

基于网络药理学的杜仲干预创伤性股骨头坏死作用机制研究*

田涛涛, 石淇允[△], 李无阴[△]

(河南省洛阳正骨医院/河南省骨科医院, 河南 洛阳 471002)

摘要: **目的** 运用网络药理学来探索杜仲干预创伤性股骨头坏死可能的作用机制。**方法** 在中药系统药理学数据库与分析平台内检索杜仲(*Eucommia ulmoides*)的生物活性成分并进行筛选,并通过蛋白质数据库 Uniprot 筛选出各活性成分可能存在的靶点,通过 GeneCards 数据库挖掘创伤性股骨头坏死的相关的作用靶点。利用 PPI 数据库构建杜仲和创伤性股骨头坏死作用的交互靶标;并用 Cytoscape 软件构建“药物成分-靶点-疾病”复杂网络关系图,通过 STRING 数据库、生物学信息注释数据库(DAVID)和 KEGG Pathway 数据库等进行蛋白互作关系分析、靶点基因功能富集分析和信号通路分析。**结果** 筛选出杜仲生物活性成分 147 个,预测出杜仲与创伤性股骨头坏死相关的靶点 42 个。富集分析显示,杜仲干预创伤性股骨头坏死的关键靶点主要与骨代谢平衡、血管新生和炎症反应有关。**结论** 杜仲可以多靶点、多途径的来防治创伤性股骨头坏死。

关键词: 杜仲;创伤性股骨头坏死;网络药理学;靶点;信号通路

中图分类号: R274.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2019)04-0076-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.04.013

创伤性股骨头坏死是髋部受到损伤后引起的严重并发症,多数文献报道髋部损伤后其出现股骨头坏死率为 12%~86%^[1-2]。近年来,以股骨颈骨折为主的髋部损伤疾病逐年上升,且趋于低龄化^[3]。目前,多数指南建议对于 60 岁以上的患者可直接行髋关节置换来降低治疗后期出现坏死二次手术的概率。但对于中青年患者尚未形成统一治疗方案^[4]。中医药在治疗慢性复杂性疾病具有一定的优势,部分临床研究发现运用中医药来防治创伤性股骨头坏死的发生及发展效果良好,但中医治疗讲究中药君臣佐使联合用药,在治疗创伤性股骨头坏死也多采用复方^[5-6],因此,临床中对于每味中药的贡献值并不清晰。

杜仲,味甘,性温,归肝、肾经,具有补肝肾,强筋骨的作用。现代药理学已证实其主要含环烯醚萜类、黄酮类、苯丙素类、酚类等成分,但关于其具体作用机制的相关研究较少^[7-8]。杜仲治疗创伤性股骨头坏死是多靶点、多环节作用的共同结果,虽然临床中大量应用杜仲来治疗创伤性股骨头坏死并取得较好的疗

效,但多数研究仍针对单一的靶点进行分析,这不能全面整体的反应杜仲的作用机制^[9-10]。网络药理学遵循中医理论,综合现代医学理论与技术,能够整体、系统的分析杜仲改善创伤性股骨头坏死的机制。本研究采用网络药理学来探索杜仲干预创伤性股骨头坏死可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 药物活性成分的筛选 在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform)(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>)搜索关键词“杜仲”获得其活性成分信息,并设置其口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18 为筛选条件进行筛选。

1.2 药物作用靶点预测与疾病靶点查询 在 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)UniprotKB 检索功能对各靶点人类基因简称进行查询,获取杜仲可能存在的靶蛋白。在 GeneCards 数据库(<https://auth.lifemapsc.com>)中以“traumatic necrosis of femoral

收稿日期: 2019-08-10

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81874477);河南省中医药科学研究专项课题项目(2016ZY1010)

第一作者简介: 田涛涛(1984-),男,硕士,主治医师,研究方向:骨与关节创伤与感染修复。

[△]通信作者: 石淇允, E-mail: lyzgsqy@126.com;

李无阴, E-mail: lyzglwy2017@126.com

head”为检索词进检索,获取创伤性股骨头坏死已知的靶蛋白。

1.3 共同靶点的确定 采用 Venny 图获取药物(杜仲)靶点与疾病(创伤性股骨头坏死)靶点的交集为共同靶点。

1.4 成分-靶点网络构建 将确定的药物疾病共同靶点导入 Cytoscape3.7.2(美国),构建“成分-靶点”网络图。

1.5 蛋白相互网络的构建 将取交集后的靶点导入在线系统 String11.0(<http://string-db.org/>),获得蛋白

质相互作用(PPI)网络。

1.6 生物通路的分析 对杜仲的作用靶标进行基因本体论(GO)分析与京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路富集分析,得到通路富集结果,并绘制典型通路信息图。

