

· 基础研究 ·

基于网络药理学方法分析股骨头坏死愈胶囊
治疗股骨头坏死的潜在靶点及作用机制张雪¹, 徐彬², 刘又文¹, 李无阴¹, 张虹¹, 岳辰¹

(1. 河南省洛阳正骨医院/河南省骨科医院, 河南 洛阳 471002;

2. 浙江省立同德医院, 浙江 杭州 310012)

摘要 目的:分析股骨头坏死愈胶囊治疗股骨头坏死(osteonecrosis of femoral head, ONFH)的潜在靶点及作用机制。**方法:**通过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)和中医药百科全书(encyclopedia of traditional Chinese medicine, ETCM)数据库检索、筛选股骨头坏死愈胶囊的有效成分和靶点。在 GeneCards 数据库中检索 ONFH 相关基因,从 GEO 数据库下载包含 ONFH 基因数据的 GSE74089 数据集获取 ONFH 差异表达基因,并通过与已获取的股骨头坏死愈胶囊药物靶点基因取交集,筛选股骨头坏死愈胶囊治疗 ONFH 的关键靶点。利用 Cytoscape 软件、STRING 数据库及已筛选出的股骨头坏死愈胶囊有效成分和关键靶点,构建药物-成分-靶点蛋白互作网络。利用 R 软件对筛选出的关键靶点基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,挖掘关键靶点的生物学功能和通路信息。利用 Cytoscape 软件和 STRING 数据库构建关键靶点蛋白互作网络,筛选股骨头坏死愈胶囊治疗 ONFH 的核心靶点。**结果:**从 TCMSp 和 ETCM 数据库中筛选出股骨头坏死愈胶囊的有效成分 203 个、靶点 592 个。在 GeneCards 数据库中检索到 ONFH 相关基因 2033 个,在 GEO 数据库 GSE74089 数据集获得 ONFH 差异表达基因 8178 个。将 ONFH 相关基因、ONFH 差异表达基因及药物靶点基因取交集后,获得股骨头坏死愈胶囊治疗 ONFH 的关键靶点 57 个。构建的药物-成分-靶点蛋白互作网络包含 200 个节点和 500 条边,蛋白互作网络显示 137 个药物有效成分与 57 个关键靶点对应关系。GO 功能富集分析结果显示,关键靶点的基因功能主要涉及激素反应、氧供反应、免疫系统过程调节、骨细胞调节、骨小梁形成、骨重塑调节、骨化调节、软骨发育及骨合成过程等;KEGG 信号通路富集分析结果显示,关键靶点的主要信号通路包括缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)信号通路、核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路、鞘脂信号通路、p53 信号通路、钙信号通路、精氨酸和脯氨酸代谢信号通路。构建的关键靶点蛋白互作网络显示,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)为具有最高度值的关键靶点,即核心靶点。**结论:**股骨头坏死愈胶囊治疗 ONFH 的潜在靶点为 TNF,其作用机制可能为通过 HIF-1、NF- κ B、p53 等信号通路,参与激素反应、氧供反应、免疫系统过程调节及骨形成调节等生物学过程。

关键词 股骨头坏死;股骨头坏死愈胶囊;网络药理学;靶点;药物作用机制

Analysis of potential targets and mechanism of action of Gugutou Huaisiyu Capsule (股骨头坏死愈胶囊) for treatment of osteonecrosis of femoral head using network pharmacology approach

ZHANG Xue¹, XU Bin², LIU Youwen¹, LI Wuyin¹, ZHANG Hong¹, YUE Chen¹

1. Luoyang Orthopedic - Traumatological Hospital, Luoyang 471002, Henan, China

2. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the potential targets and mechanism of action of Gugutou Huaisiyu Capsule (股骨头坏死愈胶囊, GHC) in treatment of osteonecrosis of femoral head (ONFH). **Methods:** The active ingredients and action targets of GHC were screened by retrieving Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSp) and Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine (ETCM). The ONFH-related genes were searched out from GeneCards database, and the ONFH-related differentially expressed genes (DEGs) were obtained from the microarray dataset GSE74089 downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. The key targets of GHC for treatment of ONFH were selected through overlapping ONFH-related genes, ONFH-related DEGs with the obtained drug target genes of GHC. The drug-ingredient-target network was built by using Cytoscape software and STRING database

基金项目:国家自然科学基金项目(82074472,81804126)

