

基于网络药理学的鹿茸治疗骨关节炎作用的机制

郭子奕, 杨扬, 何忠梅, 时坤, 李健明, 陈维佳, 宗颖*, 杜锐*

(吉林农业大学, 长春 130000)

[摘要] 目的:利用网络药理学方法探索鹿茸(*Cervi Cornu Pantotrichum*)在治疗骨关节炎中的作用机制。方法:利用BATMAN-TCM数据库筛选出鹿茸的有效活性成分,挖掘对应的靶点信息。通过GeneCards,在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)得到骨关节炎相关靶点信息。将成分靶点和骨关节炎靶点取交集,使用STRING平台建立蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。使用DAVID数据库对鹿茸治疗骨关节炎作用靶点进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析,利用R x64 3.6.3软件绘制GO,KEGG富集分析高级气泡图,利用Cytoscape 3.7.2软件绘制“中药-成分-靶点-通路”网络。体外实验分别检测鹿茸对产生氧化损伤和炎症的RAW 264.7细胞的细胞活力和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平。结果:共计得到鹿茸活性成分20种,其中神经酰胺和6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、脑苷、橄榄苦苷、鞘磷脂、胆固醇阿魏酸酯没有达到筛选条件的得分,所以共筛选出14种有效活性成分。共计303个有效成分靶点,共得到3 093个骨关节炎作用靶点。将成分靶点与骨关节炎作用靶点取交集,得到活性成分-骨关节炎作用靶点92个。GO富集分析和KEGG通路分析显示,鹿茸涉及的生物过程主要有氧化还原过程, RNA聚合酶II启动子转录的正调控、炎症反应、蛋白质合成、破骨细胞分化, TNF信号通路、癌症通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路等生物过程和信号通路。体外实验结果显示,一定浓度的鹿茸蛋白显著增加了过氧化氢(H₂O₂)诱导的氧化损伤RAW 264.7细胞的细胞活力($P < 0.05$, $P < 0.01$),并且降低了脂多糖(LPS)诱导炎症RAW 264.7细胞的TNF- α 水平($P < 0.05$)。结论:基于网络药理学方法阐释了鹿茸多成分、多靶点、多途径的治疗OA作用机制,证实了鹿茸具有抗炎及抗氧化活性,为深入研究鹿茸治疗OA提供了理论指导和科学依据。

[关键词] 鹿茸; 骨关节炎; 网络药理学; 作用机制; 信号通路; 氧化应激; 炎症

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0194-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220216 **[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.20211214.1815.004.html>

[网络出版日期] 2021-12-16 8:42

Mechanism of *Cervi Cornu Pantotrichum* in Treatment of Osteoarthritis Based on Network Pharmacology

GUO Zi-yi, YANG Yang, HE Zhong-mei, SHI Kun, LI Jian-ming, CHEN Wei-jia, ZONG Ying*, DU Rui*
(Jilin Agricultural University, Changchun 130000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of *Cervi Cornu Pantotrichum* in the treatment of osteoarthritis by network pharmacology. **Method:** The active ingredients and the corresponding targets of *Cervi Cornu Pantotrichum* were screened out by a Bioinformatics Analysis Tool of Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM). The targets related to osteoarthritis were obtained through GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). The targets corresponding to the active ingredients and those related to osteoarthritis were intersected to reveal the common targets, and STRING was

[收稿日期] 20210908(015)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1706603-02);吉林省科技发展计划项目(20200101006FG);吉林省重点技术研发项目(20180201010YY-1)

[第一作者] 郭子奕, 硕士, 从事中兽药和鹿产品的生药学、药理学研究, E-mail: 512906014@qq.com

[通信作者] *宗颖, 博士, 副教授, 从事鹿产品和中兽药的应用基础研究, E-mail: zongying@jlau.edu.cn;

*杜锐, 博士, 二级教授, 从事人兽共患病防治, 经济动物学传染病防治工作, E-mail: durui197101@sina.com

adopted to build a protein-protein interaction (PPI) network. DAVID was used for gene ontology (GO) annotation and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment on the anti-osteoarthritis targets of Cervi Cornu Pantotrichum, and R x64 3.6.3 was employed to produce the advanced bubble charts of GO terms and KEGG pathways. Cytoscape 3.7.2 was used to establish the “Chinese medicinal herb-active ingredient-target-signaling pathway” network. *In vitro* experiments were performed to detect the viability of RAW 264.7 cells exposed to oxidative stress and the tumor necrosis factor (TNF)- α level in RAW 264.7 cells with inflammation under the treatment by Cervi Cornu Pantotrichum. **Result:** A total of 20 active ingredients of Cervi Cornu Pantotrichum were obtained, of which ceramide, 6'-*O*- β -*D*-glucosylgentiopicoside, cerebroside, oleuropein, sphingomyelin, and cholesterol ferulate did not meet the screening conditions. Therefore, a total of 14 active ingredients were finally screened out, and 303 and 3 093 targets of active ingredients and osteoarthritis were respectively obtained. The two target sets were taken to intersect, which revealed 92 common targets. GO annotation and KEGG pathway enrichment showed that the targets were mainly involved in redox process, positive regulation of RNA polymerase II promoter transcription, inflammatory response, protein synthesis, osteoclast differentiation, TNF signaling pathway, signaling pathways in cancer, mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway. The results of *in vitro* experiments showed that a certain concentration of protein in Cervi Cornu Pantotrichum significantly increased the viability of RAW 264.7 cells exposed to H₂O₂-induced oxidative damage ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and reduced the level of TNF- α in the RAW 264.7 cells experiencing lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation ($P < 0.05$). **Conclusion:** Based on the network pharmacology method, the mechanism of the multi-component, multi-target and multi-pathway treatment of OA by antler antler was explained, and the anti-inflammatory and antioxidant activities of antler antler were confirmed, which provided theoretical guidance and scientific basis for further research on the treatment of OA by antler antler.

