

• 方药研究 •

基于网络药理学探讨杜仲-续断药对治疗腰椎间盘突出症的作用机制*

李志超¹, 李丹丹¹, 薛海鹏², 徐展望^{2△}

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院脊柱骨科, 山东 济南 250355)

摘要: 目的 利用网络药理学的方法探讨杜仲-续断药对治疗腰椎间盘突出症的作用机制。方法 运用 TCMSP 网络数据库对杜仲-续断 2 味中药的主要有效成分及作用靶点进行筛选和挖掘, 利用 Cytoscape3.7.2 软件, 构建中药成分-靶点网络图; 以 GeneCards 及 OMIM 在线分析平台挖掘腰椎间盘突出症的相关作用靶点, 基于 STRING 数据库构建杜仲-续断治疗腰椎间盘突出症的蛋白互作网络图(PPI), 然后进行拓扑分析, 筛选出杜仲-续断治疗腰椎间盘突出症的核心靶点, 利用 David 数据库对药物-疾病交集靶点进行生物通路及富集分析。**结果** 杜仲-续断药对成分-靶点网络图包含 36 个有效成分, 相对应靶点 1 785 个; 腰椎间盘突出症相关靶点 366 个。其中 β -谷甾醇、槲皮素和山柰酚可能是杜仲-续断药对治疗腰椎间盘突出症的关键成分。核心靶点涉及 PTGS2、MMP3、TNF、IL-6、IL-1B 等 20 个。KEGG 通路富集分析提示这些靶点参与 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路等 23 条通路。**结论** 杜仲-续断药对中的 β -谷甾醇、槲皮素和山柰酚等有效成分可能通过 IL-6、IL-1B、TNF、MMP3、PTGS2 等靶点作用于 HIF-1 信号通路、TNF 信号通路, 发挥治疗腰椎间盘突出症的作用, 为进一步分子生物学验证和临床应用提供了理论基础。

关键词: 杜仲-续断; 网络药理学; 腰椎间盘突出症; 机制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)06-0063-09

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.06.011

Study on the Mechanism of Duzhong and Xuduan in Treating Lumbar Disc Herniation Based on Network Pharmacology

LI Zhichao¹, LI Dandan¹, XUE Haipeng², XU Zhanwang²

(1. The First Medical Clinical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. Department of Spine & Orthopedics, Affiliated Hospital of Shandong University
of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the mechanism of Duzhong and Xuduan on the treatment of lumbar disc herniation by network pharmacology. **Methods** TCMSP network database was used to screen and mine the main effective components and targets of Duzhong and Xuduan, and Cytoscape3.7.2 software was used to construct the network diagram of traditional Chinese medicine components and targets. The GeneCards and OMIM online analysis platform were used to excavate the relevant action targets of lumbar disc herniation. Based on STRING database, the protein interaction network map (PPI) of eucommia bark-dipsacus asperoides was constructed, then topological analysis was carried out to screen out the core targets of eucommia bark-dipsacus asperoides. David database was used to analyze biological pathways and enrichment of drug-disease intersection targets. **Results** Duzhong and Xuduan component-target network diagram contains 36 active components, corresponding to 1 785 targets. There are 366 targets related to lumbar disc herniation, among them β -sitosterol, quercetin and kaempferol may be the key components of Duzhong and Xuduan in the treatment of lumbar disc herniation. The core targets more than 20 including PTGS2, MMP3, TNF, IL6 and IL1B. The enrichment analysis of KEGG

收稿日期: 2019-11-06

* 基金项目: 曹贻训全国名老中医传承工作室(国中医药人教函[2018]134号)

第一作者简介: 李志超(1995-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 脊柱退行性疾病。

△通信作者: 徐展望, E-mail: xzw6001@163.com

pathway indicated that these targets participate in 23 pathways such as TNF and HIF-1 signal pathway. **Conclusion** Effective components such as β -sitosterol, quercetin and kaempferol in Duzhong and Xuduan are likely to act on HIF-1 and TNF signal pathway through IL-6, IL-1B, TNF, MMP3, PTGS2 thus playing important role in treating lumbar disc herniation, which provides a theoretical basis for further molecular biological and clinical study.

KEY WORDS: Duzhong and Xuduan; Network Pharmacology; lumbar disc herniation; Mechanism

腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation, LDH), 是指椎间盘发生退行性改变以后, 在外力作用下, 纤维环部分或全部破裂, 单独或者连同髓核、软骨终板向外突出, 刺激或压迫脊髓神经和神经根引起的以腰痛为主要症状的一种病变^[1]。其病程长、易复发, 严重影响患者的正常生活。在中医学中, 将腰椎间盘突出症归于“腰痛”“腿痛”“痹症”等范畴, 病因病机多为跌仆闪挫, 气血瘀滞, 或肾精虚损, 筋骨失养, 或寒湿内侵, 阻遏经脉等^[2]。

