

## 基于网络药理学和体外实验研究苔黑酚葡萄糖苷治疗骨质疏松的分子机制

刘霞<sup>1,2</sup>, 黄明春<sup>2</sup>, 张小琼<sup>1,2</sup>, 李杰<sup>2</sup>, 张梅<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 省部共建西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137;

2. 重庆市中医院, 重庆 400021)

**[摘要]** **目的:**基于网络药理学预测苔黑酚葡萄糖苷(OG)治疗骨质疏松的作用靶点及相关信号通路,应用分子对接和体外实验验证,从而揭示其潜在作用机制。**方法:**通过 Similarity ensemble approach(SEA),SwissTargetPrediction 数据库获取 OG 药物靶点;通过疾病相关的基因与突变位点数据库(DisGeNET),GeneCards 数据库获取疾病靶点,交叉分析筛选出 OG 与骨质疏松共同作用靶点。利用 STRING 构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,随后利用 Cytoscape 3.7.2 软件中的 CytoNCA 插件进行拓扑分析筛选出核心靶点。其次,通过 g:Profiler 基因注释网站对所得共同靶点进行基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。最后,AutoDock Vina 软件用来进行分子对接以及体外细胞实验验证 OG 的抗骨质疏松作用。**结果:**OG 与骨质疏松的相关靶点 73 个,其中关键靶点 14 个。GO 和 KEGG 功能富集分析结果表明,OG 治疗骨质疏松涉及 259 个细胞生物学过程,主要包括有机氮化合物的代谢、细胞群增殖、蛋白质代谢过程、应激反应的调节、化学反应等。其作用机制可能与糖基化终末产物/糖基化终末产物受体(AGE/RAGE),白细胞介素-17(IL-17),磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)等信号通路相关。分子对接提示 OG 与关键靶点细胞周期蛋白 D<sub>1</sub>(CCND1 或 Cyclin D<sub>1</sub>),周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4)的结合能最低且相近。流式细胞仪检测结果显示,与正常组比较,OG 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例下降( $P<0.01$ ),S 期细胞比例明显增加( $P<0.01$ );蛋白免疫印迹法(Western blot)结果显示,与正常组比较,OG 能上调 Cyclin D<sub>1</sub>,CDK4 蛋白的表达( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。**结论:**OG 治疗骨质疏松具有多靶点-多通路的特点,作用机制可能通过上调细胞周期关键蛋白 Cyclin D<sub>1</sub>,CDK4 的表达改变细胞周期,从而促进细胞增殖。

**[关键词]** 苔黑酚葡萄糖苷;骨质疏松;网络药理学;分子对接;体外验证

**[中图分类号]** R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)01-0197-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211519

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211103.1728.006.html>

**[网络出版日期]** 2021-11-04 10:25

### Mechanism of Orcinol Glucoside in Treatment of Osteoporosis: An Exploration Based on Network Pharmacology and *in Vitro* Validation

LIU Xia<sup>1,2</sup>, HUANG Ming-chun<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-qiong<sup>1,2</sup>, LI Jie<sup>2</sup>, ZHANG Mei<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy,

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;

2. Chongqing Hospital of TCM, Chongqing 400021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To predict the therapeutic targets and related signaling pathways of orcinol glucoside (OG) in the treatment of osteoporosis by network pharmacology, and further clarify its mechanisms

**[收稿日期]** 20210615(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81774202);成都中医药大学2020年度“杏林学者”医院专项(YYZX2020059);2019年度“杏林学者”学科人才科研提升计划项目(YYZX2019053)

