

# 基于谱效关系和网络药理学的淫羊藿抗骨质疏松物质基础及作用机制

刘谊民<sup>1,2</sup>, 许婷<sup>1,2</sup>, 张黄琴<sup>1,2</sup>, 马程遥<sup>3</sup>, 刘玉萍<sup>1,2</sup>, 陈彦<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 南京 210028;

2. 江苏省中医药研究院中药组分与微生态研究中心, 南京 210028;

3. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**研究淫羊藿抗骨质疏松的物质基础并预测其作用机制。**方法:**应用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析14批淫羊藿的化学成分;以成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性为药效指标,采用偏最小二乘法回归分析(PLSR)建立UPLC-Q-TOF-MS/MS谱峰与ALP活性的谱效关系模型,筛选淫羊藿抗骨质疏松的药效物质基础;综合利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP),比较毒物基因组学数据库(CTD),DAVID等在线平台及Cytoscape 3.6.1软件预测淫羊藿抗骨质疏松的可能作用机制。**结果:**UPLC-Q-TOF-MS/MS分析共指认谱峰61个,鉴定化合物56个。PLSR分析显示淫羊藿苷,宝藿苷I,朝藿定A,箭藿苷A和宝藿苷II与ALP活性的相关性较强,为淫羊藿发挥抗骨质疏松作用的潜在物质基础。基于网络药理学对上述5个成分的抗骨质疏松机制进行预测,共得到肿瘤坏死因子(TNF),雄激素受体(AR),雌激素受体1(ESR1)等7个关键靶点和内分泌及其他因素调节的钙吸收、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、瞬时受体电位(TRP)通道的炎性介质调节等8条关键通路。**结论:**借助UPLC-Q-TOF-MS/MS,谱效关联和网络药理学方法可以实现淫羊藿抗骨质疏松物质基础挖掘和机制研究,为淫羊藿抗骨质疏松的科学解释和临床应用提供实验依据。

**[关键词]** 淫羊藿;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS);抗骨质疏松;谱效关系;网络药理学

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)16-0177-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210917

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210525.1524.005.html>

[网络出版日期] 2021-05-26 15:22

## Material Basis and Mechanism of Epimedii Folium Against Osteoporosis Based on Spectrum-Effect Relationship and Network Pharmacology

LIU Yi-min<sup>1,2</sup>, XU Ting<sup>1,2</sup>, ZHANG Huang-qin<sup>1,2</sup>, MA Cheng-yao<sup>3</sup>, LIU Yu-ping<sup>1,2</sup>, CHEN Yan<sup>1,2\*</sup>

(1. *Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,*

*Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;*

2. *Multi-component of Traditional Chinese Medicine (TCM) and Microecology Research Center,*

*Jiangsu Province Academy of TCM, Nanjing 210028, China;*

3. *Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)*

**[Abstract]** **Objective:** To study the material basis and potential molecular mechanism of Epimedii Folium against osteoporosis. **Method:** The chemical components in 14 batches of Epimedii Folium were analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-tandem mass spectrometry

[收稿日期] 20210127(012)

[基金项目] 江苏省中医药科技发展计划项目(YB201925)

[第一作者] 刘谊民,在读硕士,从事中药质量控制及其制剂研究,E-mail:15036974346@163.com

[通信作者] \*陈彦,博士,研究员,博士生导师,从事中药质量控制及其制剂研究,Tel:025-52362155,E-mail:yichen202@hotmail.com

(UPLC-Q-TOF-MS/MS). With the activity of alkaline phosphatase (ALP) as the pharmacodynamic index, the partial least squares regression analysis (PLSR) was conducted to establish a model uncovering the spectrum-effect relationship between UPLC-Q-TOF-MS/MS spectral peak and ALP activity and screen the active components against osteoporosis. Online databases such as the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Comparative Toxicogenomics Database (CTD), Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) and Cytoscape 3.6.1 were employed to predict the possible mechanism of action of Epimedii Folium against osteoporosis. **Result:** A total of 61 peaks and 56 compounds were identified by UPLC-Q-TOF-MS/MS. PLSR showed that icariin, baohuoside I, epimedin A, sagittatoside A, and baohuoside II might be the active components for Epimedii Folium to inhibit osteoporosis considering their strong correlation with ALP activity. As revealed by the network pharmacological analysis of the five components mentioned above, Epimedii Folium mainly regulated seven targets such as tumor necrosis factor (TNF), androgen receptor (AR), and estrogen receptor 1 (ESR1) and eight key pathways like endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption, vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway, and transient receptor potential (TRP) channels to exert its anti-osteoporosis effect. **Conclusion:** The exploration of material basis and potential molecular mechanism of Epimedii Folium against osteoporosis based on UPLC-Q-TOF-MS/MS, spectrum-effect relationship, and network pharmacology has provided an experimental basis for the scientific explanation and clinical application of Epimedii Folium in treating osteoporosis.

