

# 补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎作用机制的网络药理学研究

王伟伟<sup>1</sup>, 欧志学<sup>2</sup>, 章晓云<sup>1</sup>, 李统<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011;

2. 桂林市中医医院, 广西 桂林 541002)

**摘要** 目的: 采用网络药理学方法探讨补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的作用机制。方法: 使用中药系统药理学数据库与分析平台、中药分子机制的生物信息学分析工具, 检索和筛选补肾壮筋汤的活性成分, 然后借助 PubChem 和 Swiss TargetPrediction 数据库检索和筛选活性成分对应的靶点, 预测补肾壮筋汤的作用靶点。在 GeneCard 数据库中检索 KOA 的靶点。将检索到的 KOA 靶点和补肾壮筋汤靶点取交集, 获取补肾壮筋汤治疗 KOA 的作用靶点。通过 String 数据库和 Cytoscape3.7.2 软件分析补肾壮筋汤治疗 KOA 的作用靶点, 构建补肾壮筋汤治疗 KOA 靶点蛋白互作网络, 筛选补肾壮筋汤治疗 KOA 的关键靶点。筛选与补肾壮筋汤治疗 KOA 的作用靶点有关的活性成分, 并将其与补肾壮筋汤治疗 KOA 的作用靶点、补肾壮筋汤组成中药一同输入 Cytoscape3.7.2 软件, 构建补肾壮筋汤治疗 KOA“中药-活性成分-靶点”网络, 分析补肾壮筋汤治疗 KOA 的主要活性成分。利用 DAVID 数据库和 R3.6.2 软件进行补肾壮筋汤治疗 KOA 靶点基因 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。运用 Autodock vina 软件将补肾壮筋汤治疗 KOA 的主要活性成分与关键靶点进行分子对接, 对其结合能进行评估, 并通过 Pymol 软件将结果可视化。结果: 共筛选到补肾壮筋汤的活性成分 99 个、预测到对应的靶点 768 个, 通过与检索到的 989 个 KOA 靶点取交集, 共获得补肾壮筋汤治疗 KOA 的靶点 172 个。通过分析共获得 15 个补肾壮筋汤治疗 KOA 的关键靶点[促分裂原活化的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)1、Akt 激酶(akt kinase, AKT)1、淀粉样前体蛋白/Harvey 大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物、MAPK8、白细胞介素(interleukin, IL)-6、激肽原 1、血管内皮生长因子 A、热激蛋白 90AA1、JUN 原癌基因、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、MAPK14、IL-2、表皮生长因子受体、凝血因子 II], 5 个补肾壮筋汤治疗 KOA 的主要活性成分(汉黄芩素、啤酒甾醇、槲皮素、黄芩素、山奈酚)。GO 富集分析结果显示, 补肾壮筋汤治疗 KOA 主要涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录的调控、凋亡过程的负调控、信号传导、调控细胞增殖、转录等生物过程, 蛋白质结合、ATP 结合、锌离子结合、相同蛋白质结合、酶结合等分子功能, 以及细胞内质膜、细胞质、细胞核、胞质溶胶、核质等细胞组分; KEGG 富集分析共筛选出磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-AKT、MAPK、TNF 等 3 条主要信号通路。分子对接结果显示, 5 个主要活性成分与 15 个关键靶点均有良好的结合能力, 结合能均  $\leq -5.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; 分子对接图显示, 活性成分大多嵌入靶点活性口袋的疏水区, 结合模式多以  $\pi-\pi$  作用和氢键为主, 提示其具有较好的结合活性, 结合后构象稳定。结论: 补肾壮筋汤治疗 KOA 的作用机制可能是通过汉黄芩素、啤酒甾醇、槲皮素、黄芩素、山奈酚等活性成分, 参与调控 RNA 聚合酶 II 启动子转录、凋亡过程、信号传导、细胞增殖、转录, 影响 PI3K-AKT、MAPK、TNF 等信号通路。

**关键词** 骨关节炎; 膝; 补肾壮筋汤; 网络药理学; 药物作用机制

## Mechanism of Bushen Zhuangjin Tang (补肾壮筋汤) in treatment of knee osteoarthritis: a network pharmacology-based study

WANG Weiwei<sup>1</sup>, OU Zhixue<sup>2</sup>, ZHANG Xiaoyun<sup>1</sup>, LI Tong<sup>1</sup>

1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi, China

2. Guilin Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guilin 541002, Guangxi, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the mechanism of Bushen Zhuangjin Tang (补肾壮筋汤, BSZJT) in treatment of knee osteoarthritis (KOA) by using network pharmacological approach. **Methods:** The active ingredients of BSZJT were screened via retrieving traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) using the bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine (BATMAN-TCM), and their corresponding targets were screened out from PubChem database and

基金项目: 广西中医药适宜技术开发与推广项目 (GZSY21-78)

通讯作者: 欧志学 E-mail: ouzhixue1028@126.com

Swiss TargetPrediction database for predicting the action targets of BSZJT. The action targets of BSZJT against KOA were obtained through overlapping the targets of BSZJT with KOA that retrieved from the GeneCard database, and they were analyzed by using String database, furthermore, the target protein – protein interaction (PPI) network of BSZJT against KOA was built by using Cytoscape3. 7. 2 software for screening the key targets of BSZJT against KOA. The active ingredients related to the action targets of BSZJT against KOA were screened out and were input into the Cytoscape3. 7. 2 software together with the action targets of BSZJT against KOA and the Chinese materia medica (CMM) in BSZJT, and the herb – active ingredient – target network of BSZJT against KOA was constructed for analysing the main active ingredients of BSZJT against KOA. The Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed on the target genes of BSZJT against KOA by using DAVID database and R3. 6. 2 software to dig biological functions and pathways of the target genes. Moreover, the molecular docking was conducted between the main active ingredients of BSZJT against KOA and its key targets by using Autodock vina software, and their binding energy was evaluated with the results visualized by Pymol software.

