆碱结合、氧化还原酶、过氧化物酶活性、细胞周期蛋白结合等方面。共富集到KEGG信号通路76条, 主要涉及肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、类风湿关节炎、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、破骨细胞分化、低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路等。选择富集数目排名前10的信号通路绘制气泡图进行可视化(见图5)。

3 讨论

膝骨性关节炎可造成关节腔积液、滑膜炎症、骨赘形成、半月板损伤等一系列影响患者日常生活的情况^[6-7]。老年人群随着年龄的增加, 肝肾衰气血少, 风寒外邪更易侵袭机体, 因此易发生该病。该病属中医“膝痹”“骨痹”“痹症”等范畴, 治疗应以活血化瘀、补肾益气为主要原则^[8]。

补肾通络方组方中药中, 杜仲、怀牛膝可通利关节、破血逐瘀、舒筋活络, 有效缓解关节疼痛、跌打损



活血止痛、祛湿除风、温肾壮阳、补肝补肾等作用,可有效改善患者风湿痹痛、肝肾不足等症状,诸药合用,共

同发挥活血养血、强筋健骨、温补肝肾、化瘀止痛的作用^[9-10]。现代药理学研究表明,补肾通络方中多种中药均具有免疫调节、镇痛、抗炎的作用,显示出补肾通络方在治疗膝骨性关节炎中独特的优势^[11]。本研究中共筛选出活性(化合物)成分70个,以及其治疗膝骨性关节炎的潜在靶点46个,表明补肾通络方具有多成分、多靶点的特点。

PPI网络中共有24个靶点蛋白,10个关键蛋白中,TNF、IL-6及IL-10均为膝骨性关节炎发病过程中重要的炎性介质,可参与炎性反应的调节^[12];TLR4对细胞因子分泌、核因子- κ B活化、炎性反应具有介导作用^[13];PTGS2可参与细胞表型改变、细胞黏附增加、肿瘤血管形成、抗凋亡等过程,且可分泌炎性前列腺素;CCL2为与多种疾病发生存在密切联系的分泌蛋白,可参与炎性反应、免疫调节^[14];INS为对脂质代谢、碳水化合物代谢具有调节作用的肽激素;ALB为激素、外源性药物、代谢物、脂肪酸等内源性分子的载体蛋白,对血浆胶体渗透压具有调节作用;JUN可调节基因表达,AKT1可通过转录的方式抑制凋亡,且可参与神经元成活。可见,补肾通络方作用的靶点蛋白涉及免疫、炎症、代谢、细胞成活等多种功能。

GO功能富集分析发现,补肾通络方可调控体内多种信号通路,其生物过程均涉及凋亡过程、细胞增殖与代谢、信号传导、炎性反应等。KEGC信号通路富集分析发现,TNF信号通路、MAPK信号通路、破骨细胞分化、HIF-1信号通路为补肾通络方治疗膝骨性关节炎的潜在作用靶点。其中TNF信号通路可介导炎性反应,加重膝骨性关节炎炎性反应^[15];MAPK信号通路可促进破骨细胞成熟,且可抑制软骨细胞的凋亡^[16-17];HIF-1信号通路可促进软骨细胞形成,且维持其生存能力,可使其适应缺氧环境^[18]。

综上所述,本研究中采用网络药理学方法探讨了补肾通络方治疗膝骨性关节炎的作用机制,从分子水平方面对补肾通络方的多通路、多成分、多靶点调控机制进行了阐述。补肾通络方可能通过调控炎性反应、细胞增殖凋亡发挥疗效,这为该方治疗膝骨性关节炎提供了理论依据。但本研究也有一定的局限性,如数据库数据不全,忽略了药物成分相互作用、中药成分含量、体内其他药物代谢动力学影响等,因此还需进一步研究证实。

参考文献

- [1] 李向阳,刘宝玉. 补肾壮骨汤联合依托考昔治疗老年膝骨性关节炎的疗效及对患者血清骨代谢指标水平的影响分析[J]. 贵州医药,2022,46(4):612-613.
- [2] 胡永召,徐迎锋,阮志华,等. 热敏灸联合温阳散寒、逐瘀通

络汤治疗膝骨性关节炎(阳虚寒凝证)的临床研究[J]. 中医药信息,2022,39(2):54-59.