**[Keywords]** Epimedii Folium; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS); anti-osteoporosis; spectrum-effect relationship; network pharmacology

骨质疏松(OP)是一种常见的以骨吸收增加,骨量和矿物质含量减少为特征的慢性进行性骨病<sup>[1]</sup>,会导致骨骼脆弱,增加骨折的风险,已成为威胁老年人健康的三大疾病之一<sup>[2]</sup>。中药淫羊藿为小檗科植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿和朝鲜淫羊藿的干燥叶,具有补肾阳,强筋骨,祛风湿的功效<sup>[3]</sup>,为临床治疗骨质疏松尤其是绝经后骨质疏松的常用中药<sup>[4-5]</sup>。淫羊藿的化学成分复杂,主要含有黄酮类、有机酸、生物碱、木脂素、多糖等。一般认为淫羊藿中黄酮成分为其抗骨质疏松的主要活性成分,其中淫羊藿苷、淫羊藿素、宝藿苷 I 等单体成分的抗骨质疏松作用被广泛报道<sup>[6-8]</sup>。但中药的生物活性往往是多种成分作用于多靶点的整体结果。柯志鹏等<sup>[9]</sup>基于网络药理学对淫羊藿抗骨质疏松的有效成分及机制进行研究,结果发现淫羊藿抗骨质疏松的药效成分并非广泛报道的成分,因此淫羊藿抗骨质疏松的具体物质基础和作用机制依旧不明确,需要基于中药整体作用进行探索。

中药指纹图谱可以整体地反映中药材的质量,将其与药效指标相结合,建立合理的谱-效模型和分析方法,可以系统揭示中药成分与药理作用之间的关系,阐明中药的药效活性成分。指纹图谱作为谱

效关系研究的基础,应尽可能地避免遗漏化学成分,充分获取能有效代表中药化学成分信息的化学指纹图谱。指纹图谱常用的建立方法包括超高效/高效液相色谱法、气相色谱法、色谱质谱联用、核磁共振法等<sup>[10]</sup>。超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)具有分离速度快,分辨率高、灵敏度高,选择性高等优点,是辨识中药化学成分信息的重要手段,基于UPLC-Q-TOF-MS/MS指纹图谱的“谱效关系”研究信息全面,同时可实现药效相关成分的定性分析,已应用于中药虎杖<sup>[11]</sup>、当归<sup>[12]</sup>等的物质基础的研究。

为了明确淫羊藿抗骨质疏松的具体物质基础和作用机制,本研究基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术构建指纹图谱,以成骨诱导的MC3T3-E1 Subclone14细胞为模型,将淫羊藿提取物成分的信息与药效活性进行相关性分析,揭示了淫羊藿抗骨质疏松作用的物质基础,并借助网络药理学手段对其作用机制进行预测,为淫羊藿在骨质疏松疾病中的应用提供实验依据。

## 1 材料

Shimadzu型超高效液相色谱仪(日本岛津公司);TripleTOF 5600+型质谱仪(美国AB Sciex公

司);FA2104型1/1万电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司);MS205DU型半微量天平(梅特勒-托利多公司);KQ-500E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HERA CELL 500i CO<sub>2</sub>型细胞培养箱,1510型全波长酶标仪(美国Thermo公司);SW-CJ-1FD型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

淫羊藿苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号110737-201516,纯度>94.2%);朝藿定A,朝藿定B,朝藿定C,宝藿苷I,箭藿苷A,箭藿苷B,2"-O-鼠李糖淫羊藿次苷II对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为20120401,20120131,20120118,20120222,118525-35-2,118525-36-3,135293-13-9,纯度均>98.0%);淫羊藿素对照品(南京泽朗医药有限公司,批号ZL130506,纯度为98.0%); $\alpha$ -MEM基础培养基(上海宏新生物医药技

术有限公司,批号20190825);胎牛血清(以色列Biologic Industries公司,批号1933119);100 $\times$ 青霉素-链霉素溶液(中国Biosharp公司,批号69121000);L-抗坏血酸, $\beta$ -甘油磷酸钠,地塞米松(上海易恩化学技术有限公司,批号分别为RH145803,RH128104,RH125681);碱性磷酸酶测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20191023);BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司,批号240016);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。小鼠MC3T3-E1 Subclone 14成骨细胞(中国科学院上海细胞所)。

收集的14批淫羊藿药材,经南京中医药大学邹立思实验员鉴定分别为小檗科植物淫羊藿*Epimedium brevicornu*(编号S1~S5),朝鲜淫羊藿*E. koreanum*(编号S6~S10)和柔毛淫羊藿*E. pubescens*(编号S11~S14)的干燥叶。药材信息见表1。