临床上杜仲和续断配伍常用于 LDH 的治疗, 其中杜仲能够补肝肾、强筋骨; 续断能够补肝肾、强筋骨、续折伤。现代研究表明杜仲中的有效成分具有保肝护肾、提高骨密度、抑制骨吸收、调节骨代谢、延缓衰老、抗疲劳等作用^[3-4]。续断中的有效成分具有保护骨组织、保肝降脂、抗炎、镇痛等作用^[5]。由此可见, 杜仲-续断配伍治疗 LDH 的疗效确切。然而由于中药多成分、多靶点、相互协同作用的特点, 使得中药治疗疾病的作用机制十分复杂。网络药理学利用多层次网络构建, 从整体角度分析药物的药效物质基础及作用机制, 这种整体性、系统性的特点与中药治疗的整体观念和辨证论治的原则不谋而合。本研究选择常用药杜仲-续断药对开展网络药理学研究, 以期明确杜仲-续断有效成分及作用靶点, 并进一步分析该药对治疗 LDH 的作用机制, 为 LDH 治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 杜仲、续断药对活性成分的获取与筛选 在中药系统药理学数据库与分析平台数据库(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcm-spsearch.php>)中分别录入杜仲、续断进行检索, 按口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$, 类药性 DL ≥ 0.18 条件筛选出有效成分。

1.2 杜仲、续断药对靶点的整理 通过 TCMSP 数据库导出杜仲-续断药对有效成分所对应的靶点, 然后导入 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>), 进行基因的标准化处理。

1.3 LDH 靶点的获取与预测 在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库以及 OMIM(<http://www.omim.org/>)数据库中, 以“lumbar disc herniation”为关键词进行检索, 将检索到的蛋白名称复制到 Uniprot 数据库中进行基因的标准化处理, 得到疾病相关的靶点信息。

1.4 杜仲-续断活性成分网络构建与分析 将杜仲、续断的活性成分导入 Cytoscape3.7.2 软件, 构建有效成分的靶点网络图, 并进行网络拓扑分析。在网络中, 节点代表化合物信息, 边代表有效成分-靶点的相互作用。

1.5 蛋白(PPI)互作网络图的构建与分析 先将杜仲、续断的有效成分作用靶点进行去重, 再与 LDH 靶点组建“成分-靶点”数据库, 取两者交集, 组成“成分-靶点”映射文件, 即寻找成分与疾病共有的靶点, 将共有靶点与化合物成分输入 STRING 数据库, 构建“杜仲、续断-LDH 靶点”的 PPI 网络图。利用 Cytoscape3.7.2 软件中的 Network Analyzer 进行分析, 根据节点度(degree ≥ 9)值进行筛选, 得到杜仲-续断治疗 LDH 的核心作用靶点。

1.6 生物通路及富集分析 将 1.5 筛选出的 PPI 网络核心靶标导入 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库中, 进行 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路分析以及 GO(Gene Ontology)生物过程的富集分析。以 $P \leq 0.05$, FDR ≤ 0.05 为筛选标准, 筛选出符合条件的前 20 条 GO 生物过程与 23 条 KEGG 通路, 并用表格的形式展示。通过通路富集结果对杜仲-续断治疗 LDH 的作用机制进行预测。

2 结果与分析

2.1 杜仲-续断药对有效成分的靶点筛选及预测 利用 TCMSP 数据库, 分别将杜仲、续断输入到数据库, 进行成分搜索, 将得到的成分按照口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 为条件进行筛选, 得到有效成分共 36 个, 其中杜仲有效成分 28 个, 续断有效成分 8 个(见表 1)。

2.2 杜仲-续断成分靶点的预测及成分-靶点网络图

表 1 杜仲-续断有效成分

来源	有效成分	Mol ID	PubChem CID	分子式	分子质量	OB(%)	DL
杜仲	40957-99-1	MOL002058	181681	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	388.4	57.2	0.62
杜仲	丁香香萆(Mairin)	MOL000211	64971	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.7	55.38	0.78
杜仲	β-谷甾醇(beta-sitosterol)	MOL000358	222284	C ₂₉ H ₅₀ O	414.7	36.91	0.75
杜仲	山柰酚(kaempferol)	MOL000422	5280863	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	41.88	0.24
杜仲	杜仲甙(olivil)	MOL004367	5273570	C ₂₀ H ₂₄ O ₇	376.4	62.23	0.41
杜仲	刺桐灵(Erythraline)	MOL000443	5317205	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	297.3	49.18	0.55
杜仲	刺五加 B(Acanthoside B)	MOL005922	443024	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	580.6	43.35	0.77
杜仲	AIDS214634	MOL006709	-	-	374.42	92.43	0.55
杜仲	A	MOL007059	-	-	294.32	32.16	0.41
杜仲	表儿茶素(ent-Epicatechin)	MOL000073	182232	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	48.96	0.24
杜仲	二甲基鹅掌楸树脂醇(Yangambin)	MOL007563	443028	C ₂₄ H ₃₀ O ₈	446.5	57.53	0.81
杜仲	杜仲甲(Eucommin A)	MOL009007	442836	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₂	550.6	30.51	0.85
杜仲	桦皮树脂醇[(+)-medioresinol]	MOL009009	181681	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	388.4	87.19	0.62
杜仲	丹参碱[(-)-Tabernemontanine]	MOL009015	12309360	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.4	58.67	0.61
杜仲	环胺(Cyclopamine)	MOL009027	442972	C ₂₇ H ₄₁ NO ₂	411.6	55.42	0.82
杜仲	B	MOL009029	-	-	358.42	51.44	0.40
杜仲	脱氢丁香酚(Dehydrodieugenol)	MOL009030	165225	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	326.4	30.1	0.24
杜仲	Cinchonan-9- α ,6'-methoxy-, (9R)-	MOL009031	94175	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.4	68.22	0.4
杜仲	GBGB	MOL009038	3082301	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	550.5	45.58	0.83
杜仲	锦鸡菌素(Helenalin)	MOL009042	23205	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	262.3	77.01	0.19
杜仲	桉脂素[(+)-Eudesmin]	MOL009047	73117	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	386.4	33.29	0.62
杜仲	C	MOL009053	-	-	358.42	50.76	0.39
杜仲	三甲花翠苷(hirsutin_qt)	MOL009055	9794659	C ₁₀ H ₁₉ NOS ₂	233.4	49.81	0.37
杜仲	鹅掌楸苷(liriodendrin_qt)	MOL009057	73636	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈	742.7	53.14	0.80
杜仲	槲皮素(querctetin)	MOL000098	5280343	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	46.43	0.28
杜仲	胡萝卜素(beta-carotene)	MOL002773	5280489	C ₄₀ H ₅₆	536.9	37.18	0.58
杜仲	D	MOL008240	-	-	374.42	56.32	0.36
杜仲	丁香苷(Syringetin)	MOL011604	5281953	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346.3	36.82	0.37
续断	龙胆根素(Gentisin)	MOL003152	5281636	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	258.23	64.06	0.21
续断	β-谷甾醇(beta-sitosterol)	MOL000358	222284	C ₂₉ H ₅₀ O	414.7	36.91	0.75
续断	谷甾醇(sitosterol)	MOL000359	12303645	C ₂₉ H ₅₀ O	414.7	36.91	0.75
续断	E	MOL009312	-	-	516.49	48.14	0.68
续断	花椰菜甙(ACauloside A_qt)	MOL009317	441928	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	604.8	43.32	0.81
续断	臭山羊碱(Japonine)	MOL008188	442915	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	295.3	44.11	0.25
续断	匙羹藤皂苷 III(Sylvestroside III)	MOL009322	101967018	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₄	584.6	48.02	0.53
续断	匙羹藤皂苷 III(Sylvestroside III_qt)	MOL009323	-	-	378.51	56.47	0.43

