

# 基于网络药理学和分子对接技术探析通痹健骨方治疗 膝骨关节炎的作用机制

王雷<sup>1</sup>, 李盛华<sup>2\*</sup>, 周明旺<sup>2</sup>, 王晓萍<sup>2</sup>, 徐斌<sup>1</sup>, 魏长浩<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

**[摘要]** 目的: 基于网络药理学和分子对接技术探析通痹健骨方治疗膝骨关节炎(KOA)的作用机制, 并进一步运用细胞实验进行验证。方法: 依据中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)筛选出通痹健骨方活性成分及其对应的靶点; 通过检索 GeneCards 数据库, 在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)及 DrugBank 数据库获取 KOA 靶点; 将通痹健骨方活性成分靶点与 KOA 靶点取交集, 所得靶点即为通痹健骨方治疗 KOA 靶点。采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建活性成分-靶点网络及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络; 使用 STRING 数据库进行 PPI 网络分析; 运用 DAVID 数据分析平台进行基因本体(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析; 选取关键靶点及核心活性成分, 使用 AutoDock 软件进行分子对接。细胞实验验证网络药理学结果并进行药效学观察。结果: 网络药理学预测显示通痹健骨方治疗 KOA 活性成分有 111 个, 核心活性成分为槲皮素, 山柰酚,  $\beta$ -谷甾醇, 关键靶点为白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), 基质金属蛋白酶-3(MMP-3), 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )。GO 分析中生物过程(BP)主要涉及到炎症反应、对脂多糖的反应、凋亡信号通路和 DNA 结合转录因子活性的调节等生物过程。细胞组成(CC)则包括了质膜蛋白复合物, RNA 聚合酶 II 转录因子复合物, 膜筏, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物等方面。分子功能(MF)主要富集在细胞因子受体结合、核受体活性、蛋白质结构域特异性结合、丝氨酸水解酶活性、趋化因子受体结合、一氧化氮合酶调节剂的活性等方面。KEGG 分析获取相关信号通路为核转录因子(NF)- $\kappa$ B, 两面神激酶(JAK)/信号传导及转录激活蛋白(STAT)及 Wnt 信号通路; 分子对接结果显示, 核心活性成分与关键靶点具有较好的结合活性。实验验证结果表明, 通痹健骨方能够下调 IL-1 $\beta$ , MMP-3, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65 表达水平( $P < 0.05$ ), 上调 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白(I $\kappa$ B)- $\alpha$  水平( $P < 0.05$ )。结论: 通痹健骨方治疗 KOA 的作用机制在于应用槲皮素, 山柰酚,  $\beta$ -谷甾醇等活性成分, 以 IL-1 $\beta$ , MMP-3 及 TNF- $\alpha$  为关键靶点, 通过 NF- $\kappa$ B, JAK/STAT 及 Wnt 信号通路发挥治疗膝骨关节炎的作用。

**[关键词]** 通痹健骨方; 网络药理学; 膝骨关节炎; 分子对接; 作用机制

**[中图分类号]** R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0180-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220116 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211122.1844.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-11-23 10:54

## Mechanism of Tongbi Jiangu Prescription in Treatment of Knee Osteoarthritis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

WANG Lei<sup>1</sup>, LI Sheng-hua<sup>2\*</sup>, ZHOU Ming-wang<sup>2</sup>, WANG Xiao-ping<sup>2</sup>, XU Bin<sup>1</sup>, WEI Chang-hao<sup>1</sup>

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Tongbi Jiangu prescription (TBJG) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA) based on network pharmacology and molecular docking, and further verify it by cell experiments. **Method:** The active components and the corresponding targets of TBJG were

**[收稿日期]** 20210911(002)

**[基金项目]** 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者(2018)(国中医药人教函2018-284号); 国家中医药管理局全国中医学学术流派传承工作室建设项目(国中医药人教函2019-62号)