表1 淫羊藿样品信息

Table 1 Information of *Epimedium Folium*

编号	批号	产地	品种	编号	批号	产地	品种
S1	20181226(01-03)	甘肃	淫羊藿	S8	20181226(04-06)	东北	朝鲜淫羊藿
S2	20181217(04-06)	陕西	淫羊藿	S9	20184274	朝鲜	朝鲜淫羊藿
S3	20190103(01-03)	陕西	淫羊藿	S10	20181003	东北	朝鲜淫羊藿
S4	20190103(04-06)	陕西	淫羊藿	S11	20181130(05-07)	陕西	柔毛淫羊藿
S5	20171006	甘肃	淫羊藿	S12	20181211(01-03)	甘肃	柔毛淫羊藿
S6	20181130(08-10)	吉林	朝鲜淫羊藿	S13	2018003	陕西	柔毛淫羊藿
S7	20181130(01-03)	辽宁	朝鲜淫羊藿	S14	2018004	甘肃	柔毛淫羊藿

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备<sup>[3]</sup>

2.1.1 供试品溶液的制备 取淫羊藿药材叶片,粉碎,过3号筛。取粉末约0.2 g,精密称定,置于50 mL具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇20 mL,称定质量,超声处理1 h,放冷至室温,再称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,静置后滤过,取续滤液,即为供试品溶液。

2.1.2 混合对照品溶液制备 取朝藿定A,朝藿定B,朝藿定C,淫羊藿苷,宝藿苷I,箭藿苷A,箭藿苷B,2"-O-鼠李糖淫羊藿次苷II,淫羊藿素对照品适量,精密称定,置于10 mL量瓶中,甲醇定容制成质量浓度约40 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

### 2.2 淫羊藿化学成分分析

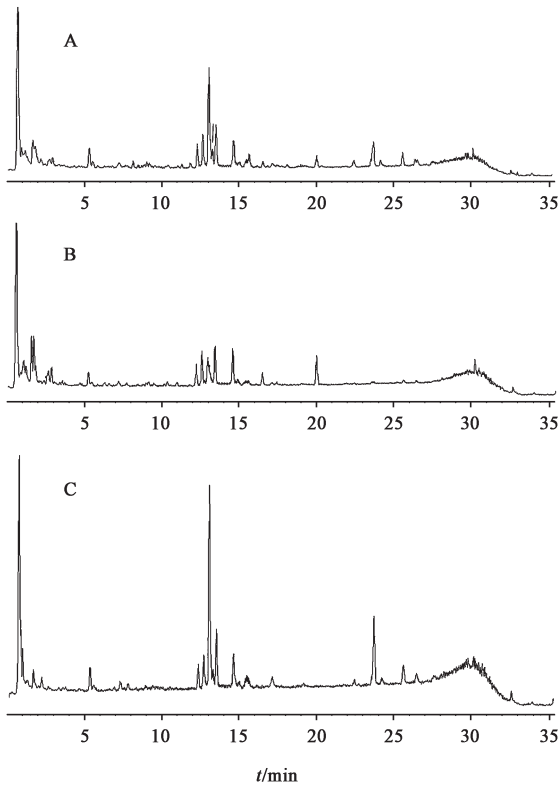
2.2.1 检测条件<sup>[13]</sup> 色谱条件:ZORBAX Extend C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.8  $\mu$ m);柱温室温;流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水(B);梯度洗脱

(0~14 min,15%~30%A;14~20 min,30%~35%A;20~26 min,35%~44%A;26~30 min,44%~80%A;30~32 min,80%~95%A;32~35 min,95%A);流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>;进样量1  $\mu$ L。

质谱条件:电喷雾离子源负离子模式(ESI<sup>-</sup>);雾化气压力379 kPa;辅助加热气压力379 kPa;气帘气压力241 kPa;离子源温度550  $^{\circ}$ C;电压-4 500 V;去簇电压-60 V;碰撞电压-10 V;质量扫描范围m/z 100~2 000。

2.2.2 UPLC-Q-TOF-MS/MS图谱的采集 取淫羊藿药材,按2.1.1项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样分析,得到淫羊藿UPLC-Q-TOF-MS/MS原始数据,不同基原淫羊藿的总离子流图见图1。

2.2.3 UPLC-Q-TOF-MS/MS结果分析 查阅淫羊藿属化学成分相关文献,建立包含150余种化合物名称、分子式和结构式信息的数据库<sup>[13-16]</sup>。将淫羊



A. 淫羊藿; B. 朝鲜淫羊藿; C. 柔毛淫羊藿  
图1 淫羊藿, 朝鲜淫羊藿和柔毛淫羊藿的UPLC-Q-TOF-MS/MS总离子流

Fig. 1 Total ion chromatogram of *Epimedium brevicomu*, *E. koreanu* and *E. pubescens*