[Keywords] Cervi Cornu Pantotrichum; osteoarthritis; network pharmacology; mechanism of action; signaling pathway; oxidative stress; inflammation

鹿茸(Cervi Cornu Pantotrichum)为鹿科动物梅花鹿或马鹿的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角,前者 and 后者的俗称分别为“花鹿茸”和“马鹿茸”^[1-2]。作为名贵药材,鹿茸在治疗骨科疾病上在我国已经有几千年的历史,大量实验研究证明,鹿茸对软骨细胞和骨细胞具有显著的增殖作用。

骨关节炎(OA)是一种严重影响人类生活和身体健康并导致关节软骨组织慢性退行性疾病,会造成关节软骨退变、断裂、缺损,最终可能会影响整个关节的功能并造成无法行走的严重后果。因其致病机制相对复杂多变,所以发病机制尚不明确,国内外至今都没有确切的根治之法,国外治疗OA多在病症早期使用镇痛和抗炎的药物缓和病人的病情,增强病人对OA的抵抗性,但此方法并不能有效遏制患者的OA进程,并且毒副作用较大,不适合长期服用。中医治疗骨关节炎运用了针灸疗法、中医推拿的传统中医手段结合了外用内服活血化瘀中药等传统中医治疗体系。不仅具有切实的疗效还

有不良反应小等特点,对早期骨关节炎的治疗具有良好的作用。鹿茸作为传统名贵药材以益精血、强筋骨等功效著称,前期有研究者发现,鹿茸可以通过提高OA大鼠软骨细胞转化生长因子- β (TGF- β)及其相关受体的表达,促进了TGF- β /Smad信号通路的转导,起到修复OA大鼠软骨损伤的作用^[3]。本研究通过网络药理学方法进一步探究鹿茸治疗OA的作用机制。

网络药理学始于2007年,因其打破固有的一种药物、一个基因、一种疾病的传统新药研发模式及其研究为大量临床试验的成功性带来的成效。使其得到广泛支持和发展,网络药理学被认为是阐明中药复杂机制的一种全新手段,从网络角度的出发说明了生物系统,药物和复杂疾病之间的相互作用关系,具有与中医相似的整体原理^[4]。网络药理学基于系统生物学的理论^[5],同时结合计算机科学、代谢组学、多向药理学、生物信息学等多门学科理论知识和功能技术^[6],通过构建活性成分-基因靶点-

疾病、基因靶点-功能/通路等网络,系统综合的阐明药物的作用机制^[7]。以其整体性和系统性的特点将单一的药物研发理念转变为多靶点、多途径的与复杂疾病相连接起来的新型研究理念。是现代中药的重要研究手段也是新药研发的重要研究途径。本实验组运用网络药理学手段阐释鹿茸发挥治疗骨关节炎功效的作用机制,旨在寻找鹿茸的治疗骨关节炎作用靶点及相关信号通路。研究结果为鹿茸治疗骨关节炎的临床应用提供理论依据,进一步为鹿茸的开发利用奠定基础。

1 鹿茸治疗骨关节炎的网络药理学研究

1.1 鹿茸活性成分的筛选和收集 由于中医药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)中未给出鹿茸的活性成分,选用BATMAN-TCM(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)数据库筛选鹿茸的有效活性成分。BATMAN-TCM(a Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechANism of Traditional Chinese Medicine)是第一个专门为研究中草药分子机制而设计的在线生物信息学分析工具。对于用户提交的TCM,BATMAN-TCM将首先预测每个查询中药成分的潜在目标,然后对这些目标进行功能分析,包括基因本体(GO)分析,京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)/Therapeutic Target Database(TTD)疾病富集分析^[8]。

1.2 鹿茸有效活性成分作用靶点的预测和筛选 通过BATMAN-TCM数据库,设置输入类型为“中药或中药清单”,输入“Lu Rong”为关键词,设置“药物-靶点”相似性模型阈值Score cutoff ≥ 30 ^[9],对于每种复合化合物,其目标预测方法给出的分数超过给定“Score cutoff”分数的预测候选目标(包括已知目标)将被视为潜在目标,并将对其进行注释和进一步探究。选择 $P \leq 0.05$,检索筛选鹿茸有效活性成分及其对应的潜在靶点。

1.3 鹿茸治疗骨关节炎靶点的预测和筛选 结合GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库和OMIM(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)数据库及文章中的治疗骨关节炎靶点,去除无效基因(重复基因和假阳性基因),汇总并整理出骨关节炎靶点集。并将骨关节炎作用靶点集与鹿茸预测作用靶点进行取交集,将相应的靶点信息列出并导入Venn diagram绘制鹿茸靶点与抗疲劳靶点的交集靶点的韦恩图。

1.4 蛋白相互作用网络构建与分析 STRING数

据库(<https://string-db.org/>, version 10.5)是一种分析蛋白与蛋白之间相互作用的数据库,把鹿茸有效活性成分对应的作用靶点与骨关节炎靶点的交集导入STRING,选择“Multiple proteins”,物种设置为“Homo sapiens”,网络边的含义选择“confidence”,线条粗细对应数据支持的强弱,网络显示选项选择“hide disconnected nodes in the network”,蛋白相互作用关系结果点击“Exports”,下载TSV格式文件并将结果导入Cytoscape 3.7.2软件绘制相互作用网络,并使用tools中的“analyze network”工具并选择“combine paired edges Treat the network as undirected”,然后再使用tools中的“Generate style from statistics”工具,设置节点的大小和颜色表示蛋白的度值在网络中的相对大小。边的粗细表示蛋白的combine score在网络中的相对大小。根据靶点的拓扑性质筛选出关键靶点并将其导入DisGeNET数据库确认其对应蛋白的名称及具体信息。

1.5 中药-活性成分-骨关节炎作用靶点的网络构建 将鹿茸的有效活性成分及其骨关节炎作用靶点的名称及类型信息导入Excel建立以Network和Type命名的两个文件,(Type文件代表某些数据的隶属关系,例如ABCB1属于基因,17- β -雌二醇属于成分、鹿茸属于药物。Network文件表示两两相连接的两个节点及对应关系,例如某种成分对应的该成分的作用靶点)将Network和Type文件数据导入Cytoscape 3.7.2以构建鹿茸-活性成分-治疗骨关节炎靶点网络。Cytoscape能对网络图进行分析和构建,其可对网络中的节点、边等能够进行重要参数的可视化设置,包括体积、色彩、形状等。网络中节点之间相连接反映节点之间的相互作用,度值越大的节点表示越多的其他节点与该节点相连,节点对应的靶点就可能是该药物中某化学成分的重要作用靶点^[10]。

1.6 治疗骨关节炎靶点通路的注释分析 利用R(R x64 3.6.3)及生物分子功能注释系统DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)在线分析平台对已获取的鹿茸治疗骨关节炎靶点集合进行GO富集分析和KEGG通路注释分析,DAVID是大规模基因生物过程及通路分析在线富集分析工具,利用DAVID导入基因靶点能有效切其准确地分析并获得基因对应的细胞组分、生物过程、分子功能,KEGG通路等信息^[11]。导出DAVID分析结果文件。使用R x64 3.6.3软件并输入合适的方程式和代码并导入

