

· 数据挖掘 ·

从分子网络解析非创伤性股骨头坏死不同中医证候的生物学基础及其对证方药的作用机制

李泰贤¹, 张彦琼^{1*}, 黄泽青², 宋梦歌², 谭彪², 王荣田³, 林娜¹, 陈卫衡^{3*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 望京医院, 北京 100102;

3. 北京中医药大学 第三附属医院, 北京 100029)

[摘要] 目的:从分子网络切入,解析非创伤性股骨头坏死(NONFH)不同中医证候的生物学基础及其对证方药的作用机制。方法:30例NONFH患者(包括痰瘀阻络证、经脉痹阻证、肝肾亏虚证各10例)为疾病组,10例接受激素治疗未发生NONFH的患者为对照组。通过全基因组表达谱芯片检测与生物分子网络分析相整合的方法,筛选NONFH不同证候相关差异基因。在中医药整合药理学研究平台(TCMIP)v2.0(<http://www.tcmip.cn/>)的疾病表型相关分子数据库与中药材数据库中分别检索并筛选NONFH不同中医证候临床表型相关基因与其对证方药的化学成分谱以及相关化学成分所对应的候选靶标谱。通过构建NONFH不同中医证候及其对证方药的相互作用网络,筛选不同中医证候及对证方药相关核心基因与靶标。结果:痰瘀阻络证相关分子网络分析结果显示,其核心证候基因参与的通路主要与调节骨代谢和脂质代谢相关,并参与机体“免疫-炎症系统”平衡和血液循环;健脾活骨方相关靶标网络分析结果显示,其核心靶标基因参与的通路主要与成骨相关,并参与化痰、活血、止痛、调节机体代谢、提高免疫功能和减轻炎症等。经脉痹阻证相关分子网络分析结果显示,其核心证候基因参与的通路主要与调节血液循环和机体“免疫-炎症系统”平衡相关,并参与调节脂质代谢和骨代谢;活血通痹方相关靶标网络分析结果显示,其核心靶标基因参与的通路主要与减轻炎症反应和成骨相关,并参与补气、活血、通痹等。肝肾亏虚证相关分子网络分析结果显示,其核心证候基因参与的通路主要与骨代谢、调节机体“免疫-炎症系统”平衡和脂质代谢相关,并参与调节血液循环;补肾壮骨方相关靶标网络分析结果显示,其核心靶标基因参与的通路主要与增强免疫功能和减轻炎症反应、强筋、壮骨有关,并参与活血和止痛。结论:NONFH不同证候生物学基础各有侧重,痰瘀阻络证以调节骨代谢和脂质代谢相关通路异常为主,经脉痹阻证在机体“免疫-炎症系统”失衡基础上,出现血液循环调节通路异常,肝肾亏虚证则在骨和脂质代谢、机体“免疫-炎症系统”和血液循环等方面呈现多通路的异常,上述对证方药的核心靶标均体现出与其对应证候生物学基础匹配的作用特点。

[关键词] 非创伤性股骨头坏死; 中医证候; 网络药理学; 生物学基础; 作用机制

[中图分类号] R2-0;R289;R816.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)16-0192-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201142

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200327.1608.002.html>

[网络出版日期] 2020-3-27 16:36

Exploration on Biological Basis Underling Different Syndromes of Nontraumatic Osteonecrosis of Femoral Head Based on Network Pharmacology

LI Tai-xian¹, ZHANG Yan-qiong^{1*}, HUANG Ze-qing², SONG Meng-ge², TAN Biao², WANG Rong-tian³,
LIN Na¹, CHEN Wei-heng^{3*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700,

[收稿日期] 20200316(030)

[基金项目] 国家科技重大新药创制项目(2019ZX09731-002);国家自然科学基金面上项目(81973888);北京市自然科学基金面上项目(7182186);中国博士后科学基金项目(2019M660954)

[第一作者] 李泰贤,博士,主治医师,从事中医骨关节疾病的临床与基础研究工作,E-mail:drilitaixian@163.com

[通信作者] *陈卫衡,博士,主任医师,从事中医骨关节疾病的临床与基础研究工作,E-mail:drchenweiheng@163.com;