**[第一作者]** 王雷, 在读博士, 从事骨与关节疾病的基础及临床研究, E-mail: wanglei2010@126.com

**[通信作者]** \*李盛华, 博士生导师, 从事骨与关节疾病的基础及临床研究, E-mail: 1702288516@qq.com

screened out according to the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP). The targets of KOA were obtained from GeneCards, online mendelian inheritance in man(OMIM), and DrugBank. The common targets of active components of TBJG and KOA were the targets of TBJG against KOA. The active component-target network and protein-protein interaction (PPI) network were constructed by Cytoscape 3.7.2. STRING was used for PPI network analysis. DAVID was used for gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses. Key targets and core active components were selected for molecular docking by AutoDock. The results of network pharmacology were verified by cell experiments and the pharmacodynamic responses were observed. **Result:** The prediction of network pharmacology showed that there were 111 active components of TBJG in the treatment of KOA. The core active components were quercetin, kaempferol, and  $\beta$ -sitosterol, and the key targets were interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Biological processes (BP) in GO analysis mainly involved inflammatory response, response to lipopolysaccharide, apoptosis signaling pathway, and regulation of DNA activity in binding transcription factor. Cellular components (CC) included plasma membrane protein complex, RNA polymerase II transcription factor complex, membrane raft, and serine/threonine protein kinase complex. Molecular functions (MF) were mainly enriched in cytokine receptor binding, nuclear receptor activity, protein domain specific binding, serine hydrolase activity, chemokine receptor binding, and activity of nitric oxide synthase regulator. As revealed by the KEGG analysis, the relevant signaling pathways were nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT), and Wnt signaling pathways. Molecular docking results showed that the core active components had good binding activities with key targets. The experimental results showed that TBJG could down-regulate IL-1 $\beta$ , MMP-3, TNF- $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B p65 expression levels ( $P < 0.05$ ), and up-regulated NF- $\kappa$ B inhibitor(I $\kappa$ B)- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The mechanism of TBJG in the treatment of KOA lies in the application of active components such as quercetin, kaempferol, and  $\beta$ -sitosterol with IL-1 $\beta$ , MMP-3, and TNF- $\alpha$  as key targets through the NF- $\kappa$ B, JAK/STAT, and Wnt signaling pathways.

**[Keywords]** Tongbi Jiangu prescription; network pharmacology; knee osteoarthritis; molecular docking; mechanism of action

膝骨关节炎(KOA)是以关节软骨变性破坏,软骨下骨囊变,滑膜炎及骨赘增生为主要病理特征的慢性退行性疾病<sup>[1]</sup>。随着我国进入到老龄化社会,KOA的发病率逐年提高且随年龄的增长快速上升。研究发现成年人中KOA患病率为20%,65岁以上老年人中患病率可达50%,给患者及家庭带来沉重的心理和经济负担<sup>[2]</sup>。目前对KOA病理机制认识尚未完善,其中由炎症因子介导的软骨退变被认为是KOA发病的重要因素之一<sup>[3]</sup>。有学者证实在KOA的早期就有炎症反应参与其中,其原因在于软骨变性与骨赘形成等理化刺激导致炎症发生,而炎症反应又加重对骨及软骨的破坏<sup>[4]</sup>。所以西医治疗KOA的药物主要以非甾体抗炎药为主,然而长期使用则存在着胃肠道反应大或疗效不理想等问题。找到一种疗效安全可靠的药物,是当前治疗该病的现实问题。中医药在与疾病的长期斗争中,积累了丰富的经验,对于本病的治疗有很大的优势和

潜力,并在治疗慢性炎症方面具有一定的特色<sup>[5-6]</sup>。

甘肃省名中医李盛华教授针对KOA病因,依据甘肃地处西北,偏风寒的地域特点,提出肾虚是根本原因,风寒侵袭是主要外在因素的思想,病机为“本虚标实、本虚标痹、虚实夹杂”之证<sup>[7]</sup>。关节失养,活动不能,不荣则痛;风寒侵袭,筋脉阻滞,不通则痛。并进一步提出补益肝肾,祛风散寒,通痹止痛为治病之法。而通痹健骨方是李教授多年临床实践总结的经验方,全方由熟地黄、杜仲、牛膝、独活、威灵仙、山药、茯苓、当归、乌药、狗脊、锁阳、延胡索、鸡血藤、甘草14味中药组成,配伍得当、标本兼治,诸药合用,共奏补肝益肾,散寒祛风,通痹止痛之功。尽管其疗效确切,但其治疗KOA的药理机制仍难以完全阐述。网络药理学作为连接中医和现代医学的桥梁,是一个新的交叉学科,通过多个数据库构建药物活性成分-靶点-疾病靶点-蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,进而从分子水平阐释药