DAVID结果文件,绘制R语言高级气泡图。将鹿茸对应的靶蛋白直接映射到通路上,获得鹿茸调控骨关节炎病症的主要通路。

1.7 治疗骨关节炎作用靶点-信号通路网络构建与分析 利用DAVID在线工具获取鹿茸治疗骨关节炎靶点的KEGG通路,通过R(R R x64 3.6.3)语言软件输入相应的代码和方程绘制KEGG高级气泡图筛选出15条主要的通路。并截取每条通路相对应的作用靶点,将鹿茸治疗骨关节炎涉及的通路、通路对应的作用靶点及靶点对应的活性成分形成相关的Excel文件导入Cytoscape 3.7.2以构建通路-作用靶点-活性成分网络。

2 实验验证鹿茸具有抗炎及抗氧化作用

2.1 鹿茸对过氧化氢(H₂O₂)诱导的RAW 264.7细胞的细胞活力影响 基于GO富集中的生物过程分析结果及文献[12-13]中的理论,探究鹿茸是否具有抗氧化活性,取生长良好的小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7,武汉普诺赛生命科技有限公司,批号CL-0190),按照细胞密度1×10⁴个/mL接种于96孔板上。在37℃,5%CO₂的培养箱孵育24h,离心,弃上清,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2遍,重新接种于含培养基的96孔板。空白组加入培养基,模型组加入400 μmol·L⁻¹的H₂O₂,给药组分别加入含高、中、低质量浓度鹿茸蛋白样品的培养基(0.25,0.5,1 g·L⁻¹)及400 μmol·L⁻¹的H₂O₂,培养4h,造模完成。采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测不同浓度鹿茸干预下的RAW 264.7细胞与模型组细胞的细胞活力对照(操作按照试剂盒说明书)。

2.2 鹿茸对脂多糖(LPS)诱导的RAW 264.7炎症细胞TNF-α水平影响 验证鹿茸的抗炎作用,利用LPS诱导RAW 264.7细胞炎症造模^[12],取生长发育良好的RAW 264.7细胞接种于96孔板中,调整密度为1×10⁴个/mL,分别加入用完全培养基稀释成高、中、低3个不同质量浓度的鹿茸样品(0.25,0.5,1 g·L⁻¹),培养1d,然后在加入5 mg·L⁻¹的LPS,培养24h,完成造模。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测与模型组细胞的比较,不同质量浓度鹿茸(0.25,0.5,1 g·L⁻¹)对RAW 264.7炎症细胞上清TNF-α的影响。

实验所用鹿茸采自吉林省长春市双阳鹿场,样品为双阳梅花鹿二杠茸。采用超微粉碎法^[12]提取鹿茸蛋白:即鲜鹿茸经液氮速冻后置入超微粉碎机中粉碎至肉糜状,粒径75 μm左右,200目以上。称取茸糜状物200g鹿按照1:10(W/V)的比例加入水

及适量的冰乙酸保持pH 4置于4℃过夜,3 000 r·min⁻¹,10 min离心(离心半径15 cm)取上清于1 kDa透析袋用自来水透析脱盐,每4h更换1次透析液,直至经pH试纸测量外部透析液为中性后结束透析。透析袋内所得即为鹿茸蛋白溶液。将鹿茸蛋白溶液55℃以下旋转蒸发浓缩至200 mL以内,真空冷冻干燥机内冷冻干燥48h得到鹿茸蛋白样品。称量干燥后粉末质量,计算产率为0.54%,4℃保存。

3 结果

3.1 化学成分及有效成分筛选 截止2021年5月,共获得鹿茸活性成分20种,包括17-β-雌二醇葡萄糖胺,三磷酸腺苷,橄榄苦苷,雌三烯,鞘磷脂,胆固醇阿魏酸酯,α-雌二醇,视黄醇,卵磷脂,胆固醇,雌激素酮,D-半乳糖醛酸,前列腺素E₁,维生素B₁,神经酰胺,脑苷,6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷,半乳糖胺,雌酮,经筛选(Score cutoff≥30,P-value≤0.05)后有14种有效活性成分,见表1。

表1 鹿茸有效化学成分

Table 1 Effective chemical composition of Cervi Cornu Pantotrichum

MOL ID	活性成分	Pubchem ID
MOL010919	17-β-雌二醇	5757
MOL011260	氨基葡萄糖	441477
MOL005307	三磷酸腺苷	5957
MOL002361	雌二醇	8815
MOL010919	α-雌二醇	5757
MOL005567	视黄醇	445354
MOL011415	卵磷脂	160339
MOL000953	胆固醇	5997
MOL010921	雌酮	6918970
MOL012957	D-半乳糖醛酸	445929
MOL007650	前列腺素E ₁	5281912
MOL006077	维生素B ₁	6037
N/A	半乳糖胺	24154
N/A	雌酮	5857

3.2 鹿茸有效活性成分作用靶点的预测和筛选 将BATMAN-TCM数据库的Score cutoff设置为≥30,将目标预测方法给出的分数超过给定“Score cutoff”分数的预测候选目标视为潜在目标,并将对其进行介绍和进一步分析。设置P-value≤0.05,共得到14个有效潜在目标,并将每个潜在目标的靶点去除重复,共得到鹿茸活性成分的靶点303个。

3.3 鹿茸治疗骨关节炎靶点的预测和筛选 将 GeneCards 数据库, OMIM 数据库及文章查阅检索出来的靶点整合, 共得到 3 093 个骨关节炎靶点。结合在 BATMAN-TCM 上筛选出的 303 个鹿茸成分靶点, 使用 Venn diagram 绘制韦恩图所示 list1 为骨关节炎靶点, list2 为鹿茸活性成分作用靶点。取二者交集得到活性成分-治疗骨关节炎靶点 92 个, 除去无效基因, 一共涉及 89 个交集基因。前 10 个靶点信息, 见表 2 及增强出版附件材料。

3.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建与分析 通过把上一步获得鹿茸活性成分对应的治疗骨关节炎的作用靶点导入 STRING 数据库, 并结合 Cytoscape version 3.7.2 软件构建鹿茸治疗骨关节炎的 PPI 网络, 见增强出版附件材料。共涉及节点数 92 个, 边数 472 个, 平均节点度为 10.3, 平均局部聚类系数为 0.536。蛋白的度值越大, 颜色越深、节点的体积越大。PPI 网络中每个节点蛋白的地位都不一样, 度值越大的蛋白在整体网络中的地位就越高, 最重要的节点称为关键节点, 在整个中药靶点的调控网络中可能起到重要的作用。如度值 > 15 的靶点有 Akt1, TNF, CREB1 等。根据 PPI 网络计算网络中每个节点的拓扑性质以探寻鹿茸治疗骨关节

