

黄芪-川芎药对治疗股骨头缺血性坏死的网络药理学分析

李军 刘雨亮 李静 李纯璞 陶宗玉 张文正 张建 魏开斌*

(泰安市中心医院关节运动医学科, 山东 泰安, 271000)

摘要:目的 基于网络药理学研究黄芪-川芎药对治疗股骨头缺血性坏死的分子作用机制。方法 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP数据库)筛选出黄芪-川芎药对的主要活性成分及作用靶点,应用 GeneCards 数据库与维恩图获取黄芪-川芎药对与股骨头缺血性坏死的共同作用靶点,运用 Cytoscape 3.7.1 软件和 STRING 数据库进行中药-疾病-靶点相互作用网络的构建与分析,最后进行基因本体(GO)富集分析和基因相互作用(KEGG)通路分析,通过分析得出结果。结果 黄芪-川芎药对主要通过 22 种活性成分、38 个作用靶点及 35 个生物学通路发挥作用治疗股骨头缺血性坏死。其中主要活性成分为槲皮素、山奈酚和芒柄花素;主要核心靶点为 AKT1;关键通路为 PI3K-Akt 信号通路。结论 通过网络药理学研究揭示黄芪-川芎药对系通过多种成分、多个靶点、多种通路治疗股骨头缺血性坏死,为后续研究开展试验工作提供了思路和理论依据。

关键词:网络药理学;黄芪;川芎;股骨头缺血性坏死;作用机制

中图分类号:R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-8011(2022)-13-0040-04

股骨头缺血性坏死(Avascular necrosis of the femoral head)因其高致残率、早期保髋方法的疗效不理想及其发病机制的复杂性,成为目前临床治疗的难题之一。随着近年来糖皮质激素较广泛的临床应用,导致股骨头缺血性坏死疾病的发病率不断攀升,而早期有效、临床疗效满意的保髋治疗方法亟需探讨。目前该疾病保髋治疗的现状:西药保髋治疗仅能改善症状,难以阻断疾病进展;保髋手术方式创伤大且疗效欠佳;而中医药治疗具有多种组分、多个靶点、多种机制等特点,在保髋治疗方式中具有独特的优势,并取得了良好的临床效果,这使得对有效治疗的具体药物及其作用机制进行下一步探讨研究尤为重要^[1]。

中医学认为股骨头缺血性坏死疾病的发病原因系肾精不足、气血两虚、寒湿痰瘀痹阻所致,导致肌肉筋骨失养、气血滞涩不畅的病机,并将该疾病归于“骨痹”“骨痿”或“骨蚀”等病证范畴。黄芪-川芎药对具有益气健脾补肾,化痰活血通络之功,契合股骨头缺血性坏死的病理机制。有研究表明,非创伤性股骨头坏死通过黄芪生骨汤联合手术治疗可改善其中医证候,有效且安全^[2];股骨头坏死区的骨内压通过使用黄芪复方制剂能得到有效降低。川芎的主要成分为川芎嗪,具有增强股骨头血管化的作用,可有效预防类固醇药物诱导的骨坏死。综上所述,黄芪-川芎药对是治疗股骨头缺

血性坏死疾病的潜在药物,其具体作用机制有待深入研究。

1 资料与方法

1.1 黄芪-川芎药对的活性成分和靶点检索与收集

以“中药名称”为关键词在 TCMSP 系统(<https://tcmsp-e.com/>)^[3]中检索黄芪和川芎的组成成分及药物所含化学成分信息,设定阈值口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18 作为筛选药物关键活性化合物的标准,进一步查找黄芪药物和川芎药物的化学成分相对应的蛋白作用靶点。最后使用 Uniprot 数据库给靶点添加基因缩写,并去除掉重复靶点,进行规范化处理。

1.2 股骨头缺血性坏死疾病靶点的搜索与收集

在 GeneCards 数据库中输入疾病关键词“avascular necrosis of the femoral head”,进行搜索并收集相关靶点。

1.3 中药-疾病共有靶点的获取

采用 Venn 图对药物靶点、疾病靶点一同进行映射,获取黄芪-川芎药对治疗股骨头缺血性坏死疾病潜在的作用靶点。

1.4 构建药物-疾病-靶点网络图

采用 Cytoscape 3.7.1 软件,对药物、活性成分、关键靶基因、疾病及其之间的相互对应关系进行可视化并导出网络图。

1.5 构建蛋白-蛋白相互作用(Protein-Protein interaction, PPI)网络

将潜在作用靶点导入 STRING 在线数据库,将物种设置为人,以“minimum required interaction score>0.700”为条件,分析获取 PPI 关系网络,下载文件并输出图形,利用 cytohubba 插件对核心靶点进行筛选。