注:A:3- β -Hydroxymethylenetanshiquinone;B:Dehydrodiconiferyl alcohol 4, γ -di-O- β -D-glucopyranoside_qt;
C:4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol;D:
(E)-3-[4-[(1R,2R)-2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1-methylol-ethoxy]-3-methoxy-phenyl]acrolein;E:(E,E)-
-3,5-Di-O-caffeoylquinic acid

的构建 利用 TCMSP 网络数据库,将杜仲-续断药对的 36 个有效成分进行检索,获取其有效成分相对应的靶点,共 1 785 个。并将其导入 Unitprot 数据库进

行基因名标准化处理,再通过 Cytoscape3.7.2 软件构建“杜仲-续断有效成分-靶点”网络图,见图 1。

网络图中共有 168 节点组成,“V 字形”代表中药

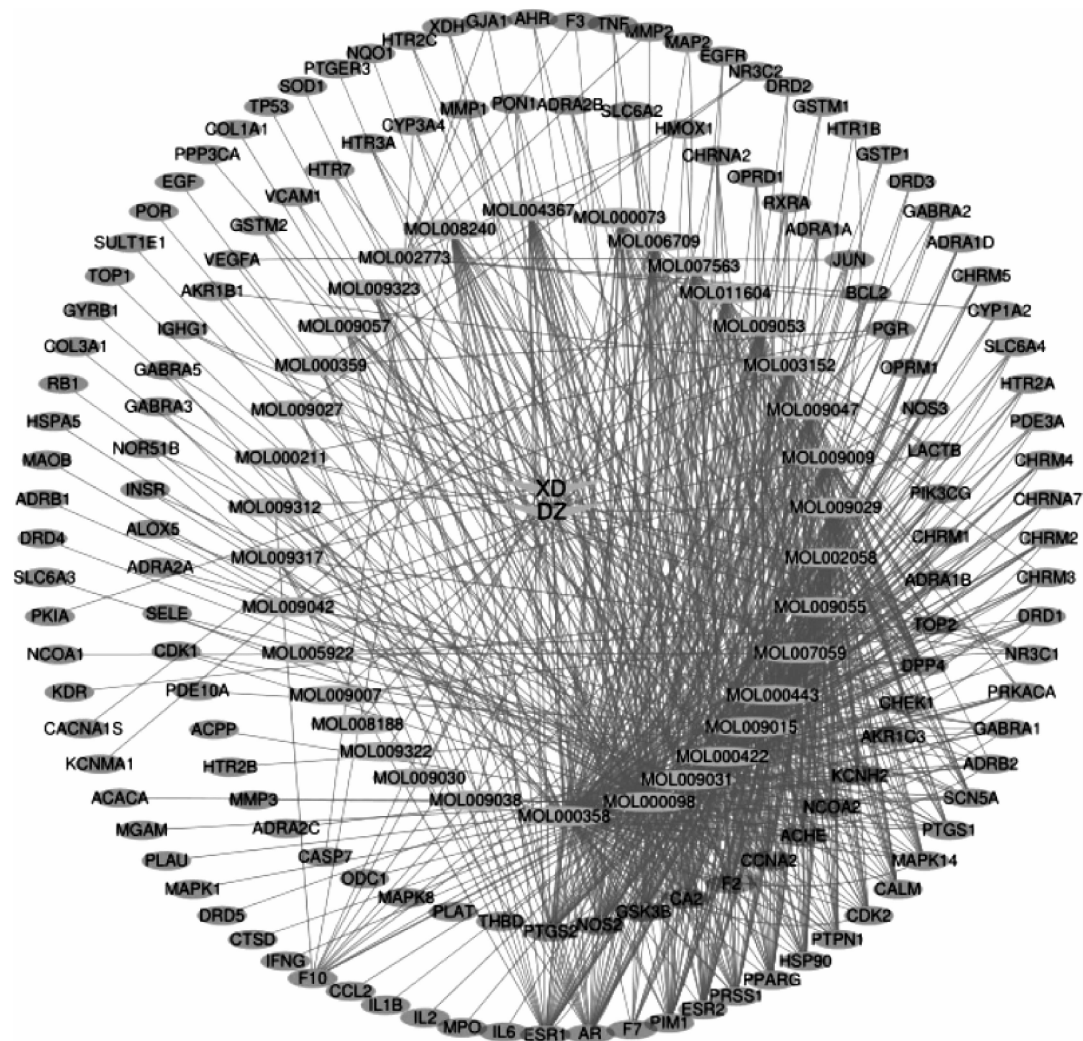


图 1 杜仲-续断有效成分靶点-网络图

杜仲和续断,“蓝色椭圆形”代表杜仲-续断中有效成分共 36 节点,“红色椭圆形”代表有效成分所对应的靶点共 132 节点,节点与节点之间的边表示药物成分与靶点之间的相互作用关系,最大自由度 104,最小自由度为 1,平均自由度为 8.84,其中度值排名前五的为 β -谷甾醇、槲皮素、Cinchonan-9- α l,6'-methoxy-, (9R)-、山柰酚、(-)-Tabernemontanine, 节点的自由度值分别为 104、88、56、56、52,说明这些化合物是杜仲-续断治疗腰椎间盘突出症的主要活性成分。

2.3 LDH 相关靶点蛋白相互作用网络构建 通过 GeneCards 数据库筛选的与 LDH 相关的靶点有 366 个。将这些基因导入 Cytoscape3.7.2 软件,构建“疾病-

靶点”网络图(见图 2)。图中共有 366 节点组成,红色圆形为疾病“腰椎间盘突出症”,蓝色矩形为疾病对应的靶点。节点与节点之间的边表示疾病 LDH 与靶点蛋白之间的对应关系。

2.4 核心靶点的筛选 通过网络合并,获得杜仲-续断和 LDH 的共有靶点 36 个(见表 2)。将这 36 个靶点导入 STRING 数据库建立杜仲-续断“成分-疾病”靶点蛋白互作 PPI 网络图(图 3),共得到 36 个节点,382 条边,平均节点度为 21.2;再将该结果以 TSV 格式导出,再通过 Cytoscape3.7.2 软件对该网络进行拓扑分析,以 degree 值 ≥ 22 为筛选标准,得到 20 个核心靶点,环加氧酶 (PTGS2)、基质金属蛋白酶 3