**Results:** Ninety – nine active ingredients of BSZJT were screened out, and 768 corresponding targets were predicted, meanwhile, 172 targets of BSZJT against KOA were obtained through overlapping the 989 KOA targets with the 768 predicted BSZJT targets. As revealed by the analysis, 15 key targets (mitogen activated protein kinase (MAPK) 1, akt kinase (AKT) 1, amyloid precursor protein (APP), harvey rat sarcoma virus oncogene homolog (HRAS), MAPK8, interleukin (IL) – 6, kininogen 1 (KNG1), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), heat shock protein 90AA1 (HSP90AA1), JUN proto – oncogene (JUN), tumor necrosis factor (TNF), MAPK14, IL – 2, epidermal growth factor receptor (EGFR) and blood coagulation factor II (F2)) and 5 main active ingredients (wogonin, cerevisterol, quercetin, baicalein and kaempferol) of BSZJT against KOA were obtained. The results of GO function enrichment analysis indicated that the target genes of BSZJT against KOA mainly participated in such biological processes (BPs) as regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, negative regulation of apoptotic process, signal transduction, regulation of cell proliferation and transcription, the molecular functions (MFs) as protein binding, ATP binding, zinc ion binding, identical protein binding, enzyme binding, and the cellular components (CCs) as intracellular plasma membrane, cytoplasm, nucleus, cytosol, nucleoplasm. The results of KEGG pathway enrichment analysis showed that the target genes of BSZJT against KOA mainly acted on 3 major signaling pathways, such as signaling pathways of phosphatidylinositol 3 – kinase (PI3K) – AKT, MAPK and TNF. The results of molecular docking showed that the 5 main active ingredients had good binding ability to the 15 key targets with the binding energy  $\leq -5.0$  kJ/mol. The molecular docking diagram illustrated that the active ingredients were mostly embedded in the hydrophobic region of the active pocket in targets with the binding modes mainly as  $\pi - \pi$  interaction and hydrogen bonds, which suggested they had good binding activity and the conformation was stabilized after binding. **Conclusion:** The mechanism of BSZJT against KOA may be that it participate in the BPs including regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, apoptotic process, signal transduction, cell proliferation and transcription to affect the signaling pathways of PI3K – AKT, MAPK and TNF through the active ingredients of wogonin, cerevisterol, quercetin, baicalein and kaempferol.

**Keywords** osteoarthritis, knee; Bushen Zhuangjin Tang; network pharmacology; mechanism of drug action

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种常见的关节退行性疾病<sup>[1]</sup>, 寻求安全有效的治疗方案具有重要意义。中医药治疗 KOA 具有较好的临床疗效, 而且不良反应较少。补肾壮筋汤出自《伤科补要》, 是临床治疗 KOA 肝肾亏虚证的常用方剂。但由于该方成分较为复杂, 具体的作用机制尚未完全明确。为此, 本研究采用网络药理学方法探讨了补肾壮筋汤治疗 KOA 的作用机制, 现总结报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 补肾壮筋汤活性成分筛选及靶点预测** 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) 检索并筛选补肾壮筋汤组成药物

“熟地黄”“青皮”“白芍”“茯苓”“山茱萸”“续断”“杜仲”“当归”“牛膝”的活性成分 (筛选条件: 口服生物利用度  $\geq 30\%$ 、类药性  $\geq 0.18$ ); 在中药分子机制的生物信息学分析工具 (bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine, BATMAN – TCM) 中检索补肾壮筋汤组成药物“五加皮”的活性成分, 并按照 Lipinski 类药五原则进行筛选, 即分子量  $< 500$ 、氢键供体数  $< 5$ 、氢键受体数  $< 10$ 、脂水分配系数  $< 5$ 、旋转键  $< 10$ <sup>[2]</sup>。在 PubChem 中检索补肾壮筋汤活性成分的结构式, 将结果导入 Swiss TargetPrediction 数据库检索活性成分对应的靶点, 按照 Probability  $\geq 0.7$  进行筛选, 汇总筛选结果并去除重复项。

**1.2 补肾壮筋汤治疗 KOA 靶点预测** 以“knee osteoarthritis”为关键词,在 GeneCard 数据库中检索 KOA 的靶点。将检索结果和筛选出的补肾壮筋汤靶点导入 Bioinformatics & Evolutionary Genomics 网站,将二者取交集,预测补肾壮筋汤治疗 KOA 的靶点。

**1.3 补肾壮筋汤治疗 KOA 关键靶点筛选** 将筛选出的补肾壮筋汤治疗 KOA 的靶点基因导入 String 数据库,分析各靶点蛋白之间的相互作用情况,设置置信度 > 0.9,隐藏游离蛋白。将 String 数据库的分析结果导入 Cytoscape3.7.2 软件,构建补肾壮筋汤治疗 KOA 靶点蛋白互作网络,并利用该软件 Network Analyzer 工具中的 MCODE 插件筛选关键蛋白模块,设置度值 = 2、节点得分 = 0.2、最大深度 = 100。

**1.4 补肾壮筋汤治疗 KOA 主要活性成分筛选** 先筛选出与补肾壮筋汤治疗 KOA 的作用靶点有关的活性成分,再将其与补肾壮筋汤治疗 KOA 的作用靶点、补肾壮筋汤组成中药一同输入 Cytoscape3.7.2 软件,构建补肾壮筋汤治疗 KOA“中药-活性成分-靶点”网络,分析补肾壮筋汤治疗 KOA 的主要活性成分。

**1.5 补肾壮筋汤治疗 KOA 靶点基因功能及信号通路分析** 将 1.3 中 String 数据库的靶点分析结果导入 DAVID 数据库,进行补肾壮筋汤治疗 KOA 靶点基因 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。利用 R3.6.2 软件将富集分析结果可视化。

**1.6 补肾壮筋汤治疗 KOA 主要活性成分与关键靶点分子对接** 取 1.3 和 1.4 筛选出的关键靶点和主要活性成分,运用 Autodock vina1.1.2 软件进行分子对接。通过 PDB 数据库搜索关键靶点的 3D 结构,并使用 Pymol1.7.2.1 软件对其进行预处理,即使用盒子对蛋白进行定位,并对蛋白结构进行残基修补、去除水分子、添加氢原子和电荷,以 PDBQT 格式保存。通过 PubChem 数据库下载主要活性成分的结构,并基于 MMFF94 力场对其进行优化。以原配体所在位点作为关键靶点的活性口袋,进行主要活性成分和关键靶点的分子对接。选取结合能较好的分子对接结果,通过 Protein-Ligand Interaction 网站和 Pymol1.7.2.1 软件进行可视化。

## 2 结果

**2.1 补肾壮筋汤活性成分筛选及靶点预测结果** 在 TCMSMP 和 BATMAN-TCM 共筛选到补肾壮筋汤的活性成分 99 个,预测到对应的靶点 768 个(表 1)。

表 1 补肾壮筋汤的活性成分及靶点数量

序号	中药	活性成分/个	靶点/个
1	熟地黄	2	51
2	山茱萸	20	177
3	青皮	5	62
4	白芍	13	154
5	续断	8	113
6	杜仲	28	206
7	当归	2	31
8	茯苓	15	143
9	牛膝	20	191
10	五加皮	1	8

