

· 基础研究 ·

基于网络药理学方法、分子对接技术及动物实验 探讨参威骨痹汤治疗骨质疏松症的作用机制

李律宇¹, 罗森², 李宁³, 李德光¹, 廖江龙¹, 邓力¹, 刘敏², 王晓颖¹, 江顺奎¹

(1. 昆明市中医医院, 云南 昆明 650500;

2. 云南中医药大学第三附属医院, 云南 昆明 650500;

3. 云南中医药大学第一临床医学院, 云南 昆明 650500)

摘要 目的:探讨参威骨痹汤治疗骨质疏松症(osteoporosis, OP)的作用机制。**方法:**①网络药理学研究。采用超高效液相色谱-质谱法鉴定参威骨痹汤中的化合物,采用网络药理学方法初步筛选参威骨痹汤治疗 OP 的关键活性成分和靶点。②分子对接验证。采用分子对接技术验证网络药理学研究确定的参威骨痹汤治疗 OP 的关键活性成分与靶点的结合效果,从中筛选结合效果最好的组合。③动物实验验证。将 60 只雌性 C57BL/6JNifdc 小鼠随机等分为 5 组,模型组和参威骨痹汤低、中、高剂量组小鼠通过双侧卵巢切除手术进行 OP 造模,假手术组小鼠仅切取卵巢周围等体积的脂肪组织。参威骨痹汤低、中、高剂量组小鼠分别按照 $14.95 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $29.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $59.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 以参威骨痹汤药液灌胃,假手术组和模型组小鼠以等体积生理盐水灌胃。药物干预 8 周后,取股骨进行 Micro-CT 检查和组织病理学观察(HE 染色和抗酒石酸酸性磷酸酶染色),采用实时定量 PCR 技术测定股骨组织中根据网络药理学和分子对接技术确定的关键靶点基因的 mRNA 表达水平。**结果:**①网络药理学研究结果。网络药理学研究结果显示, SRC、促分裂原活化的蛋白激酶 3(mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、MAPK1、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1(phosphatidylinositol-3-kinase regulatory subunit 1, PI3KR1)、信号转导及转录活化因子 3 为参威骨痹汤治疗 OP 的关键靶点,五味子丙素、10-姜酚、对羟基苯甲酸丁酯、倍半萜内酯和香豆雌酚为参威骨痹汤治疗 OP 的关键活性成分。②分子对接验证结果。分子对接结果显示,参威骨痹汤治疗 OP 关键活性成分与关键靶点的结合能均小于 $-5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明结合效果良好,其中靶点 SRC、MAPK3、PI3KR1 与活性成分五味子丙素、10-姜酚、对羟基苯甲酸丁酯的结合效果更好。③动物实验验证结果。Micro-CT 检查及组织病理学观察结果显示,参威骨痹汤能改善 OP 模型小鼠的骨质疏松程度,其中中剂量参威骨痹汤效果更好。实时定量 PCR 测定结果显示,参威骨痹汤中剂量组股骨组织中 SRC mRNA 和 MAPK3 mRNA 表达水平低于模型组, PI3KR1 mRNA 表达水平与模型组比较差异无统计学意义。**结论:**参威骨痹汤治疗 OP 的机制可能是通过五味子丙素、10-姜酚、对羟基苯甲酸丁酯等成分调控 SRC、PI3KR1、MAPK3 的表达来调节骨代谢。

关键词 骨质疏松;参威骨痹汤;网络药理学;分子对接模拟;动物实验

Analysis of mechanism of Shenwei Gubi Tang(参威骨痹汤) against osteoporosis based on the network pharmacology approach, molecular docking techniques and animal experimentation

LI Lyuyu¹, LUO Miao², LI Ning³, LI Deguang¹, LIAO Jianglong¹, DENG Li¹, LIU Min², WANG Xiaoying¹, GANG Shunkui¹

1. Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

2. The Third Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

3. The First Clinical Medical College of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of Shenwei Gubi Tang(参威骨痹汤, SWGBT) against osteoporosis(OP). **Methods:**

①Network pharmacology research. The ingredients in SWGBT were identified by using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap mass spectrometry(UHPLC-QE-MS), and the key active ingredients and action targets of SWGBT against OP were preliminarily screened using the network pharmacology approach. ②Validation by molecular docking. The binding effects between the key active ingredients and the targets of SWGBT against OP determined by network pharmacology were validated by molecular docking techniques, and

基金项目:云南省科学技术厅-中医联合专项面上项目(202101AG070053, 202301AZ070001-091)

通讯作者:江顺奎 E-mail:2031291588@qq.com

the combination with the best binding effect was screened. ③Verification by animal experimentation. Sixty female C57BL/6JNifdc mice were selected and randomized into model group, low-dose SWGBT (L-SWGBT) group, medium-dose SWGBT (M-SWGBT) group, high-dose SWGBT (H-SWGBT) group and sham-operated group. The mice in model group, L-SWGBT group, M-SWGBT group and H-SWGBT group were subjected to bilateral ovariectomy for inducing OP; while the ones in sham-operated group were merely removed an equal volume of peri-ovarian adipose tissues. After successful modeling, the mice in L-SWGBT group, M-SWGBT group and H-SWGBT group were intervened by intragastric administration with 14.95, 29.9, 59.8 g/(kg·d) SWGBT, respectively; while the ones in sham-operated group and model group with the same dose of normal saline. After 8-week drug intervention, the rats were sacrificed and their femurs were harvested for Micro-CT examination and observation on histopathological changes through HE staining and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. Furthermore, the mRNA expression levels of key target genes (determined by network pharmacology approach and molecular docking techniques) in tibia tissues were detected by using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). **Results:** ①The results of network pharmacology research showed that SRC, mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), MAPK1, phosphatidylinositol-3-kinase regulatory subunit 1 (PI3KR1), and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were the key targets of SWGBT against OP, and the schisandrin C, 10-gingerol, butyl p-hydroxybenzoate, sesquiterpene lactone, and coumestrol were the key active ingredients of SWGBT against OP. ②The results of molecular docking showed that the key active ingredients of SWGBT against OP had good binding ability to the key targets with the binding energy less than -5.0 kJ/mol, and the targets including SRC, MAPK3, and PI3KR1 exhibited better binding effects with the active ingredients including schisandrin C, 10-gingerol, and butyl p-hydroxybenzoate. ③The results of Micro-CT examination and histopathological observation showed that the SWGBT could improve the degree of OP in OP model mice, with the medium-dose SWGBT displaying better effects. The results of RT-qPCR showed that the mRNA levels of SRC and MAPK3 were lowly expressed in the tibia tissues of OP model mice in M-SWGBT group compared to model group, while, the mRNA expression level of PI3KR1 was not significantly different from that of model group. **Conclusion:** The SWGBT may regulate bone metabolism for treatment of OP through adjusting the expression of SRC, PI3KR1 and MAPK3 via the ingredients such as schisandrin C, 10-gingerol and butyl p-hydroxybenzoate.

Keywords osteoporosis; Shenwei Gubi Tang; network pharmacology; molecular docking simulation; animal experimentation

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种常见的退行性骨代谢性疾病。随着全球人口老龄化加剧, OP 的发病率呈逐年上升趋势, 已成为重要的公共健康问题^[1-3]。因此, 经济有效的抗骨质疏松药物, 一直是临床研究的热点。参威骨痹汤是云南省名中医江顺奎教授治疗骨痿、骨痹的经验方^[4], 对于 OP 有良好的疗效。本研究运用网络药理学方法、分子对接技术和动物实验分析了参威骨痹汤治疗 OP 的作用机制, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6JNifdc 小鼠 60 只, 体重 (20 ± 5) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2021-0006。实验在云南中医药大学动物实验室进行, 小鼠自由饮水、进食, 定时光照。实验方案经云南中医药大学动物实验伦理审查委员会审查通过, 伦理批件号: R-062022036。

1.2 药物与试剂

参威骨痹汤药物组成包括小红参 15 g、威灵仙

15 g、独活 10 g、桑寄生 15 g、川芎 15 g、当归 15 g、白芍 15 g、灯盏细辛 15 g、秦艽 10 g、桂枝 15 g、牛膝 30 g、防风 10 g、熟地黄 15 g、盐杜仲 10 g、甘草片 10 g、千针万线草 15 g, 上述中药饮片均由昆明市中医院药剂科提供。TriQuick Reagent 总 RNA 提取试剂 (北京索莱宝科技有限公司), RT First Strand cDNA Synthesis Kit、2 × SYBR Green qPCR Master mix (武汉塞维尔生物科技有限公司)。