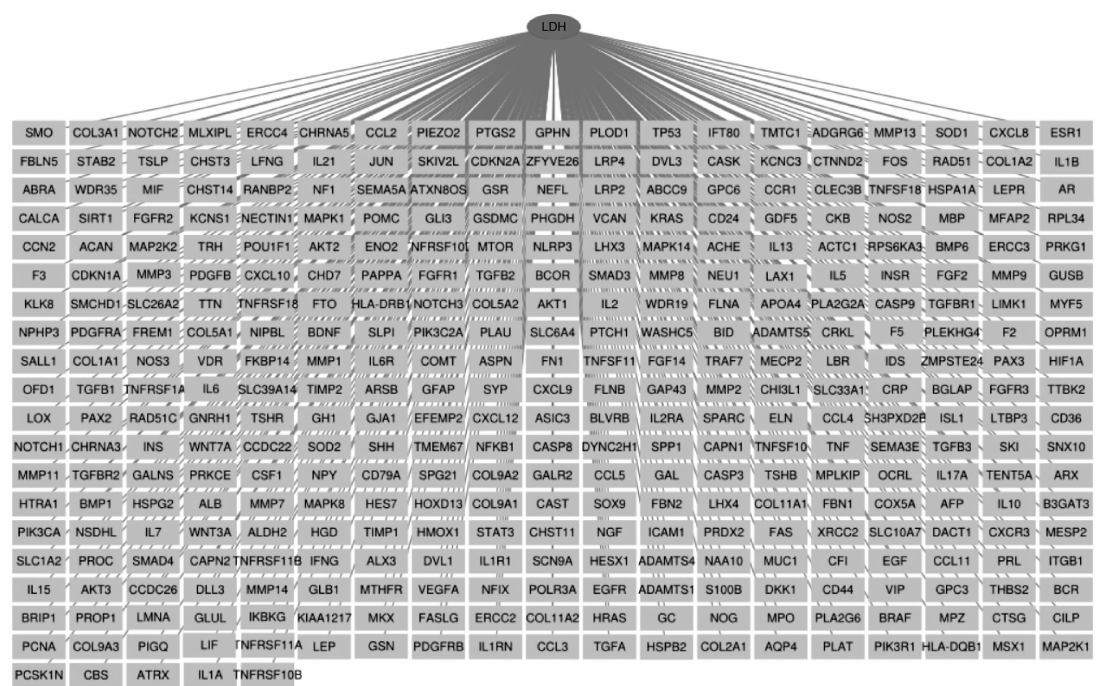


图 2 LDH-疾病-靶点网络图

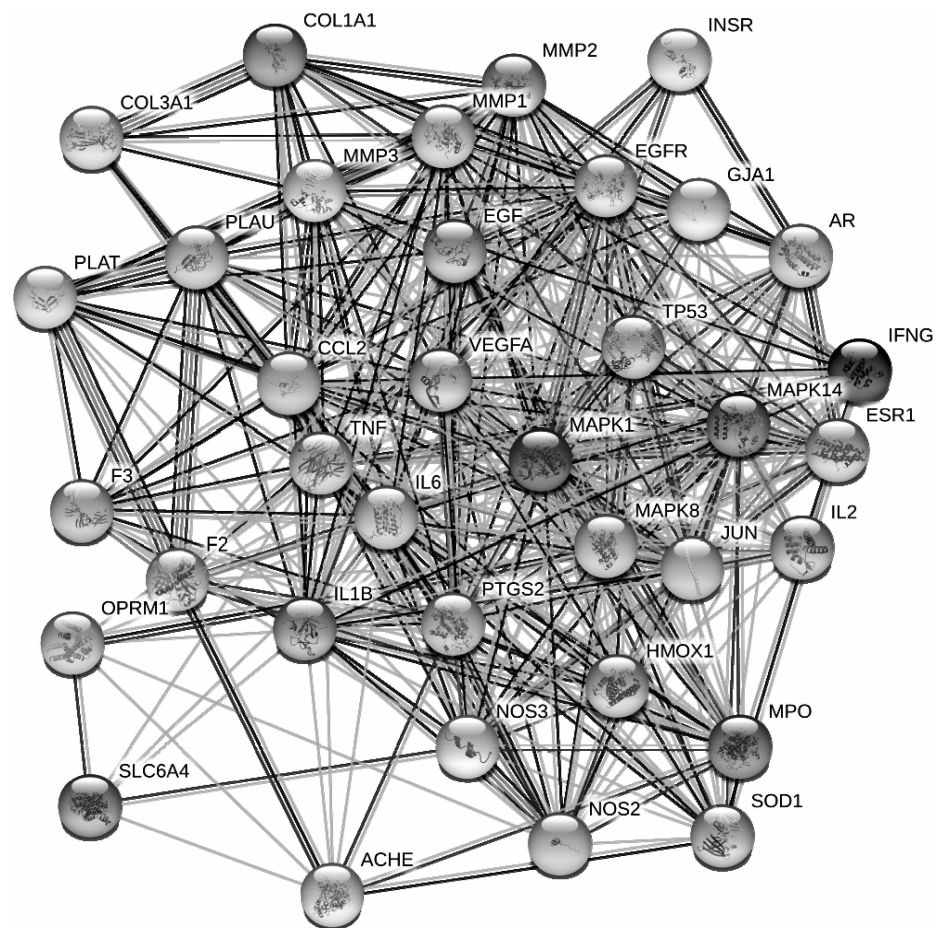


图 3 杜仲-续断“成分-疾病”靶点 PPI 图

注:节点,靶蛋白;边,功能相关性;红色,融合证据;绿色,临近证据;蓝色,共存证据;紫色,实验证据;黄色,文本挖掘;浅蓝色,数据库证据;黑色,共表达证据;边连接节点构建靶蛋白网络。

表 2 杜仲-续断-LDH 共有靶点

中药-疾病	对应靶点	靶点数目
续断	NOS2, F2, ESR1, AR, PTGS2, NOS3, ACHE, JUN, SLC6A4, OPRM1, MAPK14, INSR,	36 个
杜仲	TNF, MMP1, MAPK8, HMOX1, EGFR, MMP2, PLAU, IL6, MAPK1, IFNG, CCL2, IL1B,	
LDH	MPO, PLAT, GJA1, F3, SOD1, TP53, COL1A1, EGF, VEGFA, COL3A1, IL2, MMP3	

(MMP3)、白介素-1B (IL-1B)、C-C 基序趋化因子 (2CCL2)、促分裂原活化蛋白激酶 8(MAPK8)、雌激素受体(ESR1)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、促分裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14)、肿瘤坏死因子 (TNF)、干扰素 γ (IFNG)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、一氧化氮合酶(NOS3)、转录因子(JUN)、表皮细胞生长因子 R (EGFR)、基质金属蛋白酶 1 (MMP1)、表皮细胞生长因子(EGF)、髓过氧化物酶 (MPO)、促分裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)、白介素-6(IL-6)、肿瘤抑制基因 p53(TP53),一起构成核心网络图,见图 4。

2.5 GO 生物过程结果分析 将 2.4 项得到的核心靶点录入 David 数据库并进行 GO 生物过程分析,得到分子功能、生物过程和细胞成分条目 315 个,以

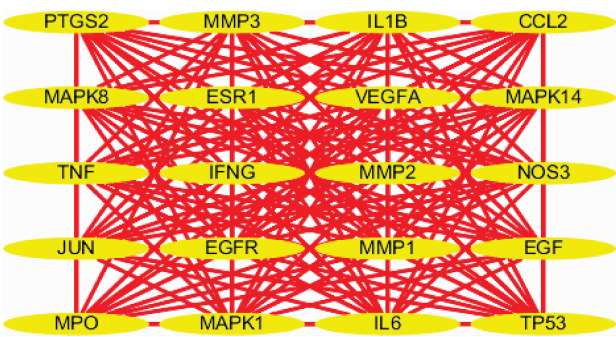


图 4 “成分-疾病”核心靶点网络图

$P \leq 0.05$, $FDR \leq 0.05$ 为标准,筛选出符合条件的前 20 个 GO 条目(见表 3)。主要包括一氧化氮生物合成过程的正调控(positive regulation of nitric oxide biosynthetic process)、细胞外间隙(extracellular space)、基因表达的正调控 (positive regulation of gene expres-