**[第一作者]** 刘霞,在读博士,主管中药师,从事中药炮制机制研究,Tel:023-67063732,E-mail:3137754430@qq.com

**[通信作者]** \*张梅,博士,研究员,博士生导师,从事中药及其复方药效物质基础及质量控制研究,Tel:028-61800231,E-mail:zhangmei63@cdutcm.edu.com

based on molecular docking and *in vitro* cell model. **Method:** The pharmacological targets of OG were obtained from Similarity ensemble approach (SEA) and SwissTargetPrediction, and the targets related to osteoporosis from DisGeNET and GeneCards. The cross-analysis was conducted to screen the common targets between OG and osteoporosis. STRING was used to construct the protein-protein interaction (PPI) network, followed by topology analysis using CytoNCA plug-in of Cytoscape 3.7.2 to screen out the core targets. The obtained common targets were subjected to gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis by g:Profiler. AutoDock Vina was utilized for molecular docking, and the *in vitro* cell experiments were then carried out for verifying the mechanism of OG in treating osteoporosis. **Result:** A total of 73 targets related to OG and osteoporosis were harvested, among which 14 were proved to be key targets by topological analysis. GO and KEGG functional enrichment analysis yielded 259 cell biological processes, mainly involving organonitrogen compound metabolic process, cell population proliferation, protein metabolic process, regulation of response to stress, and response to chemicals. Its mechanism of action might be related to advanced glycation end-product (AGE) -AGE receptor (RAGE) signaling pathway, interleukin-17 (IL-17) signaling pathway, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. Molecular docking indicated that the binding energies of OG to Cyclin D<sub>1</sub> (CCND1) and cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) were the lowest and similar. The results of flow cytometry showed that compared with the normal group, OG group exhibited decreased proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase ( $P<0.01$ ) and decreased proportion of cells in S phase ( $P<0.01$ ). As demonstrated by Western blot, compared with the normal group, OG up-regulated the protein expression levels of Cyclin D<sub>1</sub> and CDK4 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** OG alleviates osteoporosis via multiple targets and multiple pathways. It may exert the therapeutic effects by increasing Cyclin D1 and CDK4 protein expression to change cell cycle and promote cell proliferation.

**[Keywords]** orcinol glucoside (OG); osteoporosis; network pharmacology; molecular docking; *in vitro* validation

骨质疏松症(OP)是一种常见的全身性代谢性骨病,其特点是骨量低,骨微细结构改变,易导致脆性增加和骨折<sup>[1]</sup>。OP的发生与年龄密切相关,据2018年卫生健康委员会发布的中国居民OP流行病学调查显示,中国50岁以上居民患OP概率为19.2%<sup>[2]</sup>。目前西医治疗OP的药物主要包括钙剂和维生素D,甲状旁腺素类似物,双磷酸盐和雌激素等<sup>[3]</sup>。但是,这些药物存在药物疗效的不确切、患者不耐受及药物不良反应等问题<sup>[3]</sup>。

OP属于中医学“骨痿”“骨痹”“肾亏”等范畴,其病机关键是肾虚,因此补肾中药对OP的治疗已成为研究热点<sup>[4-5]</sup>。仙茅属于补肾类中药,具有补肾阳、强筋骨、祛寒湿的功效。现代药理研究表明,仙茅具有抗氧化、抗炎、调节免疫、抗骨质疏松等作用,在OP的治疗中具有广大前景<sup>[6]</sup>。苕黑酚葡萄糖苷(OG)是补肾中药仙茅中已知的主要活性成分,具有抗氧化、抗骨质疏松、抗抑郁、抗焦虑及免疫调节等多种药理学活性<sup>[7]</sup>。以往研究对OG治疗OP的作用机制已有部分阐述,如ZHOU等<sup>[8]</sup>研究发现,OG通过激活Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路

调节骨髓间充质干细胞(BMSCs)的成骨分化与脂分化间的平衡,改善OP。但目前关于OG治疗OP的研究尚有限,且尚无使用网络药理学验证OG对治疗OP作用机制的研究。为此,本研究应用网络药理学与体外实验相结合的方法,旨在拓展OG治疗OP的关键靶点和信号通路,探讨其可能的作用机制,以期为进一步新药研发提供基础,见图1。