藿UPLC-Q-TOF-MS/MS所采集的数据导入Peakview软件,根据一级质谱推断分子式,并结合二级质谱碎片信息及对照品比对,进行解析, $m/z$ 误差控制在10以内。共指认色谱峰61个,鉴定化合物56个,其中淫羊藿48个,朝鲜淫羊藿32个,柔毛淫羊藿36个,共有成分22个。

采用MarkerView 1.2.1软件对图谱进行峰提取、峰匹配、峰对齐、峰识别以及归一化等预处理, $m/z$  100~2 000;保留时间窗为0.2 min,质量窗为10 ppm;噪音消除水平为6;去除同位素峰。

### 2.3 不同批次淫羊藿对成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性的影响

**2.3.1 供试品溶液制备** 取2.1.1项下供试品溶液2 mL,37℃水浴蒸干,用DMSO 1 mL复溶,配成相当于生药材质量浓度为20 g·L<sup>-1</sup>的储备液,-20℃保存。

**2.3.2 淫羊藿对ALP活性的影响** 取对数期生长的MC3T3-E1 subclone14细胞,用 $\alpha$ -MEM完全培养基( $\alpha$ -MEM基础培养基,10%胎牛血清,100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素,0.01 g·L<sup>-1</sup>链霉素)调整细胞悬液密度为

1×10<sup>7</sup>(个)/mL,按每孔100  $\mu$ L接种于96孔细胞板中,随机分为模型组和给药组,37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,弃去培养基。模型组加入成骨诱导培养基( $\alpha$ -MEM完全培养基,50 mg·L<sup>-1</sup> L-抗坏血酸,1×10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup>地塞米松,10 mmol·L<sup>-1</sup>  $\beta$ -甘油磷酸钠),给药组加入相当于生药质量浓度0.1 mg·L<sup>-1</sup>含药诱导培养基(成骨诱导培养基配制),继续培养7 d,期间每3 d换液1次。培养结束后,以冷磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2次,加入细胞裂解液于冰上裂解30 min,4℃13 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,取上清液,一部分用BCA法测定总蛋白含量,另一部分进行ALP活性测定。将模型组ALP活性定为1,各给药组药效值依此量化,得到ALP活性的比值。

14批淫羊藿对ALP活性的影响见表2。除S5和S6外各给药组成骨细胞ALP活性均高于模型组,表明淫羊藿对成骨细胞的分化具有促进作用。

表2 不同批次淫羊藿对ALP活性影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of different batches of *Epimedii Folium* on ALP activity ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

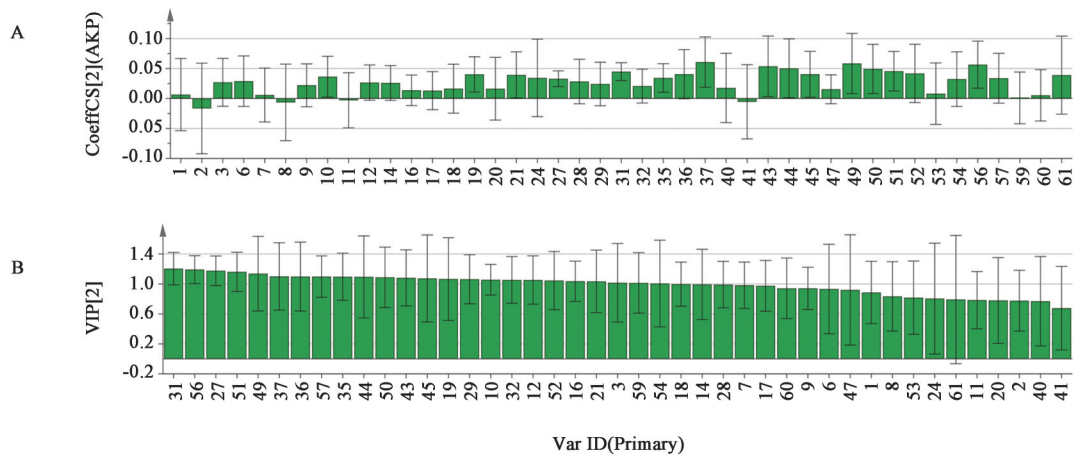
编号	$A_{\text{给药组/模型组}}$	编号	$A_{\text{给药组/模型组}}$
S1	1.403±0.495	S8	1.296±0.108 <sup>1)</sup>
S2	1.084±0.225	S9	1.973±0.169 <sup>1)</sup>
S3	1.140±0.080	S10	2.254±0.069 <sup>1)</sup>
S4	2.200±0.023 <sup>1)</sup>	S11	1.313±0.058 <sup>1)</sup>
S5	0.950±0.041	S12	1.563±0.015 <sup>1)</sup>
S6	0.958±0.124	S13	1.768±0.001 <sup>1)</sup>
S7	1.226±0.181	S14	2.299±0.241 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ 。