通讯作者:刘又文 E-mail:liuyouwen543@sina.com

based on the active ingredients and key targets of GHC. The GO function and KEGG pathway enrichment analysis were performed on key target genes respectively by using R software to dig biological functions and pathways of the key targets. The protein-protein interaction (PPI) network of the key targets was built by using Cytoscape software and STRING database for screening the core targets of GHC for treatment of ONFH. **Results:** Two hundred and three active ingredients and 592 targets of GHC were screened out from TCMS and ETCM, and 2033 ONFH-related genes and 8178 ONFH-related DEGs were obtained from GeneCards and GEO database respectively. Fifty-seven key targets of GHC for treatment of ONFH were obtained through overlapping ONFH-related genes, ONFH-related DEGs with the drug target genes of GHC. The drug-ingredient-target network diagram consists of 200 nodes and 500 edges, and the PPI network illustrated the corresponding connections between 137 active ingredients and 57 key targets. The results of GO function enrichment analysis suggested that the key targets were mainly involved in the response to hormone, response to oxygen level, regulation of immune system process, regulation of osteocytes, bone trabecula morphogenesis, regulation of bone remodeling, regulation of ossification, cartilage development and osteogenesis. The results of KEGG signaling pathway enrichment analysis indicated that the key targets were mainly enriched in hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), nuclear factor- κ B (NF- κ B), sphingolipid, p53, calcium, arginine and proline metabolism signaling pathways. The PPI network of the key targets demonstrated that the tumor necrosis factor (TNF) with the highest value acted as the core target. **Conclusion:** TNF is the potential target of GHC in treatment of ONFH. It may participate in the responses to hormones and oxygen level and the regulation of immune system process and ossification through the signaling pathways of HIF-1, NF- κ B and p53.

Keywords femur head necrosis; Gugutouhuaisiyu capsule; network pharmacology; target; mechanism of drug action

股骨头坏死 (osteonecrosis of femoral head, ONFH) 属中医学“骨蚀”范畴^[1]。中医学理论认为,肾虚、血瘀是 ONFH 的基本证候,而补肾活血法则是中医治疗 ONFH 最主要的治则之一^[2]。基于补肾活血法组方的股骨头坏死愈胶囊是传承两百余年的平乐郭氏正骨治疗“骨蚀”的经典方剂。前期的临床研究显示,股骨头坏死愈胶囊能有效改善 ONFH 患者的髋关节功能,延缓病情进展^[3]。相关的动物实验也表明,该药能够提高激素性 ONFH 兔血清骨钙素与降钙素水平^[4]。

股骨头坏死愈胶囊的组成药物较多,明确其治疗 ONFH 的靶点及作用机制较为困难。网络药理学方法是基于系统生物学理论,根据成分、疾病、靶点之间相互作用的系统研究方法,通过高通量组学数据分析、虚拟计算及网络数据库检索,对生物系统进行网络分析,具有整体性、系统性等特点,已广泛应用于药物活性成分筛选、药物作用机制及疾病发病机制研究等方面^[5]。因此,本研究基于网络药理学方法分析了股骨头坏死愈胶囊治疗 ONFH 的潜在靶点及作用机制,现总结报告如下。

1 材料与方法

1.1 药物有效成分及靶点筛选 分别在中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMS) 和中医药百科全书 (encyclopedia of traditional Chinese medicine, ETCM) 数据库中检索股骨头坏死愈

胶囊主要组成药物“鹿茸”“续断”“杜仲”“丹参”“鸡血藤”“黄芪”的活性成分 (设定口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18) 和靶点。剔除重复活性成分和靶点后,在 UniProt 数据库中将靶点蛋白名称转换为规范的基因名称,并剔除无靶点活性成分。将从 TCMS 与 ETCM 数据库筛选获得的活性成分和靶点信息取并集,得到股骨头坏死愈胶囊的有效成分和靶点信息。

1.2 关键靶点筛选 在 GeneCards 数据库中以“osteonecrosis of femoral head”为关键词进行检索,获得 ONFH 相关基因。同时从 GEO 数据库下载包含 ONFH 基因数据的 GSE74089 数据集,通过 R 软件 Limma 包进行差异基因分析 (筛选标准为 $FDR < 0.05$ 、 $\log FC > 1$) 得到 ONFH 差异表达基因。将上述 ONFH 相关基因、ONFH 差异表达基因及 1.1 中获得的药物靶点基因输入 Venny2.1.0 在线作图网站绘制韦恩图,将获得的交集基因作为股骨头坏死愈胶囊治疗 ONFH 的关键靶点。

1.3 药物-成分-靶点蛋白互作网络构建 将 1.1 筛选出的有效成分和 1.2 筛选出的关键靶点基因名称输入到 STRING 数据库 (Version11.0) 中进行检索,设置蛋白种类为“Homo sapiens”,构建药物-成分-靶点蛋白互作网络,将蛋白互作网络图导入 Cytoscape3.6.1 软件进行分析,剔除孤立有效成分和孤立靶点。

1.4 关键靶点基因功能及信号通路富集分析 使用

R 软件的 ClusterProfiler 包对 1.2 筛选出的关键靶点基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 挖掘关键靶点的生物学功能和通路信息。