1.6 GO 生物功能富集分析和 KEGG 通路分析

基于 Bioconductor 中的 R 包 ClusterProfiler 对核心靶标

基金项目:山东省中医药科技项目(2021M064、2021Z018);山东省老年医学学会科技攻关项目(LKJGG2021W121);泰安市科学技术发展计划项目(2020NS116、2021NS273、2021NS274、2021NS275)。

作者简介:李军(1978.5-),男,汉族,籍贯:山东省泰安市,硕士研究生,主治医师,研究方向:关节疾病、慢性疼痛、运动损伤等。

通讯作者:魏开斌, E-mail: wkb1966@163.com。

进行基因本体 (GO) 富集分析和基因相互作用 (KEGG) 通路分析, 选择 P 和 Q 均小于 0.05 为差异有统计学意义。输出结果同时并绘制出 bubbleplot 气泡图, 分析输出的结果, 探讨黄芪 - 川芎药对的潜在作用机制。

2 结果

2.1 黄芪 - 川芎药对的活性成分及靶点

通过 TCMSP 系统检索后, 筛选出黄芪药物的有效成分 17 个且相对应的作用靶点 179 个, 川芎药物的有效成分 6 个且相对应的作用靶点 29 个。使用 Uniprot 数据库进行汇总, 并删除筛选出的重复数据, 最终检索结果为黄芪 - 川芎药对的活性成分共计 22 个, 如芒柄花素 (formononetin)、槲皮素 (quercetin)、山奈酚 (kaempferol)、异鼠李素 (isorhamnetin)、杨梅酮 (Myricanone)、川芎啉 (Perlolyrine)、谷甾醇 (sitosterol) 1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯 (1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene)、毛蕊异黄酮 (Calycosin)、联苯双酯 (Bifendate) 等; 相对应作用靶点共计 181 个。

2.2 股骨头缺血性坏死疾病靶点

应用 GeneCards 数据库共收集股骨头缺血性坏死疾病的靶点 272 个。

2.3 中药 - 疾病共有靶点

将药物靶点和疾病靶点采用 Venn 图映射方式取交集, 得到黄芪 - 川芎药对治疗股骨头缺血性坏死的潜在作用靶点 38 个, 如 KT1、PTGS2、CCL2、IL1B、MMP9、TP53、CXCL8、IFNG 等, 提示黄芪 - 川芎药对可能通过这些潜在作用靶点发挥其相应的治疗作用。

2.4 成分 - 靶点作用网络图

左边圆形状图标中的 MOL00433、001404、002135、002140、002157 代表川芎药物的有效活性化学成分, 其他圆形状图标代表黄芪药的有效活性化学成分; 右边方块形状图标代表的潜在的作用靶点。图片清楚地显示了不同活性化学成分与不同作用靶点相互作用的一一对应关系, 也充分说明了黄芪 - 川芎药对是通过多种活性成分、多个作用靶点及多种通路起效的, 其中槲皮素 (quercetin)、山奈酚 (kaempferol) 和芒柄花素 (formononetin) 关联靶点较多, 系该药对中最主

要的活性成分。见图 1。

2.5 网络蛋白 - 蛋白相互作用网络

PPI 网络图 (见图 2) 中包含 38 个节点和节点间相互连接的 390 条边, 其中节点代表的是蛋白, 边代表的系蛋白与蛋白间的作用关系, 网络连接程度越高越密集说明蛋白间关系密切度越高。为寻找出其中的核心蛋白, 需再采用 CytoHubba 插件对网络图进行拓扑分析, 从而进一步从网络图中筛选出核心蛋白。在网络中“度值” (degree) 是一种重要的拓扑参数之一, 利用节点度值的高低来确定网络关键节点, 其中网络图中和某个节点相连的所有节点的总数量即表示为某个节点的度值, 该方法常用于评估网络中某种成分或目标的重要性^[4]。因此, 筛选条件按 Degree 进行排列, 其中某个节点的颜色越深且圆形越大, 表明该节点的 RANK 更靠前, 关键性更高。在核心靶点网络图 (见图 3) 中度值最高的靶点是 AKT1 (degree=34), 即可认为其为核心靶点, 黄芪 - 川芎药对主要是通过 AKT1 靶点而发挥其治疗股骨头缺血性坏死疾病的作用。