## 1 材料与方法

**1.1 OG相关靶点筛选** 使用PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),以“orcinol glucoside”为关键词,获取Canonical SMILES;通过Similarity ensemble approach (SEA) (<http://sea.bkslab.org/>)数据库 Z-Score>0 和SwissTargetPrediction 数据库 (<http://new.swisstargetprediction.ch/?>) Probability $\geq$ 0,限定物种为“Homo sapiens”,预测OG作用靶点,然后汇总去重获得药物靶点。

**1.2 OP相关靶点筛选** 以“osteoporosis”为关键词,通过基因与突变位点数据库(DisGeNET, <https://www.disgenet.org/>)和 GeneCards 数据库

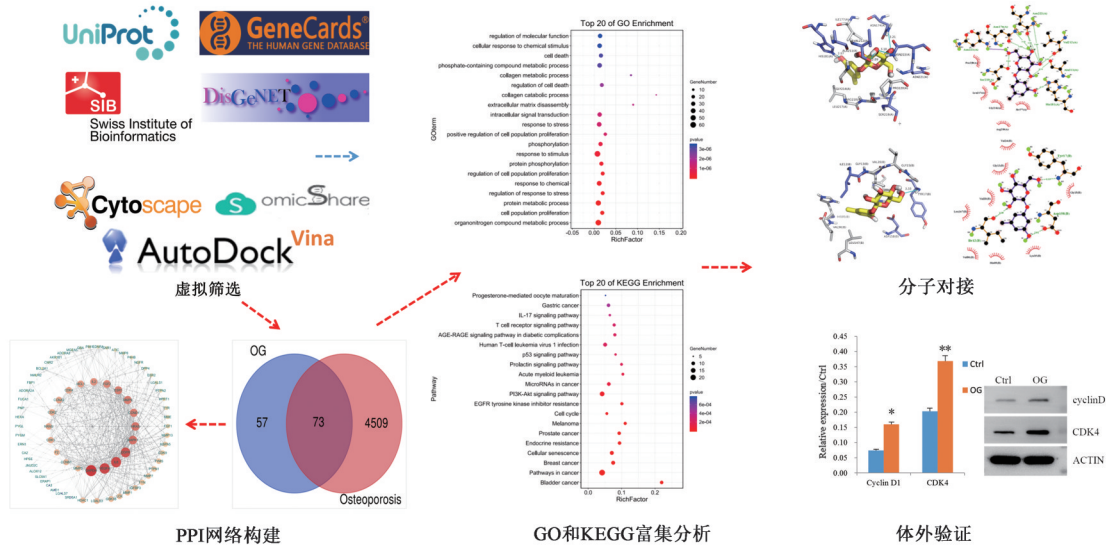


图1 OG干预骨质疏松的网络药理学分析流程

Fig. 1 Network pharmacological analysis flow chart of orcinol glucoside for osteoporosis

(<https://www.genecards.org/>)筛选相关靶点,然后汇总去重获得疾病相关靶点。

**1.3 OG-OP靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建** 利用 Venny 2.1.0 分析工具将 OG 药物靶点和 OP 疾病靶点取得交集,获得共同靶点。将所得共同靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>),选择物种种类为“Homo sapiens”,构建 PPI 网络。然后,将置信度 >0.4 的数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件中进行可视化分析,并利用 CytoNCA 插件进行拓扑分析以度中心性(DC)和介度中心性(BC)均大于中位数 2 倍的靶点作为核心靶点<sup>[9]</sup>,以进一步分析。

**1.4 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析** 通过 g: Profiler 在线平台 (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>)输入共同靶点,进行 GO 和 KEGG 富集分析。根据 P 值大小进行排序,选取排名在前 20 的生物途径(BP),细胞组分(CC),分子功能(MF)和 KEGG 信号通路,使用 Omicshare 工具 (<https://www.omicshare.com/tools/>)绘制高级气泡图。