**2.2 补肾壮筋汤治疗 KOA 靶点预测结果** 共筛选到 KOA 的靶点 989 个,将其与 768 个补肾壮筋汤靶点取交集后得到 172 个共同靶点,即补肾壮筋汤治疗 KOA 的靶点。

**2.3 补肾壮筋汤治疗 KOA 关键靶点筛选结果** 将 172 个靶点基因导入 String 数据库分析后得到 148 个节点(即 148 个靶点基因)、490 对蛋白互作关系,构建的补肾壮筋汤治疗 KOA 靶点蛋白互作网络见图 1。通过 MCODE 插件筛选到 1 个包含 15 个靶点的关键蛋白模块(图 2),这些靶点即为补肾壮筋汤治疗 KOA 的关键靶点,分别为促分裂原活化的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)1、Akt 激酶(akt kinase, AKT)1、淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)、Harvey 大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物(harvey rat sarcoma virus oncogene homolog, HRAS)、MAPK8、白细胞介素(interleukin, IL)-6、激肽原 1(kininogen 1, KNG1)、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、热激蛋白 90AA1(heat shock protein 90AA1, HSP90AA1)、JUN 原癌基因(JUN proto-oncogene, JUN)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、MAPK14、IL-2、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、凝血因子 II(blood coagulation factor II, F2)。

**2.4 补肾壮筋汤治疗 KOA 主要活性成分筛选结果** 补肾壮筋汤 99 个活性成分中与补肾壮筋汤治疗 KOA 的靶点有关的活性成分共 64 个(表 2)。构建的补肾壮筋汤治疗 KOA“中药-活性成分-靶点”网络(图 3)显示,度值前 5 位的活性成分,即补肾壮筋汤治疗 KOA 的主要活性成分分别为汉黄芩素(wogonin)、啤酒甾醇(cerevisterol)、槲皮素(quercetin)、黄芩素(baicalin)、山奈酚(kaempferol)。

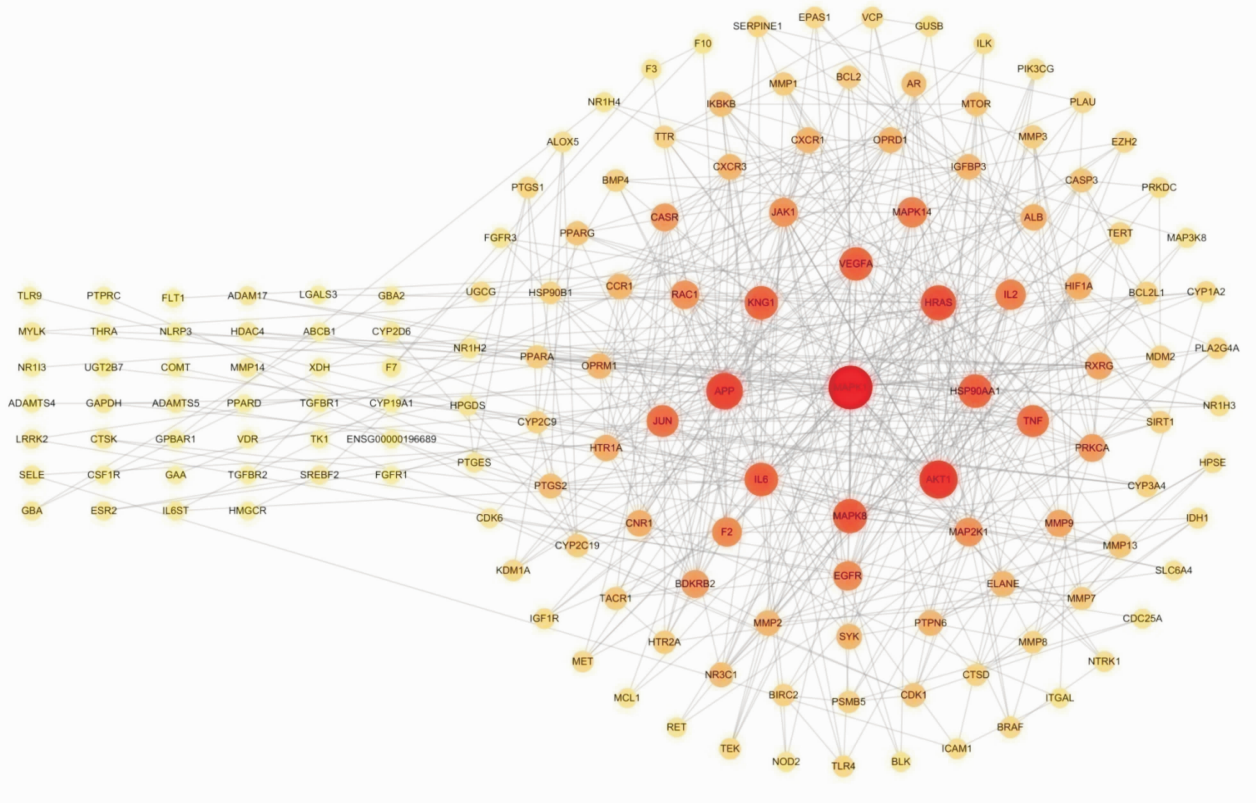


图 1 补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎的靶点蛋白互作网络

注:图中圆点代表靶点;圆点越大、颜色越深,代表该节点与其他节点联系越密切。

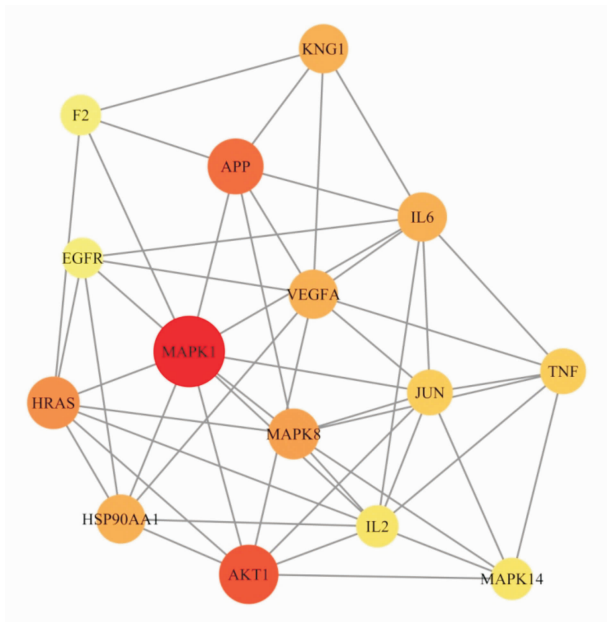


图 2 补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎的靶点蛋白互作网络关键蛋白模块图

注:图中圆点代表靶点;圆点越大、颜色越深,代表该节点与其他节点联系越密切。

## 2.5 补肾壮筋汤治疗 KOA 靶点基因功能及信号通路分析结果

将 String 数据库分析后得到的 148 个靶

点上传至 DAVID 数据库。GO 富集分析(图 4)共得到 684 个条目,其中细胞组分 64 个、生物过程 516 个、分子功能 104 个,生物过程主要涉及 RNA 聚合酶 II 启动子转录的调控、凋亡过程的负调控、信号传导、调控细胞增殖、转录等,分子功能主要涉及蛋白质结合、ATP 结合、锌离子结合、相同蛋白质结合、酶结合等,细胞组分主要涉及细胞内质膜、细胞质、细胞核、胞质溶胶、核质等。KEGG 富集分析(图 5)共得到 111 条通路,排除与 KOA 联系不够密切的通路,共筛选出磷脂酰肌醇 3 - 激酶 (phosphatidylinositol 3 - kinase, PI3K) - AKT、MAPK、TNF 等 3 条主要信号通路。