*张彦琼,博士,副研究员,从事中医药系统生物学研究工作,E-mail:yqzhang@icmm.an.cn

China; 2. Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;
3. The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the biological basis underlying the different syndromes of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head (NONFH) according to the molecular interaction network associated with syndromes and the corresponding prescriptions. **Method:** A total of 30 NONFH patients and 10 healthy controls were enrolled in the present study. The gene expression profiles associated with different syndromes of NONFH were detected by microarray analysis. Then, the molecular interaction networks of the differentially expressed genes of different syndromes were constructed to identify the crucial syndrome-related genes. After collecting the phenotype-related genes and the candidate targets of the corresponding prescriptions of different syndromes from Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine (TCMIP) v2.0 (<http://www.tcmip.cn/>), the molecular interaction network associated with syndromes and the corresponding prescriptions were constructed and the biological basis of each syndrome was analyzed by functional enrichment analysis. **Result:** The crucial genes associated with the phlegm-stasis blocking collateral syndrome were mainly involved into the bone and lipid metabolism, and the regulation of immune-inflammation balance and circulation. Consistently, the candidate targets of the corresponding prescription-Jianpi Huogu prescription might play roles in the metabolism of osteogenesis, dissipating phlegm, activating circulation to remove blood stasis, relieving pain and inflammatory response. In addition, our data revealed that the stagnation of meridians syndrome-related genes could be mainly involved into the regulation of circulation and inflammatory response, as well as the metabolism of lipid and bone. Accordingly, the corresponding prescription of this syndrome-Huoxue Tongbi Formula could exert the regulatory effects on osteogenesis and inflammatory response, as well as the activation of the circulation and qi-invigorating. Moreover, the crucial genes associated with the liver and kidney deficiency syndrome played roles in various pathological processes during NONFH, such as the abnormal bone and lipid metabolisms, the immune-inflammation imbalance, and the blocked blood circulation, which were in line with our findings on the pharmacological mechanisms of the corresponding prescription of this syndrome-Bushen Zhuanggu formula. **Conclusion:** The current study indicated that the phlegm-stasis blocking collateral syndrome may be mainly associated with the abnormal bone and lipid metabolisms. The molecular mechanisms underlying the stagnation of meridians syndrome may be the imbalance of "immune-inflammation" and the blocking circulation. Furthermore, the liver and kidney deficiency syndrome may be not only associated with the abnormal bone and lipid metabolisms, but also implicated into various biological pathways-related to inflammation and circulation. Interestingly, the pharmacological mechanisms of the corresponding prescriptions may be in accord to the biological basis of each syndrome.

[Key words] nontraumatic osteonecrosis of the femoral head; traditional Chinese medicine syndrome; network pharmacology; biological basis; pharmacological mechanism

股骨头坏死(ONFH)是致残率极高的骨伤科疑难病, 目前我国的发病人数已超1千万人^[1], 每年新增患者为15~30万^[2], 约80% ONFH患者因股骨头塌陷而需要进行人工关节置换^[3]。根据病因不同, ONFH分为创伤性股骨头坏死与非创伤性股骨头坏死(NONFH)2类, 由于近年来糖皮质激素在临床上的广泛应用与饮酒人群的增加, NONFH发病率呈逐年增高趋势, 约占ONFH的85%^[4]。由于目前尚无上市西药可用, 中医药保

关节治疗已成为临床ONFH治疗的有效重要手段^[5]。

笔者2003年提出以不同分期、不同病因辨别ONFH中医证候的“三期四型”辨证方法^[6], 成为目前中医药治疗ONFH临床中最为常用的辨证方法^[7], 而由笔者牵头制定的《股骨头坏死中医辨证标准》^[8]也已于近期发布。课题组前期研究通过全基因组表达谱芯片检测与生物分子网络分析相整合的方法, 分别筛选了NONFH早、中、晚三期痰瘀阻

络证、经脉痹阻证和肝肾亏虚证的3个代表证型候选分子标志,进而构建辨证预测模型,经十倍交叉验证和独立样本集验证表明,其辨证准确性较高、稳定性较好。通过此项研究发现以上3种中医证候与抑制成骨细胞分化、破骨细胞发育、炎症免疫反应和脂肪代谢调节等NONFH早、中、晚期病理改变紧密相关的生物学反应之间的关联^[9]。健脾活骨方、活血通痹方和补肾壮骨方分别是痰瘀阻络证、经脉痹阻证和肝肾亏虚证三种中医证候的对证临床验方,在股骨头坏死“三期四型”辨证方法指导下治疗NONFH全病程均取得了良好临床疗效^[10-14]。相关基础研究也发现了健脾活骨方纠正脂代谢紊乱、促进骨形成、改善凝血功能和骨修复以及提高局部组织再血管化^[15-18];活血通痹方改善高凝状态、减少股骨头空骨陷窝的形成^[19-20];补肾壮骨方改善凝血功能、抑制破骨细胞吸收等的部分药理作用^[21-22]。然而,要想较全面认识NONFH疾病全程的不同中医证候的科学内涵及对证方药的作用机制,传统的研究手段和方法还存在较大的困难和局限。

网络药理学是一种建立在高通量组学数据分析、计算机虚拟计算及网络数据库检索基础上的新药发现、药物药效及作用机制挖掘的研究方法^[23-24],强调整体性和系统性,这与中医学药整体观与辨证论治的基本原则不谋而合^[25]。鉴此,本研究从分子网络切入,解析NONFH不同中医证候的生物学基础及其对证方药的作用机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象 经中国中医科学院望京医院伦理委员会审查批准,收集2014年1月至2017年10月于中国中医科学院望京医院与郑州中医骨伤病医院诊断为NONFH的患者30例(包括痰瘀阻络证、经脉痹阻证、肝肾亏虚证各10例)作为疾病组;同时收集于中国医学科学院血液病医院接受激素治疗未发生NONFH患者10例为对照组。