1.5 核心靶点筛选 将 1.2 筛选出的关键靶点基因名称输入到 STRING 数据库 (Version11.0) 构建关键靶点蛋白互作网络, 并将关键靶点蛋白互作网络图导入 Cytoscape3.6.1 软件分析网络图中的关键节点及度值, 筛选其中具有最高度值的靶点作为核心靶点。

2 结果

2.1 药物有效成分及靶点筛选结果 在 TCMS 中筛选到活性成分 121 个、靶点 243 个, 在 ETCM 数据库中筛选到活性成分 95 个、靶点 405 个。将 2 个数据库中筛选到的活性成分和靶点分别取交集后获得股骨头坏死愈胶囊的有效成分 203 个 (鹿茸有效成分 2 个、续断有效成分 6 个、杜仲有效成分 153 个、丹参有效成分 86 个、鸡血藤有效成分 92 个、黄芪有效成分 134 个), 靶点 592 个。

2.2 关键靶点筛选结果 在 GeneCards 数据库中检索到 ONFH 相关基因 2033 个, 在 GEO 数据库 GSE74089 数据集获得 ONFH 差异表达基因 8178 个 (上调基因 5061 个、下调基因 3117 个) (图 1)。将 ONFH 相关基因、ONFH 差异表达基因及药物靶点基因取交集后, 获得股骨头坏死愈胶囊治疗 ONFH 的关键靶点 57 个 (图 2)。

2.3 药物-成分-靶点蛋白互作网络构建结果 构建的药物-成分-靶点蛋白互作网络包含 200 个节点和 500 条边, 蛋白互作网络显示 137 个药物有效成

分与 57 个关键靶点有对应关系 (图 3)。

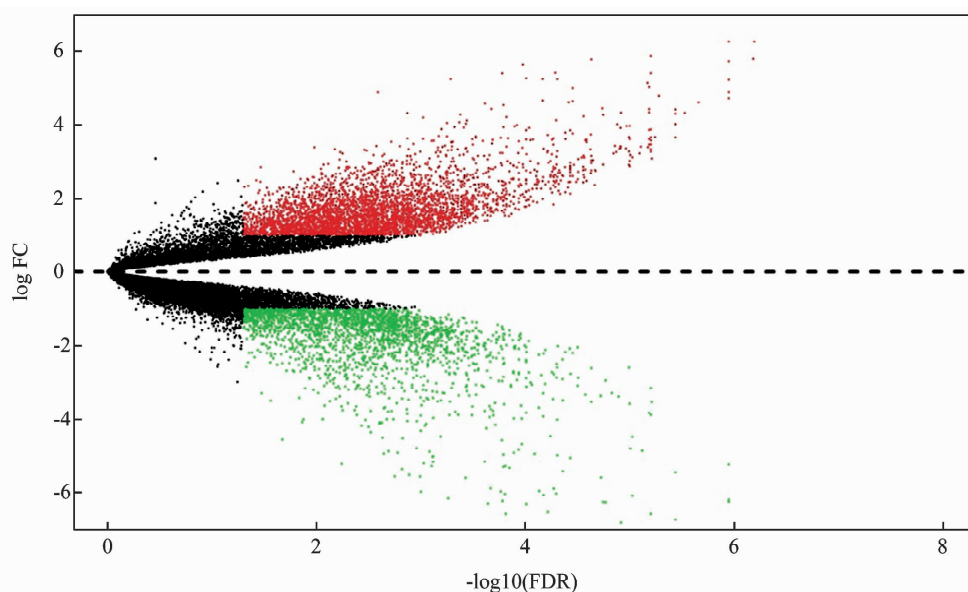
2.4 关键靶点基因功能及信号通路富集分析结果

GO 功能富集分析生物学过程、细胞组分及分子功能目录下前 10 位的富集分析结果见图 4, 主要涉及激素反应 (类固醇激素、糖皮质激素、肽激素及激素的分泌和运输), 氧供反应 (氧气水平、缺氧和氧气水平降低), 免疫系统过程调节 (炎症反应、白细胞迁移、T 细胞活化及白细胞-细胞粘附调节), 骨细胞调节 (分化、骨化、稳态、迁移), 骨小梁形成, 骨重塑调节, 骨化调节, 软骨发育, 骨合成过程等。KEGG 信号通路富集分析排名前 10 位的富集结果见图 5, 主要包括缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 信号通路、核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路、鞘脂信号通路、p53 信号通路、钙信号通路、精氨酸和脯氨酸代谢信号通路。

2.5 核心靶点筛选结果 以筛选出的 57 个关键靶点构建的蛋白互作网络图显示, 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 为具有最高度值的关键靶点, 即核心靶点 (图 6)。