## 2.6 补肾壮筋汤治疗 KOA 主要活性成分与关键靶点分子对接结果

分子对接结果显示,5 个主要活性成分与 15 个关键靶点均有良好的结合能力,结合能均  $\leq -5.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (表 3)。取每个主要活性成分与关键靶点结合能最好的组合进行可视化,分子对接图显示活性成分大多嵌入靶点活性口袋的疏水区,结合模式多以  $\pi - \pi$  作用和氢键为主,提示其具有较好的结合活性,结合后构象稳定(图 6)。

表 2 补肾壮筋汤的部分活性成分

序号	分子 ID	分子名称	简称	来源	口服生物利用度/%	类药性指数
1	MOL001494	mandenol	SZY1	山茱萸	42.00	0.19
2	MOL001495	ethyl linolenate	SZY2	山茱萸	46.10	0.20
3	MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	SZY3	山茱萸	36.90	0.75
4	MOL002879	diop	SZY4	山茱萸	43.60	0.39
5	MOL002883	ethyl oleate( NF)	SZY5	山茱萸	32.40	0.19
6	MOL003137	leucanthoside	SZY6	山茱萸	32.10	0.78
7	MOL005481	2,6,10,14,18-pentamethylicosa-2,6,10,14,18-pentaene	SZY7	山茱萸	33.40	0.24
8	MOL005503	cornudentanone	SZY8	山茱萸	39.70	0.33
9	MOL005530	hydroxygenkwanin	SZY9	山茱萸	36.50	0.27
10	MOL008457	tetrahydroalstonine	SZY10	山茱萸	32.40	0.81
11	MOL001798	neohesperidin_qt	QP1	青皮	71.17	0.27
12	MOL001803	sinensetin	QP2	青皮	50.56	0.45
13	MOL004328	naringenin	QP3	青皮	59.29	0.21
14	MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one	QP4	青皮	47.74	0.27
15	MOL005828	nobiletin	QP5	青皮	61.67	0.52
16	MOL001919	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta <sup>[a]</sup> phenanthrene-15,16-dione	BS1	白芍	43.56	0.53
17	MOL001924	paeoniflorin	BS2	白芍	53.87	0.79
18	MOL003152	gentisin	XD1	续断	64.06	0.21
19	MOL008188	japonine	XD2	续断	44.11	0.25
20	MOL009322	sylvestrosideIII	XD3	续断	48.02	0.53
21	MOL000443	erythraline	DZ1	杜仲	49.18	0.55
22	MOL005922	acanthoside B	DZ2	杜仲	43.35	0.77
23	MOL006709	aids214634	DZ3	杜仲	92.43	0.55
24	MOL007563	yangambin	DZ4	杜仲	57.53	0.81
25	MOL009007	eucommin A	DZ5	杜仲	30.51	0.85
26	MOL009009	(+)-medioresinol	DZ6	杜仲	87.19	0.62
27	MOL009015	(-)-tabernemontanine	DZ7	杜仲	58.67	0.61
28	MOL009027	cyclopamine	DZ8	杜仲	55.42	0.82
29	MOL009030	dehydrodieugenol	DZ9	杜仲	30.10	0.24
30	MOL009031	cinchonon-9-al,6'-methoxy-, (9R)	DZ10	杜仲	68.22	0.40
31	MOL009038	GBGB	DZ11	杜仲	45.58	0.83
32	MOL009047	(+)-eudesmin	DZ12	杜仲	33.29	0.62
33	MOL011604	syringetin	DZ13	杜仲	36.82	0.37
34	MOL000275	trametenolic acid	FL1	茯苓	38.71	0.80
35	MOL000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	FL2	茯苓	35.11	0.81
36	MOL000279	cervisterol	FL3	茯苓	37.96	0.77
37	MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	FL4	茯苓	43.51	0.72
38	MOL000283	ergosterol peroxide	FL5	茯苓	40.36	0.81
39	MOL000289	pachymic acid	FL6	茯苓	33.63	0.81
40	MOL000290	poricoic acid A	FL7	茯苓	30.61	0.76
41	MOL000291	poricoic acid B	FL8	茯苓	30.52	0.75
42	MOL000292	poricoic acid C	FL9	茯苓	38.15	0.75
43	MOL000296	hederagenin	FL10	茯苓	36.91	0.75
44	MOL000300	dehydroeburicoic acid	FL11	茯苓	44.17	0.83
45	MOL001006	poriferasta-7,22E-dien-3beta-ol	NX1	牛膝	42.98	0.76
46	MOL012537	spinose A	NX2	牛膝	41.75	0.40
47	MOL012542	$\beta$ -ecdysterone	NX3	牛膝	44.23	0.82
48	MOL001454	berberine	NX4	牛膝	36.86	0.78
49	MOL001458	coptisine	NX5	牛膝	30.67	0.86
50	MOL000173	wogonin	NX6	牛膝	30.68	0.23



续表 2

序号	分子 ID	分子名称	简称	来源	口服生物利用度/%	类药性指数
51	MOL002643	delta 7-stigmasterol	NX7	牛膝	37.42	0.75
52	MOL002714	baicalein	NX8	牛膝	33.52	0.21
53	MOL002776	baicalin	NX9	牛膝	40.12	0.75
54	MOL002897	epiberberine	NX10	牛膝	43.09	0.78
55	MOL003847	inophyllum E	NX11	牛膝	38.81	0.85
56	MOL004355	spinasterol	NX12	牛膝	42.98	0.76
57	MOL000785	palmatine	NX13	牛膝	64.60	0.65
58	CID4133	methyl salicylate	WJP1	五加皮		
59	MOL000211	mairin	A1	白芍、杜仲	55.38	0.78
60	MOL000098	quercetin	A2	杜仲、牛膝	46.43	0.28
61	MOL000422	kaempferol	B	白芍、杜仲、牛膝	41.88	0.24
62	MOL000359	sitosterol	C1	熟地黄、山茱萸、白芍、续断	36.90	0.75
63	MOL000449	Stigmasterol	C2	熟地黄、山茱萸、当归、牛膝	43.80	0.76
64	MOL000358	beta-sitosterol	D	山茱萸、白芍、续断、杜仲、当归、牛膝	36.90	0.75