**2.4 淫羊藿抗骨质疏松活性成分辨识** 以2.2.3项下获得的各成分峰面积为变量X,2.3.2项下获得的不同批次淫羊藿提取物对成骨细胞ALP活性影响的药效数据为变量Y,导入SIMCA 14.1软件中,经UVN标准化后,进行偏最小二乘法回归(PLSR)分析,回归系数和VIP值见图2。VIP值越大,变量的贡献也越大,图中31(淫羊藿苷),56(宝藿苷I),27(朝藿定A),51(箭藿苷A)和49(宝藿苷II)与ALP活性呈较强的正相关(VIP>1.5, $P<0.05$ ),结合现有文献对此5种成分抗骨质疏松的报道,初步确定此5种成分为淫羊藿发挥抗骨质疏松作用的物质基础。

### 2.5 基于网络药理学的淫羊藿抗骨质疏松作用机制研究<sup>[17]</sup>

**2.5.1 淫羊藿抗骨质疏松相关靶点的获取** 借助中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)及



A. 回归系数; B. VIP 值

图2 PLSR 标准化回归系数和VIP 值

Fig. 2 Coefficient plot and VIP plot of PLSR

Swiss Target Prediction 数据库, 预测 2.4 项下 5 种成分的相关靶点共 52 个。在 CTD, GeneCards, 在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM) 和 DisGeNET 4 个疾病数据库中以 “osteoporosis” 为关键词检索骨质疏松相关靶点共 3 470 个。将靶点导入 UniProt 数据库校正人类蛋白靶点的正式名称, 获得蛋白的基因名称和 UniProt 编号。利用 Venny 2.1 在线工具将成分及疾病相关靶点映射, 找到成分-疾病共同靶点 37 个, 即为淫羊藿抗骨质疏松相关靶点。

**2.5.2 成分-靶点网络构建** 将成分及 37 个共同靶点上传至 Cytoscape 3.6.1 软件生成体现成分-靶点相互作用的网络。结果表明宝藿昔 II 在整个网络中的重要性最强。

**2.5.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建** 将 2.5.1 项下获得的靶点导入 STRING 数据库, 设置物种为 “homo sapiens”, 最低相互作用阈值为中等置信度 (medium confidence) 为 0.4, 得出蛋白相互作用网络。网络包括 37 个节点和 127 条边, 未出现孤立节点, 连通性良好, 表征了淫羊藿通过多成分、多靶点的协同调控发挥抗骨质疏松的特点。经网络拓扑学分析, 各节点的平均自由度为 6.86, 平均介数为 0.034, 平均接近中心性为 0.47, 平均最短路径长度的均值为 2.20。自由度、介数、接近中心性数均高于均值、平均最短路径长度低于均值的靶点有 7 个, 分别为肿瘤坏死因子 (TNF), 雄激素受体 (AR), 雌激素受体 1 (ESR1), 环氧酶 2 (PTGS2), 丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14), 白细胞介素-2 (IL-2), 蛋白激酶 C (PRKCB)。这些靶点与其他靶点关联密切, 可能在治疗骨质疏松中占据重要地位。

**2.5.4 基因本体 (GO) 功能富集分析与京都基因与**

基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 将共有靶点导入 DAVID 6.8 数据库, 分别勾选生物过程 (BP), 分子功能 (MF), 细胞组成 (CC), KEGG 信号通路, 进行 GO 生物功能与 KEGG 通路富集分析, 基于 *P* 值和错误发现率 (FDR) 筛选, 获得潜在靶点的 GO 生物功能结果与 KEGG 通路富集分析。

GO 富集分析结果显示 226 个条目 ( $P < 0.05$  且  $FDR < 0.05$ ) 与淫羊藿治疗骨质疏松作用有关。其中 BP 分析获得 179 个条目, CC 分析中富集条目 1 个, MF 分析中获得条目 45 个。根据 *P* 值和 FDR 进行排序, 列举了各类中排名靠前的条目共 21 条。其中 BP 条目 *P* 值远小于其他条目, 表明淫羊藿主要影响生物过程而发挥抗骨质疏松作用。

