

· 基础研究 ·

杜仲防治骨关节炎的潜在活性成分及作用机制研究

李刚¹, 许波², 梁学振², 骆帝², 刘金豹²

(1. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355)

摘要 目的:探讨杜仲防治骨关节炎的潜在活性成分及作用机制。方法:通过检索中药系统药理学数据库和分析平台(traditional chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)中杜仲所有成分数据,筛选和预测杜仲入血活性成分和作用靶点;挖掘靶点数据库、药物银行、在线人类孟德尔遗传数据库、遗传关联数据库、药物遗传学和药物基因组学知识库 5 大疾病数据库中已知与骨关节炎相关的作用靶点;构建杜仲入血活性成分及已知与 OA 相关靶点的相互关系网络,通过网络拓扑分析,筛选杜仲防治骨关节炎的关键靶点;采用 ClueGo 信号通路富集,分析杜仲防治骨关节炎的作用机制。结果:通过 TCMSP 检索出 119 个杜仲相关成分,利用 TCMSP 模型预测出 7 个入血活性成分(槲皮素、 β -谷甾醇、山奈酚、丁子香酚、刺桐素、麦儿茶素、皮树脂醇)和 116 个作用靶点,且活性成分与作用靶点之间形成 271 条对应关系;从 5 大疾病数据库检索出 168 个已知与骨关节炎相关的靶点;网络拓扑分析筛选出 202 个杜仲防治 OA 的关键节点,其中疾病与药物直接映射靶点有 17 个;ClueGO 富集分析结果显示,杜仲作用于骨关节炎的关键节点涉及的信号通路主要被富集于细胞周期、增殖和凋亡以及炎症、代谢、其他疾病相关等 60 条信号通路。结论:杜仲防治骨关节炎的活性成分主要为槲皮素、 β -谷甾醇、山奈酚、丁子香酚、刺桐素、麦儿茶素、皮树脂醇。其可能的作用机制不仅表现为直接参与细胞增殖、分化及凋亡,调节骨代谢平衡;还表现为间接通过调节炎症、免疫和其他全身系统等,影响骨与软骨微环境,具有多通路、多成分、多靶点的特点。

关键词 杜仲;骨关节炎;网络药理学;活性成分;药理作用分子作用机制

Potential active ingredients of eucommia ulmoides for prevention and treatment of osteoarthritis and its mechanism of action

LI Gang¹, XU Bo², LIANG Xuezheng², LUO Di², LIU Jinbao²

1. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong, China

ABSTRACT Objective: To explore the potential active ingredients of eucommia ulmoides for prevention and treatment of osteoarthritis (OA) and its mechanism of action. **Methods:** All ingredients of eucommia ulmoides were screened for predicting the active ingredients and action targets of eucommia ulmoides by searching traditional chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP). The known OA-related action targets were found out from target database (TTD), DrugBank, online Mendelian inheritance in man (OMIM), genetic association database (GAD) and pharmacogenetics and pharmacogenomics knowledge base (PharmGKB). The network of interaction between active ingredients of eucommia ulmoides and known OA-related action targets was built, and the key targets of eucommia ulmoides in prevention and treatment of OA were selected through network topology analysis. The mechanism of action of eucommia ulmoides in prevention and treatment of OA was analyzed by using ClueGo signaling pathways enrichment. **Results:** One hundred and nineteen eucommia ulmoides-related ingredients were searched out from TCMSP, and 7 active ingredients (quercetin, β -sitosterol, kaempferol, mairin, erythraline, ent-epicatechin and medioresinol) and 116 action targets were predicted by using TCMSP model, and 271 corresponding relationships between active ingredients and action targets were found. One hundred and sixty eight known OA-related action targets were searched out from the five disease databases, and 202 key nodes for prevention and treatment of OA with eucommia ulmoides were selected out by using network topology analysis, in which 17 disease-drug mapping targets were found. The results of ClueGO enrichment analysis showed that the signaling pathways associated with the key nodes of eucommia ulmoides that effected on OA were mainly concentrated in 60 signal pathways which related to cell cycle, cell proliferation and cell apoptosis, inflammation, metabolism and other diseases. **Conclusion:** The main active ingredients of eucommia ulmoides for prevention and treatment of OA are quercetin, β -sitosterol, kaempferol, mairin, erythraline, ent-epicatechin and medioresinol. They can directly regulate the bone metabolism balance by participating in cell proliferation,

differentiation and apoptosis, and they can indirectly affect the micro-environment of bone and cartilage by regulating inflammation, immunity and other body systems, which may be their mechanisms of action. They have the characteristics of multiple pathways, multiple ingredients and multiple targets.