1.3 实验仪器

SkyScan1276 Micro-CT (Bruker 公司), Donatello 脱水机 (DIAPATH 公司), JB-P5 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司), RM2016 病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司), QExactiveTM HF 质谱仪、VanquishUHPLC 色谱仪、HypesilGoldcolumn 色谱柱 (FRESENIUS 公司), D3024R 低温离心机 (SCILOGEX 公司), FC-3100 微量核酸蛋白定量仪 (杭州遂真生物技术有限公司), StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪、Mini Amp Thermal Cycler PCR 仪 [爱普拜斯应用生物系统贸易 (上海) 有限公司], Mini-6K 微型离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司)。

2 方 法

2.1 网络药理学研究

2.1.1 参威骨痹汤活性成分筛选及靶点预测 将参威骨痹汤水煎液样本置于 EP 管中,加入预冷的 80% 甲醇涡旋震荡,冰浴静置 5 min,在 4 ℃ 下以 15 000 × *g* 离心 20 min。取上清液,加质谱级水将甲醇稀释至 53%,在 4 ℃ 下以 15 000 × *g* 离心 20 min,收集上清液,采用超高效液相色谱-质谱法 (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap mass spectrometry, UHPLC-QE-MS) 进行分析。对照样本选择 53% 的甲醇水溶液,前处理过程与实验样本相同。将质谱检测得到的原始文件导入 Compound Discoverer 3.1 软件进行谱图处理及数据库搜库,得到代谢物的定性定量结果。使用 Python 软件对样本中检测到的色谱峰进行积分,其中每个特征峰的峰面积表示 1 个代谢物的相对定量值,使用总峰面积对定量结果进行标准化,最后得到代谢物的定量结果。

将筛选到的参威骨痹汤活性成分数据导入中药系统药理学数据库和分析平台、中医药整合药理学研究平台 v2.0、BATMAN-TCM 数据库和 PubChem 数据库进行检索,预测对应的作用靶点,并在 UniProt 数据库中查找与作用靶点相关的标准基因进行标准化处理,删除重复靶点,得到参威骨痹汤活性成分对应的靶点。

2.1.2 参威骨痹汤治疗 OP 靶点预测 以“osteoporosis”为关键词在 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、DisGeNET 数据库检索与 OP 相关的靶点,合并检索结果并删除重复值,获得 OP 疾病靶点。将 OP 疾病靶点和药物靶点导入 Venny 2.1.0,取共同靶点,得到参威骨痹汤治疗 OP 的靶点。

2.1.3 参威骨痹汤治疗 OP 关键靶点筛选 将药物治疗 OP 的靶点基因上传至 STRING 数据库,Organisms 选择“Homo sapiens”,设置置信度 ≥ 0.9。将分析结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建蛋白质互作网络,筛选参威骨痹汤治疗 OP 的关键靶点。

2.1.4 参威骨痹汤治疗 OP 靶点基因功能及信号通路分析 将 2.1.2 中筛选到的参威骨痹汤治疗 OP 的靶点信息导入 Metascape 数据库进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,并利用微生信平台将结果进行可视化处理。

2.1.5 参威骨痹汤治疗 OP 关键活性成分筛选 将

获得的参威骨痹汤活性成分文件和参威骨痹汤治疗 OP 关键靶点文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建参威骨痹汤治疗 OP 活性成分-关键靶点网络,筛选参威骨痹汤治疗 OP 关键活性成分。

2.2 分子对接验证

从 PubChem 数据库获取参威骨痹汤治疗 OP 关键活性成分的 3D 结构,从 PDB 数据库获取关键靶点的 3D 结构,采用 AutoDock 软件进行分子对接,选择结合效果最好的组合以 PyMOL 软件进行可视化处理。

2.3 动物实验验证

2.3.1 动物分组及造模 适应性喂养 4 周后,将 60 只雌性 C57BL/6JNifdc 小鼠称重后按体质量排序编号,从随机数字表中选取 60 个连续 2 位数记录在小鼠编号下方,再将 60 个随机数字从小到大排序,随机数字排序 1~12 对应的小鼠纳入假手术组,13~24 对应的小鼠纳入模型组、25~36 对应的小鼠纳入参威骨痹汤低剂量组、37~48 对应的小鼠纳入参威骨痹汤中剂量组、49~60 对应的小鼠纳入参威骨痹汤高剂量组。模型组和参威骨痹汤低、中、高剂量组小鼠通过双侧卵巢切除手术进行 OP 造模,假手术组小鼠仅切取卵巢周围等体积的脂肪组织。

2.3.2 药物干预 术后各组小鼠均自由饮水、进食,1 周后进行药物干预。按照体表面积等效剂量换算 (人与小鼠的换算系数为 0.002 6) 确定给药剂量,以临床等效剂量为中剂量,低、中、高剂量比例为 1:2:4。根据计算结果,参威骨痹汤低、中、高剂量组小鼠分别按照 14.95 g · kg⁻¹ · d⁻¹、29.9 g · kg⁻¹ · d⁻¹、59.8 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 以参威骨痹汤药液灌胃 (上述药物剂量均指生药量),假手术组和模型组小鼠以等体积生理盐水灌胃。药物干预 8 周后,使用小动物麻醉机对小鼠进行麻醉,取双侧股骨、胫骨进行后续实验。

2.3.3 股骨 Micro-CT 检查 取以 4% 多聚甲醛固定的右侧股骨进行 Micro-CT 检查,扫描分辨率 6.534 μm、曝光时间 350 ms、扫描角度 180°。选择股骨远端骨骺线及以下 6 mm 的松质骨区域作为感兴趣区^[5]。使用 NRecon 1.7.4.2 三维重建软件对感兴趣区原始图像进行重建,使用 CT-Analyser 1.20.3.0 软件进行分析,计算骨小梁骨密度、骨体积分数、骨小梁数量、骨小梁分离度、骨小梁厚度等参数。

2.3.4 股骨组织病理学观察 取以 4% 多聚甲醛固

定的左侧股骨,用 EDTA 脱钙液脱钙、石蜡包埋,制成厚度 4 μm 的切片,分别进行 HE 染色和抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色,使用 CaseViewer2.3 软件分析评估小鼠骨质疏松程度。

2.3.5 胫骨组织中关键靶点基因 mRNA 水平测定

采用实时定量 PCR 技术检测小鼠胫骨组织中根据网络药理学方法和分子对接技术确定的靶点基因的 mRNA 表达水平。引物序列见表 1,以 GAPDH 作为内部参考基因,采用比较 Ct 值法计算靶点基因 mRNA 的相对表达量。

2.4 数据统计

采用 SPSS27.0 软件进行数据统计分析。各组小鼠股骨骨小梁骨密度、骨体积分数、骨小梁数量、骨小梁分离度、骨小梁厚度及胫骨组织中 SRC mRNA、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1 (phosphatidylinositol-3-

kinase regulatory subunit 1, PI3KR1) mRNA、促分裂原活化的蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3) mRNA 表达水平的组间总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 网络药理学研究结果

3.1.1 参威骨痹汤活性成分筛选及靶点预测结果

采用 UHPLC-QE-MS 技术从参威骨痹汤水煎液中共鉴定出 983 种化合物,通过 Compound Discoverer3.1 软件检索共确定 82 种化合物,通过在相关数据库检索分析,共得到对应靶点 1012 个。

3.1.2 参威骨痹汤治疗 OP 靶点预测结果 共检索到 5435 个 OP 疾病靶点,通过与 1012 个药物靶点交集后共得到 560 个共有靶点(图 1)。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'—3')
SRC	上游引物 CCTGGTGCTCCTTCTGTTCTCCTC 下游引物 TGCCGACTTGAAGCCACTCTC
促分裂原活化的蛋白激酶 3	上游引物 AGGAGCGGCTGAAGGAGTTG 下游引物 GCAGAGAAGGAGCAGGTAGGAG
磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1	上游引物 ACAGTAGGAGGAGGTTGGAAGAAG 下游引物 TGCCTCAGCCACATCAAGTATTG