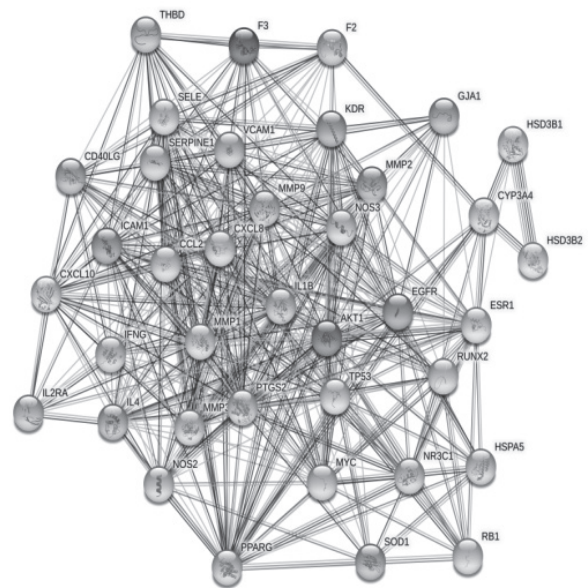


图 2 药对治疗股骨头缺血性坏死的蛋白互作网络图

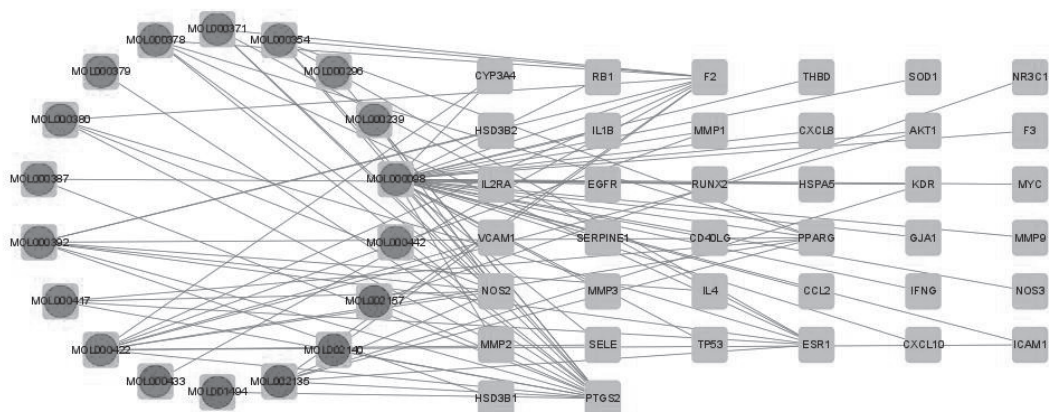


图 1 药对 - 成分 - 靶点网络

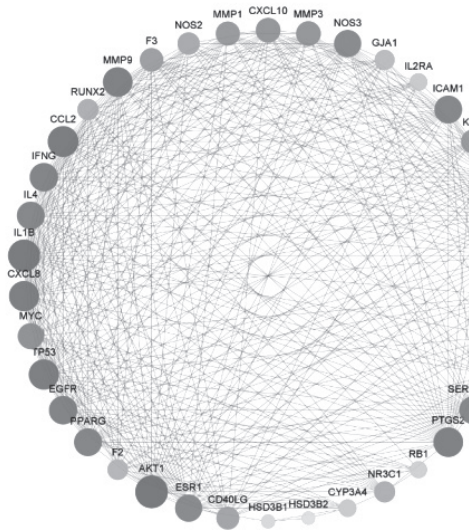


图 3 核心靶点拓扑分析

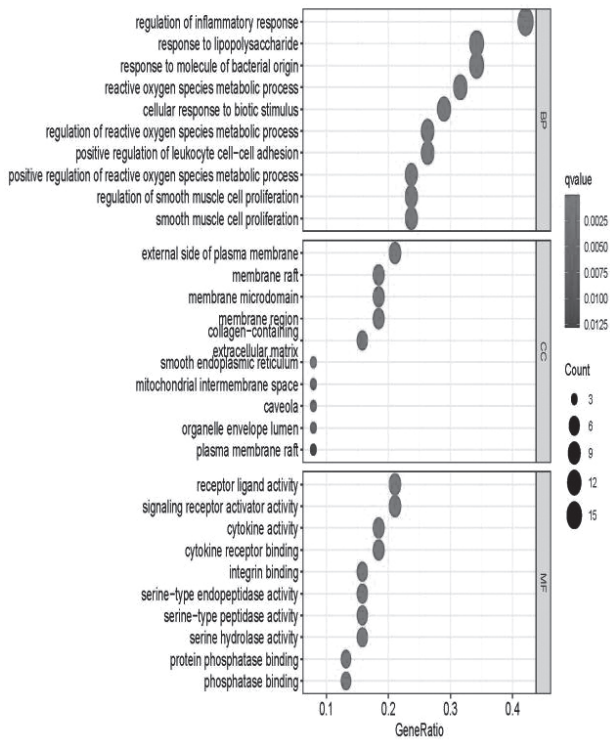


图 4 GO 功能富集图

2.6 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

GO 富集中的交集基因主要参与以下生物过程：炎症反应、脂多糖、活性氧化代谢过程、白细胞细胞间黏附和 T 细胞活化等（见图 4）。KEGG 主要涉及 PI3K-AKT、脂质和动脉粥样硬化、AGE-RAGE、IL-17 和 TNF 信号通路（见图 5）。其中，PI3K-AKT 通路中由于有核心靶点 AKT1 的参与，该通路被认为是黄芪-川芎药对治疗股骨头缺血性坏死的关键通路。