Keywords eucommia ulmoides; osteoarthritis; network pharmacology; active ingredients; molecular mechanisms of pharmacological action

随着人口老龄化的日趋严重,骨关节炎(osteoarthritis, OA)的发病率和患病率均呈逐年上升趋势。流行病学研究表明,全世界 50 岁以上人群约有 50% 的人患有 OA,而我国 75 岁以上人群的 OA 患病率高达 80%,其致残率可达 53%^[1]。目前临床上治疗 OA 的手段较多^[2],主要包括药物防治、饮食调控、运动疗法和手术治疗,其中口服西药在临床应用最为广泛,但西药的不良反应和患者对药物的耐受性问题使其不能长期服用,同时多数药物靶向性过于单一,故亟需探寻新的思路解决上述问题。传统中医凭借其“简、便、廉、效”的优势在防治 OA 方面发挥着得天独厚的优势,具有广阔的发展前景。杜仲具有强筋骨、补肝肾、益腰膝、除酸痛的功效,主要用于治疗肾虚腰痛、筋骨无力、妊娠漏血等^[3]。研究表明,杜仲在治疗 OA 方面发挥着重要作用,但其药效物质基础和分子机制至今尚不明确^[4-5]。另外,考虑到中药的多成分、多靶点、多通路特点,单纯依靠现有的技术手段往往难以科学、有效、全面地阐释中药的作用机制。而网络药理学方法是基于药物系统和生物系统的作用模式提出的一种药物设计新方法,为中药治疗疾病的机制研究提供了有效的策略^[6]。本研究采用网络药理学方法,筛选杜仲防治 OA 的潜在活性成分,预测其作用靶点,为深入探讨杜仲防治 OA 的作用机制提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 软件与数据库 网络图像化软件 Cytoscape 3.2.1 软件^[7],中药系统药理学数据库和分析平台(traditional chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)^[8],治疗靶点数据库(therapeutic target database, TTD)^[9],药物银行(DrugBank)^[10],在线人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)^[11],遗传关联数据库(the genetic association database, GAD)^[12],药物遗传学和药物基因组学知识库(pharmacogenetics and pharmacogenomics knowledge base, PharmGKB)^[13]。

1.2 筛选杜仲入血活性成分及预测其作用靶点 检

索 TCMSP 中杜仲所有成分数据,根据各个成分的吸收(absorption)、分布(distribution)、代谢(metabolism)及排泄(excretion)即 ADME 参数筛选可能的入血活性成分,其中筛选条件^[14-16]为药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,药物相似性(drug like, DL) ≥ 0.18 ;同时,采用 TCMSP 模型预测杜仲入血活性成分的作用靶点,并采用 Cytoscape 软件构建杜仲入血活性成分-靶点网络图,其中以“节点”表示分子、靶蛋白,以“边”表示成分与靶点之间的关系,挖掘相关文献分析其相互之间作用关系。

1.3 检索已知与 OA 相关的靶点 以“osteoarthritis”为关键词检索 5 大疾病数据库中目前已知与 OA 相关的靶点,数据库包括 TTD、DrugBank、OMIM、GAD、PharmGKB。

1.4 构建蛋白质-蛋白质相互关系网络和筛选关键靶点 采用 BisoGenet 插件^[17]对获得的上述杜仲入血活性成分及已知与 OA 相关的靶点进行蛋白质-蛋白质相互关系(protein-protein interaction, PPI)网络绘制;利用 CytoNCA 软件^[18]分析上述 PPI 中节点的重要网络特征,包括度中心性(degree centrality, DC)、介度中心性(betweenness centrality, BC)、接近中心性(closeness centrality, CC)、特征向量中心性(eigenvector centrality, EC)、网络中心性(network centrality, NC)和局部边连通性(local average connectivity, LAC)等;借助网络拓扑理念筛选网络中的关键节点,筛选标准为 DC 大于所有节点 DC 中位数的 2 倍,BC、CC、EC、NC 及 LAC 等指标大于所有节点对应值的中位数。