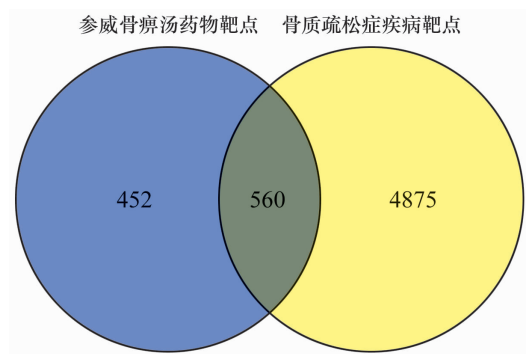
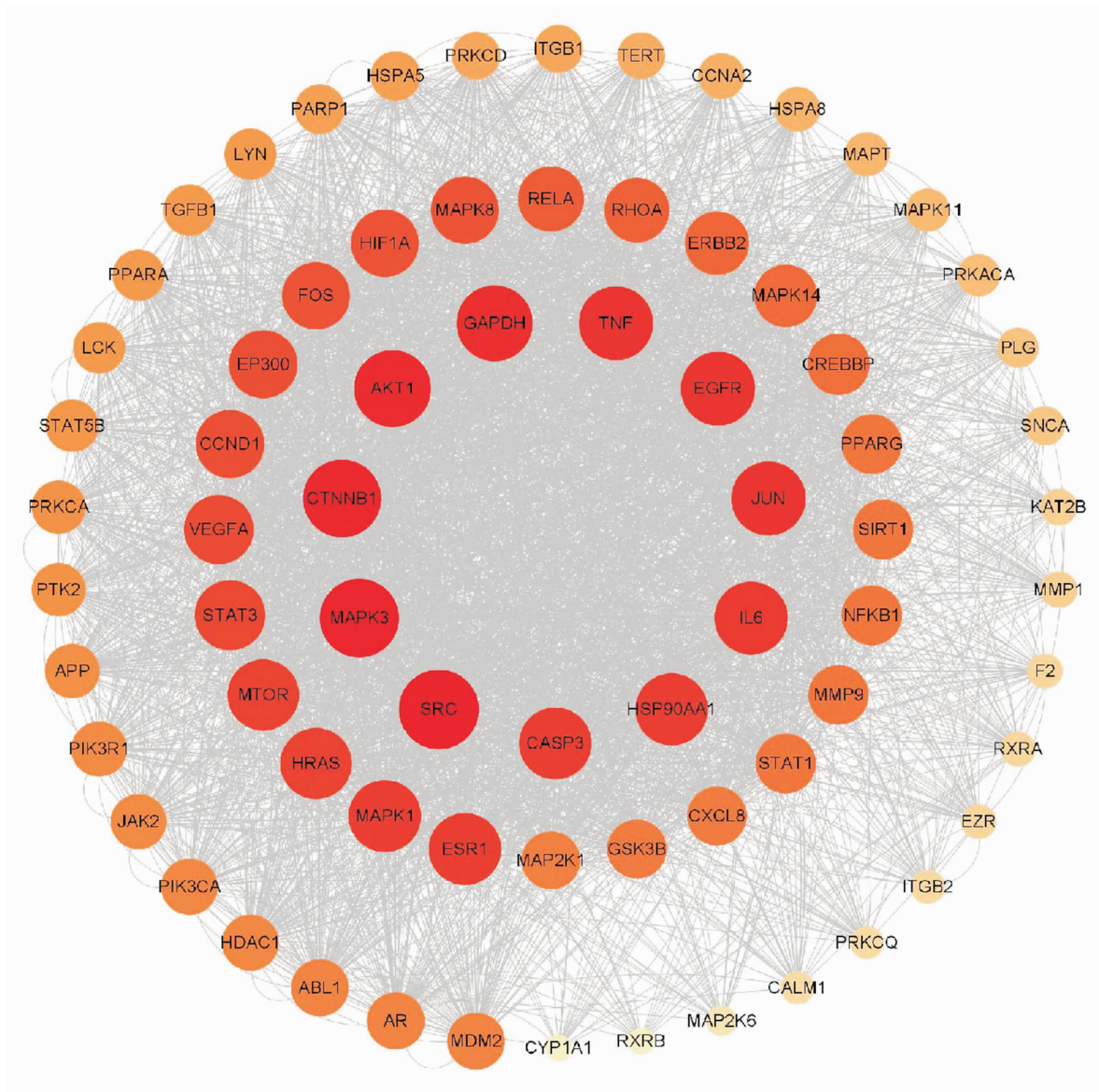


图 1 参威骨痹汤治疗骨质疏松症靶点预测韦恩图

3.1.3 参威骨痹汤治疗 OP 关键靶点筛选结果 将确定的 560 个参威骨痹汤治疗 OP 的靶点基因上传至 STRING 数据库,构建的蛋白质互作网络包括 421 个节点。拓扑分析结果显示,自由度均值为 23.410 926 37、中介中心性均值为 0.005 701 549、接近中心性均值为 0.354 304 109、特征向量中心性均值为 0.105 337 824、局部边连通性均值为 20.919 922 19,其中中介中心性、接近中心性、特征向量中心性大于 2 倍均值的靶点较少,故以自由度、中介中心性大于 2 倍均值进行筛

选。设置自由度 > 46.821 852 74、中介中心性 > 0.011 403 09,得到 73 个靶点,其中 SRC、MAPK3、MAPK1、PI3KR1、信号转导及转录活化因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 等靶点的度值较高,为关键靶点(图 2)。

3.1.4 参威骨痹汤治疗 OP 靶点基因功能及信号通路分析结果 KEGG 通路富集分析共得到 190 条信号通路,根据靶点基因数量,筛选出 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路等 19 条主要信号通路(图 3)。GO 功能富集分析共得到 1898 个条目,其中生物过程 1390 个、细胞组成 172 个、分子功能 336 个。生物过程主要包括 MAPK 活性正向调节、炎症反应、正向调控细胞迁移、正向调控血管生成、负向调控细胞凋亡过程等,细胞组成主要包括细胞膜、细胞质、膜筏、质膜的组成成分、顶端质膜、细胞外泌体等,分子功能主要包括蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白结合、酶结合、肽酶结合、整合素结合等(图 4)。



节点越大、颜色越深,代表度值越大,说明靶点在网络中越重要。

图 2 参威骨痹汤治疗骨质疏松症关键靶点蛋白互作网络图

3.1.5 参威骨痹汤治疗 OP 关键活性成分筛选结果

构建的参威骨痹汤治疗 OP 活性成分-关键靶点网络共有 182 个节点,其中活性成分 109 个、靶点 73 个(图 5)。以自由度为主要参数、中介中心性为次要参数、接近中心性为第 3 参数,筛选出的关键活性成分包括五味子丙素、10-姜酚、对羟基苯甲酸丁酯、倍半萜内酯和香豆雌酚。见表 2。

3.2 分子对接验证结果

分子对接结果显示,参威骨痹汤治疗 OP 关键活性成分与关键靶点的结合能均小于 $-5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,表明结合效果良好,其中靶点 SRC、MAPK3、PI3KR1 与活性成分五味子丙素、10-姜酚、对羟基苯甲酸丁酯的

结合效果更好(表 3、图 6)。

3.3 动物实验验证结果

3.3.1 股骨 Micro-CT 检查结果 5 组小鼠骨小梁骨密度、骨小梁分离度、骨小梁厚度组间总体比较,差异均无统计学意义。模型组的骨体积分数低于假手术组和参威骨痹汤中、高剂量组($P=0.012, P=0.011, P=0.001$),其余各组骨体积分数的组间差异均无统计学意义。模型组的骨小梁数量少于假手术组和参威骨痹汤中、高剂量组($P=0.019, P=0.001, P=0.001$),其余各组骨小梁数量的组间差异均无统计学意义。见图 7、表 4。