表 3 杜仲-续断调控治疗 LDH 生物过程分析

类型	编号	作用途径	P 值	基因数目
生物过程	GO:0045429	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	2.07×10^{-14}	9
细胞组分	GO:0005615	extracellular space	2.29×10^{-14}	21
生物过程	GO:0010628	positive regulation of gene expression	9.38×10^{-11}	11
细胞组分	GO:0005576	extracellular region	1.08×10^{-9}	18
生物过程	GO:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	5.64×10^{-9}	6
生物过程	GO:0001525	angiogenesis	1.47×10^{-8}	9
生物过程	GO:0001666	response to hypoxia	5.52×10^{-8}	8
生物过程	GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated	6.21×10^{-8}	11
生物过程	GO:0000187	activation of MAPK activity	8.11×10^{-8}	7
生物过程	GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	1.12×10^{-7}	7
生物过程	GO:0048661	positive regulation of smooth muscle cell proliferation	1.46×10^{-7}	6
生物过程	GO:0051090	regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	1.93×10^{-7}	5
分子功能	GO:0019899	enzyme binding	3.11×10^{-7}	9
生物过程	GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	3.35×10^{-7}	10
生物过程	GO:0071260	cellular response to mechanical stimulus	3.44×10^{-7}	6
生物过程	GO:0045909	positive regulation of vasodilation	3.61×10^{-7}	5
生物过程	GO:0045080	positive regulation of chemokine biosynthetic process	9.85×10^{-7}	4
生物过程	GO:0070374	positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	1.48×10^{-6}	7
生物过程	GO:0030335	positive regulation of cell migration	1.98×10^{-6}	7
生物过程	GO:0071230	cellular response to amino acid stimulus	2.64×10^{-6}	5

sion)、细胞外区(extracellular region)、脂多糖介导的信号通路(lipopolysaccharide-mediated signaling pathway)、血管生成(angiogenesis)、缺氧反应(response to hypoxia)等生物过程。

2.6 KEGG 通路富集分析 将 2.4 项得到的核心靶点录入 David 数据库,得到 KEGG 通路 80 条,以 $P \leq 0.05$, $FDR \leq 0.05$ 为标准,筛选出符合条件的 23 条信

号通路(见表 4),其中包括美洲锥虫病(Chagas disease)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis)、膀胱癌(Bladder cancer)、利什曼病(Leishmaniasis)等信号通路,其中,与 LDH 相关的通路可能为 HIF-1 信号通路、TNF 信号通路。

3 讨论

表 4 KEGG 富集分析表

Term	信号通路	P 值	基因数目
hsa05142	Chagas disease (American trypanosomiasis)	5.39×10^{-11}	11
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	7.18×10^{-10}	10
hsa04668	TNF signaling pathway	1.91×10^{-9}	10
hsa05323	Rheumatoid arthritis	9.22×10^{-9}	9
hsa05219	Bladder cancer	4.37×10^{-8}	7
hsa05140	Leishmaniasis	4.93×10^{-8}	8
hsa05133	Pertussis	7.25×10^{-8}	8
hsa05132	Salmonella infection	1.47×10^{-7}	8
hsa05200	Pathways in cancer	2.57×10^{-7}	13
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	2.99×10^{-7}	7
hsa05164	Influenza A	1.87×10^{-6}	9
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	5.26×10^{-6}	11
hsa05205	Proteoglycans in cancer	5.31×10^{-6}	9
hsa04915	Estrogen signaling pathway	8.83×10^{-6}	7
hsa05146	Amoebiasis	1.31×10^{-5}	7
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	1.31×10^{-5}	7
hsa05321	Inflammatory bowel disease (IBD)	1.55×10^{-5}	6
hsa05212	Pancreatic cancer	1.68×10^{-5}	6
hsa05332	Graft-versus-host disease	2.06×10^{-5}	5
hsa05152	Tuberculosis	2.42×10^{-5}	8
hsa04010	MAPK signaling pathway	2.97×10^{-5}	9
hsa05168	Herpes simplex infection	3.00×10^{-5}	8

中医学中 LDH 多属于“腰痛”“腰腿痛”“痹症”等范畴。《中医病证诊断疗效标准》将 LDH 规范为血瘀证、寒湿证、湿热证和肝肾亏虚证四证。历代医家对腰痛病因病机的认识各有不同,对本病的辨证论治有不同的侧重,其中以补益肝肾为基本治法的方药使用较多。杜仲、续断二者味甘性温,归肝、肾经,皆能补肝肾、强筋骨,是临床治疗肝肾亏虚之腰椎间盘突出症的常用药对^[9]。《玉楸药解》中记载:“杜仲,益肝肾,养筋骨,祛关节湿淫,治腰膝酸痛,腿足拘挛”;侯士良《中药八百种详解》中记载:“杜仲,甘温补肝肾,壮筋