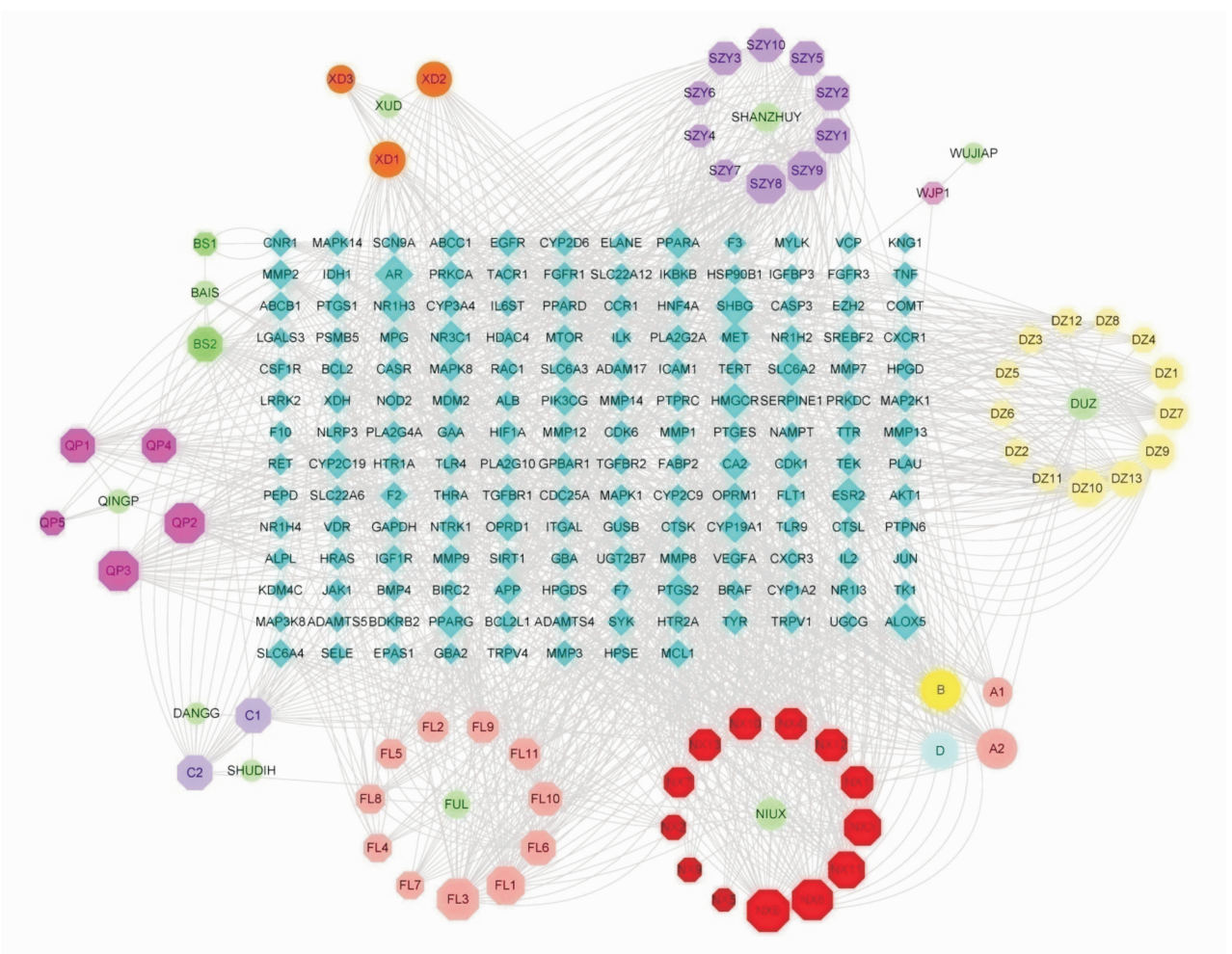


图 3 补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎“中药-活性成分-靶点”网络图

注:图中蓝色菱形为补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎的靶点,绿色圆形为中药,六边形为中药对应的活性成分;WUJIAP 代表五加皮,SHANZHUY 代表山茱萸,XUD 代表续断,DUZ 代表杜仲,NIUX 代表牛膝,FUL 代表茯苓,SHUDIH 代表熟地黄,DANGG 代表当归,QINGP 代表青皮;图中活性成分名称以简称表示,对应英文名称见表 2。

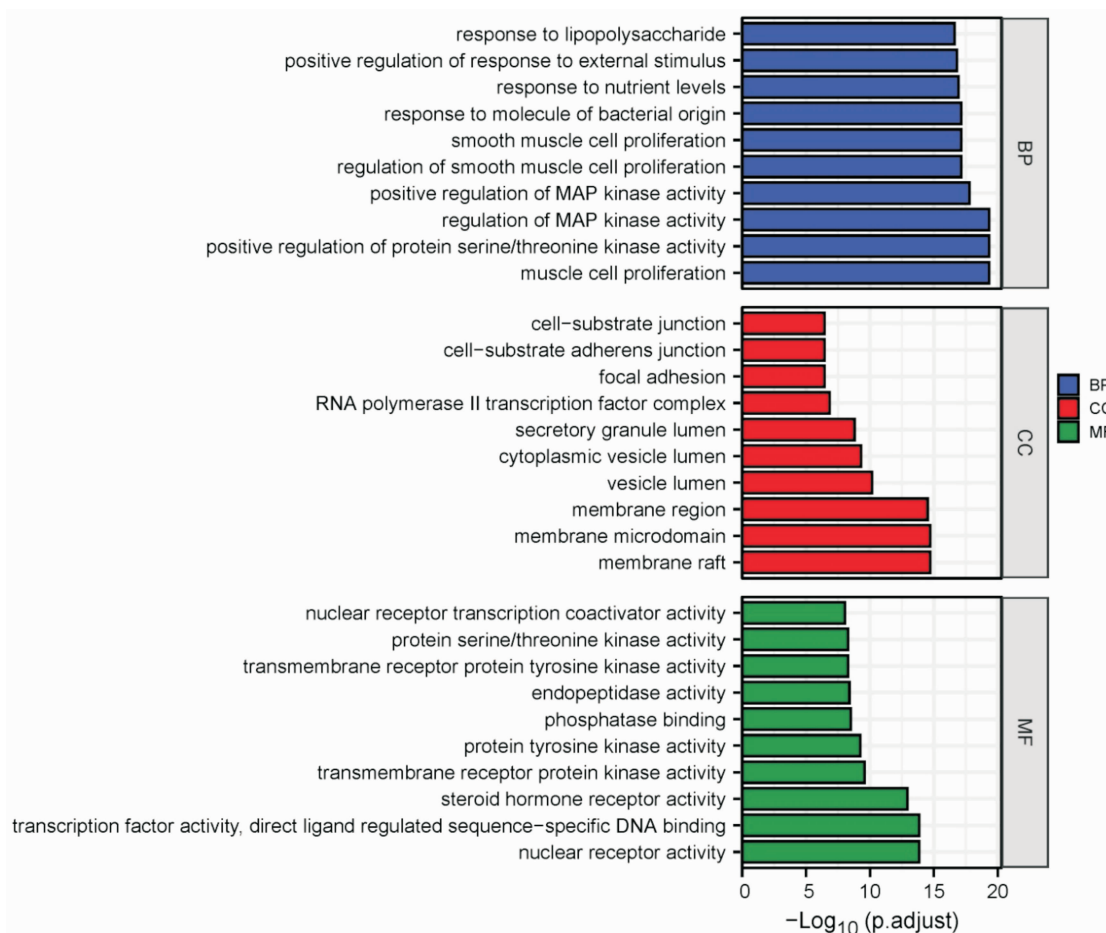


图 4 补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎靶点基因 GO 富集分析柱状图(前 10 位)