物治疗疾病的作用机制。因此本研究基于网络药理学和分子对接技术,拟探析通痹健骨方治疗KOA所涉及的核心活性成分、关键靶点及主要信号通路,并以细胞实验进行验证,以期为进一步临床应用和更深层次的机制研究提供方向和理论依据。

## 1 材料与方

**1.1 通痹健骨方活性成分及靶点挖掘** 采用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmsp-e.com>)检索通痹健骨方中每味中药的活性成分。依据口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18筛选出中药活性成分,对不满足筛查要求,但含量高或活性强的活性成分给予手动添加。再依据TCMSP数据库将每味中药活性成分与潜在靶点逐一配对,运用UniProt数据库(<https://uniprot.org/>)将靶点进行标准化,筛选物种为“Homo sapiens”的靶点,作为通痹健骨方活性成分靶点。

**1.2 膝骨关节炎相关靶点获取** 以“Knee Osteoarthritis, Osteoarthritis”为检索词分别从在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>), DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 3个数据库中检索相关靶点,重复靶点保留1个,所得靶点即为KOA靶点。

**1.3 网络构建及分析** 将通痹健骨方活性成分靶点与KOA靶点取交集,并与通痹健骨方活性成分一一对应。采用Cytoscape 3.7.2软件构建活性成分与交集靶点网络图。将交集靶点输入到STRING数据库(<https://string-db.org/>),物种设置为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值设为最高置信度“highest confidence(0.9)”,得到PPI网络信息,再运用Cytoscape 3.7.2软件将PPI网络做可视化处理。以介数(betweenness)和自由度(degree)的均值作为截点,将截点之上的靶点视为关键靶点,活性成分作为核心活性成分并分析其药理作用。

**1.4 基因本体(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析** 将筛选出的主要靶点输入到DAVID数据分析平台(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)进行GO及KEGG富集分析。依据富集基因数,选取前20位生物过程(BP),细胞组成(CC),分子功能(MF)和KEGG信号通路。

**1.5 分子对接验证** 为验证通痹健骨方关键靶点治疗KOA的准确性,将核心活性成分与关键靶点进行分子对接。从TCMSP平台下载核心活性成分的3D分子结构,从PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)

下载靶点蛋白结构,以人源蛋白、分辨率及优先选择具有原始配体为依据,利用AutoDock 4.2.6软件进行分子对接,运用PyMOL, Discovery Studio 2016软件进行输出优化。

## 1.6 细胞实验

**1.6.1 实验药物** 通痹健骨方全部药物购自甘肃省中医院药剂科(批号210615),由药剂科王红丽主任中药师鉴定所有药材均符合2020年版《中华人民共和国药典》要求。在甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室,将上述中药饮片按成方比例加水浸泡,煮沸30 min,弃药渣取汤剂;离心10 min(转速2 000 r·min<sup>-1</sup>,离心半径125 mm),取上清液;采用冷冻干燥机进行冷冻干燥制备冻干粉,得率为25%。精密称取适量冻干粉,加完全培养基使其溶解,微孔滤器过滤除菌,以生药量计算,配制成药物质量浓度为4 g·L<sup>-1</sup>通痹健骨方基准母液,-20℃冰箱保存备用。使用时提前解冻母液,用完全培养基对母液进行稀释,获得以生药量计算,高、中、低质量浓度分别为600, 400, 200 mg·L<sup>-1</sup>通痹健骨方工作液。

**1.6.2 细胞** KOA软骨标本来源于甘肃省中医院行人工表面膝关节置换术中废弃的KOA软骨组织,标本的取材均获得知情同意。取膝关节置换术中股骨髁关节面标本,参照人软骨细胞培养操作流程<sup>[8]</sup>,常规培养、传代,传至第三代时用于实验,并经甲苯胺蓝染色法与Ⅱ型胶原免疫荧光法鉴定,分离的细胞为软骨细胞。本实验已通过甘肃省中医院伦理委员会审查(批准号2020-136-01)。