**1.5 分子对接** 从药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库(<https://www.tcmspw.com/>)下载 OG 的 MOL2 格式;从 RCSB-PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)获得目标蛋白 3D 结构(PDB 格式)。利用 PyMOL 软件去除蛋白质上的溶剂和配体,AutoDock 1.5.6 对化合物和靶蛋白进行加氢、计算电荷等处理,转化为 pdbqt 格式,最后使用 AutoDock Vina 程序进行分子对接,计算结合能大

小。运用 Ligplus 及 PyMOL 软件对对接结果分别进行二维和三维的可视化分析。

### 1.6 实验验证

**1.6.1 药物与试剂** OG(成都普菲德生物技术有限公司,批号 17063006,纯度 ≥98%);MC3T3-E1 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(北纳生物,货号 339285);DMEM 培养基(Gibco 公司,批号 8119153);胎牛血清(PAN Biotech 公司,批号 P171225);青/链霉素(Hyclone 公司,批号 J190007);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)和细胞周期试剂盒(联科生物,批号分别为 A00114, A01124);RIPA 裂解液,BCA 蛋白定量检测试剂盒,SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒,β-肌动蛋白(β-actin),细胞周期蛋白 D<sub>1</sub>(Cyclin D<sub>1</sub>,武汉塞维尔生物科技有限公司,货号分别为 G2002, G2026, G2003, GB12001, GB11079);周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4,武汉三鹰生物技术有限公司,货号 11026-1-ap)。

**1.6.2 实验仪器** Synergy HTX 型多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),CytoFLEX LX 型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特),DYY-6C 型电泳仪电源(北京六一仪器厂),Neofuge 13R 型冷冻离心机[力新仪器(上海)有限公司]。

**1.6.3 细胞培养** 以含 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素的 DMEM 培养基培养 MC3T3-E1 细胞,置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待细胞铺满 80% ~ 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶(含有 0.01% 乙二胺四乙酸)消化传代培养。

**1.6.4 CCK-8 法检测 MC3T3-E1 细胞增殖** 取对数

生长期的MC3T3-E1细胞,以每孔 $2 \times 10^3$ 个细胞接种于96孔培养板中,培养箱中培养24 h后,加入不同质量浓度OG( $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  mg·L<sup>-1</sup>)实验孔,并设置空白孔(不含细胞、药物)和对照孔(不含药物)。培养箱中继续培养24, 48, 72 h后,加入CCK-8溶液10 μL,培养箱孵育2 h,用酶标仪测定在450 nm处各孔的吸光度A,观察OG对MC3T3-E1细胞增殖影响。

**1.6.5 碘化吡啶(PI)染色法检测细胞周期** 取对数生长期MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔铺于6孔培养板中。将细胞分为正常组(Ctrl组)和给药组(OG组),给药处理48 h后收集细胞,按照细胞周期试剂盒说明书进行染色,室温避光孵育25 min, CytoFLEX LX型流式细胞仪上机检测。

**1.6.6 Western blot法检测Cyclin D<sub>1</sub>, CDK4蛋白的表达** 按照PI染色实验分组处理细胞48 h后收集细胞,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取蛋白,按BCA试剂盒说明书测定蛋白浓度,加热法进行蛋白变性,制备10% SDS-PAGE凝胶上样后进行电泳、转膜、封闭,4 °C过夜孵育Cyclin D<sub>1</sub> (1:2 000), CDK4(1:1万)及β-actin(1:5 000)一抗,次日用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔

(1:3 000)室温孵育2 h,随后按照ECL试剂盒所示方法进行显影,显影结果采用AlphaEase FC软件测量条带灰度值。

**1.6.7 统计学处理** 采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据符合正态分布且方差齐性较好,多组样本量比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间的两两比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验;不符合正态分布且方差不齐时,采用非参数检验进行比较。