2 结果

2.1 杜仲的活性成分及相应靶蛋白 在 TCMSPP 数据库中检索出 147 种杜仲活性成分,经过筛选得到符合标准的成分 28 种。表 1。

表 1 杜仲生物活性成分

序号	ID	活性成分	OB	DL
1	MOL009042	Helenalin	77.01	0.19
2	MOL009030	Dehydrodieugenol	30.1	0.24
3	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
4	MOL000073	ent-Epicatechin	48.96	0.24
5	MOL000098	quercetin	46.43	0.28
6	MOL008240	(E)-3-[4-[(1R,2R)-2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1-methylol-ethoxy]-3-methoxy-phenyl]acrolein	56.32	0.36
7	MOL009055	hirsutin_qt	49.81	0.37
8	MOL011604	Syringetin	36.82	0.37
9	MOL009053	4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol	50.76	0.39
10	MOL009029	Dehydrodiconiferyl alcohol 4,γ-di-O-β-D-glucopyranoside_qt	51.44	0.4
11	MOL009031	Cinchonan-9-al, 6'-methoxy-, (9R)-	68.22	0.4
12	MOL004367	olivil	62.23	0.41
13	MOL007059	3-β-Hydroxymethylenetanshiquinone	32.16	0.41
14	MOL006709	AIDS214634	92.43	0.55
15	MOL000443	Erythraline	49.18	0.55
16	MOL002773	β-carotene	37.18	0.58
17	MOL009015	(-)-Tabernemontanine	58.67	0.61
18	MOL002058	40957-99-1	57.2	0.62
19	MOL009009	(+)-medioresinol	87.19	0.62
20	MOL009047	(+)-Eudesmin	33.29	0.62
21	MOL000358	β-sitosterol	36.91	0.75
22	MOL005922	Acanthoside B	43.35	0.77
23	MOL000211	Mairin	55.38	0.78
24	MOL009057	liriodendrin_qt	53.14	0.8
25	MOL007563	Yangambin	57.53	0.81
26	MOL009027	Cyclopamine	55.42	0.82
27	MOL009038	GBGB	45.58	0.83
28	MOL009007	Eucommin A	30.51	0.85

2.2 药物靶点预测及共同靶点的确定 在 Uniprot 数据库中输入潜在靶标的 PDB ID,并剔除重复的基因靶标后共得到 102 个。在 GeneCards 数据库(<https://auth.lifemaps.com>)中以“traumatic necrosis of femoral

head”为检索词进检索,获取创已知的疾病靶点 542 个。取两者交集为共同靶点共 42 个。见图 1、表 2。

表 2 杜仲潜在靶标

序号	靶标	序号	靶标	序号	靶标
1	PTGS1	15	CYP1B1	29	HIF1A
2	PGR	16	GSTM1	30	ERBB2
3	CHRM2	17	ESR1	31	MYC
4	BCL2	18	HTR3A	32	NOS3
5	CASP9	19	DRD2	33	NFE2L2
6	CASP3	20	NR3C2	34	PARP1
7	CASP8	21	NR3C1	35	COL3A1
8	PRKCA	22	DRD4	36	CRP
9	PON1	23	EGFR	37	RUNX2
10	PPARG	24	ESR2	38	CTSD
11	CYP3A4	25	VEGFA	39	IGFBP3
12	ICAM1	26	FOS	40	IGF2
13	SELE	27	PLAU	41	ALB
14	VCAM1	28	IL6	42	CTNNB1

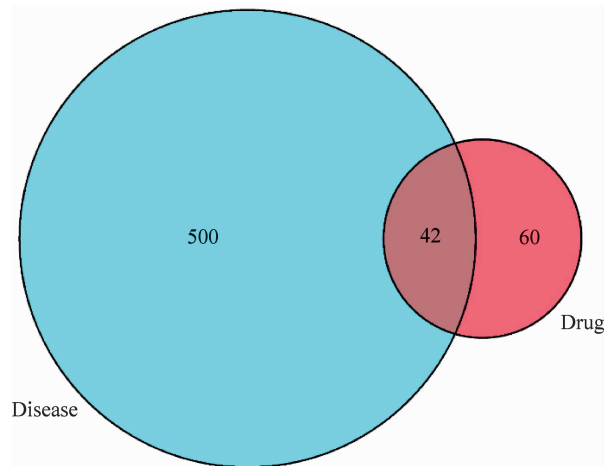


图 1 共同靶点

2.3 成分-靶点与疾病靶点网络 使用 Cytoscape 3.7.2 建立杜仲干预创伤性股骨头坏死网络图, 见图 2。该图中有靶蛋白的节点 58 个, 表示相互作用的线 149 条。