表 2 鹿茸治疗骨关节炎靶点(前 10 个)

Table 2 Anti-osteoarthritis target of Cervi Cornu Pantotrichum (top 10)

靶点	度值
蛋白激酶 B 1(Akt1)	51
肿瘤坏死因子(TNF)	42
环状 AMP 反应元件结合蛋白 1(CREB1)	42
前列腺素 G/H 合酶 2(PTGS2)	33
雌激素受体(ESR1)	32
连环蛋白 β_1 (CTNNB1)	29
基质金属蛋白酶-9(MMP-9)	27
母亲 DPP 同源物 3(SMAD3)	23
CXC 趋化因子受体 4 型(CXCR4)	22
转录因子 SOX-9(SOX9)	18

炎的关键靶点, 筛选网络中度值靠前的靶蛋白在鹿茸治疗骨关节炎的过程中发挥重要作用。筛选条件为度值 ≥ 15 的节点作为关键节点, 将关键靶点名称导入 DisGeNET 数据库, 以获得关键靶点对应的蛋白名称和蛋白类型。所有关键靶点的拓扑性质信息, 见表 3, 其中包括关键靶点的度 ≥ 15 , 接近中心性 $\geq 0.486\ 033\ 52$, 中介中心性 $\geq 0.005\ 996\ 29$, 并列出了其全称及蛋白类型。

表 3 鹿茸治疗骨关节炎的 15 个关键靶点及其拓扑性质

Table 3 15 key target of Cervi Corun Pantotrichum in treatment of osteoarthritis and its topological properties

基因	蛋白全称	蛋白分类	度	接近中心性	中介中心性
Akt1	protein kinase B 1	kinase	50	0.690 476 19	0.200 832 24
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	none	42	0.630 434 78	0.156 274 41
TNF	tumor necrosis factor	signaling	41	0.630 434 78	0.137 689 43
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	enzyme	32	0.587 837 84	0.067 100 79
ESR1	estrogen receptor 1	nuclear receptor	32	0.576 158 94	0.077 911 26
CTNNB1	catenin beta 1	none	29	0.568 627 45	0.053 632 35
MMP-9	matrix metalloproteinase 9	enzyme	27	0.554 140 13	0.054 698 76
SMAD3	SMAD family member 3	transcription factor	23	0.527 272 73	0.031 763 09
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4	G-protein coupled receptor	22	0.524 096 39	0.024 047 4
SOX9	SRY-box transcription factor 9	none	18	0.508 771 93	0.010 094 08
雄激素受体(AR)	androgen receptor	nuclear receptor	18	0.514 792 9	0.005 996 29
转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)	transforming growth factor beta 1	signaling	17	0.508 771 93	0.022 125 35
多巴胺受体 D2(DRD2)	dopamine receptor D2	G-protein coupled receptor	17	0.486 033 52	0.015 384 38
核受体亚家族 3 C 组成员 1(NR3C1)	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	nuclear receptor	17	0.514 792 9	0.011 876 03
阿片受体 1(OPRM1)	opioid receptor mu 1	G-protein coupled receptor	15	0.497 142 86	0.017 474 62
谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2B(GRIN2B)	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B	ion channel	15	0.491 525 42	0.011 470 43

3.5 中药-有效活性成分-治疗骨关节炎作用靶点网络构建 将“网络”及“类型”文件导入 Cytoscape version 3.7.2 软件以构建鹿茸-有效活性成分-治疗骨关节炎作用靶点网络,见增强出版附件材料。共124个节点,177条边,紫色部分代表中药鹿茸,红色部分代表13种不同的鹿茸有效活性成分,绿色和蓝色部分代表鹿茸治疗骨关节炎作用靶点,其中蓝色部分表示39个同时作用于两个或多个鹿茸活性成分的基因靶点,并将其使用蓝色的边与活性成分相连,分别为转录因子 AP-2 γ (TFAP2C),成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2),类固醇17- α -羟化酶/17,20裂合酶1(CYP17A1)等39个。这些靶点分别与两个或多个成分相关联。说明鹿茸的活性成分能作用多个靶点。一个靶点也能同时作用于多个活性成分,鹿茸治疗骨关节炎作用是多成分、多靶点共同协同作用的,且不同成分可能发挥同种作用。

3.6 富集分析和通路分析 利用 DAVID 和 R x64 3.6.3 进行 GO 富集分析和 KEGG 分析。GO 分为生物过程、细胞组分及分子功能的分析。共得到 597 条 GO 过程和 KEGG 通路。通过 R 语言软件 R x64 3.6.3 分析靠前的 GO 及 KEGG 并绘制 GO 和 KEGG 富集分析的高级气泡。富集在某条目上的基因数量多少用图中气泡大小代表,某条目上被富集的基因数量越多,发现错误率(FDR)由图中气泡的颜色来显示,越小的 FDR 值对应越深的气泡颜色,即红色的气泡显示 FDR 值最小。基因的富集程度用富集因子来表示,越高的富集程度对应越大的富集因子值。见增强出版附件材料。

生物过程分析所示,鹿茸治疗骨关节炎靶点主要涉及了信号传导(signal transduction),对缺氧的反应(response to hypoxia),对药物的反应(response to drug),转录调控, DNA 模板化(regulation of transcription, DNA-templated),转录的正调控, DNA 模板化(positive regulation of transcription, DNA-templated), RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控(positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter),基因表达的正调控(positive regulation of gene expression),细胞增殖的正调控(positive regulation of cell proliferation),凋亡过程的正调控(positive regulation of apoptotic process), RNA 聚合酶 II 启动子转录的负调控(negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter),基因表达的负调控

(negative regulation of gene expression),细胞增殖的负调控(negative regulation of cell proliferation),凋亡过程的负调控(negative regulation of apoptotic process),氧化还原过程(oxidation-reduction process),炎症反应(inflammatory response)。BP 分析可以看出骨关节炎与氧化反应有关,氧化应激是骨关节炎发病病机中的重要环节之一,而氧化损伤带来的氧自由基可导致骨关节炎患者的滑膜和关节组织产生炎症,不利于软骨细胞的生长和代谢反应,导致患者的病情难以恢复进而推进疾病的进程,从而恶化骨关节炎的病情^[13]。

细胞组分富集分析所示,鹿茸的治疗骨关节炎靶点主要涉及的细胞组分有蛋白质复合物、质膜、细胞质核周区、核、核质、神经元投射、膜筏、膜、质膜的组成部分、膜的组成部分、细胞外间隙、胞质溶胶、细胞质、细胞表面、顶端质膜,可见细胞组分中气泡大小及富集因子分数均最大的依次是质膜、细胞核、膜的组成部分及细胞质等。其中细胞质对应的气泡的颜色最浅,FDR 值最高。细胞核的富集因子排名最靠前。