## 2 结果

**2.1 OG-OP靶点的获取** 汇总SEA, SwissTargetPrediction数据库相关靶点,删除重复性靶点得到130个药物靶点。汇总DisGeNET, GeneCards数据库获得靶点去重后得到4 582个疾病靶点。利用Venny 2.1.0在线工具,得到73个共同靶点。

**2.2 PPI网络构建及拓扑分析** 所得共同靶点提交至STRING数据库,将置信度>0.4的数据导入Cytoscape 3.7.2对PPI网络进行可视化,该网络由73个节点和461条边组成。利用CytoNCA插件计算网络节点的DC, BC中位数值分别为8和15.141 35, 故以DC≥16, BC≥30.282 7为筛选条件,选取OG干预OP的候选靶点,即得到核心靶点14个,见表1。

表1 OG抗骨质疏松核心靶点信息

Table 1 Information on core targets of OG against OP

序号	靶点信息	简称	DC	BC
1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)	49	1 058.475
2	vascular endothelial growth factor A	血管内皮生长因子A(VEGFA)	45	640.963 5
3	interleukin-6	IL-6	44	763.386 5
4	epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体(EGFR)	41	440.131 0
5	mitogen-activated protein kinase 1	丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)	33	279.903 6
6	GTPase HRas	HRAS	32	154.246 2
7	matrix metalloproteinase-9	基质金属蛋白酶9(MMP9)	30	305.934 2
8	G <sub>1</sub> /S-specific cyclin D <sub>1</sub>	CCND1	30	90.020 24
9	estrogen receptor	ESR1	29	272.752 1
10	fibroblast growth factor 2	碱性成纤维细胞生长因子2(FGF2)	27	124.605 3
11	interleukin-2	IL-2	25	118.738 6
12	induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	MCL1	22	51.108 77
13	cyclin-dependent kinase 4	CDK4	20	35.866 26
14	prothrombin	F2	16	93.151 69

**2.3 GO和KEGG富集分析** GO富集分析获得259个细胞生物学过程,其中BP分析获得189个条目(约占总条目的73.0%),MF获得47条,CC获得23条。根据P<0.05进行筛选,并对P值进行降序排

序,选择前20个条目建立气泡图,详见增强出版内容。该结果表明,上述共同基因功能主要与BP相关,其中涉及有机氮化合物的代谢,细胞群增殖,蛋白质代谢过程,应激反应的调节,化学反应等。

KEGG通路富集分析获得51条信号通路。根据 $P < 0.05$ 进行筛选,并对 $P$ 值进行降序排序,选择前20个条目建立气泡图。KEGG富集分析主要涉及AGE/RAGE, IL-17, PI3K/Akt等信号通路,提示OG治疗OP可能通过多个通路联合共同发挥作用,其中PI3K/Akt信号通路富集的关键靶点最多。

#### 2.4 分子对接验证 OG和14个核心靶点(GAPDH, VEGFA, IL-6, EGFR, MAPK1, HRAS,

MMP9, CCND1, ESR1, FGF2, IL-2, MCL1, CDK4, F2)的对接结果见表2。当结合能小于0时,提示配体与受体可自发结合,且结合的构象越稳定时结合能越低,发生作用的可能性就越大,本研究选取结合能 $\leq -7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ( $1 \text{ kcal}\approx 4.186 \text{ kJ}$ ,下同)作为筛选条件<sup>[10]</sup>。然后,将结合能 $\leq -7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的OG与靶点对接结果采用Ligplus及PyMOL进行可视化分析。

表2 OG与核心靶点分子对接信息

Table 2 Molecular docking information of OG with core targets

靶点	PDB ID	结合能/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	靶点	PDB ID	结合能/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
GAPDH	4WNC	-6.7	CCND1	6P8E	-7.0
VEGFA	3QTK	-5.2	ESR1	5TN9	-6.8
IL-6	4O9H	-5.8	FGF2	4OEE	-6.5
EGFR	5Y9T	-6.7	IL-2	4NEM	-6.1
MAPK1	4FUX	-6.2	MCL1	2PQK	-6.6
HRAS	4DOT	-6.1	CDK4	2W99	-7.3
MMP-9	4HMA	-6.2	F2	6O39	-6.4