**1.6.3 试剂** 白细胞介素-1β(IL-1β),基质金属蛋白酶-3(MMP-3)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,货号分别为MM-0181H2, MM-0108H2, MM-0122H2); TRIzol (Ambion公司,货号15596018);无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司,批号20190406);异丙醇(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号20201101);总RNA提取试剂盒,逆转录试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为R1200, T2240)。引物序列由生工生物工程股份有限公司合成,见表1。

**1.6.4 IL-1β, MMP-3和TNF-α水平检测** 将第3代软骨细胞以2×10<sup>4</sup>个/孔接种于细胞培养板中,随机分为空白组,通痹健骨方高、中、低浓度组,每组设3个复孔;待细胞贴壁后,吸除完全培养基,用PBS洗涤2次;向高、中、低浓度组每孔中加入对应的通

表1 聚合酶链式反应(PCR)引物序列  
Table 1 Primer sequences of PCR

基因	引物(5'-3')	长度/bp
核转录因子(NF)-κB p65	上游 ATGCGCTTCCGCTACAAGTG	107
	下游 CTGGTCCTGTGTAGCCATTGA	
上调NF-κB抑制蛋白(IκB)-α	上游 ACTCCATCCTGAAGGCTACCA	108
	下游 CCTGAGCATTGACATCAGCAC	
甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)	上游 CAGGAGGCATTGCTGATGAT	142
	下游 GAAGGCTGGGGCTCATT	

痹健骨方工作液 2 mL,空白组仅加入完全培养基 2 mL;干预 24 h 后吸取上清液,剩余步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作进行。

**1.6.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)**检测 NF-κB p65 mRNA, IκB-α mRNA 水平。细胞培养、分组及给药同 1.6.4 项,干预 24 h 后收集各组细胞,按总 RNA 提取试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA,使用 RNase-free 的 DNase I 去基因组。按照逆转录试剂盒说明,每个样本取 RNA 1 μL,作为逆转录模板合成 cDNA,再以此为模板,按反应体系 10 μL 进行 PCR 反应;反应条件为 95 °C 预变性 60 s, 95 °C 变性 15s, 60 °C 退火 15 s, 40 个循环;以 GAPDH 做为内参,结果以 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 表示 mRNA 相对表达。

**1.6.6 统计方法** 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 通痹健骨方活性成分及靶点的筛选** 通痹健骨方的活性成分共有 236 个,依据筛选标准结合手动筛选结果,得到 111 个活性成分,在 TCMS 数据库中将其与潜在靶点逐一配对,重复靶点仅保留 1 个,共得到 199 个靶点。

**2.2 KOA 靶点获取** 重复靶点保留 1 个,从 OMIM, DrugBank 及 GeneCards 3 个数据库中共得到 1 702 个靶点。

**2.3 网络构建及分析** 将通痹健骨方 199 个活性成分靶点与 1 702 个 KOA 靶点进行映射,得到 109 个共同靶点,见增强出版附件材料。利用 Cytoscape 3.7.2 软件建立活性成分与靶点相互作用网络,共有 256 个节点和 1 250 条边,见增强出版附件材料。靶点数目居前 3 位的活性成分为槲皮素、山柰酚和 β-谷甾醇,推测可能是通痹健骨方治疗 KOA 的核心活性成分,见表 2。

表2 通痹健骨方主要活性成分基本信息

Table 2 Basic information of main active components of Tongbi Jiangu prescription

ID	英文名称	化学成分
MOL000098	quercetin	槲皮素
MOL000422	kaempferol	山柰酚
MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇

为了进一步研究通痹健骨方治疗膝骨关节炎的作用机制,将 109 个交集所得靶点进行 PPI 网络分析见增强出版附件材料,网络中所有靶点均可以发生相互作用,产生了 2 154 条代表蛋白间相互作用的边,筛选出自由度和介数均超过平均值的靶点为 IL-1β, MMP-3 和 TNF-α,认为其可能是通痹健骨方治疗膝骨关节炎的关键靶点。