分子功能富集分析所示,鹿茸治疗骨关节炎作用靶点涉及的分子功能主要包括锌离子结合,转录激活因子活性, RNA 聚合酶 I 核心启动子近端区域序列特异性结合,转录调控区 DNA 结合,转录因子活性,序列特异性 DNA 结合,类固醇激素受体活性,序列特异性 DNA 结合, RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区序列特异性 DNA 结合,蛋白质同二聚化活性,蛋白质异二聚化活性,转录因子结合,受体结合,蛋白质结合,相同的蛋白质结合,酶结合, DNA 结合,由分子功能高级气泡图可见蛋白质合成是最关键的分子功能,其富集因子排序最靠前。

利用 R x64 3.6.3 绘制 KEGG 通路高级气泡图,显示分析结果,鹿茸的治疗骨关节炎作用主要是通过干预结核, TNF 信号通路,调控干细胞多能性的信号通路,癌症中的蛋白多糖,前列腺癌,癌症相关通路,破骨细胞分化,神经活性配体-受体相互作用, mTOR 信号通路, MAPK 信号通路, HTLV-I 感染,乙型肝炎,雌激素信号通路, cAMP 信号通路, Alcoholism, 等多个信号通路干预鹿茸的治疗骨关节炎作用,鹿茸治疗骨关节炎功能是一个多成分多靶点相互调节影响的结果。见表4。

3.7 作用靶点-活性成分-通路的网络建立 利用 Cytoscape version 3.7.2,构建鹿茸治疗骨关节炎作用靶点-活性成分-通路网络。节点为连接模块之间

表4 鹿茸治疗骨关节炎的15条通路

Table 4 15 pathways of Cervi Cornu Pantotrichum to treat osteoarthritis

通路名称	富集基因数/个	FDR	P-value
结核	9	9.297×10^{-3}	1.150×10^{-3}
TNF 信号通路	9	7.780×10^{-4}	3.619×10^{-5}
调控干细胞多能性的信号通路	8	1.006×10^{-2}	1.326×10^{-3}
癌症中的蛋白多糖	9	1.346×10^{-2}	2.503×10^{-3}
前列腺癌	9	2.210×10^{-4}	8.567×10^{-5}
癌症相关通路	24	1.023×10^{-8}	7.929×10^{-11}
破骨细胞分化	8	8.273×10^{-3}	8.979×10^{-4}
神经活性配体-受体相互作用	15	1.707×10^{-4}	3.969×10^{-5}
mTOR 信号通路	4	7.969×10^{-2}	6.929×10^{-11}
MAPK 信号通路	9	3.285×10^{-2}	1.018×10^{-2}
HTLV-I 感染	14	2.210×10^{-2}	7.993×10^{-6}
乙型肝炎	9	3.298×10^{-3}	3.068×10^{-4}
雌激素信号通路	8	2.622×10^{-3}	1.626×10^{-4}
cAMP 信号通路	13	1.707×10^{-4}	3.278×10^{-5}
alcoholism	10	3.298×10^{-3}	2.349×10^{-4}

的关键点,称为楔点。度中心性是在分析网络时表示节点中心性的最简单直观的衡量指标。节点度值越大此节点的度中心性便越高,这个节点在该网络中的地位就越高。而在一个网络中,某些被较多条边连接且直接连接较多其他节点的节点,称之为关键节点或中心节点。这些节点很有可能参与了此调控网络中的重要生物过程和功能,也起到了维持网络整体稳定性的作用^[14]。何星垚等^[15]基于网络药理学知识探究银杏叶在抗高血脂功效上的作用机制时,构建靶向网络,通过度值等8种网络参数,分析发现银杏叶多个重要靶点,并成功揭示了银杏叶抗高血脂的作用,表明度值等网络参数在分析网络中各靶点或节点时起着关键的作用。共有81个节点,187条边,蓝色节点代表鹿茸治疗骨关节炎涉及的信号通路所对应的作用靶点,绿色节点代表涉及的15条关键通路。橘黄色节点每个代表靶点对应的鹿茸有效活性成分,发现涉及骨关节炎的通路对应的有效活性成分为9种,这9种活性成分大概率为鹿茸治疗骨关节炎的潜在有效活性成分。根据KEGG通路分析可知鹿茸的有效活性成分广泛作用于细胞增殖、分化和迁移、肿瘤、炎症、代谢、生长、免疫、分泌,基因转录等相关通路,体现了鹿茸多成分-多靶点-多通路的相互协调、相互作用或相互影响以达到治疗骨关节炎效果的药效特点。也从侧面反映骨关节炎的复杂病理机制的特点。

见增强出版附件材料。

3.8 鹿茸的抗炎作用及对氧化损伤的保护作用

对RAW 264.7细胞进行H₂O₂氧化损伤后,模型组细胞的存活率为(60.1±2.3)%左右。在鹿茸的前期干预下,氧化损伤的RAW 264.7细胞的细胞活力明显提高,且呈剂量依赖性。与模型组比较,在中、高质量浓度(0.5, 1 g·L⁻¹)时有统计学意义(P<0.05),高浓度的鹿茸组极显著提高了氧化损伤下的RAW 264.7细胞存活率。说明鹿茸对H₂O₂诱导的RAW 264.7氧化损伤细胞具有保护作用。见表5。

表5 不同浓度鹿茸对H₂O₂诱导的氧化应激RAW 264.7细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of different concentrations of Cervi Cornu Pantotrichum on viability of H₂O₂-induced oxidative stress RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白		-
模型(H ₂ O ₂)		60.1±2.3
鹿茸低浓度+H ₂ O ₂	0.25	63.5±1.2
鹿茸中浓度+H ₂ O ₂	0.5	79.9±3.5 ¹⁾
鹿茸高+H ₂ O ₂	1	89.5±0.8 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P<0.05。

与空白细胞比较,模型组和鹿茸高、中、低组的细胞上清TNF-α浓度均明显升高。与模型组比较,高、中、低浓度的鹿茸给药组的细胞上清TNF-α浓

度均有下降趋势,且呈浓度依赖性降低,高、中浓度鹿茸给药组的TNF- α 浓度较低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果表明鹿茸能够降低RAW 264.7炎症细胞的相关炎症因子的分泌从而起到抗炎的效果。见表6。