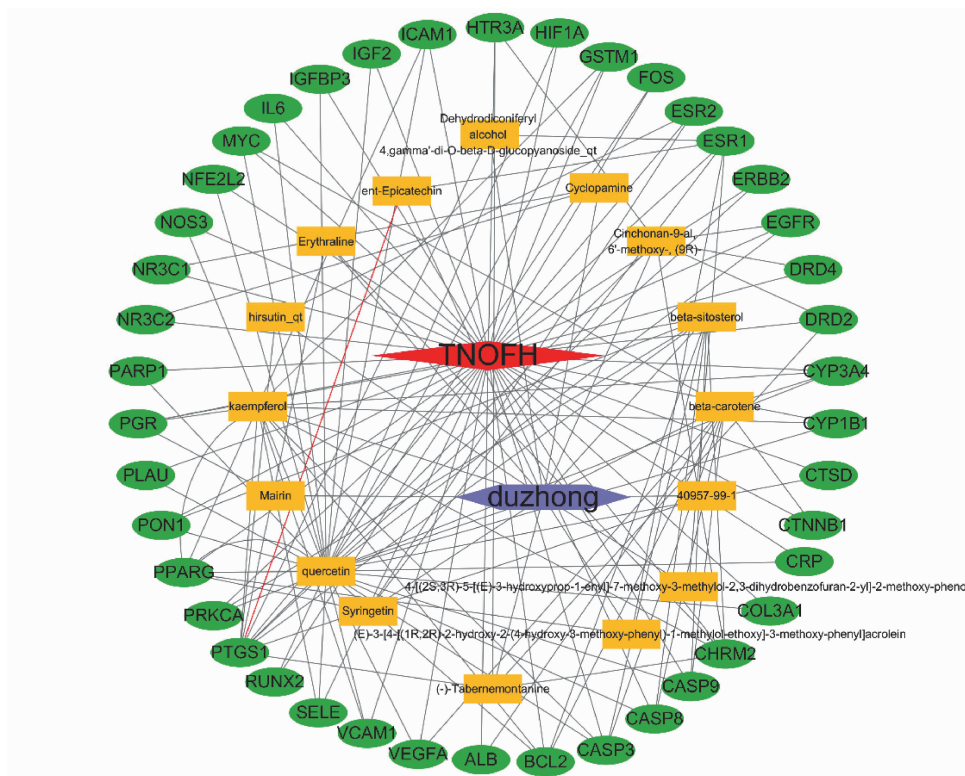


图 2 杜仲干预创伤性股骨头坏死成分-靶点网络图

2.4 蛋白质相互作用网络构建 使用 String 数据库获取杜仲与创伤性股骨头坏死相关靶标的相互作用关系, 导入 Cytoscape 软件, 构建靶标相互作用网络。网络图中共包含节点 42 个, 线 320 条。见图 3。