3 讨论

中医学理论认为肾藏精, 主骨生髓, 为先天之本。骨骼的生长发育、盛衰强弱均与肾精充盈与否有关, 肾精充盈则骨有所养、骨骼强健, 肾精亏虚则骨失所养、髓不实而骨不坚, 因此肾精充盈是保证骨骼健康的重要条件。肝肾同源, 肝藏血, 肾水亏虚不能滋养肝木, 又会形成血虚、血瘀, 血液不能发挥其濡养作用, 从而诱发骨蚀。因此, 尽管历代医家对于骨蚀的



(1) 差异表达基因火山图

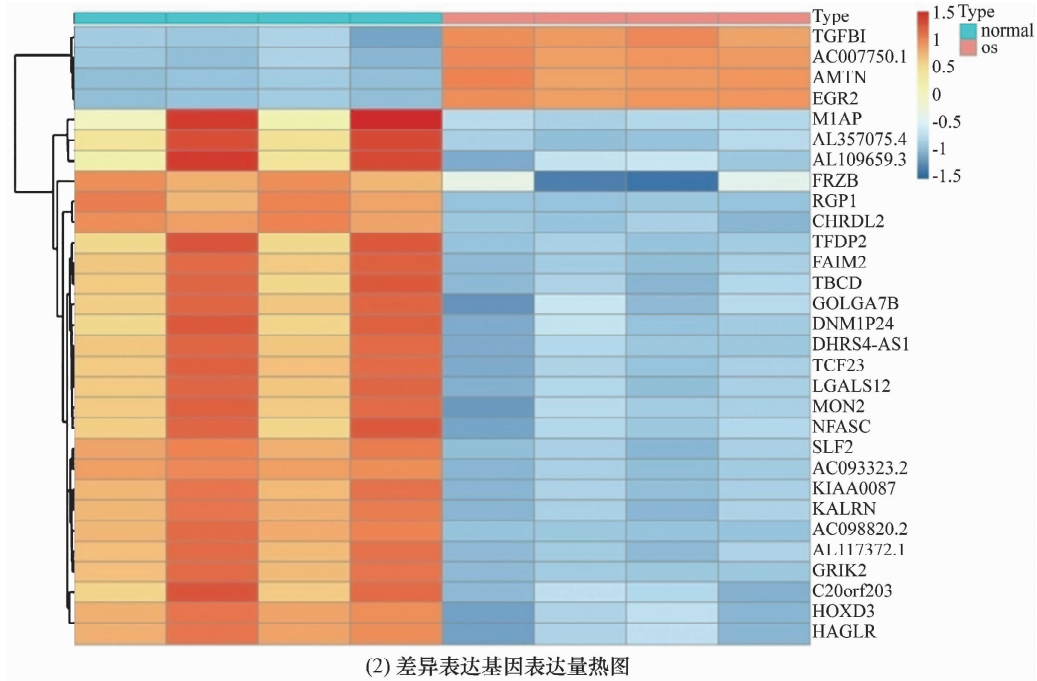


图 1 GEO 数据库筛选出的股骨头坏死差异表达基因火山图和表达量热图

注: (1) 中横坐标表示差异倍数、纵坐标表示可信程度; 图中每个点代表 1 个基因, 绿色和红色点代表差异表达基因 (红色点代表上调基因, 绿色点代表下调基因)。 (2) 中每个小方格代表 1 个基因, 基因表达量越大颜色越深 (红色为高表达、蓝色为低表达); 每行表示每个基因在不同样本中的表达量, 每列表示每个样品中所有基因的表达量; 左侧树状图表示对来自不同样本的不同基因的聚类分析结果。

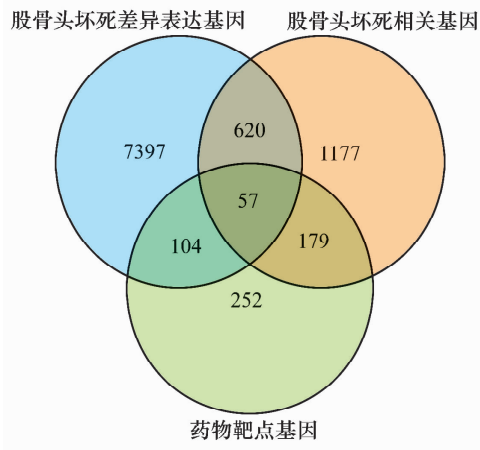


图 2 股骨头坏死愈胶囊治疗股骨头坏死关键靶点筛选韦恩图

辨证论治并不完全统一, 但均认为肾虚、血瘀是其基本证候, 补肾活血法为其主要治则之一。股骨头坏死愈胶囊中, 鹿茸温肾壮阳, 丹参活血化瘀, 二者共为君药; 续断、杜仲合用补肝肾、强筋骨、行血脉、助鹿茸补肾壮骨兼活血, 黄芪益气行血, 鸡血藤行血补血, 四药共为臣药。诸药合用, 共奏温补肾阳、活血祛瘀止痛之效。