表6 不同浓度鹿茸对LPS诱导的RAW 264.7炎症细胞的TNF- α 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of different concentrations of Cervi Cornu Pantotrichum on level of TNF- α in RAW 264.7 inflammatory cells induced by lipopolysaccharide ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
空白		10.35 \pm 0.55 ²⁾
模型(LPS)		63.10 \pm 3.30
鹿茸低浓度+LPS	0.25	48.15 \pm 4.35
鹿茸中浓度+LPS	0.5	32.00 \pm 3.20 ¹⁾
鹿茸高浓度+LPS	1	24.55 \pm 1.05 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

4 分析与讨论

4.1 主要成分及其靶标分析 鹿茸是名贵的动物药材,李时珍的《本草纲目》记载鹿茸有“强筋健骨”之效用^[16-17]。但其“健骨”之说、尤其是在治疗骨关节炎上的作用机制一直以来并不明确,本研究采用网络药理学的方法对鹿茸治疗骨关节炎靶点进行预测和筛选,获得14种鹿茸有效活性成分,通过GeneCards, OMIM数据库及文章查阅,总结出鹿茸89个治疗骨关节炎的相关基因靶点。利用STRING数据库生成了鹿茸治疗骨关节炎基因的PPI。利用Cytoscape构建了鹿茸-活性成分-治疗骨关节炎靶点网络。取网络中中度值 ≥ 15 的节点作为关节靶点,根据DisGeNET数据库结果显示的关键靶点的靶蛋白类型及拓扑性质信息表明参与鹿茸治疗骨关节炎过程的可能有激酶(Akt1),信号(TNF, TGF- β_1),转路因子(SMAD家族成员3, SRY-box转录因子9),酶(前列腺素-内过氧化物合酶2, 基质金属肽酶9),受体(雌激素受体1, C-X-C基序趋化因子受体4, 雄激素受体, 多巴胺受体D2, 核受体亚家族3C组成员1, 阿片受体mu1), 蛋白(cAMP反应元件结合蛋白1, 连环蛋白 β_1), 离子通道(谷氨酸离子型受体NMDA型亚基2B)等。并基于重要靶点开展后续研究。

4.2 主要的GO富集和通路分析 根据R x64 3.6.3的GO富集分析和KEGG通路分析结果能够看出,鹿茸在治疗骨关节炎上可能主要涉及炎症、缺氧、细胞增殖、氧化还原等反应及转录、凋亡的正负调

控和DNA模板化调控、蛋白质合成、破骨细胞分化,神经活性配体-受体相互作用等生物过程。KEGG通路显示鹿茸治疗骨关节炎涉及的通路主要有TNF信号通路,调控干细胞多能性的信号通路,癌症相关通路, mTOR信号通路, MAPK信号通路, 雌激素信号通路, cAMP信号通路, 实验证明雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶,存在于两种复合物mTORC1, mTORC2。而研究表明mTOR是抑制自噬的关键靶蛋白^[18]是磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt通路中关键的下游分子, PI3K磷酸化后的产物PIP3将Akt和mTOR2传输至细胞膜中,进而将mTOR2磷酸化同时导致Akt活化。这一过程中的蛋白最终促使机体分泌抑制炎症因子而发挥抑制炎症、组织修复的功能^[19]。商连斌等^[20]通过蛋白免疫印迹法(Western blot)对比右膝盖骨关节处假手术处理组小鼠和续断总皂苷干预的小鼠膝关节软骨组织中的p-PI3K, p-Akt, p-mTOR等蛋白的表达量,结果表明与假手术组的小鼠对比,续断总皂苷干预的小鼠软骨组织中的p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白水平明显降低,证明续断总皂苷通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路的过度活化而发挥小鼠膝关节软骨的自噬作用,进一步达到抑制组织炎症的功效。另外,PI3K/Akt/mTOR信号通路也被广泛应用于抗氧化研究之中。MAPK参与了各种细胞分化、增殖、及迁移的调控。MAPK涉及的信号通路被广泛应用于大量炎症相关通路的实验和研究中^[21-23]。研究表明MAPK/ERK通路经影响了膝关节骨关节炎患者软骨细胞的代谢调节,进而参与了膝关节骨关节炎发生发展^[24]。另有实验证明针对用白细胞介素(IL)-1 β 干预形成的骨关节炎养软骨细胞损伤模型的SW1353细胞,3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(PDK1)能够调节p38/MAPK信号通路促使骨关节炎样的软骨细胞凋亡^[25]。TNF是一只生物体内重要的细胞因子调控了多种信号通路,涉及了细胞的凋亡坏死、炎症及免疫等生物过程。作为促炎性细胞因子之一的TNF本身就与炎症反应关系密切^[26]。研究表明,血小板裂解物(PL)不仅能减轻OA的疼痛症状,还恢复了软骨细胞中TNF- α 抑制的合成代谢基因表达,并且TNF- α 增加了分解代谢基因的表达^[27]。这些作用由肿瘤坏死因子下游信号传导介导,包括抑制NF- κ B通路和c-Jun通路的活性,从而有可能达到治疗骨关节炎的效果。雌激素被认为是人体内的一种重要激素,而雌激素缺乏被研究证明能加重骨关节炎程度的病状加深,

通过临床数据分析,雌激素可能参与了组织稳态的维护。使用雌激素辅助给药能显著减少中老年女性的骨关节炎发病几率,也能OA带来的减轻疼痛症状^[28]。付超等^[29]实验表明,因切除卵巢组织而缺乏雌激素的实验组大鼠的Mankin评分高于对照组大鼠,说明缺乏雌激素可能会导致软骨退行性变化程度升高。同时,大幅度的雌激素增加会使IL-1 β 的表达明显降低而损害软骨组织^[30],且软骨厚度降低^[31]。DIETRICH等^[32]发现雌激素受体的ER α 亚型在正常人滑膜细胞中大量定期表达,提示雌激素可以人体的滑膜功能中发挥重要作用。任海龙等^[33]则发现雌激素可能通过直接或间接作用破骨细胞促使其分泌各种细胞因子起到保护软骨组织的功能,其发现与本文KEGG通路分析中的破骨细胞分化对应上。SCIORE等^[34]的研究提示雌激素受体在兔和人类的韧带组织中存在表达。这些研究都证明了软骨组织可能是被雌激素作用的重要靶标之一。cAMP作为动物组织内已知的能够传导多种生物效应的第二信使,负责调控关键的生理过程,其中包括代谢、分泌、钙的稳态、肌肉收缩、和基因转录等。被激活的cAMP/蛋白激酶A(PKA)信号通路具有抑制炎症的作用^[35]。大量实验证明cAMP/PKA通路在神经性疼痛模型中扮演这调控神经元的身份地位,能够维持神经元的兴奋程度及舒缓机体痛觉过敏反应^[36]。嵇波等^[37]通过针刀松解法或电针的方法对膝骨关节炎模型的新西兰大白兔进行治疗干预。实验结果显示针刀松解法或电针的疗法可通过显著降低海马组织或下丘脑组织中的cAMP含量从而有效控制膝骨关节炎病症加重和维持功能的稳定正常,使痛感减轻。破骨细胞发挥骨吸收的作用。破骨细胞与成骨细胞通过协同作用促进骨骼形成并维持骨骼的发育。丁洪志等^[38]发现香叶木素可以通过调控MAPK信号通路发挥抑制破骨细胞分化的功能,从而进一步降低早期骨关节炎软骨下骨骨质丢失,有利于治疗骨关节炎。肖勉等^[39]对以造模成功的颞下颌关节骨关节炎小鼠模型的颞下颌骨关节中破骨细胞的分化情况及数量增减进行实验观察,发现颞下颌关节骨关节炎患者的病理进程可能是由患者的滑液通过影响破骨细胞分化来介导的。