**2.4 GO 富集及 KEGG 信号通路富集** GO 富集分析见增强出版附件材料,其中生物过程主要涉及到炎症反应、对脂多糖的反应、凋亡信号通路和 DNA 结合转录因子活性的调节等生物过程。细胞组成则包括了质膜蛋白复合物和 RNA 聚合酶 II 转录因子复合物、膜筏、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物等方面。分子功能主要富集在细胞因子受体结合、核受体活性、蛋白质结构域特异性结合、丝氨酸水解酶活性、趋化因子受体结合、一氧化氮合酶调节剂的活性等方面。KEGG 信号通路富集分析结果见增强出版附件材料,有 3 条信号通路与 KOA 密切相关,分别是 NF-κB, 两面神激酶(JAK)/信号传导及转录激活蛋白(STAT)和 Wnt 信号通路,提示通痹健骨方能够通过多途径作用于 KOA。以 NF-κB 信号通路为例,通痹健骨方治疗 KOA 的潜在靶点和作用机制,见增强出版附件材料。

**2.5 分子对接验证** 本研究选取度值较高的关键靶点 IL-1β, MMP-3 及 TNF-α 作为受体,以核心活性成分为作为配体,进行分子对接验证。众所周知,配体潜在作用活性越强, docking score 值越高。本

研究 docking score 值均>5.0,提示核心活性成分与关键靶点具有较好的结合活性,结果见表3,分子对接见增强出版附件材料。

### 2.6 实验结果

**2.6.1 通痹健骨方对 KOA 软骨细胞上清液中 IL-1 $\beta$ , MMP-3, TNF- $\alpha$  表达的影响** 与空白组比较通痹健骨方各浓度组上清液中 IL-1 $\beta$ , MMP-3 及 TNF- $\alpha$  水平均降低( $P<0.05$ );高浓度组与中、低浓度组比较,高浓度组较低且 IL-1 $\beta$ , MMP-3 及 TNF- $\alpha$  水平下降程

表3 通痹健骨方核心活性成分与关键靶点分子对接分数

Table 3 Molecular docking fraction of core active components and key targets of Tongbi Jiangu prescription

核心活性成分	关键靶点		
	IL-1 $\beta$	MMP-3	TNF- $\alpha$
槲皮素	8.21	6.74	5.22
山柰酚	6.08	7.39	8.18
$\beta$ -谷甾醇	6.53	5.85	7.14

度与通痹健骨方浓度呈剂量依赖性,结果见表4。

表4 通痹健骨方对 KOA 软骨细胞上清液中 IL-1 $\beta$ , MMP-3 及 TNF- $\alpha$  表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Tongbi Jiangu prescription on expression of IL-1 $\beta$ , MMP-3 and TNF- $\alpha$  in supernatant of KOA chondrocytes ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/mg·L <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	MMP-3	TNF- $\alpha$
空白		70.39 $\pm$ 2.18	1.35 $\pm$ 0.17	110.37 $\pm$ 5.26
通痹健骨方	200	59.14 $\pm$ 3.23 <sup>1,2)</sup>	0.93 $\pm$ 0.08 <sup>1,2)</sup>	85.09 $\pm$ 3.43 <sup>1,2)</sup>
	400	47.62 $\pm$ 5.16 <sup>1,2)</sup>	0.71 $\pm$ 0.12 <sup>1,2)</sup>	77.56 $\pm$ 2.28 <sup>1,2)</sup>
	600	34.36 $\pm$ 1.92 <sup>1)</sup>	0.45 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	61.08 $\pm$ 4.55 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与高浓度组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

**2.6.2 通痹健骨方对 KOA 软骨细胞 NF- $\kappa$ B p65 mRNA, I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA 表达的影响** 与空白组比较,通痹健骨方各组 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 水平均降低( $P<0.05$ ), I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA 水平均升高( $P<0.05$ );高浓度组与中、低浓度组比较,高浓度组 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 较低, I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA 水平较高,且 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 水平下降程度, I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA 水平升高程度与通痹健骨方浓度呈剂量依赖性,结果见表5。

表5 通痹健骨方对 KOA 软骨细胞 NF- $\kappa$ B p65, I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Tongbi Jiangu prescription on NF- $\kappa$ B p65 and I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA expression in KOA chondrocytes ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/mg·L <sup>-1</sup>	NF- $\kappa$ B p65	I $\kappa$ B- $\alpha$
空白		4.65 $\pm$ 0.37	0.53 $\pm$ 0.14
通痹健骨方	200	2.52 $\pm$ 0.19 <sup>1,2)</sup>	0.74 $\pm$ 0.09 <sup>1,2)</sup>
	400	1.97 $\pm$ 0.13 <sup>1,2)</sup>	0.89 $\pm$ 0.11 <sup>1,2)</sup>
	600	1.51 $\pm$ 0.24 <sup>1)</sup>	1.18 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与高浓度组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨论