注:BP、MF、CC 分别为生物过程、分子功能、细胞组分。

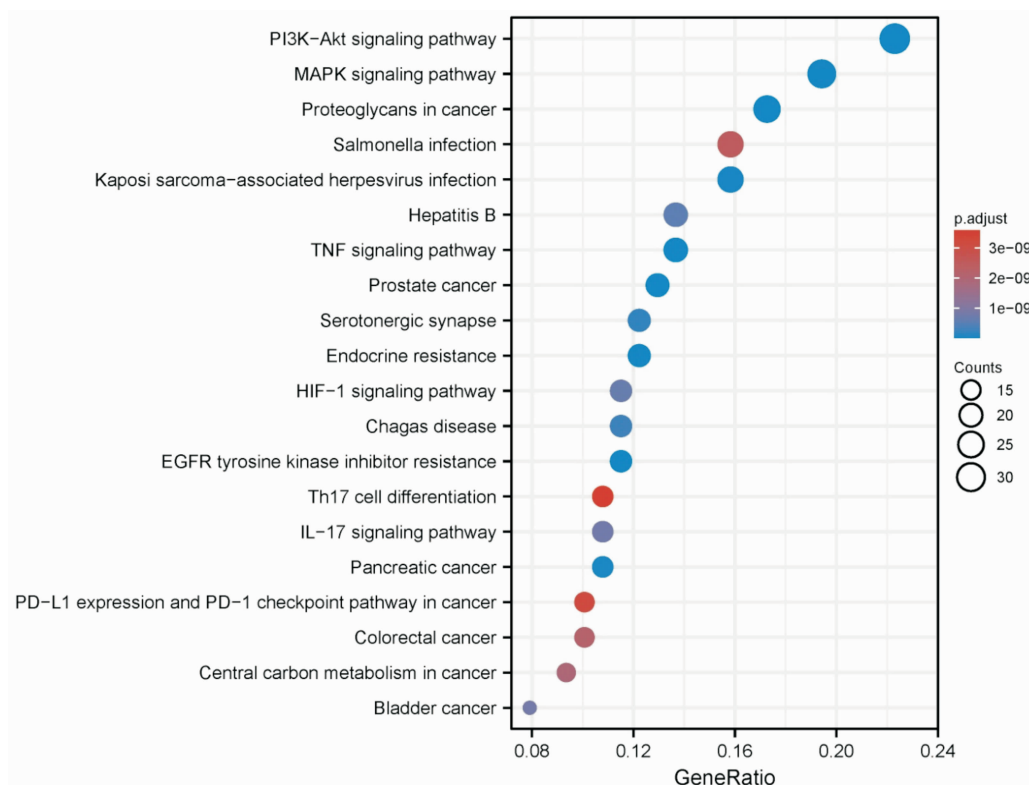


图 5 补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎靶点基因 KEGG 富集分析气泡图(前 20 位)

表 3 补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎主要活性成分与关键靶点的结合能

单位:  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

关键靶点	主要活性成分				
	汉黄芩素	啤酒甾醇	槲皮素	山奈酚	黄芩素
促分裂原活化的蛋白激酶 1	-31.81	-37.25	-33.07	-32.23	-33.05
Akt 激酶 1	-21.35	-22.60	-23.44	-21.77	-23.43
Harvey 大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物	-33.49	-33.90	-39.77	-38.09	-37.66
白细胞素 6	-24.28	-23.02	-25.12	-24.28	-28.87
血管内皮生长因子 A	-30.56	-33.49	-32.23	-36.84	-8.79
热激蛋白 90AA1	-32.65	-35.16	-34.74	-32.65	-34.73
JUN 原癌基因	-25.95	-28.88	-25.95	-26.37	-27.20
淀粉样前体蛋白	-25.37	-32.65	-25.53	-25.11	-28.03
促分裂原活化的蛋白激酶 8	-33.49	-31.81	-32.23	-32.65	-33.89
激肽原 1	-25.12	-26.79	-25.12	-23.86	-20.08
肿瘤坏死因子	-20.50	-17.57	-20.50	-20.50	-20.50
促分裂原活化的蛋白激酶 14	-25.94	-22.59	-25.94	-25.10	-26.78
白细胞素 2	-21.76	-21.34	-23.01	-24.27	-25.10
表皮生长因子受体	-25.94	-22.18	-24.27	-22.59	-23.43
凝血因子 II	-30.96	-27.20	-33.89	-33.05	-33.05