KEGG 通路富集分析共获得 36 条信号通路 ( $P < 0.05$ ), 根据相关文献检索获得 23 条与骨质疏松相关信号通路。其中  $FDR < 0.05$  的通路有 8 条, 分别为内分泌及其他因素调节的钙重吸收、血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路、癌症通路、瞬时受体电位 (TRP) 通道的炎性介质调节、甲状腺激素信号通路、癌症中蛋白聚糖、鞘脂类信号通路和细胞周期。

### 3 讨论

本研究收集了 2020 年版《中华人民共和国药典》淫羊藿项下 4 个基原淫羊藿药材。然而市售箭叶淫羊藿的混淆严重, 收集到的多批箭叶淫羊藿均掺杂有其他基原淫羊藿, 因此仅以箭叶淫羊藿外的 3 个基原淫羊藿为原药材。在前期, 课题组考察了不同质量浓度 (0.01, 0.1, 1, 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 淫羊藿对 MC3T3-E1 subclone14 细胞分化的影响, 结果表明 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  淫羊藿提取物对 MC3T3-E1 subclone14 细胞分化有明显促进作用, 因此选择生药质量浓度

为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行药效实验。研究通过PLSR法对14批淫羊藿药材UPLC-Q-TOF-MS/MS指纹图谱及ALP活性进行关联分析,发现淫羊藿苷,宝藿苷I,朝藿定A,箭藿苷A和宝藿苷II与ALP活性相关性较强,为淫羊藿发挥抗骨质疏松的物质基础。朝藿定A、淫羊藿苷为中药淫羊藿的含量测定指标,宝藿苷I为朝藿定A、朝藿定C及淫羊藿苷体内代谢的主产物,箭藿苷A为朝藿定A的水解产物,现有研究表明5种成分均具有抗骨质疏松活性<sup>[6-7,18-20]</sup>,证明本研究筛选的淫羊藿抗骨质疏松物质基础具有可信性。

网络药理学研究发现淫羊藿治疗骨质疏松的关键靶点主要有TNF, AR, ESR1, PTGS2, MAPK14, IL-2, PRKCB。TNF是典型的促炎因子,在骨质疏松的发生发展中发挥重要作用。有研究发现雌激素缺乏导致骨量、密度和强度迅速降低,主要是炎症因子特别是TNF- $\alpha$ 升高所致<sup>[21]</sup>。IL-2是促进骨质疏松性骨折愈合的细胞因子,与TNF- $\alpha$ 的作用相反,金天格胶囊发挥其抗骨质疏松作用可能与提高IL-2, IL-4的阳性表达、降低TNF- $\alpha$ 的阳性表达有关<sup>[22]</sup>。雌激素水平的降低可导致骨质疏松,而雄激素对于雄性动物骨小梁骨量的维持同样必不可少<sup>[23]</sup>。此外,PTGS2基因编码形成环氧酶2(COX-2)蛋白,在体外能诱导破骨细胞形成<sup>[24]</sup>,体内促进骨吸收<sup>[25]</sup>。MAPK缺陷会损害成骨/软骨分化<sup>[26-27]</sup>。PRKCB蛋白可能与去卵巢大鼠骨质疏松形成有关<sup>[28]</sup>。

KEGG通路富集分析揭示了淫羊藿可以通过多条通路,从增殖、分化、自噬、内分泌、抗炎、钙离子代谢等多个方面,对骨髓间质干细胞、成骨细胞、破骨细胞、骨细胞进行调控,发挥抗骨质疏松作用。骨骼发挥正常生理功能基于正常血清钙离子水平,肾脏的重吸收是血钙的主要来源之一。雌激素、甲状旁腺激素、降钙素等激素在钙的重吸收中发挥重要作用。雌激素既可以抑制骨组织对钙的重吸收,进而引起甲状旁腺激素增加和肾小管钙吸收增加,又可以不依赖甲状旁腺激素直接增加肾小管钙吸收<sup>[29]</sup>。雌激素缺乏可减弱肾小管对钙的重吸收,影响骨的代谢<sup>[30]</sup>。骨质疏松被认为是一种慢性炎症性疾病。TRP通道是一种 $\text{Ca}^{2+}$ 渗透性的阳离子通道,作为分子传感器,使细胞能够接收和响应机械和环境信号。TRP家族中TRPV亚族离子通道在骨代谢中发挥重要作用。TRPV1基因缺失及其药理抑制/脱敏均能在体外降低破骨细胞活性,在体内