3 讨论

目前认为酒精、激素等诱发的炎症反应、氧化应激等病理改变，造成了股骨头内血管的损伤及成骨的不足，从而导致股骨头缺血性坏死疾病的发生，其典型的病理变化为成骨

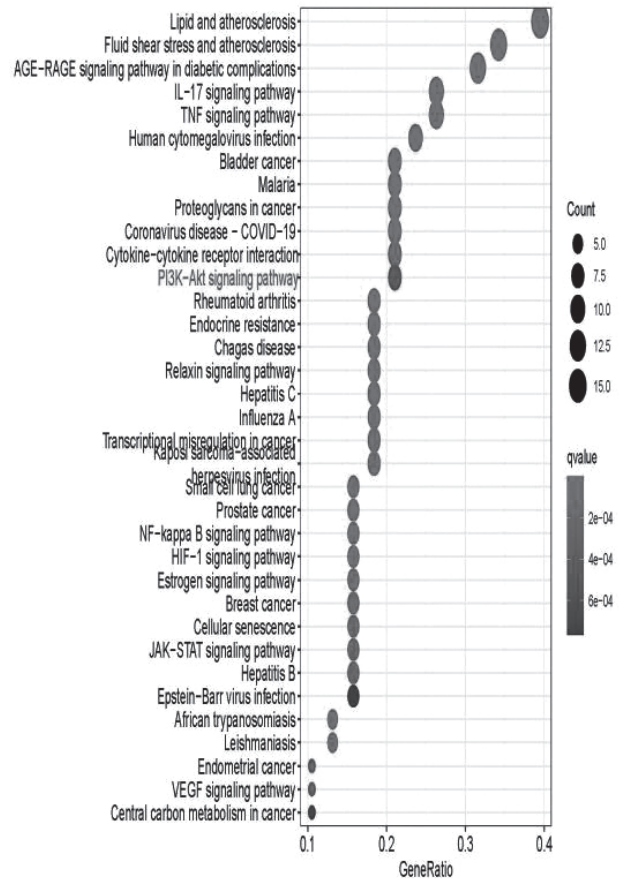


图 5 KEGG 通路富集图

细胞分化的减少、髓内脂肪细胞的增强并沉积及骨循环的受损^[5]，最终导致股骨头塌陷变形，致使患者疼痛、活动受限，严重者患肢致残，日常生活难以自理，最终要靠全髋关节置换解除痛苦，而年轻患者不得不面临再次置换或返修的风险。目前西医保髋治疗该疾病的疗效并不理想，而中药药具有多组分、多靶点、多机制的作用特点，为股骨头坏死的整体治疗方面开拓新思路，通过辨证施治从而取得了较好的疗效，受到了患者及家属的认可。目前研究^[2]黄芪生骨汤联合手术治疗、活血通络汤（含黄芪、丹参、川芎、当归、巴戟天、地龙、怀牛膝、鸡内金）等治疗该疾病取得了良好的疗效。因此，黄芪-川芎药对是治疗股骨头缺血性坏死疾病的潜在药物，开发中医药治疗股骨头缺血性坏死的新方法以及研究其潜在的作用机制具有非常重要意义^[6]。

本研究基于网络药理学方法，建立“药物-靶点-疾病”网络关系，本研究发现黄芪-川芎药对治疗股骨头缺血性坏死疾病主要是通过 22 种活性成分、38 个作用靶点及 35 个生物学通路发挥其治疗作用。其中槲皮素、山奈酚和芒柄花素为主要活性成分；AKT1 为核心靶点；磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)/AKT 信号通路为关键信号通路。槲皮素是天然存在的多酚类化合物，文献报道^[7]槲皮素既能通过增加成骨细胞特异性基因的表达而激活成骨细胞的生成作用；又能对破骨细胞的形成、增殖和成熟起抑制作用。其他药理研究表明槲皮素还

具有抗炎、抗氧化剂和免疫调节功能,能减轻免疫细胞炎症因子的分泌,其作用机制与抑制核因子- κ B、蛋白激酶 B 的磷酸化有关;槲皮素对疼痛类疾病的缓解具有良好药理作用,并且该药物的不良反应小,故其药用前景较好^[8]。山奈酚在多项体外研究中表明其具有引起破骨细胞因子的下调而发挥抗破骨细胞活性的作用^[9];同时抑制骨髓脂肪细胞的形成;并能刺激前成骨细胞分化和矿化,促进成骨细胞增殖,其机制是通过细胞外调节激酶和雌激素受体途径来提高成骨细胞内 ALP 活性而实现。