- [3] 林凤绣,李志敏,赖智君. 独活寄生汤结合雷火灸治疗膝骨性关节炎风寒湿痹型的疗效及其对关节功能和血清MMP-3、骨桥蛋白水平的影响[J]. 临床和实验医学杂志,2022,21(4):395-399.
- [4] 吴刚,张永锋. 温针灸加补肾通络方对绝经后骨质疏松症患者骨代谢及疼痛的影响[J]. 检验医学与临床,2021,18(21):3172-3175.
- [5] 刘建,曹柏龙. 补肾通络方联合毫火针治疗腰椎间盘突出症的临床效果[J]. 中国医药导报,2020,17(31):158-161.
- [6] 陈宇,邓小磊,王有雪. 穴位贴敷联合小针刀治疗膝骨性关节炎疗效及对患者骨代谢炎症因子的影响[J]. 陕西中医,2022,43(3):363-366.
- [7] 杨卫可,贾瑞平,王明晶,等. 抗骨质疏松治疗对膝骨性关节炎患者全膝关节置换术后临床疗效的影响[J]. 新乡医学院学报,2020,37(12):1147-1151.
- [8] 王东伟,王军涛. 五痹汤合桃红四物汤加減联合温针灸治疗膝骨性关节炎的疗效观察[J]. 世界中医药,2021,16(4):653-657.
- [9] 陆辉,高松年. 补肾通络方对绝经后骨质疏松症患者骨密度及骨代谢标志物水平的影响[J]. 临床与病理杂志,2019,39(12):2740-2746.
- [10] 舒碧莹,蔡枫. 补肾通络方治疗肝肾阴虚型类风湿关节炎的临床疗效及其对相关细胞因子含量的影响[J]. 北京中医药,2021,40(2):140-143.
- [11] 白宏江,葛鹏斌,韩龙,等. 补肾通络方治疗肝肾亏虚兼寒湿阻痹型膝骨性关节炎的临床疗效分析[J]. 中国中医骨伤科杂志,2020,28(10):20-24.
- [12] 步开东,范顺武,翁科迪. 关节镜微创手术联合玻璃酸钠治疗对老年膝骨性关节炎患者生活质量及血清IL-6、IL-10的影响[J]. 中国老年学杂志,2019,39(7):1637-1639.
- [13] 毛洪刚,朱艳丽,刘岩,等. 膝骨性关节炎者TLR-4、IL-1 β 的表达变化及临床意义[J]. 中国医药导报,2020,17(3):82-85.
- [14] 潘莉,郭斌,唐徐韵,等. 基于网络药理学探讨牛膝治疗膝骨性关节炎的有效物质与作用机制研究[J]. 中国民族民间医药,2020,29(18):38-45.
- [15] 贺丰,付玲玲,曾杰,等. 基于网络药理学探讨伸膝汤治疗膝骨性关节炎的作用机制[J]. 世界中医药,2021,16(7):1067-1073.
- [16] 王飞,全路,魏红芳,等. 姜黄素通过p38 MAPK/NF- κ B信号通路对膝骨性关节炎的作用机制分析[J]. 临床和实验医学杂志,2021,20(13):1373-1377.
- [17] 樊静袁,袁普卫,郑洁,等. 基于脊髓大麻麻素受体CB2介导的MAPK信号通路探讨电针治疗膝骨性关节炎慢性痛的机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(13):1582-1586.
- [18] 朱凯,梁学振,刘金豹,等. 基于网络药理学探讨四妙散治疗骨性关节炎的作用机制[J]. 世界中医药,2021,16(18):2690-2695.

(收稿日期:2023-04-11;修回日期:2023-08-21)