减少模型小鼠骨丢失<sup>[31]</sup>。同时,破骨细胞中TRPV4激活会促进破骨细胞的分化,导致骨丢失<sup>[32]</sup>。炎症介质可以激活TRPV离子通道,促进 $\text{Ca}^{2+}$ 内流,淫羊藿可能通过其抗炎作用调节 $\text{Ca}^{2+}$ 的信号转导发挥抗骨质疏松作用<sup>[33]</sup>。癌症通路是一条非常庞大的通路,淫羊藿可能是作用于其中的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt),雷帕霉素靶体蛋白(mTOR),p53通路而发挥抗骨质疏松作用。PI3K/Akt信号通路对成骨细胞的分化、成熟和骨生长的各个阶段都至关重要。mTOR属于PI3K相关激酶家族。地塞米松广泛应用于骨质疏松动物模型的构建,体外研究表明,诱导成骨细胞氧化应激,抑制PI3K/Akt/糖原合成酶激酶-3(GSK3) $\beta$ 信号通路激活进而导致成骨细胞凋亡可能是DXM诱发骨质疏松的原因之一<sup>[34]</sup>。同时DXM还可以通过PI3K/Akt/mTOR增强破骨细胞的自噬,诱导骨质破坏<sup>[35]</sup>。而在骨细胞中,PI3K/Akt信号通路在其机械信号转导,细胞自噬,凋亡中发挥着重要作用<sup>[36-37]</sup>。mTOR通路还可以通过与经典的Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路,脂肪酸样化合物过氧化物酶增殖剂激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )信号通路以及核转录因子- $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL)/核转录因子- $\kappa$ B受体活化因子(RANK)信号通路等相互作用调节骨髓间充质干细胞/成骨细胞介导的骨形成、成脂分化、骨细胞稳态和破骨细胞介导的骨吸收,参与维持骨稳态<sup>[38]</sup>。此外,甲状腺激素水平影响着儿童的生长发育以及成人骨重塑和骨量维持。VEGF信号通路可影响骨组织供血及骨重塑,促进VEGF的表达可改善骨组织供血<sup>[39]</sup>,促进骨髓间充质干细胞的成骨分化<sup>[40]</sup>。细胞周期对骨代谢相关细胞的增殖调控起着重要的作用<sup>[6]</sup>。

本研究首次基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术和谱-效学方法初步揭示了淫羊藿发挥抗骨质疏松的物质基础,并借助网络药理学阐明了淫羊藿抗骨质疏松可能机制,为淫羊藿抗骨质疏松的科学解释和临床应用提供了实验依据。但后期仍旧需要在不脱离中药整体作用的前提下对5种成分的药效加以验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] BELLAVIA D, DIMARCO E, COSTA V, et al. Flavonoids in bone erosive diseases: perspectives in osteoporosis treatment[J]. Trends Endocrinol Metab,