#### 2.5 OG抗OP实验

**2.5.1 OG对MC3T3-E1细胞增殖的影响** 不同质量浓度的OG( $1\times 10^{-1}, 1\times 10^{-2}, 1\times 10^{-3}, 1\times 10^{-4}, 1\times 10^{-5}, 1\times 10^{-6} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )分别干预MC3T3-E1细胞24, 48, 72 h后,与正常组比较,在48 h时,OG质量浓度为 $1\times 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对MC3T3-E1活力的影响最大( $P < 0.01$ ),使MC3T3-E1活力提高了23.9%。OG质量浓度为 $1\times 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与细胞共同培养48 h后,药物达到最有效促进细胞增殖效果。因此,选用OG质量浓度为 $1\times 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时处理MC3T3-E1细胞48 h作为后续实验干预浓度和时间节点。见表3。

表3 OG对MC3T3-E1细胞增殖的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of OG treat MC3T3-E1 cell proliferation ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	干预时间/h		
		24	48	72
Ctrl	100	100	100	100
OG	$1\times 10^{-1}$	99.5 $\pm$ 0.41	108.1 $\pm$ 1.33 <sup>1)</sup>	101.2 $\pm$ 2.20
	$1\times 10^{-2}$	102.4 $\pm$ 1.28	118.2 $\pm$ 1.68 <sup>2)</sup>	100.9 $\pm$ 2.73
	$1\times 10^{-3}$	100.4 $\pm$ 0.55	112.3 $\pm$ 2.24 <sup>2)</sup>	99.5 $\pm$ 2.17
	$1\times 10^{-4}$	111.0 $\pm$ 2.29 <sup>2)</sup>	123.9 $\pm$ 2.45 <sup>2)</sup>	99.9 $\pm$ 1.38
	$1\times 10^{-5}$	108.6 $\pm$ 1.91 <sup>2)</sup>	110.8 $\pm$ 4.25 <sup>2)</sup>	98.1 $\pm$ 1.44
	$1\times 10^{-6}$	102.6 $\pm$ 1.45	103.8 $\pm$ 1.95	97.9 $\pm$ 1.21

注:与Ctrl组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表4,5同)。

**2.5.2 OG对MC3T3-E1细胞周期的影响** 药物处理MC3T3-E1细胞48 h后,用流式细胞仪检测细胞周期,结果显示,与正常组比较,OG组的 $G_0/G_1$ 期细胞比例下降( $P < 0.01$ ),S期细胞比例增高( $P < 0.01$ )。见表4。

表4 OG对MC3T3-E1细胞周期的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of OG treat MC3T3-E1 cell cycle ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
Ctrl	77.27 $\pm$ 0.06	12.21 $\pm$ 0.13	10.55 $\pm$ 0.16
OG	67.67 $\pm$ 0.92 <sup>2)</sup>	20.32 $\pm$ 0.18 <sup>2)</sup>	12.01 $\pm$ 1.10

**2.5.3 OG对MC3T3-E1细胞周期蛋白Cyclin D<sub>1</sub>, CDK4表达情况的影响** 药物处理MC3T3-E1细胞48 h后,Western blot结果显示,与正常组比较,OG组的Cyclin D<sub>1</sub>, CDK4蛋白表达量升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),见表5,图2。

表5 OG对Cyclin D<sub>1</sub>, CDK4蛋白表达情况( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Protein expression of OG on Cyclin D<sub>1</sub>, CDK4 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

分组	Cyclin D <sub>1</sub>	CDK4
Ctrl	0.07 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.04
OG	0.16 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	0.37 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>