2.5 GO 生物学功能分析 将 42 个潜在靶点映射到 DAVID 数据库中, 进行生物学功能富集, 系统的分析其生物过程。共富集到 65 条生物过程, 其中 P ≤ 0.01 的生物过程共有 55 条。见图 4。

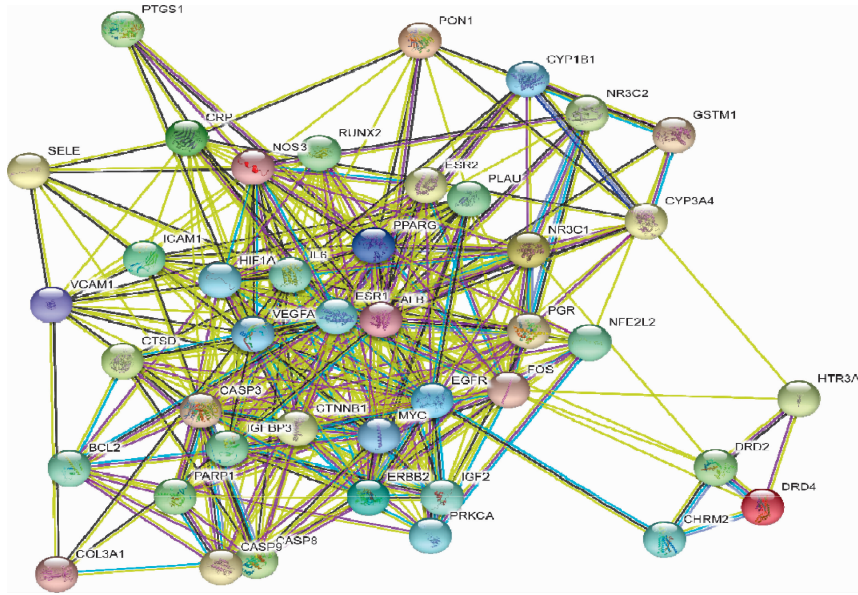


图 3 杜仲干预创伤性股骨头坏死 PPI 图

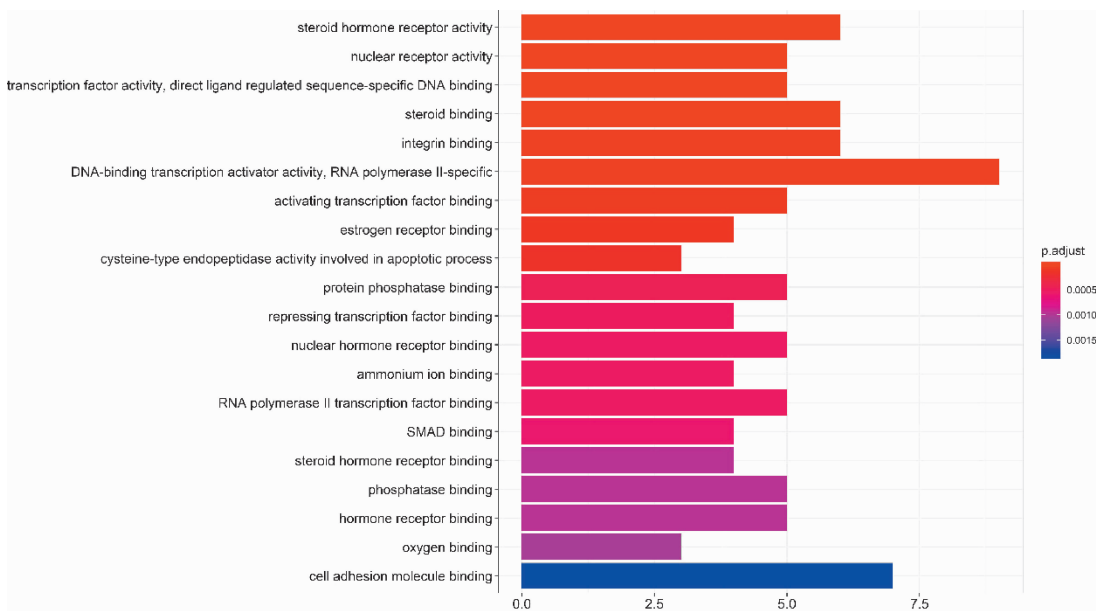


图 4 GO 功能富集分析条形图

2.6 KEGG 通路分析 通过 KEGG 通路富集分析, 筛选出 62($P \leq 0.01$)条通路与杜仲防治创伤性股骨头坏死的作用相关。见图 5。杜仲对 PI3K/Akt signaling pathway 信号通路作用靶点标注图。见图 6。

3 讨论

创伤性股骨头坏死是较为复杂的常见骨病之一,其发生发展受多种因素的调控^[11]。目前多数治疗仅能延缓疾病的进展^[12]。中医认为创伤性股骨头坏死多属于肾虚血瘀,是机体收到创伤后导致气血运行失常,前期以“瘀”为主要病机,疾病发展后期以

“虚-瘀”为主要特点^[13]。而杜仲是常用的补益类药物,大量治疗创伤性股骨头坏死的复方中均应用杜仲,但尚无研究提出杜仲为复方中主要改善创伤性股骨头坏死的药物。

本研究采用网络药理学的方法,发现杜仲的有效活性成分可能通过调节 PTGS1、BCL2、PON1、PPARG、ICAM1 等相关靶点来防治创伤性股骨头坏死^[14-16]。这些靶点主要为调控成骨细胞和破骨细胞的代谢平衡、促进或抑制血管的新生和凋亡、改善内环境的炎症反应等。将预测到的 42 个目标靶点导入