- 2021, 32: 76-94.
- [ 2 ] LI C R, LI Q, LIU R J, et al. Medicinal herbs in the prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(1): 1-22.
- [ 3 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 340-341.
- [ 4 ] 范元赫, 杨永菊, 关雪峰. 基于中医传承辅助系统分析骨质疏松组方用药规律[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(9): 201-205.
- [ 5 ] 张倩, 王花欣, 王媛, 等. 中药防治绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(7): 1083-1088.
- [ 6 ] WANG Y, WANG R, ZHANG F Q. Icaritin promotes the proliferation and differentiation of osteoblasts from the rat mandible by the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 3445-3450.
- [ 7 ] XI Y H, JIANG T W, YU J M, et al. Preliminary studies on the anti-osteoporosis activity of Baohuoside I [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108850.
- [ 8 ] LIM R Z L, LI L, YONG E L, et al. STAT-3 regulation of CXCR4 is necessary for the prenylflavonoid icaritin to enhance mesenchymal stem cell proliferation, migration and osteogenic differentiation [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862(7): 1680-1692.
- [ 9 ] 柯志鹏, 张新庄, 曹泽彧, 等. 基于网络药理学研究淫羊藿治疗骨质疏松症的分子作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(18): 4048-4052.
- [ 10 ] 张小艺, 刘久石, 高石曼, 等. 中药谱效关系的研究方法及应用进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(20): 4405-4411.
- [ 11 ] 李姣姣, 于猛, 高原, 等. 基于谱效关系的中药虎杖抗炎活性成分探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(12): 208-213.
- [ 12 ] 刘洁丽, 马霞, 张瑛, 等. 当归地上部分补血作用的谱效关系研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(7): 1416-1424.
- [ 13 ] 于雪娥, 秦建平, 李家春, 等. 基于UPLC/Q-TOF-MS/MS技术快速分析淫羊藿总黄酮胶囊中的化学成分[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(24): 4587-4597.
- [ 14 ] 马文娟, 姚广哲, 贾琪, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS法定性分析淫羊藿中的化学成分[J]. *中药材*, 2019, 42(7): 1554-1559.
- [ 15 ] 王媛, 袁磊, 李遇伯, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的淫羊藿化学成分分析[J]. *中草药*, 2017, 48(13): 2625-2631.
- [ 16 ] SHEN P, GUO B L, GONG Y, et al. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium* species[J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(10): 1448-1458.
- [ 17 ] 李泽运, 曹星, 袁永亮, 等. 排毒清脂片的UPLC-Q-TOF-MS成分分析及网络药理学探索[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7): 129-134.
- [ 18 ] 詹扬, 韦英杰, 孙娥, 等. 二维斑马鱼模型联合色谱技术评价朝藿定A及其代谢物宝藿苷I抗骨质疏松活性[J]. *药学学报*, 2014, 49(6): 932-937.
- [ 19 ] XIAO H H, FUNG C Y, MOK S K, et al. Flavonoids from *Herba Epimedii* selectively activate estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ ) and stimulate ER-dependent osteoblastic functions in UMR-106 cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 143: 141-151.
- [ 20 ] 李芳, 徐忠坤, 顾少莉, 等. 淫羊藿总黄酮胶囊活性成分宝藿苷II对MC3T3-E1细胞增殖分化的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(6): 54-57.
- [ 21 ] WEITZMANN N M. Bone and the immune system [J]. *Toxicol Pathol*, 2017, 45(7): 911-924.
- [ 22 ] 赵玉玺, 张彬, 湛梅圣, 等. 金天格胶囊对骨质疏松性骨折大鼠血清IL-2、IL-4和TNF- $\alpha$ 表达的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(7): 796-800.
- [ 23 ] MANOLAGAS S C, O'BRIEN C A, ALMEIDA M, et al. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9(Suppl 1): 699-712.
- [ 24 ] 夏婷, 李双庆. 炎症相关骨质疏松症的发病机制[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(1): 117-120.
- [ 25 ] KASUKAWA Y, MIYAKOSHI N, SRIVASTAVA A K, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib reduces bone resorption, but not bone formation, in ovariectomized mice *in vivo* [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2007, 211(3): 275-283.
- [ 26 ] RODRÍGUEZ-CARBALLO E, GÁMEZ B, SEDÓ -CABEZÓN L, et al. The p38 alpha MAPK function in osteoprecursors is required for bone formation and bone homeostasis in adult mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102032.
- [ 27 ] CONG Q, JIA H, BISWAS S, et al. p38 $\alpha$  MAPK Regulates lineage commitment and OPG synthesis of bone marrow stromal cells to prevent bone loss under physiological and pathological conditions [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(4): 566-578.
- [ 28 ] 孙鑫, 邓洋洋, 燕燕, 等. 补肾益髓方对骨质疏松症大鼠肾PKC蛋白表达的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2012, 18(11): 1213-1215.
- [ 29 ] MATTIX KRAMER H J, GRODSTEIN F, STAMPFER M J, et al. Menopause and postmenopausal hormone use and risk of incident kidney stone [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(5):

- 1272-1277.
- [30] GALLAGHER J C, RIGGS B L, DELUCA H F. Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980, 51 (6) : 1359-1363.
- [31] ROSSI F, BELLINI G, TORELLA M, et al. The genetic ablation or pharmacological inhibition of TRPV1 signaling is beneficial in the restoration of quiescent osteoclast activity in ovariectomized mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(10):2621-2630.
- [32] MASUYAMA R, MIZUNO A, KOMORI H, et al. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(8):1708-1721.
- [33] 苏晓乾,夏长波,严福林,等. 基于网络药理学和分子对接研究淫羊藿治疗抑郁症的抗炎作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(17):162-169.
- [34] DENG S, DAI G, CHEN S, et al. Dexamethasone induces osteoblast apoptosis through ROS-PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110:602-608.
- [35] FU L J, WU W, SUN X J, et al. Glucocorticoids enhanced osteoclast autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 107(1):60-71.
- [36] RIQUELME M A, GU S, HUA R, et al. Mechanotransduction via the coordinated actions of integrins, PI3K signaling and connexin hemichannels [J]. *Bone Res*, 2021, 9(1):86-96.
- [37] WANG X Y, GONG L J, HUANG J M, et al. Pinocembrin alleviates glucocorticoid-induced apoptosis by activating autophagy via suppressing the PI3K/Akt/mTOR pathway in osteocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 880:173212.
- [38] SHEN G Y, REN H, QIU T, et al. Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in osteoporosis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5):3929-3944.
- [39] 蔡吓明,魏建铭. 染料木黄酮通过促进 VEGF 表达改善去势大鼠骨质疏松的作用机制 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(1):10-13.
- [40] LIU X D, CAI F, LIU L, et al. MicroRNA-210 is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promotion of VEGF expression and osteoblast differentiation [J]. *Biol Chem*, 2015, 396 (4):339-347.

[责任编辑 顾雪竹]