### 3 讨论

OP是现代临床中一种常见的骨科疾病,其发病机制非常复杂,包括生活习惯、营养、年龄、遗传因

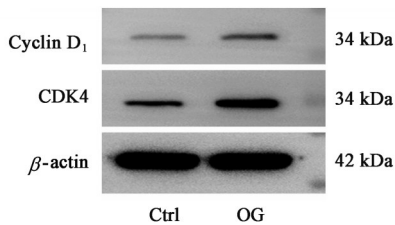


图2 OG对Cyclin D<sub>1</sub>,CDK4蛋白表达电泳( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig. 2 Protein expression electrophoresis of OG on Cyclin D<sub>1</sub>, CDK4 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

素、激素及免疫等方面多种因素相互影响的结果<sup>[11]</sup>。中医学把OP归属于“骨痿”“骨痹”“肾亏”等范畴,认为其病机关键是肾虚<sup>[12]</sup>。近年来,补肾中药及复方制剂如淫羊藿、杜仲、补肾活血汤、补肾化痰方等作为OP的治疗或辅助治疗药物<sup>[13-16]</sup>,以其相对安全、毒副作用小等特点,在防治OP方面取得较好疗效。

中药活性成分不仅是中医药发挥临床疗效的活性物质,还是现代创新药物开发的源泉,从分子水平认知中药材作用更有利于了解药用植物体内生物活性途径及调控机制<sup>[17]</sup>。OG是补肾中药仙茅中已知主要活性成分,其抗骨质疏松作用已有报道,OG可激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路调节BMSCs细胞的成骨分化与成脂分化间的平衡,从而改善OP<sup>[8]</sup>。另有研究报道,OG可与二仙汤中其他活性成分协同配伍,减轻去卵巢大鼠的骨质流失,增加血清骨形态发生蛋白2(BMP2)水平,可使下降的骨钙素逆转至正常水平<sup>[18]</sup>。OG的药代动力学也表明,可在全肠道以原型被吸收入血,回肠吸收速率最佳,机体在虚寒状态,尤其阳虚状态下可增加药物的吸收<sup>[7]</sup>。但目前对于OG的研究数量有限,其药物作用的具体靶点尚未有明确阐述。

本研究首次基于网络药理学初步筛选OG抗OP的73个共同靶点,并依据拓扑分析筛选出14个核心靶点。GO和KEGG富集分析发现这些共同靶点参与了多个生物学过程和可能通过干预AGE/RAGE,IL-17,PI3K/Akt等信号通路发挥抗OP的作用,其中PI3K/Akt信号通路富集的关键靶点最多。研究表明,PI3K/Akt信号通路可通过促进成骨细胞增殖、分化和骨形成而参与OP的抑制<sup>[19]</sup>。分子对接结果显示,OG与核心靶点有明显结合能力,其中与Cyclin D<sub>1</sub>( $-7.0\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),CDK4( $-7.3\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )蛋白结合能力最强,说明OG可能通过影响细胞周期而发挥抗OP作用。

本研究通过体外实验进行验证表明,OG在 $1\times$

$10^{-4}\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与MC3T3-E1共同培养48h后能明显促进细胞的增殖。流式细胞仪检测细胞周期结果解释了OG促进细胞增殖的原因,由于OG干预MC3T3-E1细胞48h后, $G_0/G_1$ 期细胞所占比例下降( $P<0.01$ ),而S期细胞所占比例上升( $P<0.01$ ),更多的细胞从 $G_0/G_1$ 期被促进进入到S期,故而促进细胞增殖<sup>[20]</sup>。其中,Cyclin D<sub>1</sub>与CDK4结合后可稳定其活性,在调控细胞周期 $G_1$ 期中发挥关键作用<sup>[21]</sup>。研究显示,转录因子NF- $\kappa$ B通过反转录激活Cyclin D<sub>1</sub>和CDK4的表达,促进细胞周期 $G_1/S$ 转变,进而促使肾透明细胞癌(ccRCC)细胞的增殖<sup>[21]</sup>。最后,导致细胞周期改变的原因用Western blot来初步判断,结果显示Cyclin D<sub>1</sub>及CDK4蛋白在OG的作用下明显升高,进而能够促进细胞周期从 $G_0/G_1$ 进入下一阶段。