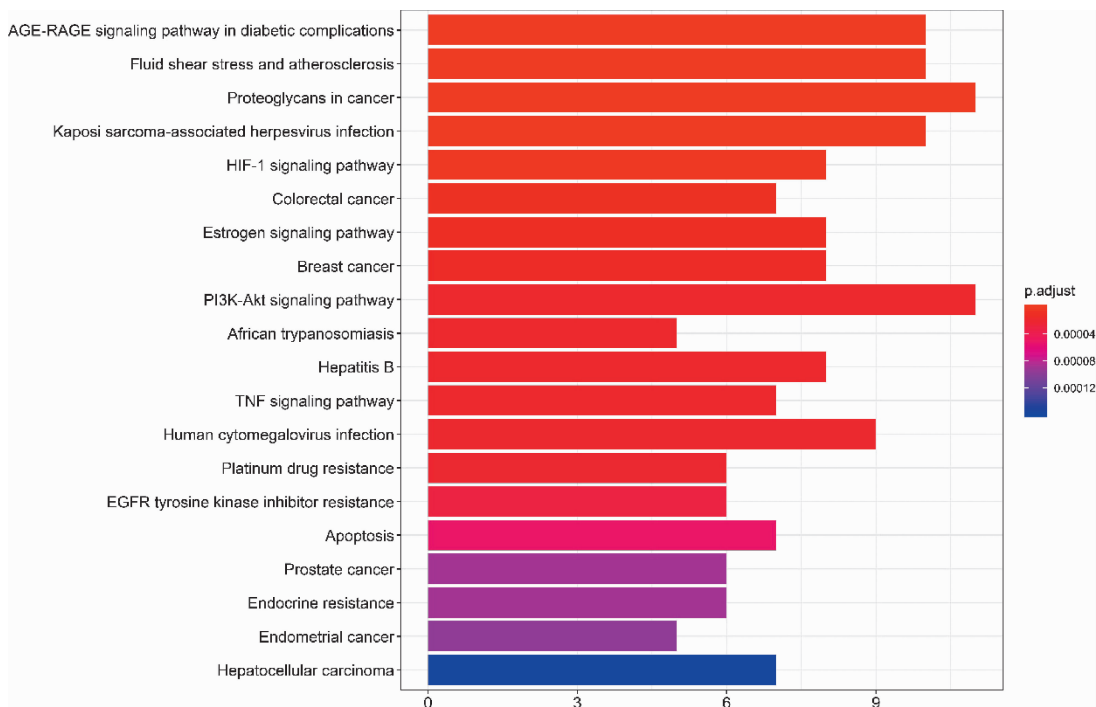


图 5 KEGG 通路富集分析条形图

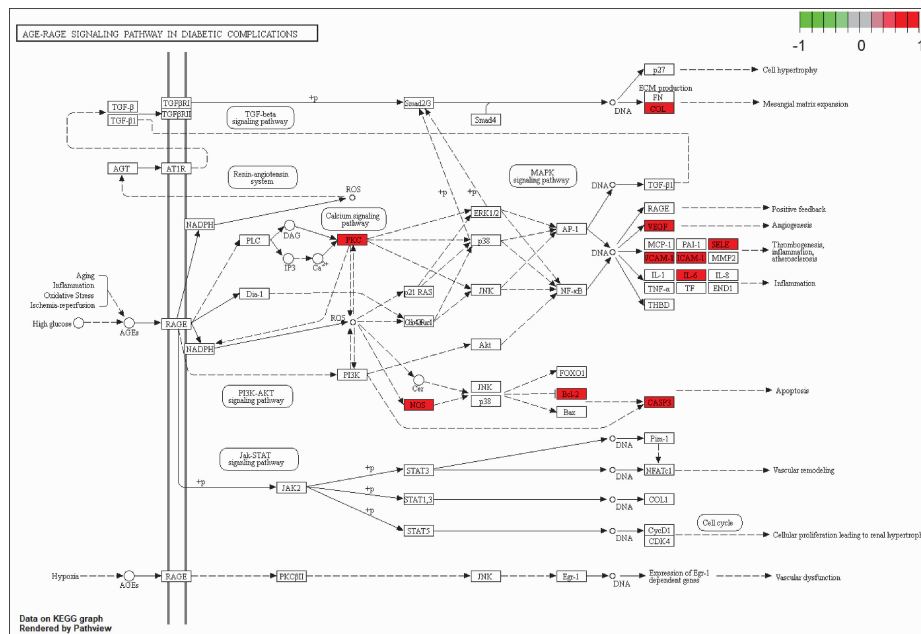


图 6 杜仲成分在创伤性股骨头坏死相关通路中的作用靶点标注图

KEGG Pathway 数据库，得到目标靶点在 PI3K/Akt signaling pathway、Proteoglycans in cancer, Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection 等信号通路上的相关调控过程，证实了杜仲多靶点、多途径的参与防治创伤性股骨头坏死的发生发展^[17-18]。如 PI3K/Akt 信号通路是调控人体细胞分化、增殖与凋亡的重要信号通路，多数学者认为它可能是影响骨转换