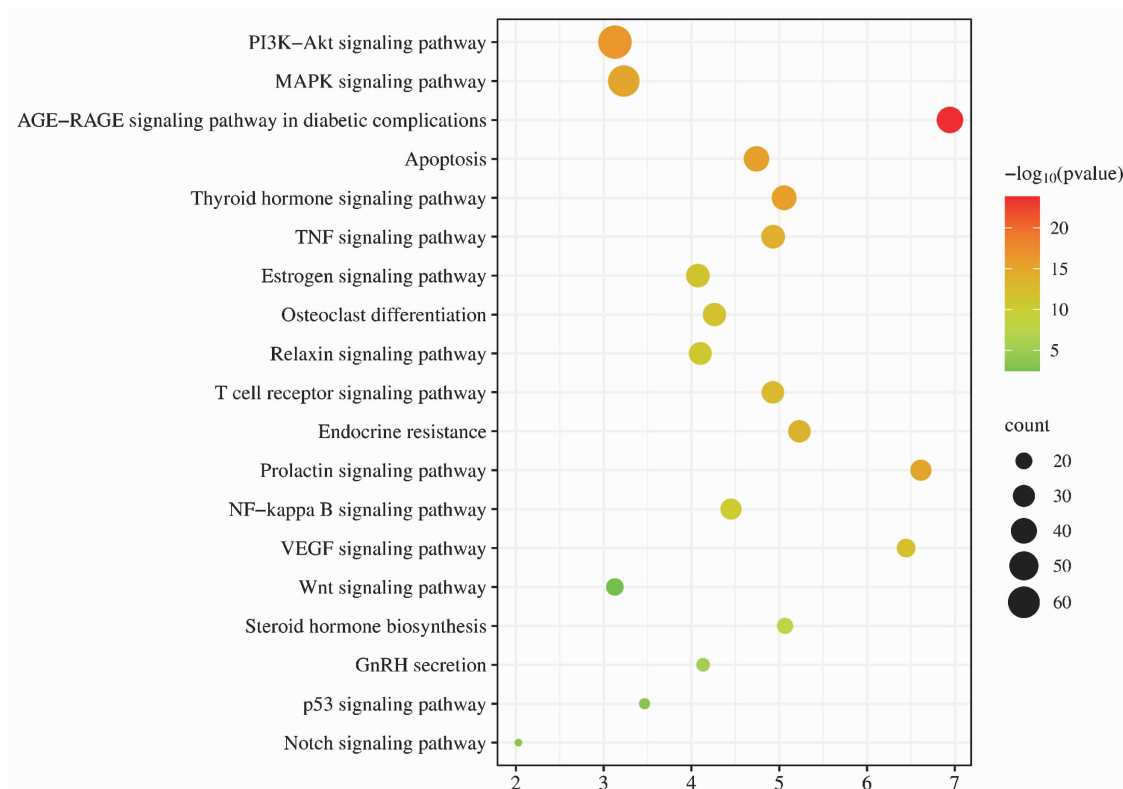


图3 参威骨痹汤治疗骨质疏松症靶点 KEGG 通路富集分析气泡图(前 19 位)

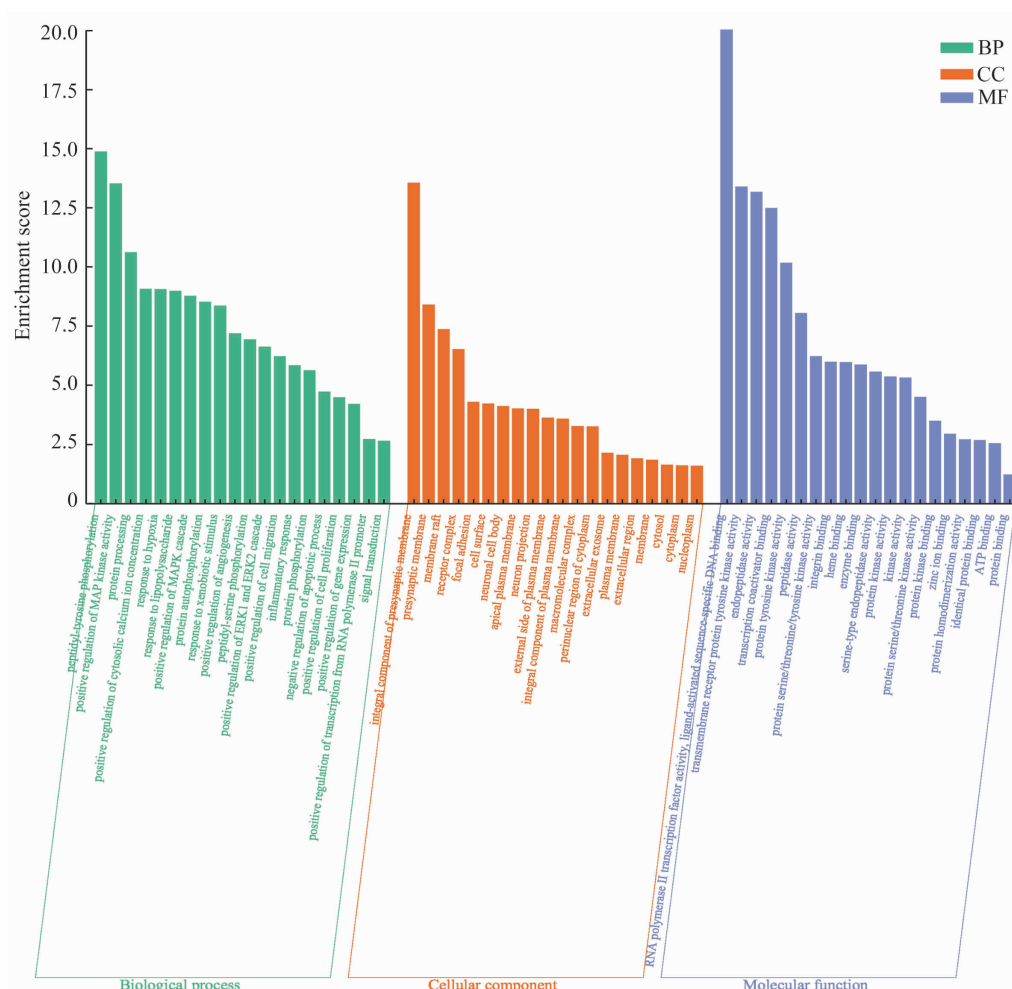
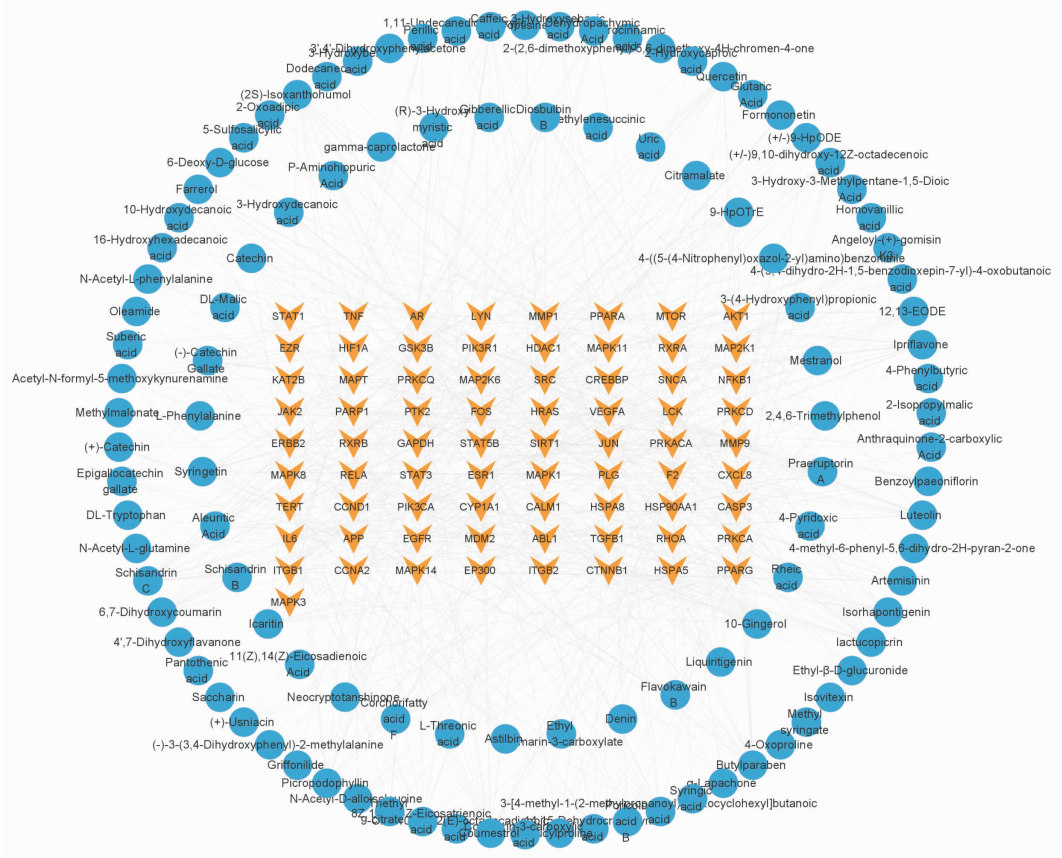