1.5 分析 ClueGO 信号通路富集结果 采用 ClueGO 信号通路富集^[19]分析上述关键靶点的信号通路,初步研究杜仲防治 OA 的可能作用机制。富集结果通过节点气泡图的形式进行展现,节点的大小代表信号通路的显著程度。

2 结果

2.1 杜仲活性成分及作用靶点分析结果 通过 TCMSP 检索出 119 个杜仲相关成分,根据 ADME 参数筛

选标准获得 25 个可能的杜仲入血活性成分,其筛选分布图见图 1。通过 TCMS 模型预测出 7 个入血活性成分(槲皮素、 β -谷甾醇、山奈酚、丁子香萜、刺桐

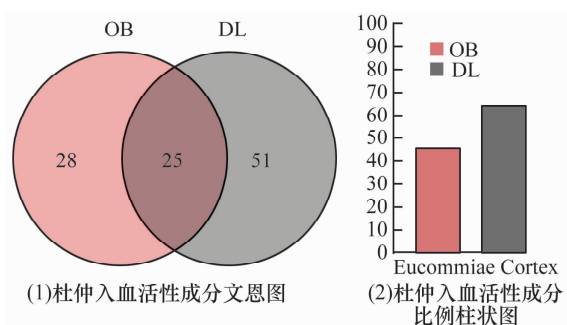


图 1 根据 ADME 参数筛选出的杜仲入血活性成分分布图
OB:药物口服生物利用度;DL:药物相似性;ADME:吸收、分布、代谢及排泄

灵、麦儿茶素、皮树脂醇)和 116 个作用靶点,且活性成分和作用靶点之间形成 271 条对应关系(图 2)。

2.2 已知与 OA 相关靶点的检索结果 从 TTD、DrugBank、OMIM、GAD、PharmGKB 疾病数据库中获得已知与 OA 相关的靶点分别为 35 个、1 个、61 个、97 个、2 个,删除重复靶点最终获得 168 个已知与 OA 相关的靶点。

2.3 杜仲防治 OA 的 PPI 网络分析结果 杜仲入血活性成分的作用靶点 PPI 网络图显示:与这些作用靶点产生直接或间接作用的靶点有 4921 个,靶点与靶点之间形成 125 175 条相互关系;已知与 OA 相关靶点的 PPI 网络图显示:与其直接或间接相关的靶点有 4101 个,靶点与靶点之间形成 97 706 条相互关系。