4.3 体外实验分析 结合上述分析结果,笔者通过体外细胞实验分别对经鹿茸蛋白预处理后的氧化损伤RAW 264.7细胞和鹿茸蛋白治疗后的炎症RAW 264.7细胞进行考察,发现一定浓度下的鹿茸

蛋白不仅有效的提高了H₂O₂诱导氧化损伤的RAW 264.7细胞的细胞活力($P<0.05$),而且高剂量的鹿茸蛋白还明显降低了LPS诱导的RAW 264.7炎症细胞的TNF- α 含量($P<0.05$),结果提示鹿茸具有显著的氧化损伤保护作用及抗炎活性,验证了网络药理学研究相关结果,为深入展开对鹿茸治疗骨关节炎的研究提供了依据。

4.4 网络药理学研究可能存在的问题 虽然网络药理学研究手段日渐成熟,但考虑在鹿茸治疗OA上可能仍存在一些潜在问题。其一,中药的药效物质可能不是单一成分的简单叠加。一种疾病的药效可能与药效成分的浓度有关,而网络药理学研究过程中忽视了成分的含量^[40]。所以在网络药理学研究过程中可以加强的中药物质成分的前期研究,对其含量进行考量。其二,中药作为中药的制备加工过程中可能伴随着药物原有成分的物质改变^[41],例如鹿茸广泛的加工方法为煮炸干燥法^[42]和冷冻干燥法^[43]等,其不同加工方式之间的成分及与新鲜鹿茸相比存在一定差异,这将导致与网络药理学分析中检索的活性成分及药效物质存在差异^[44-46],从而可能影响分析结果。这需要中药成分检索建立在多种制备过程后的化学成分基础之上。

综上所述,骨关节炎可损伤患者的骨关节组织,并且病症随着时间或年龄的增长可能发生恶化,导致关节强直、疼痛、活动受阻,严重的还可能影响心脏功能^[47],甚至使患者丧失步行能力等危害。因此,分析骨关节炎的病机和开发解决骨关节炎可行的方针对现代社会具有重要意义。本研究通过网络药理学方法发现了鹿茸治疗骨关节炎可能涉及的89个作用靶点,表明其作用机制是多方面、多组件、多靶标的。通过PPI网络预测了16个调控骨关节炎的关键靶点,绘制靶点网络图。将鹿茸及其有效活性成分与治疗骨关节炎靶点进行映射,构建一个网络,显示鹿茸治疗骨关节炎作用所涉及成分、靶点和过程。针对作用靶点分析出鹿茸治疗骨关节炎可能涉及的主要GO富集及治疗骨关节炎相关的核心信号通路,分析发现鹿茸的化合物参与了细胞增殖、自噬和凋亡作用、破骨细胞分化、炎症反应、雌激素水平、氧化还原反应等一系列与治疗骨关节炎相关的靶蛋白的相互作用,这些功能可能作为鹿茸治疗骨关节炎的作用机制。本研究的体外实验显示鹿茸具有抗氧化和抗炎作用,验证了网络药理学研究结果。综上,分析结果,揭示了鹿茸在针对骨关节炎的治疗上的主要活性成分及潜