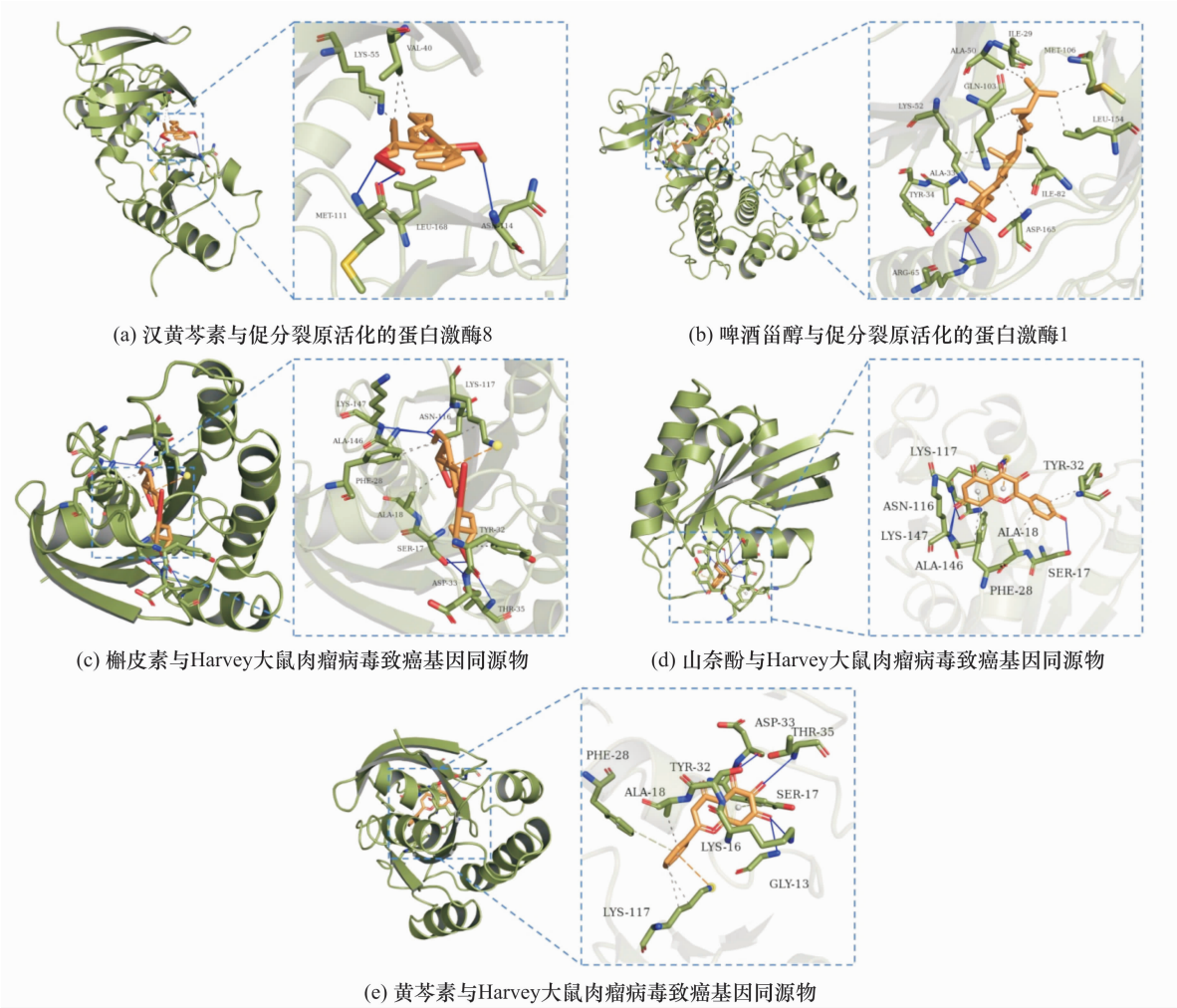


图 6 补肾壮筋汤治疗膝骨关节炎的主要活性成分与关键靶点分子对接图

### 3 讨论

从本研究的结果来看,汉黄芩素、啤酒甾醇、槲皮素、黄芩素、山奈酚为补肾壮筋汤治疗 KOA 的主要活

性成分。相关研究表明,汉黄芩素能抑制人软骨细胞中 NO、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 等炎症因子的表达,同时诱导核因子 E2 相关因子 2 转位至



细胞核,与抗氧化反应元件结合,发挥抗氧化作用<sup>[3]</sup>。啤酒甾醇是从内生真菌乙酸乙酯提取物中分离出的一种活性化合物<sup>[4]</sup>,能阻断脂多糖诱导的诱导型一氧化氮合酶和环氧合酶 2 表达上调,抑制其发挥免疫抑制作用,以及抑制 NO、PGE2 等炎症因子的释放<sup>[5]</sup>。槲皮素则具有抗氧化应激、抗炎等作用<sup>[6]</sup>,可降低基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13)以及 IL-1 $\beta$  等细胞因子的表达,从而抑制细胞外基质的降解来保护关节软骨<sup>[7]</sup>。作为黄芩主要活性成分之一的黄芩素,目前已被相关研究证实具有抗病毒、抗氧化、抗炎以及镇痛等作用<sup>[8-9]</sup>。杨波等<sup>[10]</sup>通过实验发现,黄芩素可通过调节 miR-29a-3p 来抑制 MAPK6 磷酸化,从而抑制软骨细胞退化。山奈酚是一种存在于绿茶、浆果及一些中草药中的膳食类黄酮<sup>[11]</sup>,能抑制 TNF、IL-1、IL-6 基因表达和对应炎症因子分泌<sup>[12]</sup>。

对于靶点的分析表明, MAPK1、AKT1、APP、HRAS、MAPK8、IL-6、KNG1、VEGFA、HSP90AA1、JUN、TNF、MAPK14、IL-2、EGFR、F2 等 15 个靶点为补肾壮筋汤治疗 KOA 的关键靶点。而靶点基因富集分析结果表明, MAPK1、AKT1、HRAS 都与 PI3K-AKT 和 MAPK 这 2 条关键信号通路有关。MAPK1 参与多种细胞过程,如增殖、分化和凋亡等。相关研究显示,增加 MAPK1 的表达,可减弱 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞炎症损伤<sup>[13]</sup>。AKT 在转化生长因子  $\beta$  的调控下可发生磷酸化,诱导组织金属蛋白酶抑制因子 3 表达,增强细胞外基质强度<sup>[14]</sup>。HRAS 是 RAS 基因家族成员之一,负责调控细胞的生长与分裂<sup>[15]</sup>。HRAS 多见于癌症研究当中<sup>[16]</sup>,其在 KOA 中作用的报道较少。Lü 等<sup>[17]</sup>在轻度的 OA 组织中观察到 HRAS 表达下调,以及 II 型胶原蛋白和 MMP-13 表达下调。Jiang 等<sup>[18]</sup>的研究结果显示,HRAS 敲减可减弱 miR-218-5p 抑制对 TNF 诱导的软骨细胞功能障碍的保护作用。因此,后续的相关研究可基于 MAPK1、AKT1 等核心靶点进行实验设计,也可将 HRAS 作为研究补肾壮筋汤治疗 KOA 细胞机制的新方向。

本次研究中对靶点基因的富集分析结果发现,补肾壮筋汤治疗 KOA 的大部分关键靶点与 PI3K-AKT 信号通路和 MAPK 信号通路有关。PI3K-AKT 信号通路主要参与细胞增殖、凋亡以及分化,目前也被认为是调控软骨细胞凋亡的最重要的信号通路之一。PI3K 被激活后产生磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,后

者与细胞内 AKT 结合后促使下游因子磷酸化,调节细胞功能<sup>[19]</sup>。颜春鲁等<sup>[20]</sup>研究发现,右归丸能有效抑制 KOA 模型大鼠软骨组织中 PI3K、pAKT 等相关蛋白表达,促进细胞自噬以阻止软骨细胞进一步退化;同时还发现,右归丸能通过调控 PI3K-AKT 信号通路来抑制 KOA 患者的炎症反应及软骨细胞外基质的过度降解,从而延缓关节软骨退变。MAPK 广泛存在于真核细胞当中<sup>[21]</sup>,作为 MAPK 信号通路三大亚类之一的 p38MAPK 信号通路,与 KOA 的病情进展关系密切。谢文鹏等<sup>[22]</sup>通过动物实验发现,存在炎症的软骨基质中,p38MAPK 通路中的 TNF、IL-1 $\beta$  等炎症因子的分泌可被苍膝通痹胶囊抑制,同时该药还抑制了 MMP-3、MMP-13 的表达,进而抑制 II 型胶原蛋白的降解以保护关节软骨。