图4 参威骨痹汤治疗骨质疏松症靶点 GO 功能富集分析柱状图(前 20 位)



黄色节点代表作用靶点,蓝色节点代表活性成分。

图 5 参威骨痹汤治疗骨质疏松症活性成分-关键靶点网络图

表 2 参威骨痹汤治疗骨质疏松症关键活性成分

名称	自由度	中介中心性	接近中心性
五味子丙素	19	0.024 184 315	0.381 037 567 084 078 7
10-姜酚	18	0.021 967 092	0.373 029 772 329 246 9
对羟基苯甲酸丁酯	16	0.023 504 861	0.381 037 567 084 078 7
倍半萜内酯	16	0.014 177 265	0.353 233 830 845 771 2
香豆雌酚	15	0.014 996 504	0.365 351 629 502 572 9

表 3 参威骨痹汤治疗骨质疏松症关键活性成分与关键靶点分子对接结合能

靶点	活性成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
SRC	五味子丙素	-5.796
	10-姜酚	-7.097
	对羟基苯甲酸丁酯	-5.072
促分裂原活化的蛋白激酶 3	五味子丙素	-6.144
	10-姜酚	-7.859
	对羟基苯甲酸丁酯	-5.100
磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1	五味子丙素	-5.591
	10-姜酚	-6.007
	对羟基苯甲酸丁酯	-5.302

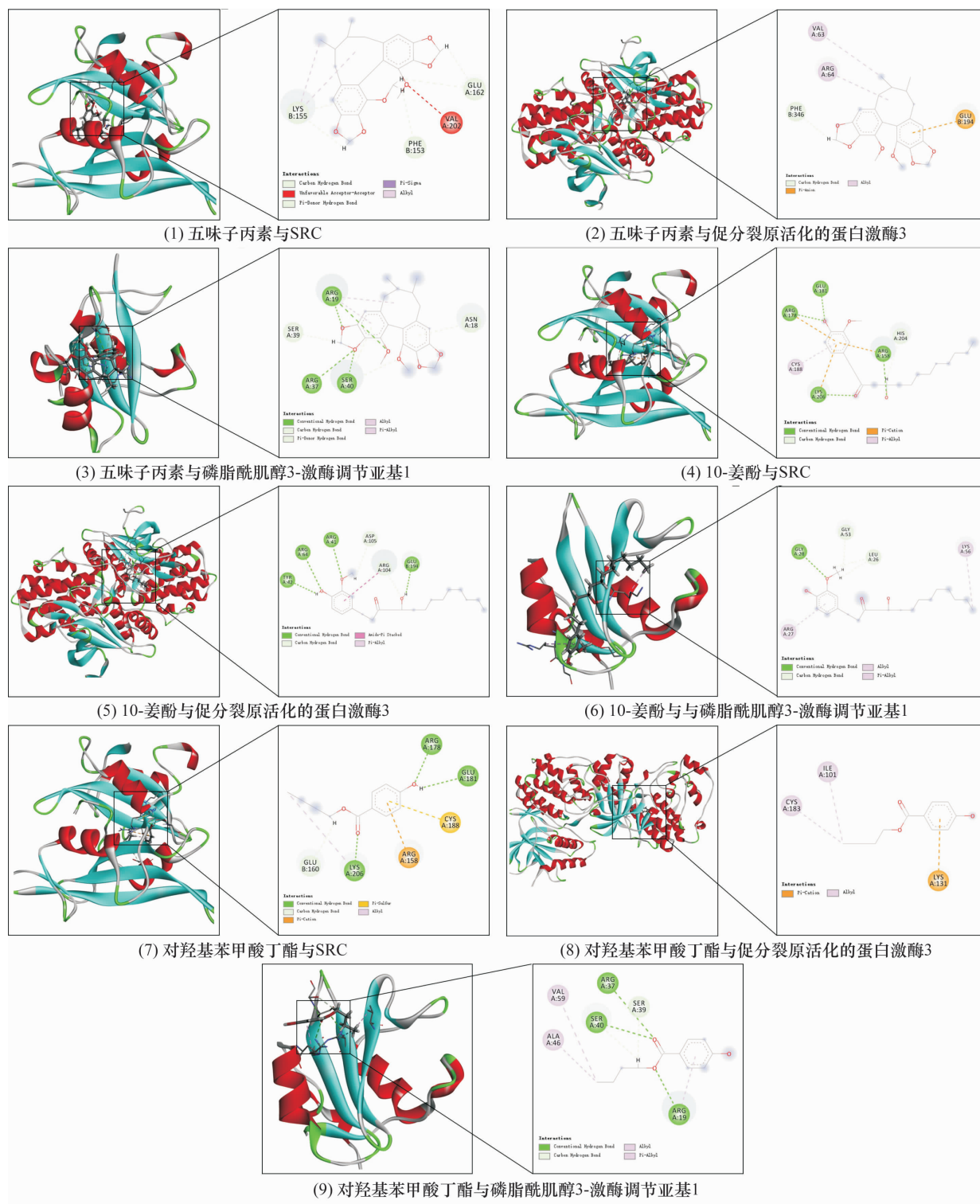


图6 参威骨痹汤治疗骨质疏松症主要活性成分和核心靶点分子对接结果

3.3.2 股骨组织病理学观察结果 HE 染色和 TRAP 染色结果显示,与假手术组相比,其余 4 组小鼠股骨骨小梁数量减少,厚度变薄,髓腔内骨髓细胞脂肪化程度增加,破骨细胞数量增多;与模型组相比,参威骨痹汤低、中、高剂量组小鼠股骨微结构改善,骨髓细胞脂肪化程度降低,破骨细胞数量减少,其中参威骨痹汤中剂量组改善效果更明显(图 8)。

3.3.3 胫骨组织中关键靶点基因 mRNA 水平测定结果 根据分子对接结果、股骨 Micro-CT 检查结果及股骨组织病理学观察结果,最终选择比较假手术组、模型组及参威骨痹汤中剂量组小鼠胫骨组织中 SRC mRNA、PI3KR1 mRNA、MAPK3 mRNA 表达水平。结果显示:假手术组和参威骨痹汤中剂量组的 SRC mRNA 表达水平均低于模型组 ($P = 0.001$, $P =$

0.001);模型组的 PI3KR1 mRNA 表达水平低于假手术组 ($P = 0.004$),模型组与参威骨痹汤中剂量组 PI3KR1 mRNA 表达水平的差异无统计学意义 ($P = 0.081$);假手术组和参威骨痹汤中剂量组的 MAPK3 mRNA 表达水平均低于模型组 ($P = 0.044, P = 0.001$)。见表 5。