中药复方具有药味多、途径多、靶点多及成分复杂的特点,用传统方法研究确有一定难度,这也是目前对其机理认识还比较模糊的原因。网络药理学作为连接中医和现代医学的桥梁,能够将二者有效的融合起来,使中药复方的作用机制从分子水

平解释成为可能。因此为了探析通痹健骨方治疗 KOA 的作用机制,笔者采用网络药理学多个数据库对其进行分析、探索并实验验证。

依据通痹健骨方活性成分-靶点网络可知槲皮素、山柰酚及 $\beta$ -谷甾醇是治疗 KOA 的核心活性成分。槲皮素是一种生物活性很强的黄酮类化合物,广泛存在于药材中,具有抗炎、抗氧化等多种作用<sup>[9]</sup>。现代药理研究表明槲皮素能够明显减少 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  等炎症因子的分泌,是治疗 KOA 潜在的抗炎药物<sup>[10]</sup>。研究发现应用槲皮素后,OA 大鼠疼痛行为学检测及组织学评分显著改善,与此相应的是血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  含量降低<sup>[11]</sup>。当然槲皮素的抗炎作用在临床实践中也得到进一步确认,有学者指出口服槲皮素能够明显改善 KOA 患者临床症状,而其机制与降低 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  炎症因子表达密切相关,与本文网络药理学结果也相符合<sup>[12-13]</sup>。研究证实山柰酚能够延缓 OA 患者临床症状<sup>[14]</sup>,其机制与降低 OA 大鼠软骨细胞中 IL-1 $\beta$  含量有关,此结果与基础实验的结论相一致<sup>[15]</sup>。而 $\beta$ -谷甾醇通过抑制 IL-6 表达,降低 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  等炎症因子的分泌,进而产生抗炎作用在 KOA 模型中也得到进一步验证<sup>[16]</sup>。由此可见通痹健骨方主要通过抑制炎症因子表达发挥治疗 KOA 作用。

炎症因子在 KOA 发病机制中占有重要地位并扮演重要角色,曾经普遍认为 KOA 是非炎症退行性

疾病,随着对KOA认识和研究的不断深入,炎症因子在KOA发病、发展中的作用逐渐被认识并重视。在KOA患者和动物模型中,可明显检测到IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 异常高表达<sup>[17-18]</sup>。因此降低炎症因子表达成为治疗KOA一个重要靶点。通过网络药理学分析可知,通痹健骨方治疗KOA关键靶点为IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 及MMP-3, SHAHINE等<sup>[19]</sup>发现OA患者IL-1 $\beta$ 基因表达水平与疼痛指数呈正相关,相应的是在KOA患者中关节液、滑膜中都检测出IL-1 $\beta$ 高表达,并与KOA病情呈正相关,即IL-1 $\beta$ 含量越高,病情越重<sup>[20-21]</sup>。TNF- $\alpha$ 能导致基质金属蛋白酶含量增加,进而加速软骨降解,与KOA患者临床症状明显相关<sup>[22]</sup>。如文中所述MMP-3能够降解软骨II型胶原蛋白及蛋白多糖,导致软骨退变,进而导致KOA的发生及发展<sup>[23]</sup>。

在GO生物过程富集分析中,分子功能与生物过程富集分析的结果与PPI网络分析的规律相一致,也与KOA发病机制相符合。KOA相关基因富集于该过程,引起膝骨关节炎的发生。而参与富集的基因多为通痹健骨方所涉及的基因,由此可见通痹健骨方通过调控该过程,从而达到治疗KOA的目的。