关键靶点基因 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析结果显示, 股骨头坏死愈胶囊治疗 ONFH 的

分子生物学机制主要涉及 HIF - 1、NF - κB、p53 等信号通路, 参与激素反应、氧供反应, 免疫系统过程调节、骨细胞调节、骨小梁形成、骨重塑调节、骨化调节、软骨发育、骨合成等生物学过程。已有研究表明, 补肾活血药物可通过 HIF - 1 信号通路、NF - κB 信号通路, p53 信号通路治疗多种疾病, 包括 ONFH、骨关节炎及脊柱退变^[6]。HIF - 1α 是恢复细胞内氧浓度的关键调节因子, 在调节干细胞血管生成中起关键作用^[7], 也被证实参与了早期 ONFH 的发生发展^[8]。HIF - 1α 信号通路被证实参与骨细胞和成骨细胞的形态和功能调节^[9]。Wu 等^[10]发现, 桃红四物汤可以促进家兔股骨头组织中 HIF - 1α 及血管内皮生长因子的表达, 抑制细胞凋亡, 从而延缓 ONFH。NF - κB 是炎症反应的主要介质, 通过参与细胞因子释放, 与许多骨科疾病的发生有密切联系^[11]。Qu 等^[12]在 ONFH 患者的变性软骨和经卵泡素样蛋白 1 处理的软骨细胞中检测到 NF - κB 信号通路激活。Pei 等^[13]发现, Toll 样受体 4/NF - κB 的过度激活可能交互式地抑制 Wnt/β - catenin 信号通路并诱发 ONFH, 并提出 NF - κB 可以作为 ONFH 的治疗靶点。Zhang 等^[14]研究发现, 氧化应激可以提高骨髓间充质干细

胞表达 p53, 而抑制 p53 表达可以显著增强线粒体自噬, 抵抗骨髓间充质干细胞的凋亡和衰老, 并有效提高骨髓间充质干细胞对早期激素诱导的 ONFH 的修复作用。结合本研究的结果, 我们认为股骨头坏死愈