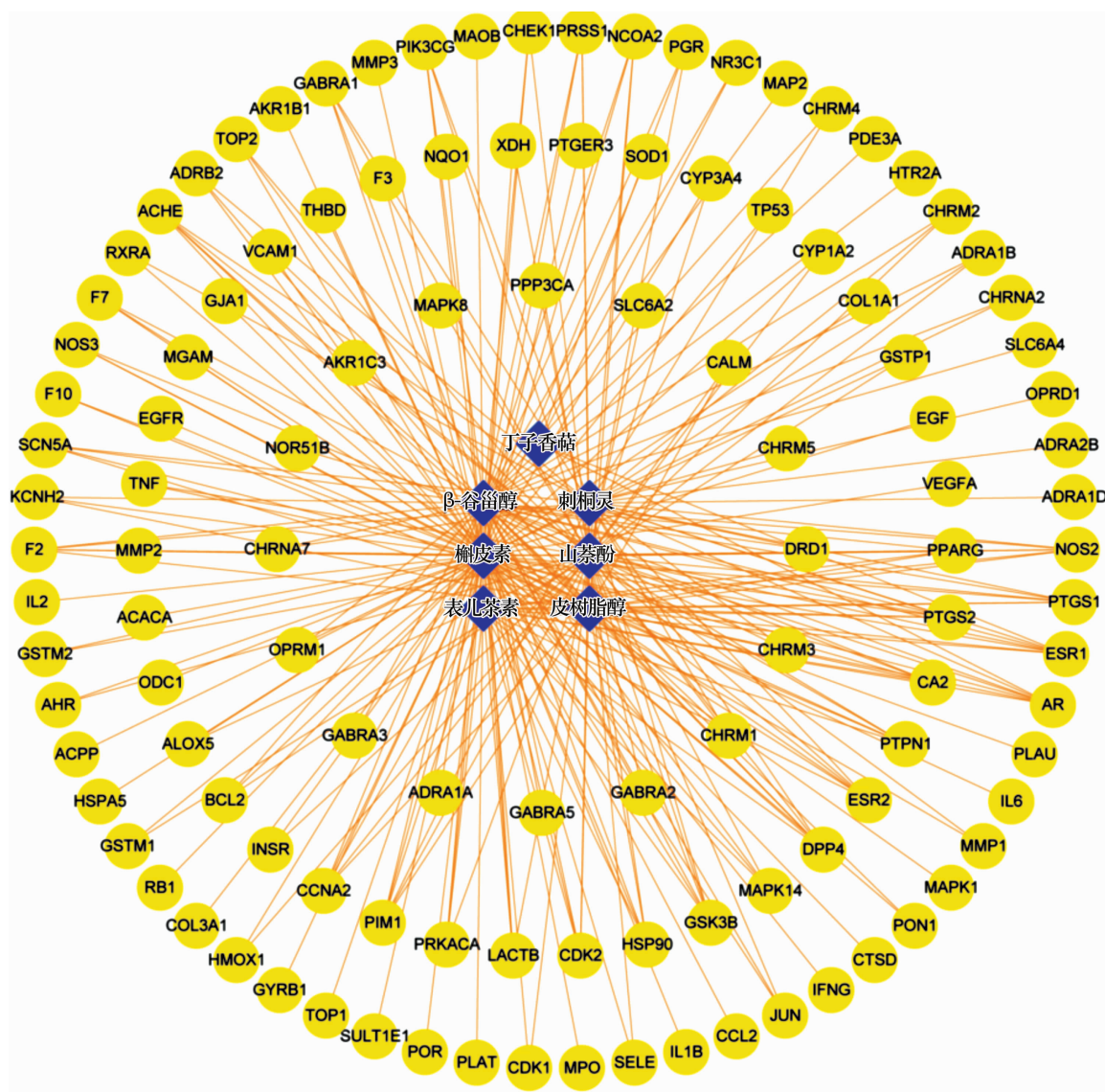


图 2 杜仲入血活性成分-靶点网络图

圆形和菱形代表节点,即分子、靶蛋白;线表示成分与靶点之间的关系

2.4 杜仲防治 OA 的关键靶点筛选结果 采用 CytoNCA 分析疾病和药物的交集靶点的网络参数, 拓扑分析获得 202 个杜仲防治 OA 的关键节点, 其中疾病与药物直接映射靶点有 17 个(表 1)。杜仲防治 OA 关键节点的目标筛选策略见图 3。

表 1 根据网络拓扑筛选的杜仲治疗骨关节炎的关键靶点

序号	靶点	序号	靶点
1	PTGS1	10	IL6
2	ESR1	11	MMP1
3	AR	12	IL1B
4	PTGS2	13	TP53
5	ESR2	14	COL1A1
6	MAPK14	15	GSTP1
7	ALOX5	16	GSTM1
8	MMP2	17	MMP3
9	TNF		

PTGS: 前列腺素 G/H 合酶; ESR: 乙烯应答转录因子; AR: 雄激素受体; MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶; ALOX5: 花生四烯酸 5-脂氧合酶; MMP: 基质金属蛋白酶; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素; TP53: 细胞肿瘤抗原 P53; COL1A1: α -1 型胶原蛋白; GSTP1: 谷胱甘肽 S-转移酶 P1; GSTM1: 谷胱甘肽 S-转移酶 MU 1

2.5 杜仲防治 OA 的机制分析结果 杜仲作用于 OA 的关键节点涉及的信号通路主要富集于细胞周期、增殖和凋亡以及炎症、代谢、其他疾病相关等 60 条信号通路(图 4)。

3 讨论

OA 是由多种因素引起的以关节软骨变性、骨质丢失、关节边缘骨赘形成及软骨下骨质增生为特征的慢性、渐进性、退行性关节疾病^[20]。MMP 是降解细胞外基质的主要酶系, 能降解绝大多数的软骨细胞外基质, 在 OA 疾病的发生、发展中起着至关重要的作用。有研究表明, 杜仲可通过对 MMP1 的调控发挥保护软骨的作用^[21]。杜仲, 一方面能调节 MMP 和组织金属