芒柄花素作为异黄酮类单体,首先在鸡血藤被发现,研究表明其可通过激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶途径刺激骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,促进成骨细胞的再生,增加骨量而修复骨皮质缺损,已被前期的研究证明^[10];也有近期研究表明芒柄花素对与骨细胞骨吸收相关的功能基因(如 CTSK、TRAP、MMP9、Car 2 等)的表达起到显著的抑制作用,因此被认为其同时具有调控成骨细胞和破骨细胞活性功能,在治疗股骨头坏死导致骨结构破坏和骨塌陷方面具有独特的优势药物之一。PI3K/Akt 信号通路在细胞的存活、增殖、生长和分化过程中发挥重要作用,也是骨质恢复再生的重要信号通路,通过调节成骨细胞与破骨细胞的增殖分化而促进骨重塑的过程。磷酸酶和紧张素同源物通过 PI3K/AKT/VEGF 通路调节人胰腺癌细胞的血管生成。外泌体依靠激活 PI3K/AKT 信号通路促进骨再生。人参皂苷可通过 PI3K/AKT 通路保护过氧化氢诱导的大鼠骨髓干细胞凋亡。LV 等^[11]证明骨碎补总黄酮可以通过 PI3K/AKT 通路改善类固醇诱导的股骨头缺血性坏死。Zhan 等^[12]发现大蒜素可以通过激活 PI3K/AKT 通路来抑制成骨细胞凋亡和类固醇诱导的股骨头坏死。PI3K-Akt 信号通路不仅能增强成骨细胞增殖的活性,而且可促进成骨细胞的分化增殖,其作用机制系通过糖原合成激酶 3 β 来实现 Wnt/ β -catenin 的调控^[13]。此外,该信号通路亦能通过成骨细胞释放两种关键的因子:巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL),从而触发破骨细胞分化。随着 RANKL 同受体结合后,其下游的信号(NF- κ B、JNK、p38MAPK)就会被相继激活,诱导破骨细胞的分化。c-fos、活化 T 细胞核因子 1 等也调控其下游信号激酶(NF- κ B、p38MAPK)的表达,影响破骨细胞的分化。故黄芪-川芎药对能通过调控 PI3K-Akt 信号通路,调控股骨头的骨质代谢,促使股骨头坏死区骨质的代谢及新骨的再生。