胶囊的有效成分通过 57 个关键靶点, 参与氧供反应、激素反应、细胞凋亡、免疫调节、骨代谢等生物学过程, 进而对 ONFH 发挥治疗作用。

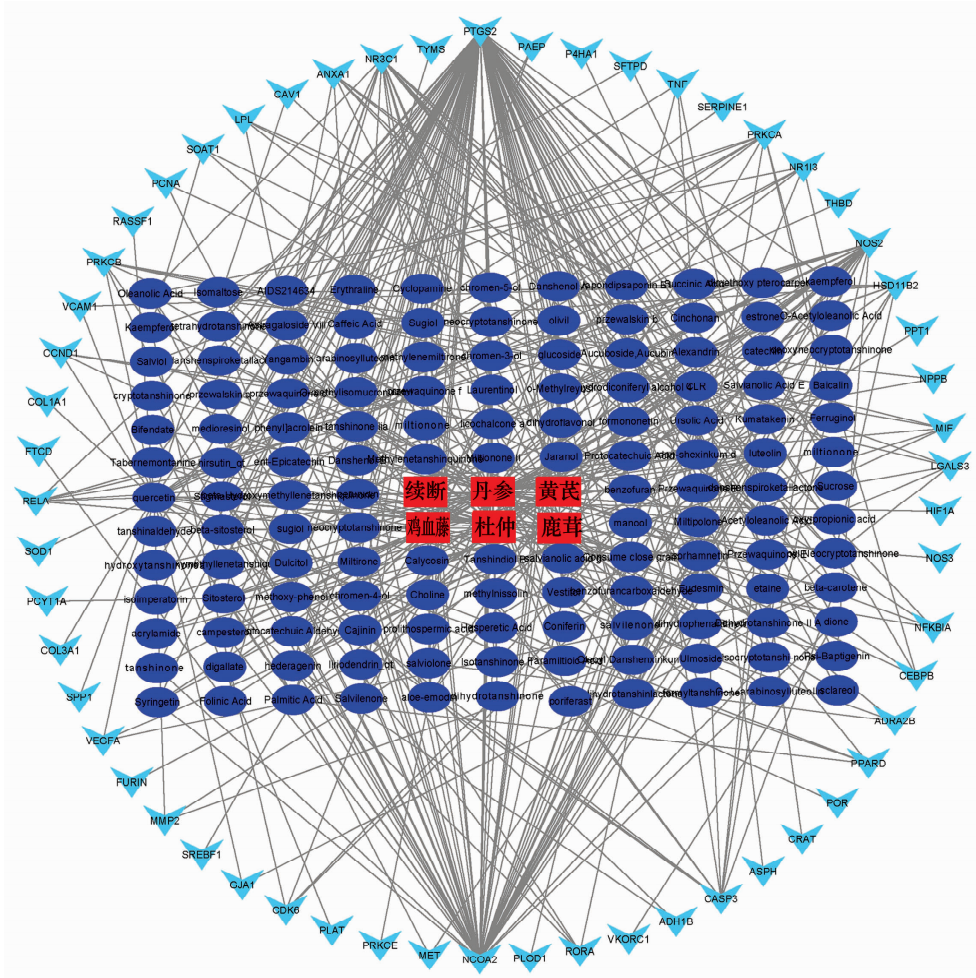


图 3 构建的药物 - 成分 - 靶点蛋白互作网络图

注: 红色为 6 种中药, 蓝色为 137 个药物有效成分, 浅蓝色为有效成分对应的 57 个关键靶点。

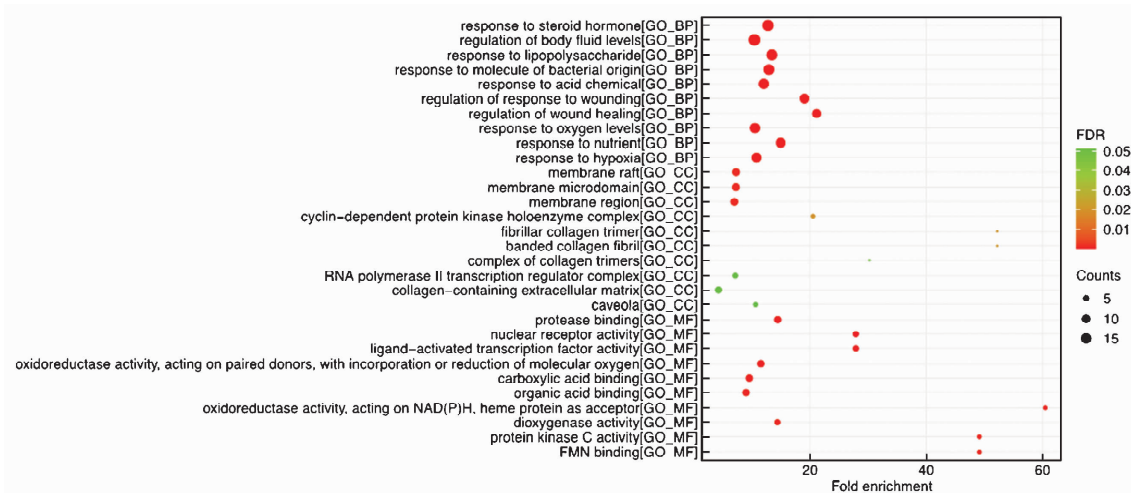


图 4 股骨头坏死愈胶囊治疗股骨头坏死关键靶点基因 GO 功能富集分析结果气泡图

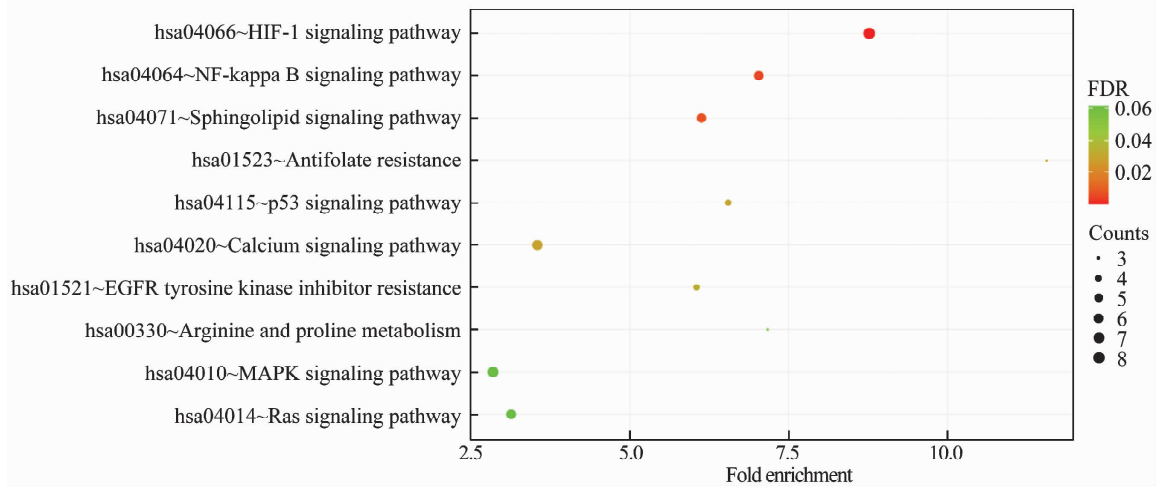


图 5 股骨头坏死愈胶囊治疗股骨头坏死关键靶点基因 KEGG 信号通路富集分析结果气泡图

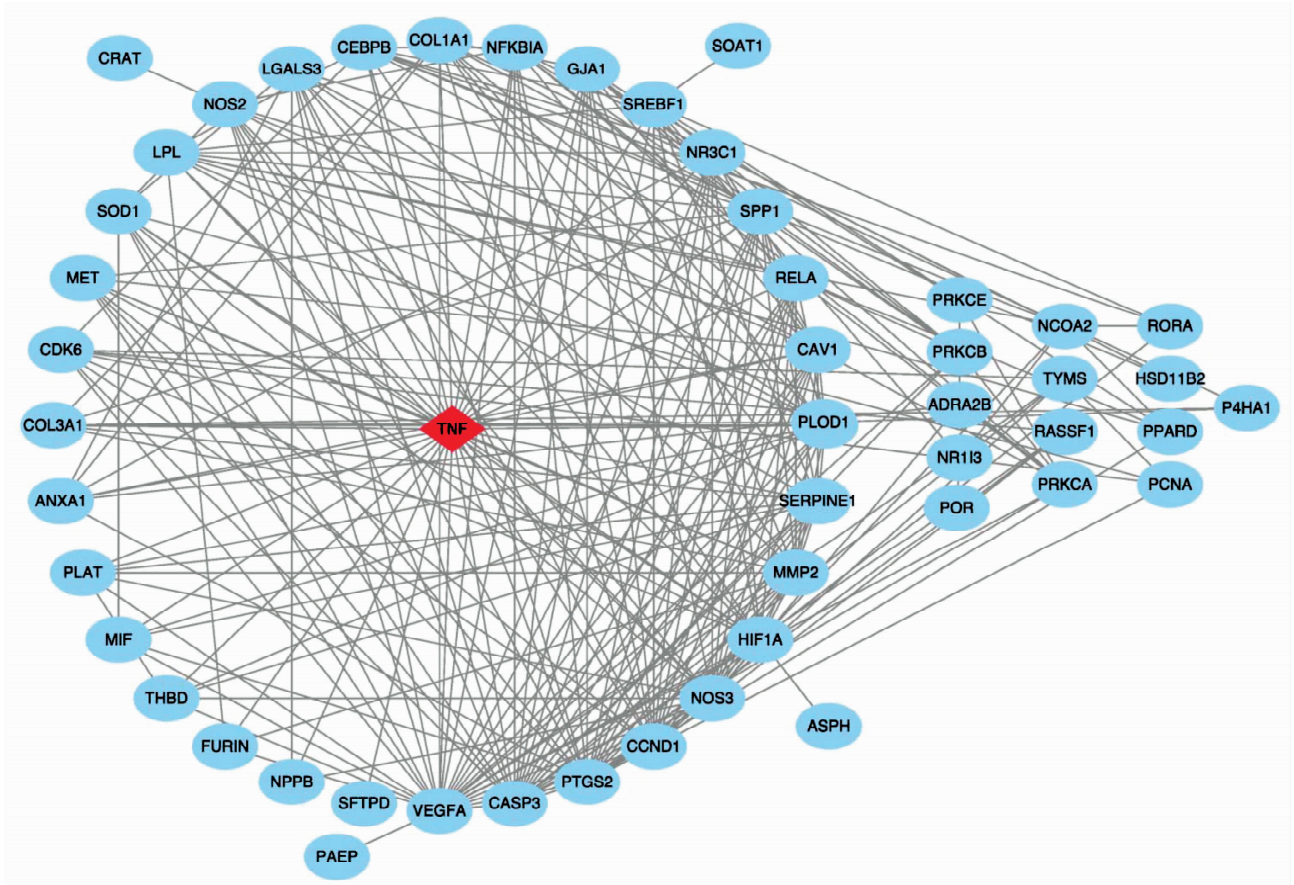


图 6 股骨头坏死愈胶囊治疗股骨头坏死关键靶点蛋白互作网络图

注:浅蓝色椭圆形节点为关键靶点,红色菱形节点为具有最高度值的关键靶点;节点之间的直线代表 2 个基因之间的连接,连接越多相关性越强。

筛选出的 57 个关键靶点的蛋白互作网络显示, TNF 是具有最高度值的核心靶点。作为重要的炎症因子, TNF 与成骨细胞分化、成熟密切相关^[15-16], 参与 ONFH 的发生发展^[17-18]。Li 等^[19]的研究表明, 在 ONFH 患者的软骨退变过程中, TNF 通过 NF - κB 信号通路上调了解聚蛋白样金属蛋白酶 - 7 的表达, 而

后者可使软骨退变加重。Peng 等^[20]的研究表明, 移植碱性成纤维细胞生长因子 - 2 基因转染的间充质干细胞和异种抗原 - 松质骨, 可以抑制 TNF 表达, 促进 ONFH 的修复。Qu 等^[12]发现, 卵泡抑素样蛋白 1 在 ONFH 患者关节滑膜及软骨组织中表达增加, 并且可以增加 ONFH 模型中 TNF 的表达。