在的分子作用机制,将为鹿茸在实际临床应用提供了支持和验证也为后续鹿茸在骨关节炎上的实验提供思路,鹿茸作为潜在治疗骨关节炎的中药,在疾病严重危害患者健康的背景下,本研究为将来的药效物质基础研究及探索其作用机制奠定了坚实的基础并提供了理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王文龙. 提高免疫力抗疲劳鹿茸片的研究[D]. 长春:吉林大学,2018.
- [2] 刘松鑫,宫瑞泽,陆雨顺,等. 不同品种、规格鹿茸的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药,2020,51(3):806-811.
- [3] 张留安. 针刀联合益胃健骨汤内服治疗膝关节骨性关节炎临床研究[J]. 中医学报,2017,32(4):647-650
- [4] HUANG M W, YANG H J, ZHOU X C, et al. Advances on network pharmacology in ethnomedicine research[J]. Chin J Chin Matera Med, 2019, 44(15): 3187-3194.
- [5] 项昌培,周瑞,张晶晶,等. 三七对糖尿病肾病、糖尿病脑病和糖尿病心肌病“异病同治”的网络药理学作用机制分析[J]. 中国中药杂志,2021,46(10):2424-2433.
- [6] 李玮婕,毛霞,郭秋岩,等. 网络药理学研究策略在组合药物研究中的应用[J]. 转化医学电子杂志,2018,5(3):3-16
- [7] 杜佳雪,刘绍能. 防风治疗肠易激综合征的网络药理学研究[J]. 沈阳药科大学学报,2021,38(4):415-423.
- [8] LIU Z, GUO F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. Sci Rep, 2016, 6: 21146.
- [9] 段凯旋,罗文浩,罗琼,等. 基于BATMAN-TCM在线分析平台研究钩藤药理机制[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2019,40(2):91-96.
- [10] 韦琳,宗伟,曾庆鸿,等. 花椒抗炎镇痛网络药理学分析及实验验证研究[J]. 中国中药杂志,2021,46(12):3034-3042.
- [11] HUANG D W, SHEMAN B T, LEMPICKI R A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: 1-13.
- [12] 李超华,王毅,何忠梅,等. 鹿茸蛋白2种不同提取方法的比较研究[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(9):23-25.
- [13] 滕元平,时宝振,赵全阳,等. 穿龙骨刺片联合艾瑞昔布治疗膝骨关节炎的疗效及对氧化应激的影响[J]. 现代药物与临床,2021,36(8):1674-1677.
- [14] SUBUDHI A K, BOOPATHI P A, PANDEY I, et al. Disease specific modules and hub genes for intervention strategies: a co-expression network based approach for *Plasmodium falciparum* clinical isolates[J]. Infect Genet Evol, 2015, 35: 96-108.
- [15] 何星垚,刘珺,罗春,等. 银杏叶治疗高脂血症的网络药理学研究[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(10):787-791.
- [16] 杨世雷. 补肾良药话鹿茸[J]. 中国现代药物应用,2016,10(9):265-266.
- [17] 刘玥欣,徐岩,赵昕彤,等. 鹿茸多肽对单侧颈总动脉结扎所致轻度认知功能障碍模型大鼠的保护作用研究[J]. 人参研究,2019,31(6):42-44.
- [18] ZHANG Y, VASHEGHANI F, LI Y H, et al. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(7): 1432-1440.
- [19] 张志康,翁勤洁. 免疫细胞内的 AKT/mTOR/STATs 信号通路 with 多发性硬化症的研究进展[J]. 医学研究生学报,2019,32(7):771-775.
- [20] 商连斌,金连峰,王哲,等. 续断总皂苷对膝骨关节炎大鼠软骨组织中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响的实验研究[J]. 辽宁中医杂志,2021,48(5):188-191,222.
- [21] 周子艺,夏晓霞,冉欢,等. 植物多酚通过 RAGE/MAPK/NF- κ B 通路抑制 AGEs 诱导的炎症反应研究进展[J]. 食品科学,2021, doi: 11.2206.TS.20210723.1724.018.
- [22] 邵兴,向晶,童洪杰,等. 清胰通腑泻热饮对重症急性胰腺炎患者外周血单核细胞 p38MAPK/NF- κ B 信号通路及下游炎症因子的影响[J]. 新中医,2021,53(8):59-62.
- [23] 黄贞伟,张庆,黄莉莉,等. 片仔癀通过抑制 TLR4/MAPK 信号通路减轻 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞神经炎症损伤研究[J]. 康复学报,2021,31(1):44-51.
- [24] 王珂杰,许晨阳,张益舸,等. MAPK/ERK 通路基因遗传变异和膝关节炎遗传易感性的关联研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2018,38(6):781-785.
- [25] GE Q, WANG H, XU X, et al. PDK1 promotes apoptosis of chondrocytes via modulating MAPK pathway in osteoarthritis[J]. Tissue Cell, 2017, 49(6): 719-725
- [26] 李秋月,许海玉,杨洪军. 促炎因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 在神经病理性疼痛中的研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(19):3709-3712.

- [27] LI Y, LI Z, XIE D, et al. Chondroprotective effects of platelet lysate towards monoiodoacetate-induced arthritis by suppression of TNF- α -induced activation of NF- κ B pathway in chondrocytes[J]. Aging, 2019, 11(9):2797-2811.
- [28] KARSDAL M A, BAY-JENSEN A C, HENRIKSEN K, et al. The pathogenesis of osteoarthritis involves bone, cartilage and synovial inflammation: may estrogen be a magic bullet[J]. Menopause Int, 2012, 18(4):139-146.
- [29] 付超, 李勇, 李立峰, 等. 雌激素缺乏对骨关节炎中 Notch 信号的影响[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2017, 37(4):467-472.
- [30] CIRILLO D J, WALLACE R B, WU L, et al. Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the Women's Health Initiative [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(10):3194-3204.
- [31] HAM K D, CARLSON C S. Effects of estrogen replacement therapy on bone turnover in subchondral bone and epiphyseal metaphyseal cancellous bone of ovariectomized cynomolgus monkeys[J]. Bone Miner Res, 2004, 19(5):823-829.
- [32] DIETRICH W, HAITEL A, HOLZER G, et al. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in normal human synovia[J]. J Soc Gynecol Investig, 2006, 13(7):512-517.
- [33] 任海龙, 邢国胜, 白人骁. 雌激素与骨性关节炎[J]. 中国骨伤, 2005, 18(12):766-768.
- [34] SCIORE P, FRANK C B, HART D A. Identification of sex hormone receptors in human and rabbit ligaments of the knee by reverse transcription polymerase chain reaction: evidence that receptors are present in tissue from both male and female subjects[J]. J Orthop Res, 1998, 16(5):604-610.
- [35] 徐嫣. 姜黄素通过激活 cAMP/PKA 通路抑制炎症反应改善缺血性脑卒中后抑郁[D]. 衡阳: 南华大学, 2020.
- [36] SONG X J, WANG Z B, GAN Q, et al. cAMP and cGMP contribute to sensory neuron hyperexcitability and hyperalgesia in rats with dorsal root ganglia compression [J]. J Neurophysiol, 2006, 95(1):479-492.
- [37] 嵇波, 刘清国, 郭长青, 等. 针刀松解法或电针对膝骨关节炎兔脑组织 cAMP、cGMP 的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(7):456-460.
- [38] 丁洪志, 穆培, 许志兴, 等. 香叶木素通过抑制破骨细胞分化治疗早期骨关节炎的可行性研究[J]. 实用药物与临床, 2019, 22(10):1023-1029.
- [39] 肖勉, 胡智慧, 江恒华, 等. 破骨细胞分化在颞下颌关节骨关节炎发生中的作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2021, 39(4):398-404.
- [40] 孟凡翠, 汤立达. 中药网络药理学研究中存在的问题与发展展望[J]. 中草药, 2020, 51(8):2232-2237.
- [41] 段海婧, 龙晓宙, 杜丽东, 等. 中药防治肿瘤的网络药理学研究概况及存在的问题[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3):206-214.
- [42] 杨鹏. 浅谈鹿茸煮炸操作技术[J]. 畜牧兽医科技信息, 2018(10):83.
- [43] 田晋梅, 张争明, 杨静, 等. 冻干鹿茸加工工艺研究进展[J]. 特产研究, 2020, 42(2):85-89.
- [44] 宫瑞泽, 赵卉, 曲迪, 等. 不同产地加工及炮制方法对鹿茸中胶原蛋白含量的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(22):1-6.
- [45] 田晏, 黄晓莉, 侯召华. 基于主成分和聚类分析的鹿茸加工技术研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21):311-318.
- [46] 王燕华. 不同加工方式鹿茸化学成分的对比分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [47] 明子罗, 建铭. 骨关节病危害健康的杀手[J]. 中国保健营养, 2011(8):91-93.

[责任编辑 顾雪竹]