KEGG通路富集分析可知与KOA明显相关的通路有3条。JAK/STAT信号通路作为炎症因子在细胞内传递信号的共同通道,在机体组织中广泛存在<sup>[24]</sup>。有学者发现新止骨增生丸通过调控JAK/STAT通路,降低TNF- $\alpha$ 的表达,抑制KOA炎症反应,发挥治疗KOA的作用,从临床角度佐证了网络药理学分析中TNF- $\alpha$ 作为靶点治疗KOA的有效性<sup>[25]</sup>。Wnt信号通路分为经典和非经典信号通路,既能独立也能与其他信号通路共同导致KOA炎症反应的发生<sup>[26]</sup>。其经典的Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路能够促进环氧合酶-2(COX-2)与基质金属蛋白酶(MMP)表达,引发软骨炎症反应,加速软骨退变及KOA发生<sup>[27]</sup>。NF- $\kappa$ B信号通路已被证实存在在KOA炎症反应中扮演重要角色<sup>[28]</sup>。陈浩雄等<sup>[29]</sup>发现补肾活血方通过调控NF- $\kappa$ B信号通路,进而下调炎症因子NF- $\kappa$ B p65表达,降低炎症反应,最终达到缓解疼痛、改善关节功能的目的。由此提示通痹健骨方通过多个途径作用于膝骨关节炎,进而发挥其提高患者生活质量,改善临床症状的目的。

ELISA结果表明,与空白组比较通痹健骨方各浓度组上清液中IL-1 $\beta$ , MMP-3及TNF- $\alpha$ 水平均降

低( $P<0.05$ );高浓度组与中、低浓度组比较,高浓度组较低且IL-1 $\beta$ , MMP-3及TNF- $\alpha$ 水平下降程度与通痹健骨方浓度呈正相关。提示通痹健骨方能够降低人KOA软骨细胞上清液中IL-1 $\beta$ , MMP-3、TNF- $\alpha$ 水平。PCR检测结果发现,与空白组比较,通痹健骨方各组NF- $\kappa$ B p65 mRNA水平均降低( $P<0.05$ ), I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA水平均升高( $P<0.05$ );高浓度组与中、低浓度组比较,高浓度组NF- $\kappa$ B p65 mRNA较低, I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA水平较高,且NF- $\kappa$ B p65 mRNA下降程度, I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA升高程度与通痹健骨方浓度呈剂量依赖性。由此可知通痹健骨方不仅通过降低IL-1 $\beta$ , MMP-3, TNF- $\alpha$ 水平,而且通过调控NF- $\kappa$ B信号通路中NF- $\kappa$ B p65 mRNA, I $\kappa$ B- $\alpha$  mRNA含量,达到治疗KOA的目的,与网络药理学分析结果也相呼应。推测患者之所以能够明显缓解疼痛并改善功能与NF- $\kappa$ B信号通路及炎症因子密切相关。

综上所述,本研究通过网络药理学方法对通痹健骨方治疗膝骨关节炎多成分、多靶点间的相互关系及作用机制进行了深入探析,明确了本方治疗KOA的分子机制,并对其药理机制通过新的范式提供了理论依据,为深入探索通痹健骨方治疗膝骨关节炎具有重要的参考意义。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 符仲秋,王维学,丰景斌. 藤黄健骨胶囊对大鼠膝骨关节炎的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(15):1996-1998.
- [2] THIRUTHOPU N S. Knee-osteoarthritis-an-overview[J]. J Novel Physiotherap, 2021, 10(6):442.
- [3] 贺娟娟,颜春鲁,安方玉,等. 炎症因子与炎症因子相关信号通路在膝骨关节炎中的调控机制研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(12):1308-1311.
- [4] 易南星,梁倩倩,张伟强,等. 骨性关节炎相关滑膜炎研究进展[J]. 昆明医科大学学报, 2019, 40(3):136-139.
- [5] 郑梓灌,林涛,吴丽芳. 独活寄生汤口服联合二乌红花饮离子导入治疗膝骨关节炎肾虚髓亏证[J]. 中医正骨, 2019, 31(5):38-40.
- [6] 周巧,刘健,忻凌,等. 芙蓉膏外敷联合中药治疗活动期膝骨关节炎的临床数据挖掘及关联分析研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(4):505-508.
- [7] 吴献毅,周明旺,叶丙霖,等. 李盛华教授治疗膝骨关节炎的学术思想[J]. 中国中医急症, 2017, 26(10):1730-1732.
- [8] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:

- 人民卫生出版社, 2002: 1861.
- [9] BASU A, SCHELL J, SCOFIELD R H. Dietary fruits and arthritis[J]. *Food Funct*, 2018, 9(1): 70-77.
- [10] LEYVA-LOPEZ N, GUTIERREZ-GRIJALVA E P, AMBRIZ-PEREZ D L, et al. Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 921.
- [11] BRITTI D, CRUPI R, IMPELLIZZERI D, et al. A novel composite formulation of palm itoylethanolamide and quercetin decreases inflammation and relieves pain in inflammatory and osteoarthritic pain models[J]. *Bmc Vet Res*, 2017, 13(1): 229.
- [12] KANZAKI N, SAITO K, MAEDA A, et al. Effect of a dietary supplement containing glucosamine hydrochloride, chondroitin sulfate and quercetin glycosides on symptomatic knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. *J Sci Food Agr*, 2012, 92(4): 862-869.
- [13] HALEAGRAHARA N, HODGSON K, MIRANDA-HERNANDEZ S, et al. Flavonoid quercetin-methotrexate combination inhibits inflammatory mediators and matrix metalloproteinase expression, providing protection to joints in collagen-induced arthritis [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(5): 1219-1232.
- [14] ZHUANG Z L, YE G Q, HUANG B. Kaempferol alleviates the interleukin- $\beta$ -induced inflammation in rat osteoarthritis chondrocytes via suppression of NF- $\kappa$ B[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 3925-3931.
- [15] HUANG X J, PAN Q Y, MAO Z K, et al. Kaempferol inhibits interleukin- $\beta$  stimulated matrix metalloproteinases by suppressing the MAPK-associated ERK and P38 signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 2697-2704.
- [16] CHOI J N, CHOI Y H, LEE J M, et al. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucoside from *Trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae) in lipopolysaccharide stimulated raw 264.7 murine macrophages [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(24): 2340-2343.
- [17] HOSNIJEH F S, BIERMA-ZEINSTRAS M, BAY-JENSEN A C. Osteoarthritis year in review 2018: biomarkers (biochemical markers) [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 28(3): 296-315.
- [18] LEE Y M, SON E, KIM S H, et al. Anti-inflammatory and antiosteoarthritis effect of *Mollugo pentaphylla* extract [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 74-81.
- [19] SHAHINE E M, ELHADIDI A S. AB0776 efficacy of glucosamine sulphate in lowering serum level of interleukin-1 in symptomatic primary knee osteoarthritis: clinical and laboratory study [J]. *Alex J Med*, 2014, 50(2): 159-163.
- [20] 黄庆恩, 黎金焕, 文立春, 等. 膝关节关节炎炎症细胞因子的研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2016, 5(11): 74-76, 80.
- [21] 郑剑平, 利春叶. 白细胞介素-1在骨性关节炎的水平及作用 [J]. *中国实用医药*, 2013, 4(15): 5-7.
- [22] 崔允强. 补肾强骨方治疗膝关节骨性关节炎的疗效及对患者血清 TNF- $\alpha$ , IL-6 和 IL-10 的影响 [J]. *黑龙江医药*, 2018, 31(4): 831-833.
- [23] PENGAS I, ELDRIDGE S, ASSIOTIS A, et al. MMP-3 in the peripheral serum as a biomarker of knee osteoarthritis, 40 years after open total knee meniscectomy [J]. *J Exp Orthop*, 2018, 5(1): 21.
- [24] 金连峰, 王秀婷, 石健, 等. 新止骨增生丸对膝关节炎软骨细胞 JAK/STAT 信号通路下 STAT3、p-STAT3 表达影响及作用机制研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(6): 8-12.
- [25] 王学川, 李霄, 梁承远. 基于 JAK-STAT 信号通路的药物研究进展 [J]. *陕西科技大学学报*, 2019, 37(6): 79-86.
- [26] KIM S J, KIM D S, KIM S H, et al. Beta catenin regulates expression of cyclooxygenase 2 in articular chondrocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(1): 221-226.
- [27] TAMAMURA Y, OTANI T, KANATANI N, et al. Developmental regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(19): 19185-19195.
- [28] ROGERS E L, REYNARD L N, LOUGHLIN J. The role of inflammation-related genes in osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(11): 1933-1938.
- [29] 陈浩雄, 何斌斌, 徐宁达, 等. 补肾活血方治疗膝关节关节炎对 NF- $\kappa$ B 信号通路靶效应的临床研究 [J]. *光明中医*, 2018, 33(24): 3653-3656.

[责任编辑 顾雪竹]