本研究的结果显示,股骨头坏死愈胶囊治疗 ONFH 的潜在靶点为 TNF,其作用机制可能为通过 HIF-1、NF- κ B、p53 等信号通路,参与激素反应、氧供反应、免疫系统过程调节及骨形成调节等生物学过程。

参考文献

- [1] 魏秋实,何伟,张庆文,等. 股骨头坏死中医证型分布规律的文献研究和系统评价[J]. 中华关节外科杂志(电子版),2013,7(3):369-372.
- [2] 朱蜀云,杨康,王巍,等. 股骨头坏死中医治法应用分析[J]. 中医正骨,2020,32(1):40-42.
- [3] 谭旭仪,刘又文,高书图,等. 股骨头坏死愈胶囊对股骨头坏死患者血液流变学的影响[J]. 中成药,2014,36(10):2227-2228.
- [4] 刘又文,王玉辉,贾宇东,等. 股骨头坏死愈胶囊对兔激素性股骨头坏死血清骨钙素与降钙素的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(3):248-250.
- [5] ZHANG R, ZHU X, BAI H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: review and assessment[J]. Front Pharmacol, 2019, 10:123.
- [6] 夏天卫,李若颀,环大维,等. 基于网络药理学方法探究补肾活血汤治疗激素性股骨头坏死的作用机制[J]. 中医正骨,2020,32(3):14-20.
- [7] MUTIJIMA E, DE MAERTELAER V, DEPREZ M, et al. The apoptosis of osteoblasts and osteocytes in femoral head osteonecrosis: its specificity and its distribution [J]. Clin Rheumatol, 2014, 33(12):1791-1795.
- [8] LI D, HU Q, TAN G, et al. Erythropoietin enhances bone repair effects via the hypoxia-inducible factor signal pathway in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Am J Med Sci, 2018, 355(6):597-606.
- [9] ZUO G L, ZHANG L F, QI J, et al. Activation of HIF α pathway in mature osteoblasts disrupts the integrity of the osteocyte/canalicular network [J]. PLoS One, 2015, 10(3):266.
- [10] WU J, YAO L, WANG B, et al. Tao-Hong-Si-Wu decoction ameliorates steroid-induced avascular necrosis of the femoral head by regulating the HIF-1 α pathway and cell apoptosis [J]. Biosci Trends, 2016, 10(5):410-417.
- [11] ZHANG Z, DAI F, CHENG P, et al. Pitavastatin attenuates monocyte activation in response to orthopedic implant-derived wear particles by suppressing the NF- κ B signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5):6932-6938.
- [12] QU Y, LIU Y, LI R. FSTL1 promotes inflammatory reaction and cartilage catabolism through interplay with NF κ B signaling pathways in an in vitro ONFH model [J]. Inflammation, 2019, 42(4):1491-1503.
- [13] PEI J, FAN L, NAN K, et al. Excessive activation of TLR4/NF- κ B interactively suppresses the canonical Wnt/ β -catenin pathway and induces SANFH in SD rats [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):11928.
- [14] ZHANG F, PENG W, ZHANG J, et al. P53 and parkin co-regulate mitophagy in bone marrow mesenchymal stem cells to promote the repair of early steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1):42.
- [15] LIU Y, JIANG W, LIU S, et al. Combined effect of tnf- α polymorphisms and hypoxia on steroid-induced osteonecrosis of femoral head [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3):3215-3219.
- [16] WANG L M, ZHAO N, ZHANG J, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits osteogenic differentiation of pre-osteoblasts by downregulation of EphB4 signaling via activated nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. J Periodontal Res, 2018, 53(1):66-72.
- [17] SAMARA S, KOLLIA P, DAILIANA Z, et al. Predictive role of cytokine gene polymorphisms for the development of femoral head osteonecrosis [J]. Dis Markers, 2012, 33(4):215-221.
- [18] FANG B, WANG D, ZHENG J, et al. Involvement of tumor necrosis factor alpha in steroid-associated osteonecrosis of the femoral head: friend or foe? [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1):5.
- [19] LI J K, CHENG L, ZHAO Y P, et al. ADAMTS-7 exhibits elevated expression in cartilage of osteonecrosis of femoral head and has a positive correlation with TNF- α and NF- κ B P65 [J/OL]. Mediators Inflamm, 2015 [2021-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310498>.
- [20] PENG W, DONG W, ZHANG F, et al. Effects of transplantation of FGF-2-transfected MSCs and XACB on TNF- α expression with avascular necrosis of the femoral head in rabbits [J]. Biosci Rep, 2019, 39(4):765.

(收稿日期:2021-05-19 本文编辑:李晓乐)