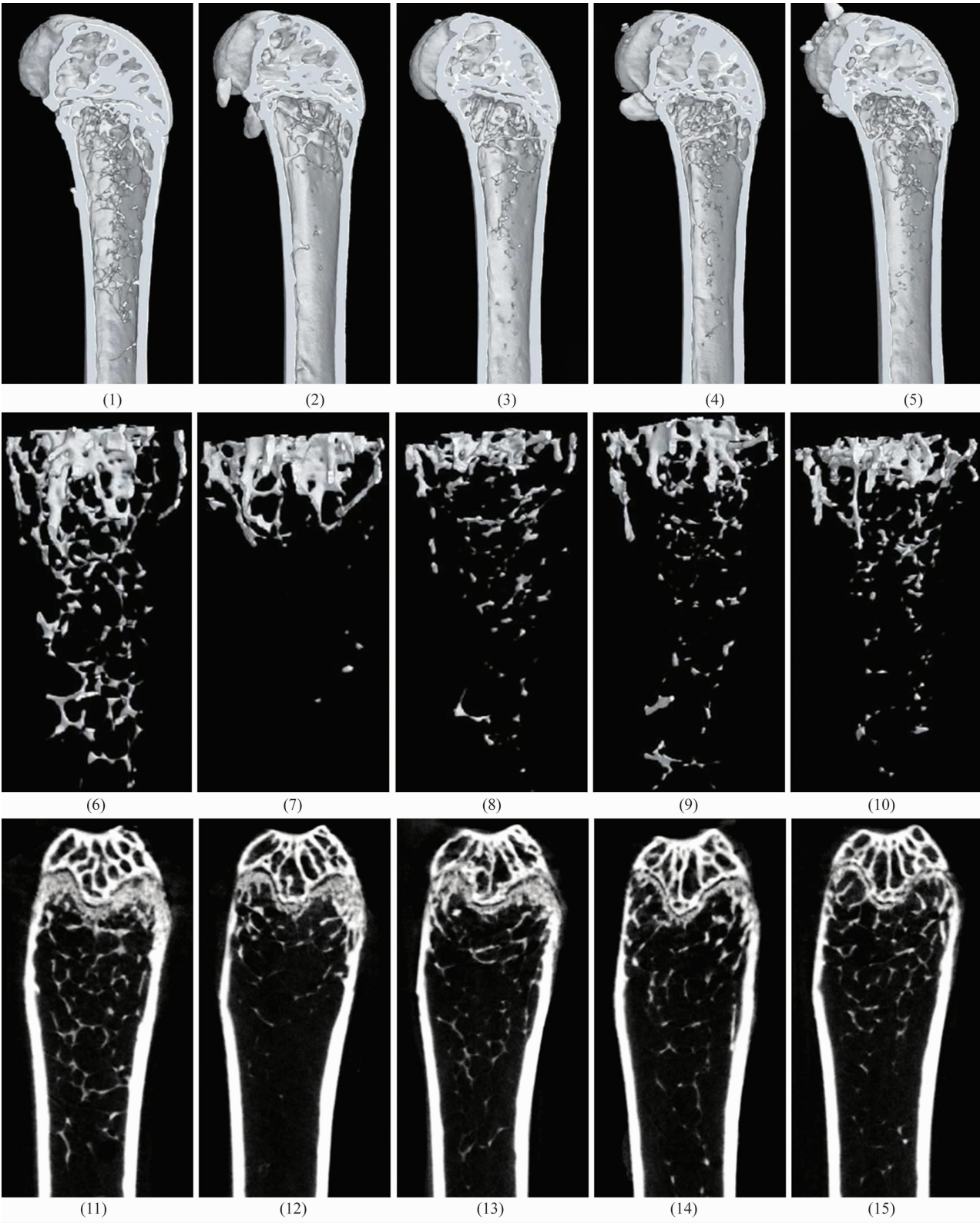
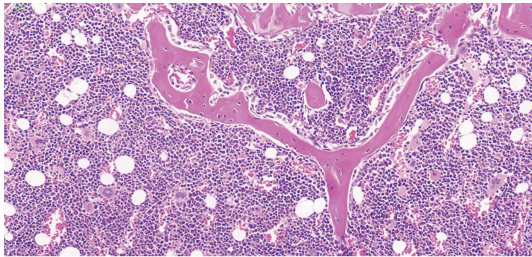


图 7 5 组小鼠股骨远端 Micro-CT 图像

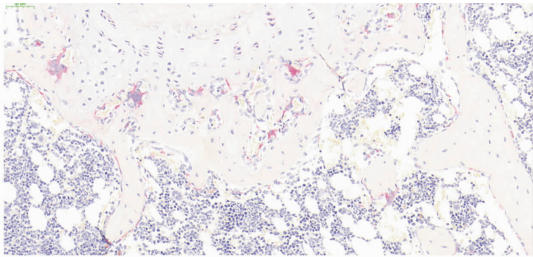
注:(1)(2)(3)(4)(5)分别为假手术组、模型组和参威骨痹汤低、中、高剂量组小鼠股骨远端 CT 三维图像;(6)(7)(8)(9)(10)分别为各组小鼠股骨远端骨小梁 CT 三维图像;(11)(12)(13)(14)(15)分别为各组小鼠股骨远端 CT 二维图像。

表 4 5 组小鼠股骨远端 Micro-CT 检查结果

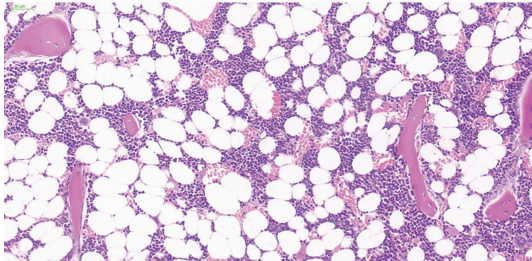
组别	样本量/ 只	骨小梁骨密度/ ($\bar{x} \pm s, \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	骨小梁数量/ ($\bar{x} \pm s, \text{个} \cdot \text{mm}^{-1}$)	骨体积分数/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	骨小梁分离度/ ($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)	骨小梁厚度/ ($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)
假手术组	3	0.413 ± 0.021	1.424 ± 0.164	11.128 ± 1.272	0.276 ± 0.021	0.073 ± 0.002
模型组	3	0.373 ± 0.006	1.050 ± 0.042	7.909 ± 0.212	0.322 ± 0.032	0.072 ± 0.003
参威骨痹汤低剂量组	3	0.393 ± 0.029	1.286 ± 0.231	9.720 ± 2.070	0.290 ± 0.022	0.078 ± 0.003
参威骨痹汤中剂量组	3	0.403 ± 0.012	1.406 ± 0.061	11.744 ± 1.480	0.288 ± 0.021	0.079 ± 0.002
参威骨痹汤高剂量组	3	0.393 ± 0.005	1.327 ± 0.049	10.904 ± 0.520	0.275 ± 0.004	0.075 ± 0.003
F 值		2.250	4.097	3.848	2.301	3.331
P 值		0.136	0.032	0.038	0.130	0.056



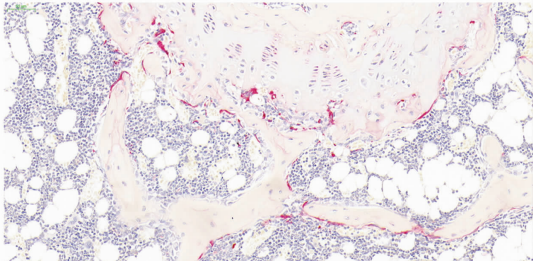
(1) 假手术组HE染色



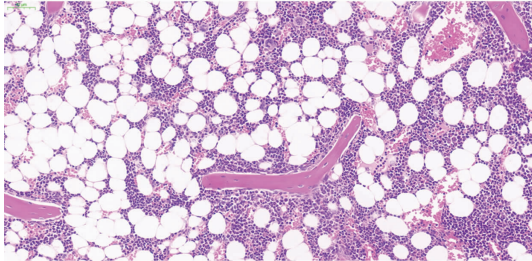
(2) 假手术组TRAP染色



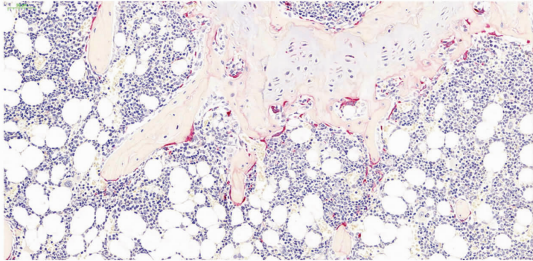
(3) 模型组HE染色



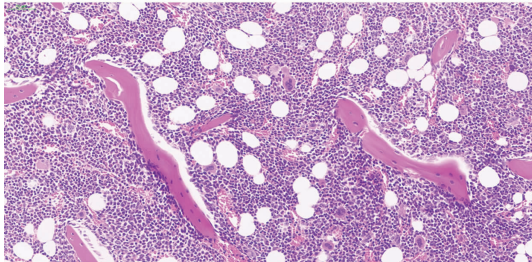
(4) 模型组TRAP染色



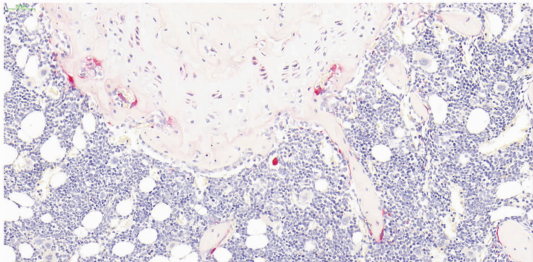
(5) 参威骨痹汤低剂量组HE染色



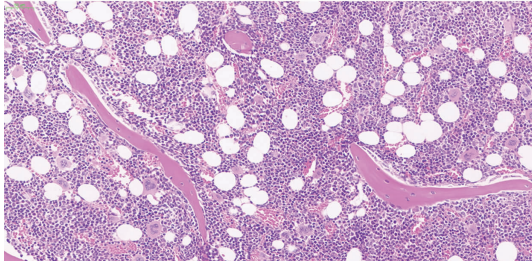
(6) 参威骨痹汤低剂量组TRAP染色



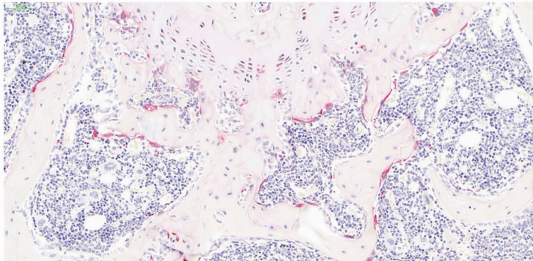
(7) 参威骨痹汤中剂量组HE染色



(8) 参威骨痹汤中剂量组TRAP染色



(9) 参威骨痹汤高剂量组HE染色



(10) 参威骨痹汤高剂量组TRAP染色

TRAP 为抗酒石酸性磷酸酶。

图 8 5 组小鼠股骨组织 HE 染色与抗酒石酸性磷酸酶染色图片 (×400)