蛋白酶抑制剂的表达, 保护关节软骨; 另一方面, 具有促进骨髓间充质干细胞成骨分化和抑制其成脂肪分化的双向调节作用, 参与软骨下骨的骨重塑和骨代谢^[6-7]。中医学将 OA 归属于“骨痹”范畴, 其基本病机为肾精亏虚、经络瘀滞。《素问·五脏生成篇》曰: “骨痹不已, 复感于邪, 内舍于肾”, 《医学衷中参西录》言: “补肾之药, 实兼开瘀血之药”, 故治疗该病应以补肾为本, 配合活血化瘀药物, 从而达到标本兼治的目的。杜仲始载于《神农本草经》, 味甘, 性温, 入肝、肾经, 属《神农本草经》上品行列。《本草纲目》记载: “杜仲补肝肾、强筋骨、除酸痛、强志、益精气, 久服轻身耐老。”以杜仲为君药的中药复方制剂能改善 OA 的临床症状和膝关节功能, 但是单味杜仲防治 OA 的具体作用机制尚不清楚, 故本研究基于网络药理学和生物信息学探讨单味杜仲在防治 OA 中的作用机制和关键通路^[22]。

机体生理病理状态的内在调控是较为复杂的过程, 绝非通过单一靶点或信号通路单独发挥作用, 而是通过不同的靶点和信号通路相互交互发挥作用。本研究通过 ADME 参数及 TCMS 预测模型筛选出 7 个入血活性成分、116 个作用靶点和 271 条成分和作用靶点之间形成的对应关系, 说明杜仲的入血活性成分之间在调控作用靶点方面具有协同作用。本研究在分析杜仲与 OA 的相互作用关系时, 不仅考虑两者的直接靶点映射, 还考虑直接调控靶点与间接调控靶点相结合的调控方式。本研究结果显示部分靶点在防治 OA 过程中具有重要意义, 如 PTGS1 和 PTGS2 是阿司匹林和布洛芬等非甾体抗炎药物的靶点, 是前列腺素生成的关键节点; ESR1 和 ESR2 可调节分生组织的基因表达, 从而调节器官发育; MMP1、MMP2 和 MMP3 均参与血管重塑、血管生成、组织修复、肿瘤侵