综上所述,本研究采用网络药理学和体外实验初步揭示了OG治疗OP具有多靶点-多通路的特点,作用机制可能通过上调细胞周期关键蛋白Cyclin D<sub>1</sub>,CDK4的表达改变细胞周期而促进细胞增殖,这一结论丰富了OG治疗OP的机制研究,为下一步新药研发提供基础研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] BLACK D M, ROSEN C J. Postmenopausal osteoporosis [J]. N Engl J Med, 2016, 374 (3): 254-262.
- [2] 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.
- [3] 叶丹. 骨质疏松药物治疗的研究进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2021, 42(1):148-151.
- [4] 钟建春,谢兴文,李鼎鹏,等. 补肾方药治疗骨质疏松的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(3): 85-88.
- [5] 张骞予,杨鹤祥,楼家晖. 补肾中药诱导骨髓间充质干细胞增殖分化防治骨质疏松的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(3):193-195.
- [6] 周芳,姚萌,吴倩,等. 仙茅的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(8):2238-2247.
- [7] 强明敏,尹佳,刘会会,等. 苍黑酚葡萄糖苷药代动力学及药理活性研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, doi:21. 1543. R. 20210514. 1107. 016.
- [8] ZHOU X Y, LIU Z Z, HUANG B, et al. Orcinol glucoside facilitates the shift of MSC fate to osteoblast

- and prevents adipogenesis via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2703-2713.
- [ 9 ] LI J, HUANG Y Q, ZHAO S, et al. Based on network pharmacology to explore the molecular mechanisms of astragalus membranaceus for treating T2 diabetes mellitus [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(22): 633-633.
- [ 10 ] ORRIS G M, HUEY R, LINDSTROM W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785-2791.
- [ 11 ] ZHAO H Y, ZHAO N, ZHENG P, et al. Prevention and treatment of osteoporosis using Chinese medicinal plants: special emphasis on mechanisms of immune modulation [J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018(4): 1-11.
- [ 12 ] 梁伟乔, 钟诚, 李宇明. 骨质疏松症的中医病因病机认识与治疗进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(1): 135-139.
- [ 13 ] 刘谊民, 许婷, 张黄琴, 等. 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探索 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20210917.
- [ 14 ] 门志涛, 徐敏, 黄承军, 等. 基于网络药理学研究杜仲治疗骨质疏松性骨折的作用机制 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(5): 721-726.
- [ 15 ] 岳志军, 姜自伟, 李紫阁, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨补肾活血汤“从虚从瘀”治疗骨质疏松症的分子机制 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(4): 542-548, 584.
- [ 16 ] 谭张奎, 周广文, 张妍, 等. 补肾化痰方对去势骨质疏松模型大鼠 Th17/Treg 平衡机制的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(5): 33-40.
- [ 17 ] 童宇茹, 张逸风, 沈思雨, 等. 中药活性成分“合成生物学”创造与新药发现——高伟教授 [J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(5): 783-787.
- [ 18 ] WANG N, XU P, WANG X, et al. Integrated pathological cell fishing and network pharmacology approach to investigate main active components of Er-Xian decoction for treating osteoporosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 241: 111977.
- [ 19 ] 史东梅, 董明, 陆颖, 等. PI3K/Akt 信号通路骨破坏: 问题与机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(23): 3716-3722.
- [ 20 ] 郭晨旭, 刘静波, 谢强, 等. 白术内酯 I 通过调低 Cyclin D1/CDK4 抑制胃癌细胞 SGC-7901 的增殖及机制 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2020, 45(4): 456-460.
- [ 21 ] TCHAKARSKA G, SOLA B. The double dealing of cyclin D1 [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(2): 163-178.

[责任编辑 顾雪竹]