综上所述,本文结果研究发现黄芪-川芎药对中的槲皮素、山奈酚和芒柄花素等活性成分作用于主要的分子靶点 AKT1,涉及并参与炎症反应、脂多糖、活性氧代谢过程、白细胞细胞间黏附和 T 细胞活化等多个生物过程,并通过 PI3K/AKT 信号通路,增加成骨细胞特异性基因的表达,激活成骨细

胞的生成作用;同时又对破骨细胞的形成、增殖和成熟起抑制作用,具有调控成骨细胞和破骨细胞活性的双层功能,发挥其对股骨头缺血性坏死疾病导致骨结构破坏和骨塌陷等方面的独特优势。相信随着科学技术日新月异的发展、系统生物学及网络药理学研究的不断深入与完善,中医药基础理论将会获得更充足的科学论证。目前虽然股骨头缺血性坏死疾病的发病原因、病理变化机制仍未完全明确,但本研究在分子机制上对黄芪-川芎药对在防治该疾病相关的相关机制进行相关的探讨,研究证实该药对在治疗股骨头坏死方面具有较好的理论价值,以期后续具体实验提供思路和理论依据。

参考文献

- [1]于潼,谢利民,张振南.成人非创伤性股骨头坏死中医证候与中医体质关系研究[J].中华中医药杂志,2016,31(1):339-341.
- [2]平春峰.手术配合黄芪生骨汤治疗非创伤性股骨头坏死临床观察[J].实用中医药杂志,2021,37(3):427-429.
- [3]解晶,李丰,石彬彬,等.系统药理学:TCMSP 解析中医基础理论研究进展[J].世界中医药,2019,14(10):2627-2635.
- [4]Ge Q,Chen L,Tang M,et al.Analysis of mulberry leaf components in the treatment of diabetes using network pharmacology[J].Eur J Pharmacol, 2018,833:50-62.
- [5]Xu HH,Li SM,Fang L,et al.Platelet-rich plasma promotes bone formation,restrains adipogenesis and accelerates vascularization to relieve steroids-induced osteonecrosis of the femoral head[J].Platelets,2020, 24:1-10.
- [6]Wang L,Zhang L,Pan H,et al.Abnormal subchondral bone microstructure following steroid administration is involved in the early pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis[J].Osteoporos Int.,2016,27(1):153-9.
- [7]Guo C,Yang R,J,Jang K,et al.Protective Effects of Pretreatment with Quercetin Against Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis and the Inhibition of Osteoblast Differentiation via the MAPK and Wnt/ β -Catenin Pathways in MC3T3-E1 Cells[J].Cell.Physiol.Biochem.,2017, 43:1547-1561.
- [8]李聪,胡强,张燕翔,等.槲皮素的药理学活性研究进展[J].湖北中医杂志,2018,40(6):63-66.
- [9]Adhikary S,Choudhary D,Ahmad N,et al.Dietary flavonoid kaempferol inhibits glucocorticoid-induced bone loss by promoting osteoblast survival[J].Nutrition,2018,53:64-76.
- [10]Kong X,Wang F,Niu Y,et al.A comparative study on the effect of promoting the osteogenic function of osteoblasts using isoflavones from Radix Astragalus[J].Phytother Res,2018,32(1):115-124.
- [11]Lv W,Yu M,Yang Q,et al.Total flavonoids of Rhizoma drynariae ameliorate steroid-induced avascular necrosis of the femoral head via the PI3K/AKT pathway[J].Mol Med Rep.,2021,23(5):345.
- [12]Zhan J,Yan Z,Zhao M,et al.Allicin inhibits osteoblast apoptosis and steroid-induced necrosis of femoral head progression by activating the PI3K/AKT pathway[J].Food Funct.,2020,11(9):7830-7841.
- [13]宋世雷,陈跃平,章晓云.PI3K-AKT 信号通路调控股骨头坏死的相关机制[J].中国组织工程研究,2020,24(3):408-415.