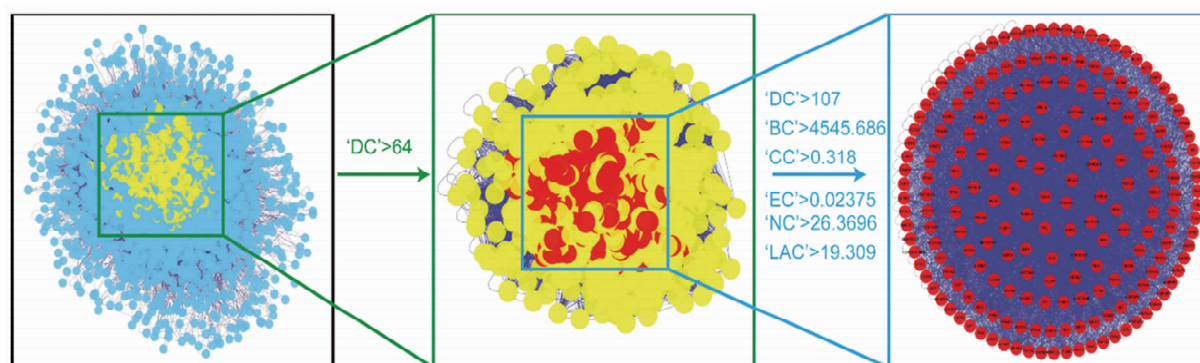


图 3 杜仲防治 OA 关键节点的目标筛选策略图

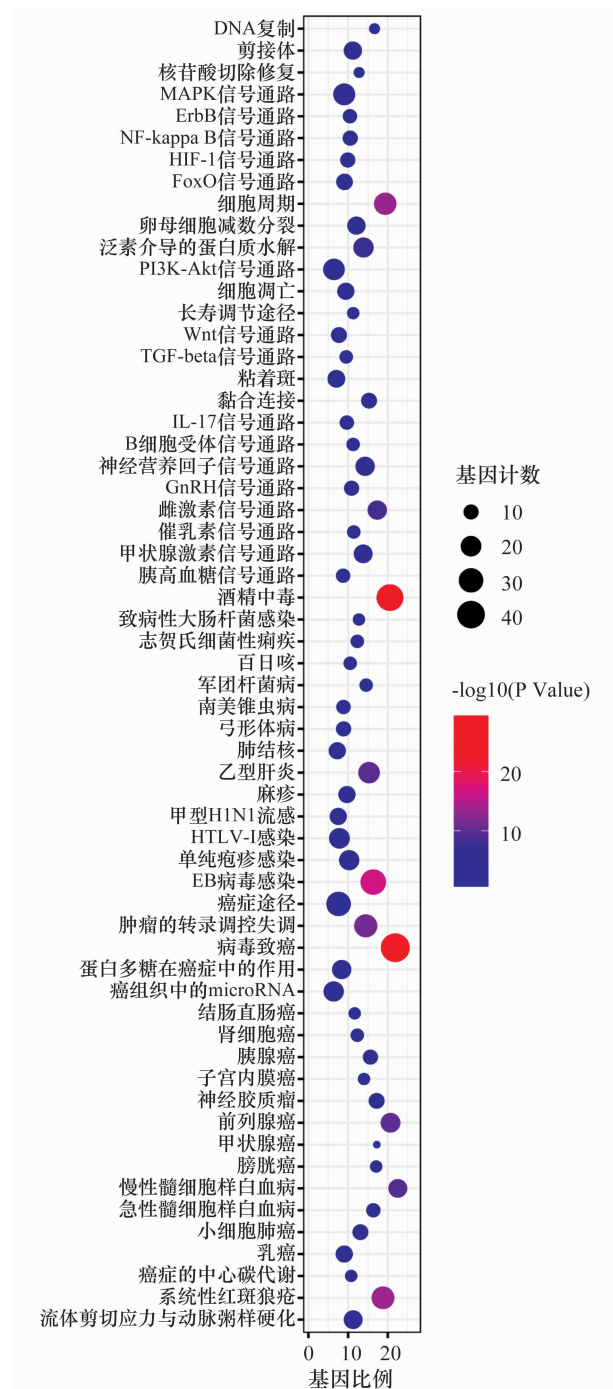


图4 杜仲防治骨关节炎 ClueGO 信号通路富集分析气泡图

袭、炎症反应、动脉粥样硬化斑块破裂等的过程中; MAPK14 是 p38 MAPK 家族中的一种,在细胞外刺激诱发的细胞外反应级联中起着重要作用;IL6 和 IL1B 的表达在与淋巴细胞、单核细胞分化有关的分泌细胞中起着至关重要的作用。

信号通路富集结果显示,杜仲主要通过影响细胞增殖、分化和凋亡以及炎症、代谢、免疫、其他疾病相关等信号通路而发挥防治 OA 的作用。①细胞周期和增殖相关通路。细胞的增殖、分化和凋亡只有受到

机体多种机制的严格调节,才能保证人体正常的生命活动有序进行^[23]。本研究结果显示,与其相关通路主要富集在 Wnt、TGF- β 、FoxO、HIF-1、MAPK、PI3K/Akt、DNA 复制、泛素介导的蛋白质水解、核苷酸切除修复、卵母细胞减数分裂、剪接体、黏合连接及细胞凋亡等。②炎症相关通路。在 OA 发病进展过程中炎症既是其启动因素,又是其主要病理特征,能激活多种炎症反应的信号转导过程^[24]。杜仲作用于 OA 炎症相关信号通路主要富集在 NF- κ B 信号通路、IL-17 信号通路、B 细胞抗原受体信号通路等。③代谢相关信号通路。体内代谢之间是相互作用、相互联系的,通过全身其他系统,如内分泌系统、神经系统等多种代谢可以间接影响或干预骨微环境^[25]。在显著富集的信号通路中存在部分调控其他系统的信号通路,如胰高血糖素、甲状腺激素、促性腺激素释放激素、催乳激素等。④其他疾病相关信号通路。疾病之间的调控机制存在相互联系、相互影响和相互交叉的关系^[26]。如慢性髓细胞样白血病、乙型肝炎、百日咳、结核病等疾病以及甲状腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、肾细胞癌、胰腺癌、膀胱癌等癌症相关信号通路也被显著富集。故在防治 OA 方面,不仅要从局部关键通路入手,还要考虑到疾病病因、所处机体环境的差异。