表 5 5 组小鼠胫骨组织中关键靶点基因 mRNA 水平测定结果

组别	样本量/只	SRC mRNA($\bar{x} \pm s$)	PI3KR1 ¹⁾ mRNA($\bar{x} \pm s$)	MAPK3 ²⁾ mRNA($\bar{x} \pm s$)
假手术组	3	0.263 ± 0.110	1.283 ± 0.305	0.639 ± 0.210
模型组	3	1.567 ± 0.241	0.194 ± 0.181	1.003 ± 0.059
参威骨痹汤中剂量组	3	0.260 ± 0.028	0.533 ± 0.253	0.581 ± 0.228
F 值		71.886	17.782	9.253
P 值		0.000	0.003	0.015

注:PI3KR1 为磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1,MAPK3 为促分裂原活化的蛋白激酶 3。

4 讨 论

OP 在中医学中应归属于“骨痿”“骨痹”等范畴^[6-8],其病位在骨,与肾、肝、脾关系密切。参威骨痹汤的主要组成药物有小红参、威灵仙、牛膝、桑寄生、杜仲、独活、川芎、当归等。小红参为云南道地药材,为茜草科植物云南茜草的根,该药能入血补肝,兼能滋补肾精,温阳散寒,又能祛风除湿,益气活血止痛。现代药理学研究发现,小红参具有抗炎和调节免疫的作用^[9-11]。威灵仙祛风除痹、通络止痛,可发挥免疫抑制的作用^[12]。牛膝、桑寄生、杜仲三药均可补益肝肾、强筋壮骨,可促进骨髓基质细胞成骨分化^[13-16]。独活祛风除湿、通痹止痛,可抑制核因子- κ B 受体激活蛋白配体诱导破骨细胞分化的活性^[17]。川芎、当归活血、补血,可以发挥抗炎止痛的作用^[18-19]。综上所述,参威骨痹汤补益肝肾、祛风除湿、散寒蠲痹、舒利关节的功效可能与现代药理学中改善骨代谢、促进成骨分化、抗炎止痛的作用有关。

本研究利用 UHPLC-QE-MS 技术分析了参威骨痹汤的活性成分,通过网络药理学方法预测了参威骨痹汤治疗 OP 的关键活性成分、关键靶点及作用机制,再以分子对接技术锁定结合效果最好的 3 个靶点基因——SRC、PI3KR1、MAPK3,最后通过动物实验进行了验证。SRC 是一种重要的细胞信号受体激酶^[20],对骨代谢具有重要的调节作用。研究表明,SRC 缺失可导致小鼠发生骨硬化症^[21],使用 SRC 抑制剂可促进成骨细胞形成,减少骨表面侵蚀^[22],抑制 SRC 表达可明显减少破骨细胞数量^[23]。但 Marzia 等^[24]的研究发现,敲除 SRC 基因可以使碱性磷酸酶活性降低,进而抑制成骨细胞分化。这表明 SRC 具有双向调节骨代谢的作用。本研究中,SRC 在模型组中高表达,而经参威骨痹汤干预后 SRC 表达水平明显降低,表明参威骨痹汤可能通过抑制 SRC 表达来发挥抗骨质疏松的作用。PI3K 是一种存在于细胞质中的脂质激酶,由 3 个亚基组成,其中 PI3KR1 是一种与骨形成密

切相关的关键介质^[25],被认为与骨代谢关系密切。研究表明,抑制 PI3KR1 表达可以抑制成骨细胞增殖,并诱导小鼠胚胎成骨细胞前体凋亡^[26]。PI3K 信号通路与骨代谢之间也存在密切联系。许多中药的有效成分可以通过抑制 PI3K 通路抑制破骨细胞生成,从而减缓骨质流失^[27-28]。但也有研究发现,激活 PI3K 信号通路可以抑制 OP 的发生^[29]。这表明 PI3K 信号通路对 OP 的发生发展也具有双向调节作用。本研究中,模型组 PI3KR1 表达量较假手术组明显降低,给药后出现升高趋势,表明参威骨痹汤可能通过上调 PI3KR1 表达来发挥抗骨质疏松作用。MAPK 是细胞外信号调节激酶-MAPK 信号通路中一种关键的细胞信号分子。多项研究发现,抑制 MAPK 信号通路,可抑制破骨细胞分化,延缓骨质流失^[30-33];增强 MAPK 信号传导,可以促进破骨细胞相关基因 mRNA 表达^[34-35]。这提示 MAPK 信号通路可能在骨代谢中发挥负向调节作用。MAPK3 是 MAPK 的重要亚型^[36],是细胞凋亡信号通路中的刺激因子^[37],在 MAPK 信号通路中发挥重要作用^[38]。本研究中,MAPK3 在模型组中高表达,经参威骨痹汤干预后,表达量明显降低。这表明参威骨痹汤可能通过抑制 MAPK3 表达发挥抗骨质疏松作用。综上所述,参威骨痹汤可能通过调控上述 3 个靶点基因发挥调节骨代谢,抗骨质疏松的作用。

本研究的结果提示,参威骨痹汤治疗 OP 的机制可能是通过五味子丙素、10-姜酚、对羟基苯甲酸丁酯等成分调控 SRC、PI3KR1、MAPK3 的表达来调节骨代谢。今后我们将对参威骨痹汤治疗 OP 的信号通路及有效成分进行深入挖掘。

参考文献

[1] NOH J Y, YANG Y, JUNG H. Molecular mechanisms and emerging therapeutics for osteoporosis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (20) :7623.