本研究的结果提示,补肾壮筋汤治疗 KOA 的作用机制可能是通过汉黄芩素、啤酒甾醇、槲皮素、黄芩素、山奈酚等活性成分,参与调控 RNA 聚合酶 II 启动子转录、凋亡过程、信号传导、细胞增殖、转录,影响 PI3K-AKT、MAPK、TNF 等信号通路。受条件限制,本研究未能将分析结果与方剂配伍、药物配比及药物剂量等具体问题相联系。本研究得出的补肾壮筋汤的主要活性成分槲皮素和山奈酚,也见于其他骨科方药的活性成分研究结果中,这可能与数据库信息收集的局限性有关。

## 参考文献

- [1] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.
- [2] LIPINSKI C A. Rule of five in 2015 and beyond: target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 101: 34-41.
- [3] ABUSARAH J, BENABDOUNE H, SHI Q, et al. Elucidating the role of protandim and 6-gingerol in protection against osteoarthritis[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(5): 1003-1013.
- [4] CHOWDHURY N S, SOHRAB M H, RANA M S, et al. Cytotoxic naphthoquinone and azaanthraquinone derivatives from an endophytic fusarium solani[J]. J Nat Prod, 2017, 80(4): 1173-1177.
- [5] LEYVA-LÓPEZ N, GUTIERREZ-GRIJALVA E P, AMBRIZ-PÉREZ D L, et al. Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 921.

(下转第 26 页)

582 – 586.

- [16] FANG D M, RITTER M A, DAVIS K E. Coronal alignment in total knee arthroplasty: just how important is it? [J]. J Arthroplasty, 2009, 24(6 Suppl): 39 – 43.
- [17] BELLEMANS J, COLYN W, VANDENNEUCKER H, et al. The Chitranjan Ranawat Award: is neutral mechanical alignment normal for all patients? The concept of constitutional varus[J]. Clin Orthop Relat Res, 2012, 470(1): 45 – 53.
- [18] 钟昌恒, 彭昊. 下肢力线在全膝关节置换术的应用进展[J]. 生物医学工程与临床, 2022, 26(2): 253 – 257.
- [19] 喻长纯, 王战朝, 尚延春. 膝关节内翻屈曲畸形全膝关节置换的软组织平衡[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(10): 1062 – 1066.
- [20] MATZIOLIS G, ADAM J, PERKA C. Varus malalignment has no influence on clinical outcome in midterm follow – up after total knee replacement[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2010, 130(12): 1487 – 1491.

(收稿日期: 2021-12-30 本文编辑: 李晓乐)

(上接第 14 页)

- [6] GUIMARÃES G C, PIVA H, ARAUJO G C, et al. Binding investigation between M2 – 1 protein from hRSV and acetylated quercetin derivatives: 1H NMR, fluorescence spectroscopy, and molecular docking [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 111: 33 – 38.
- [7] KIM J R, YOO J J, KIM H A. Therapeutics in osteoarthritis based on an understanding of its molecular pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 674.
- [8] ZHANG X H, XU X X, XU T. Ginsenoside ro suppresses interleukin – 1 $\beta$  – induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes by inhibiting NF –  $\kappa$ B[J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(4): 283 – 289.
- [9] 罗晓平, 于之伦, 邓超, 等. 黄芩素对 2,4,6 – 三硝基苯磺酸诱导的小鼠实验性肠炎的作用和机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(6): 541 – 546.
- [10] 杨波, 龙慧, 王郑钢, 等. 黄芩素通过促进 miR – 29a – 3p 抑制 MAP2K6 改善骨性关节炎模型大鼠软骨细胞退化[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(6): 32 – 37.
- [11] IMRAN M, RAUF A, SHAH Z A, et al. Chemo – preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: a comprehensive review [J]. Phytother Res, 2019, 33(2): 263 – 275.
- [12] KADIOGLU O, NASS J, SAEED M E, et al. Kaempferol is an anti – inflammatory compound with activity towards NF –  $\kappa$ B pathway proteins [J]. Anticancer Res, 2015, 35(5): 2645 – 2650.
- [13] LI Q, WU M, FANG G, et al. MicroRNA – 186 – 5p down-regulation inhibits osteoarthritis development by targeting MAPK1[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(4): 253.
- [14] YANG Y, GU Y, ZHAO H, et al. Loganin attenuates osteoarthritis in rats by inhibiting IL – 1 $\beta$  – induced catabolism and apoptosis in chondrocytes via regulation of phosphatidylinositol 3 – kinases (PI3K)/Akt [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 4159 – 4168.
- [15] WU X Y, LIU W T, WU Z F, et al. Identification of HRAS as cancer – promoting gene in gastric carcinoma cell aggressiveness[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(9): 1935 – 1948.
- [16] CHEN Y T, HUANG Z Y, TANG H H, et al. Pterostilbene sensitizes cisplatin – resistant human bladder cancer cells with oncogenic HRAS[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(10): 2869.
- [17] LÜ G, LI L, WANG B, et al. LINC00623/miR – 101/HRAS axis modulates IL – 1 $\beta$  – mediated ECM degradation, apoptosis and senescence of osteoarthritis chondrocytes[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(4): 3218 – 3237.
- [18] JIANG H, DAI J, ZHANG C, et al. Circ\_0045714 alleviates TNF –  $\alpha$  – induced chondrocyte injury and extracellular matrix degradation through miR – 218 – 5p/HRAS axis[J]. J Bioenerg Biomembr, 2021, 53(1): 97 – 107.
- [19] YUDUSHKIN I. Control of Akt activity and substrate phosphorylation in cells[J]. IUBMB Life, 2020, 72(6): 1115 – 1125.
- [20] 颜春鲁, 李盛华, 安方玉, 等. 右归丸通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对膝骨关节炎模型鼠软骨组织保护作用的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(3): 318 – 322.
- [21] CHU X, YU T, HUANG X, et al. Tomatidine suppresses inflammation in primary articular chondrocytes and attenuates cartilage degradation in osteoarthritic rats[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(13): 12799 – 12811.
- [22] 谢文鹏, 杨灵森, 马亮, 等. 基于 p38 MAPK 信号通路探讨苍膝通痹胶囊对 KOA 大鼠关节软骨的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(18): 70 – 76.

(收稿日期: 2022-01-04 本文编辑: 李晓乐)