的平衡重要通路^[19]。

综上所述，通过网络药理学研究方法能够证实杜仲可多途径、多靶点防治创伤性股骨头坏死的发生发展。杜仲各种活性成分间存在着密切的协同关系，其主要的靶点也在创伤性股骨头坏死中发挥着至关重要的作用，这将有助于进一步研究中医药防治创伤性股骨头坏死。

参考文献:

- [1] LY T V, SWIONTKOWSKI M F. Treatment of femoral neck fractures in young adults[J]. *Journal of Bone & Joint Surgery American Volume*, 2008, 90(10):2254-2266.
- [2] 赵德伟, 马志杰. 创伤性股骨颈骨折后股骨头坏死的预防[J]. *中华显微外科杂志*, 2019, 42(1):3-4.
- [3] 居家宝, 张培训. 髋部骨折流行病学特点: 单中心 1397 例分析[J]. *实用骨科杂志*, 2019, 25(7):592-595.
- [4] 中华医学会骨科学分会创伤骨科学组, 中国医师协会骨科医师分会创伤专家工作委员会. 成人股骨颈骨折诊治指南[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2018, 20(11):921-928.
- [5] 中华中医药学会. 股骨头坏死中医疗效评价标准(2019年版)[J]. *中医正骨*, 2019, 31(6):3-6.
- [6] 中华中医药学会. 股骨头坏死中医辨证标准(2019年版)[J]. *中医正骨*, 2019, 31(6):1-2.
- [7] 李刚, 许波, 梁学振, 等. 杜仲防治骨关节炎的潜在活性成分及作用机制研究[J]. *中医正骨*, 2018, 30(9):4-9.
- [8] 王宇华, 许惠琴, 狄留庆, 等. 生杜仲和盐杜仲对小鼠免疫功能的影响和抗疲劳作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(2):49-50.
- [9] 邸莎, 杨映映, 王翼天, 等. 杜仲临床应用及其用量[J]. *吉林中医药*, 2019, 39(1):24-27.
- [10] 雒晓梅, 宿美凤, 常晓燕, 等. 基于 LC-MS 联用的杜仲主要化学成分定性及定量分析[J]. *中国现代中药*, 2019, 21(8):1029-1040.
- [11] 曾平, 陈金龙, 李金溢, 等. 创伤性股骨头坏死血清差异蛋白质组学的研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2019, 27(5):453-458.
- [12] 中国医师协会骨科医师分会显微修复工作委员会, 中国修复重建外科专业委员会骨缺损及骨坏死学组, 中华医学会骨科分会显微修复学组. 成人股骨头坏死临床诊疗指南(2016)[J]. *中华骨科杂志*, 2016, 36(15):945-954.
- [13] 石淇允, 李无阴, 张颖, 等. 补肾活血中药治疗早中期股骨头坏死的系统评价与 Meta 分析 [J]. *云南中医学院学报*, 2019, 42(1):47-54.
- [14] 张立岩, 孙新, 田丹, 等. Bcl-2 基因转染骨髓干细胞治疗激素性股骨头坏死的疗效研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(14):19-23.
- [15] 王华, 姜未, 周天健, 等. 膝骨性关节炎患者中低密度脂蛋白与氧化应激的关系及意义 [J]. *广东医学*, 2018, 39(21):3207-3210.
- [16] 胡益森. miR-301b-3p 靶向调控 PPAR γ /NF- κ B 信号通路在心肌缺血/再灌注损伤中的作用研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- [17] Chen Y, Hu Y, Yang L, et al. Runx2 alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation via PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(8):822-832.
- [18] 王钰钢, 范启明, 汤亭亭. AMPK 信号通路对骨代谢的调节作用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(3):322-326.
- [19] 陈炳艺, 郭文韬, 林嘉辉, 等. 片仔癀通过 PI3k/Akt 通路抑制人骨肉瘤耐药细胞 MG63/ADM 增殖 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4):1520-1524.