本研究结果显示,杜仲防治骨关节炎的活性成分主要为槲皮素、 β -谷甾醇、山奈酚、丁子香酚、刺痛灵、麦儿茶素、皮树脂醇;其可能的作用机制不仅表现为直接参与细胞增殖、分化及凋亡,调节骨代谢平衡,还表现为间接通过调节炎症、免疫和其他全身系统等,影响骨与软骨微环境,具有多通路、多成分、多靶点的特点。

4 参考文献

- [1] BERTRAND J, CROMME C, UMLAUF D, et al. Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(10): 1594-1601.
- [2] 郑晓芬. 骨关节炎发病机制和治疗的最新进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(20): 3255-3262.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 154.
- [4] 朱福群, 唐芳瑞, 刘荣华. 杜仲强筋健骨的药理作用及临床应用研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2015, 27(4): 92-96.
- [5] 陈伟才, 罗军. 杜仲叶提取物诱导羊骨髓间充质干细胞

- 成骨及抑制其成脂肪分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(10): 1960 – 1964.
- [6] HOPKINS AL. Network pharmacology[J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(10): 1110 – 1111.
- [7] LI Y, ZHANG J, ZHANG L, et al. Systems pharmacology to decipher the combinational anti – migraine effects of Tianshu formula[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 174(15): 45 – 56.
- [8] MA C, WANG L, XIE XQ. GPU accelerated chemical similarity calculation for compound library comparison[J]. J Chem Inf Model, 2011, 51(7): 1521 – 1527.
- [9] LIU H, WANG J, ZHOU W, et al. Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: an example using licorice[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 146(3): 773 – 793.
- [10] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6964 – 6982.
- [11] LI J, ZHAO P, LI Y, et al. Systems pharmacology – based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufeì Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Sci Rep, 2015, 5: 15290.
- [12] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[M]. London: Routledge, 2003: 125.
- [13] LIU X, ZHU F, MA X, et al. The therapeutic target database: an Internet resource for the primary targets of approved, clinical trial and experimental drugs[J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15(8): 903 – 912.
- [14] WISHART DS, KNOX C, GUO AC, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 901 – 906.
- [15] HAMOSH A, SCOTT AF, AMBERGER J, et al. Online mendelian inheritance in man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1): 52 – 55.
- [16] BECKER KG, BARNES KC, BRIGHT TJ, et al. The genetic association database[J]. Nat Genet, 2004, 36(5): 431 – 432.
- [17] MA Q, LU AY. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine[J]. Pharmacol Rev, 2011, 63(2): 437 – 459.
- [18] MARTIN A, OCHAGAVIA ME, RABASA LC, et al. Bisogenet: a new tool for gene network building, visualization and analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(1): 91.
- [19] 梁桂洪, 梁祖建, 林勇凯, 等. 补肾活血中药对比塞来昔布治疗膝骨性关节炎疗效与安全性的 Meta 分析[J]. 中国药房, 2016, 27(27): 3810 – 3814.
- [20] 李西海, 刘献祥. 骨关节炎的核心病机——本痿标痹[J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1248 – 1249.
- [21] 鲁海, 谢国平, 刘文刚, 等. 杜仲干预大鼠膝骨性关节炎关节软骨破坏的机理研究[J]. 内蒙古中医药, 2015, 34(11): 144 – 145.
- [22] 王和鸣, 葛继荣, 殷海波, 等. 复方杜仲健骨颗粒治疗膝关节炎性骨性关节炎 400 例临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(6): 489 – 491.
- [23] 王秋实, 李平. TGF – β 1 受体 1 和 2 在 TGF – β 1 调节细胞增殖中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 32(2): 122 – 127.
- [24] 魏雨杰, 王文雅. 炎症引起的软骨细胞外基质的变化对骨关节炎病理进展的作用[J]. 河北联合大学学报: 医学版, 2014, 16(2): 170 – 171.
- [25] 马涛, 王通. 运动对废用性骨质疏松大鼠骨代谢和破骨细胞分化 OPG – RANKL – RANK 系统的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2017, 36(7): 578 – 585.
- [26] 吴嘉瑞, 金燕萍, 段笑娇, 等. 基于网络药理学的“桔梗 – 甘草”药对作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 179 – 183.