[2] NGUYEN D T, HO-LE T P, PHAM L, et al. BONEcheck: a

- digital tool for personalized bone health assessment[J]. *Osteoporos Sarcopenia*, 2023, 9(3): 79–87.
- [3] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317–318.
- [4] 李律宇, 杨春艳, 侯敏, 等. 参威骨痹汤治疗肝肾亏虚、寒湿痹阻型骨关节炎 103 例临床观察[J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(4): 67–69.
- [5] KIM Y, BRODT M D, TANG S Y, et al. MicroCT for scanning and analysis of mouse bones[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2230: 169–198.
- [6] 彭广, 葛殊玮, 王凡, 等. 孙达武教授治疗老年性骨质疏松症临证经验[J]. 光明中医, 2024, 39(2): 251–254.
- [7] 郭超, 张兴彩, 王卫国, 等. 基于网络药理学探讨“山药-杜仲”药对治疗骨质疏松症的作用机制[J]. 西部中医药, 2024, 37(2): 48–53.
- [8] 王柳蕴, 李芸佳, 胡熠婷, 等. 基于脏腑理论探讨骨质疏松症的治疗[J]. 光明中医, 2023, 38(17): 3479–3482.
- [9] 张希, 东方梓涵, 李江, 等. 小红参免疫作用及质量标志物预测分析[J]. 亚太传统医药, 2022, 18(7): 193–197.
- [10] 张光云, 童英, 杨丽萍, 等. 小红参临床应用与药理学研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(12): 51–54.
- [11] 李慧, 包永睿, 王帅, 等. 中药茜草抗氧化、抗炎、抗肿瘤不同药用部位精准研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(3): 401–407.
- [12] 赵继荣, 杨文通, 陈文, 等. 威灵仙有效化学成分及镇痛机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9): 9–12.
- [13] 郎小琴, 高越, 周叶, 等. 牛膝多糖对老年骨质疏松大鼠模型骨代谢及生物力学特征的影响[J]. 中华全科医学, 2019, 17(4): 547–550.
- [14] 王艳, 周广举, 严宗逊, 等. 川牛膝在去卵巢大鼠体内的骨保护作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(8): 918–921.
- [15] 董佳梓, 鞠大宏, 贾朝娟, 等. 桑寄生、枸杞子、桑椹对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(6): 483–486.
- [16] 熊伟, 赵亮. 盐炙杜仲对维甲酸诱导骨质疏松大鼠生化指标及骨密度的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(8): 1866–1867.
- [17] 曹刘丹, 胡晨, 顾琼, 等. 独活化学成分及抗骨质疏松活性评价[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(12): 2918–2923.
- [18] 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: 45–56.
- [19] 马艳春, 吴文轩, 胡建辉, 等. 当归的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 111–114.
- [20] THOMAS S M, BRUGGE J S. Cellular functions regulated by Src family kinases[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997, 13: 513–609.
- [21] BOYCE B F, YONEDA T, LOWE C, et al. Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice[J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(4): 1622–1627.
- [22] ZHENG L Z, WANG X L, CAO H J, et al. Src siRNA prevents corticosteroid-associated osteoporosis in a rabbit model[J]. *Bone*, 2016, 83: 190–196.
- [23] SALVADORI L, BELLADONNA M L, CASTIGLIONI B, et al. Kymasin up natural product inhibits osteoclastogenesis and improves osteoblast activity by modulating Src and p38 MAPK[J]. *Nutrients*, 2022, 14(15): 3503.
- [24] MARZIA M, SIMS N A, VOIT S, et al. Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation[J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(2): 311–320.
- [25] TANIGUCHI C M, EMANUELLI B, KAHN C R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2): 85–96.
- [26] MI B, XIONG Y, CHEN L, et al. CircRNA AFF4 promotes osteoblast cells proliferation and inhibits apoptosis via the Mir-7223-5p/PIK3R1 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24): 11988–12001.
- [27] CUI J, LI X, WANG S, et al. Triptolide prevents bone loss via suppressing osteoclastogenesis through inhibiting PI3K-AKT-NFATc1 pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 6149–6161.
- [28] HAN J, LI L, ZHANG C, et al. Eucommia, cuscutea, and drynaria extracts ameliorate glucocorticoid-induced osteoporosis by inhibiting osteoclastogenesis through PI3K/Akt pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 772944.
- [29] LI M, YANG N, HAO L, et al. Melatonin inhibits the ferroptosis pathway in rat bone marrow mesenchymal stem cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling axis to attenuate steroid-induced osteoporosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022: 8223737.
- [30] ZHANG Y T, HU C, ZHANG S X, et al. Euphoesulatin a prevents osteoclast differentiation and bone loss via inhibiting RANKL-induced ROS production and NF- κ B and MAPK signal pathways[J]. *Bioorg Chem*, 2022, 119: 105511.

- [3] 王眠龙. 仙灵骨葆胶囊治疗骨质疏松症导致腰腿痛的典型病例报告[J]. 海峡药学, 1999, 11(S2): 92-93.
- [4] 胡彩仙, 程梅芬. 仙灵骨葆胶囊治疗骨质疏松症 30 例的临床观察[J]. 中成药, 2000, 22(3): 246-247.
- [5] 方向明, 王蓬华, 杨强. 仙灵骨葆治疗老年性骨质疏松症的疗效观察[J]. 现代康复, 2001, 5(6): 87.
- [6] 邵光湘, 韩铭, 韩琳. 仙灵骨葆胶囊治疗酒精性股骨头坏死的临床观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(S2): 106-108.
- [7] 尚玉敏, 刘艳艳, 李惠萍. 仙灵骨葆胶囊治疗绝经后骨质疏松症的临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(1): 55.
- [8] 吴鹏强, 徐花兰. 仙灵骨葆胶囊防治老年性胸腰椎骨质疏松症[J]. 浙江中西医结合杂志, 2007, 17(7): 429-430.
- [9] 吴剑, 鲍同柱, 鄢飞, 等. 栀子粉外敷加仙灵骨葆治疗膝骨性关节炎[J]. 山东中医杂志, 2008, 27(9): 594-595.
- [10] 崔书国, 赵建, 崔喜双. 仙灵骨葆配合中药熏洗治疗膝骨性关节炎 60 例[J]. 河北中医药学报, 2008, 23(3): 26-27.
- [11] 魏书亭. 仙灵骨葆胶囊配合阿伦磷酸钠治疗原发性骨质疏松症 98 例疗效观察[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(1): 173-174.
- [12] 赵杨, 王广宏. 仙灵骨葆联合玻璃酸钠治疗膝关节骨性关节炎的临床观察[J]. 中医药信息, 2011, 28(4): 86-87.
- [13] 邵亚超. 仙灵骨葆联合玻璃酸钠治疗膝骨性关节炎 46 例[J]. 中国药业, 2015, 24(4): 88.
- [14] 陈少初, 胡益雄, 赖俊成, 等. 医用臭氧联合仙灵骨葆胶囊治疗膝骨性关节炎 40 例疗效观察[J]. 海南医学, 2013, 24(7): 960-963.
- [15] 钟芳晓, 王武琦. 仙灵骨葆胶囊联合医用臭氧对膝骨性关节炎疼痛及膝关节功能影响的分析[J]. 新中医, 2015, 47(8): 120-122.
- [16] 吴中琴. 仙灵骨葆胶囊合用钙尔奇 D 治疗女性绝经后骨质疏松症的疗效观察[J]. 海峡药学, 2010, 22(12): 159-160.
- [17] 冯炎林, 陈文钦, 吴奋飞. 仙灵骨葆、福善美联合钙尔奇 D 治疗骨质疏松的效果比较[J]. 海峡药学, 2013, 25(6): 163-164.
- [18] 鲍军国, 李新春. 仙灵骨葆胶囊联合钙尔奇 D 和阿仑膦酸钠片治疗老年骨质疏松的疗效比较研究[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(4): 784-785.
- [19] 汪发莲, 杨生仁, 李舜君, 等. 仙灵骨葆胶囊联合阿仑膦酸钠对骨质疏松症患者的骨代谢及骨转换指标的影响[J]. 药物评价研究, 2020, 43(11): 2259-2262.
- [20] 吴耀华, 吴稀民, 付远亮, 等. 仙灵骨葆胶囊治疗骨质疏松症的疗效及对骨密度、骨代谢的影响[J]. 北方药学, 2022, 19(7): 65-67.
- [21] 潘方瑛, 张健儿, 郑美暄. 仙灵骨葆胶囊联合唑来膦酸盐、钙尔奇 D 治疗骨质疏松症疗效观察及对骨代谢指标的影响[J]. 新中医, 2022, 54(11): 138-141.
- [22] 酆妙尔, 苏进展, 宋侠, 等. 基于定量 CT 评价仙灵骨葆胶囊治疗骨质疏松的疗效分析[J]. 中国中医药科技, 2023, 30(5): 884-886.

(收稿日期: 2023-12-25 本文编辑: 吕宁)

(上接第 12 页)

- [31] XU M, SONG D, XIE X, et al. CGK733 alleviates ovariectomy-induced bone loss through blocking RANKL-mediated Ca^{2+} oscillations and NF- κ B/MAPK signaling pathways[J]. iScience, 2023, 26(10): 107760.
- [32] XIAO L, ZHONG M, HUANG Y, et al. Puerarin alleviates osteoporosis in the ovariectomy-induced mice by suppressing osteoclastogenesis via inhibition of TRAF6/ROS-dependent MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(21): 21706-21729.
- [33] LI X, JIANG J, YANG Z, et al. Galangin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis via inhibiting MAPK and NF- κ B signalling pathways [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(11): 4988-5000.
- [34] HOU G Q, GUO C, SONG G H, et al. Lipopolysaccharide (LPS) promotes osteoclast differentiation and activation by enhancing the MAPK pathway and COX-2 expression in RAW264.7 cells[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(2): 503-510.
- [35] ZHANG J, ZHENG X, ZHAO F, et al. UHMWPE wear particles and dendritic cells promote osteoclastogenesis of RAW264.7 cells through RANK-activated NF- κ B/MAPK/AKT pathways [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(9): 9400-9408.
- [36] ROSKOSKI R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation [J]. Pharmacol Res, 2012, 66(2): 105-143.
- [37] KYRIAKIS J M, AVRUCH J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 807-869.
- [38] HU X H, YANG X Y, LIAN J, et al. Moringa oleifera leaf attenuate osteoporosis in ovariectomized rats by modulating gut microbiota composition and MAPK signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 161: 114434.

(收稿日期: 2024-01-12 本文编辑: 李晓乐)