骨,为治腰痛必用之品”。《滇南本草》中记载:“续断,补肝,强筋骨。走经络,止经中疼痛”,《日华子本草》中记载:“续断,助气,调血脉,补五劳七伤。”杜仲-续断药对在历代医家的验方使用中十分常见,《千金要方》丹参丸,《扶寿精方》续断丸,《本事方》思仙续断丸等,均重视杜仲、续断两药配伍,效果显著。现代研究发现^[7],杜仲-续断配伍在补肾强骨中存在整体调节和综合治疗的优势,具有良好的临床疗效。

通过 TCMS 数据库分析得出, β -谷甾醇、槲皮素和山柰酚可能是杜仲-续断药对治疗 LDH 的关键

成分。 β -谷甾醇具有抗炎、抗氧化和调节人体甾体激素等多种生理作用^[8]。 β -谷甾醇可以通过减少 NO 的合成,抑制巨噬细胞 IL-6 活性,减少 IL-1、TNF 等炎症因子的分泌,起到抗炎的作用^[9]。有研究证实, β -谷甾醇可显著降低细胞内脂质过氧化物含量、提高谷胱甘肽水平,减轻脂质蓄积造成的肝细胞的过氧化损伤,从而起到保护肝脏的作用^[10]。槲皮素具有抗炎、抗病毒、抗氧化、免疫抑制等广泛的药理作用^[11]。胡庆华等^[12]研究表明,槲皮素可明显缓解高果糖饮食或氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症,并可通过下调 NLRP3 炎症体各组分和 TLRs 信号通路中关键分子基因和蛋白水平,缓解肾脏炎症反应及减轻肾损伤,起到改善肾功能的作用。袁小亮等^[13]研究表明,槲皮素可显著降低 MMP-13/TIMP-1 的比例,促进抑制软骨细胞外基质的降解,促进对关节软骨的保护。山奈酚具有抗炎、抗氧化、抗菌等药理作用^[14]。研究表明山奈酚可显著降低 IL-1B 等因子的表达,抑制大鼠 OA 软骨细胞促炎介质的表达^[15]。汤利华等^[16]的实验研究表明,在糖尿病肾病大鼠中,山奈酚能够降低大鼠蛋白尿、血肌酐和尿素氮含量,同时降低 Caspase-3、Caspase-9、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 及炎症因子 IL-18 和 IL-1B 的表达水平,对肾功能和组织病理损伤具有保护作用。故杜仲-续断药对中的 β -谷甾醇、槲皮素和山奈酚等有效成分,表现出抗炎、保护肝脏、改善肾功能、保护软骨等显著功效,很可能是治疗 LDH 的有效成分。

杜仲-续断治疗 LDH 的多个有效成分对应多个靶点,通过对“药物-疾病”核心靶点网络图分析,结果显示 PTGS2、MMP3、TNF、IL-6、IL-1B 等 20 个核心靶点在杜仲-续断治疗 LDH 中发挥了重要作用。目前,现代医学一致认为椎间盘退变是 LDH 最本质的病理变化之一,不仅表现有形态学和组织学的变化,同时也伴随生化性质的一系列改变。其中,IL-6、IL-1B、TNF 和 MMP3 都是重要的细胞因子,是可能导致椎间盘退变的原因之一^[17]。MMP3 是细胞外基质降解的重要蛋白之一,能够改变椎间盘基质内蛋白多糖、胶原、弹性蛋白等生物大分子的结构、功能及含量,从而在椎间盘退变和突出中起作用^[18-19]。IL-6 可刺激炎症细胞聚集、促进炎症介质合成,诱导 MMPs 的表达,破坏蛋白聚糖 II 型胶原的比例,使髓核脱水,加

速椎间盘退变^[20]。TNF 内的多种生物学活性可以促进细胞因子和炎症介质的生成,改变内皮细胞的通透性,参与痛觉敏感性的形成;诱导 MMPs 活性上调,减少胶原和蛋白多糖的合成^[21-22]。在一项骨关节炎的研究中发现,槲皮素能减少 IL-1B、TNF、IL-6 等细胞因子的表达,抑制软骨细胞外基质的降解,保护关节软骨^[23]。PTGS2 可参与炎症、凋亡和免疫反应,细胞因子和趋化因子的级联反应,调控破骨细胞与成骨细胞的生成和分化^[24-25]。由此可见,杜仲-续断可能通过作用于以上 IL-6、IL-1B、MMP3、TNF 和 PTGS2 等靶点,参与治疗 LDH 的消炎镇痛、抑制椎间盘的退变等过程。

通过 KEGG 通路富集分析,HIF-1 信号通路、TNF 信号通路等可能是治疗 LDH 的关键通路。张丹等^[26]认为,HIF-1 在成血管-成骨耦联反应中发挥关键作用,作为上游基因调控着体内多种成血管、成骨基因的表达,促进血管形成的同时,协同促进骨的再生。TNF 信号通路中的 TNF- α 不仅可以使其信号通路发生异常,还可以和其他促炎性细胞因子刺激破骨细胞分化和活化,而引起骨丢失,刺激滑膜成纤维细胞和软骨细胞产生降解软骨的蛋白酶,最终导致关节和软骨的破坏^[27]。故杜仲-续断中的 β -谷甾醇、槲皮素和山奈酚等很可能通过 IL-6、IL-1B、TNF、MMP3、PTGS2 等靶点作用于 HIF-1 信号通路、TNF 信号通路,参与各细胞因子的调控,抑制炎症因子表达,促进骨的生成,减少软骨和关节的破坏,从而发挥治疗 LDH 的作用。

综上所述,杜仲-续断在治疗 LDH 上具有多成分、多靶点、多通路的特点,因数据有限,存在一定的局限性,从整体层面分析药物与疾病间的作用机制,初步预测了杜仲-续断药对参与治疗 LDH 的核心靶标,为治疗 LDH 提供了一些新的思路,也为今后进一步的分子生物学验证提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 陈孝平,汪建平,秦新裕,等. 外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:753.
- [2] 李妍,姚啸生. 中西医治疗腰椎间盘突出症研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(4):231-234.
- [3] 冯晗,周宏灏,欧阳冬生. 杜仲的化学成分及药理作用研

- 究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(6): 713-720.
- [4] 彭红梅, 李小妹. 杜仲的药理研究现状及应用展望[J]. 中医学报, 2013, 28(1): 72-73.
- [5] 李广润, 宫丽丽, 吕亚丽, 等. 川续断皂苷VI药理作用研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2014, 33(7): 477-480.
- [6] 阮朝阳. 寒湿型和寒湿兼肾虚型腰椎间盘突出症中成药用药规律分析 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(3): 36-40.
- [7] 肖亚平, 曾杰, 焦琳娜, 等. 补肾中药对骨质疏松症的治疗及其信号通路调节作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(1): 21-30.
- [8] 任建敏. 食物中植物甾醇生理活性及药理作用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 389-393.
- [9] JCHOI J N, CHOI Y H, LEE J M, et al. Anti-inflammatory effects of β -sitosterol- β -D-glucoside from *trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264. 7 murine macrophages [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(24): 2340-2343.
- [10] 周海玥, 汤威, 姜婧, 等. β -谷甾醇与豆甾醇对非酒精性脂肪肝作用的体外研究 [J]. 营养学报, 2016, 38(5): 456-461.
- [11] 骆明旭, 罗丹, 赵万红. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(17): 12-14.
- [12] 胡庆华, 缪明星, 卢国, 等. 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾脏 NLRP3 和 TLRs 表达的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3496-3502.
- [13] 袁小亮, 李林福, 施伟梅, 等. 槲皮素对关节软骨中 MMP-13、TIMP-1 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2): 283-285.
- [14] 陈育华, 周克元, 袁汉尧. 山奈酚药效的研究进展[J]. 广东医学, 2010, 31(8): 1064-1066.
- [15] ZHUANG Z, YE G, HUANG B. Kaempferol alleviates the interleukin-1 β induced inflammation in rat osteoarthritis chondrocytes via Suppression of NF- κ B [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 3925-3931.
- [16] 汤利华, 方超, 王浩然, 等. 山奈酚对高糖诱导的糖尿病肾病大鼠肾功能和组织病理损伤的保护作用[J]. 免疫学杂志, 2018, 34(12): 1041-1046.
- [17] 杜伟, 申勇, 李宝俊, 等. 细胞因子 IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、MMP3 与颈椎间盘退变机制的相关性研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(3): 259-262.
- [18] YANG C C, LIN C Y, WANG H S, et al. Matrix Metalloproteases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Medial Plica and Pannus-like Tissue Contribute to Knee Osteoarthritis Progression [J]. *PloS One*, 2013, 8(11): e79662.
- [19] 杨圣, 史可中, 安荣泽, 等. 基质金属蛋白酶-3 在突出椎间盘中的表达及其意义 [J]. 中国矫形外科杂志, 2000(11): 62-64.
- [20] TAKADA T, NISHIDA K, DOITA M, et al. Interleukin-6 production is upregulated by interaction between disc tissue and macrophages [J]. *Spine*, 2004, 29(10): 1089-1092.
- [21] GENEVAY S, FINCKH A, PAYER M, et al. Elevated levels of tumor necrosis factor - α in periradicular fat tissue in patients with radiculopathy from herniated disc [J]. *Spine*, 2008, 33(19): 2041-2046.
- [22] MILLWARD -SADLER S J, COSTELLO P W, FREEMONT A J, et al. Regulation of catabolic gene expression in normal and degenerate human intervertebral disc cells: implications for the pathogenesis of intervertebral disc degeneration [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(3): R65.
- [23] 于维汉, 何耀华. 槲皮素在治疗骨关节炎中作用机制的研究进展 [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2019, 12(6): 477-480.
- [24] 王洁, 卞莹莹, 张川, 等. 肿瘤坏死因子及其受体在类风湿性关节炎中的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2017, 35(4): 289-293.
- [25] PAULISSEN S M, VAN HAMBURG J P, DAVELAAR N, et al. Synovial fibroblasts directly induce Th17 pathogenicity via the cyclooxygenase/prostaglandin E2 pathway, independent of IL-23 [J]. *J Immunol*, 2013, 191(3): 1364-1372.
- [26] 张丹, 任利玲. 缺氧诱导因子 1 α 在组织工程成骨和成血管中的作用 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2016, 30(4): 504-508.
- [27] 黄蓓, 汪庆童, 刘亢亢, 等. 类风湿关节炎发生发展中 TNF- α 信号通路与 CD4 $^{+}$ T 细胞的关系 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7): 900-903.