1.2 诊断与辨证标准 股骨头坏死的诊断参照MONT等^[26]提出的诊断标准,辨证标准参考股骨头坏死“三期四型”辨证方法^[6]和《股骨头坏死中医辨证标准》^[8]。

1.3 纳入排除标准 纳入标准,①符合NONFH诊断标准的患者;②接受激素治疗随访1年未发生NONFH患者;③知情同意,自愿签署知情同意书者。排除标准,原发病病情严重,需其他治疗替代激素治疗者。

1.4 血清样本采集与RNA的提取和全基因组表达谱芯片的检测 疾病组与对照组患者均于治疗前清晨空腹抽取静脉血2.5 mL入PAXgene静脉血收集管中,上下颠倒混匀后,放-80 °C冰箱保存。本研究RNA的提取与质检,芯片检测委托上海伯豪生物技术有限公司完成,具体方法参考本课题组前期研究^[27]。

1.5 基因芯片数据分析 采用GeneChip Scanner 3000图像分析软件与Command Console Software 4.0(美国Affymetrix公司)对芯片进行扫描并读取原始数据,采用微阵列显著性分析软件(Significance Analysis of Microarrays, SAM)筛选出NONFH不同证候与对照组之间有统计学意义的基因。根据假阳性错误(false discovery rate, FDR)值来鉴定这些基因的百分率范围。

1.6 NONFH不同证候相关差异基因的筛选 基于不同中医证候与对照组样本相比的差异基因的相互作用信息,建立其相互作用网络,并计算网络节点的拓扑特征值包括节点连接度、节点介度、节点紧密度。选取上述3个拓扑特征值均大于其中位数的节点作为不同中医证候网络的关键节点。

1.7 NONFH疾病表型相关基因及靶标预测 在TCMIP v2.0的疾病表型相关分子数据库中,以“股骨头坏死”“osteonecrosis of the femoral head”为关键词进行检索,筛选NONFH不同中医证候(痰瘀阻络证、经脉痹阻证和肝肾亏虚证)临床表型相关基因。在TCMIP v2.0 (<http://www.tcmip.cn/>)中药材数据库数据库中,检索NONFH不同中医证候的对证方药(健脾活骨方、活血通痹方和补肾壮骨方)的组成药物,获得健脾活骨方、活血通痹方和补肾壮骨方的化学成分以及相关化学成分所对应的候选靶标。

1.8 通过构建NONFH不同中医证候及对证方药的相互作用网络,筛选不同中医证候及对证方药相关核心基因与靶标 基于蛋白互作网络分析(String)数据库提取NONFH不同中医证候及对证方药的相关分子与候选靶标的相互作用信息,并利用Navigator软件构建不同中医证候及对证方药的相互作用网络,并根据网络拓扑特征值,筛选不同中医证候及对证方药相关核心基因与靶标。

1.9 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料两组间比较采用 χ^2 检验,计量资料两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线一般资料比较 疾病组与对照组患者性

别、身体质量指数、年龄、使用激素时间等一般临床资料比较见表1,差异均无统计学意义,具有可比性。

表1 基线一般资料比较

Table 1 Clinical information of study subjects

组别	性别/例		身体质量指数($\bar{x}\pm s$) /kg·m ⁻²	年龄中位数、范围 (min-max)/岁	使用激素时间中位数、范围 (min-max)/月
	男	女			
疾病	13	17	23.07±3.01	39(21~74)	34(2~112)
对照	7	3	25.02±2.87	34(17~57)	17(12~120)

2.2 NONFH不同中医证候相关核心差异基因筛选 基因芯片检测数据已提交至美国国立生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information)的基因表达谱数据库(Gene Expression Omnibus),具体数据详见(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE123568>)。疾病组(痰瘀阻络证、经脉痹阻证、肝肾亏虚证)与对照组之间的具有显著差异表达特征的基因数汇总(筛选标准:fold change>1.5, P<0.05)见表2。基于上述各证候差异表达基因之间的相互作用信息,建立各证候相关基因互作网络,通过网络计算,筛选各证候核心差异基因。以痰瘀阻络证为例,①利用痰瘀阻络证组 vs. 对照组的1 908个差异基因建立其相互作用网络,包含1 247个节点和5 833对相互作用。②通过筛选连接度(Degree)大于网络连接度平均值的节点作为hub节点,获得340 hub基因。③建立上述hub基因的直接相互作用网络,包含340个节点和3 261对相互作用。④通过计算上述hub基因网络的节点拓扑特征值(连接度、紧密度、介数、核数),分别获得痰瘀阻络证、经脉痹阻证和肝肾亏虚证相关网络的核心差异基因101,154和101个。

表2 组间差异表达基因汇总

Table 2 Comparisons of differently expressed genes in controls and different syndromes of nontraumatic osteonecrosis of femoral head

组别	差异表达 基因总数	上调表达 基因数	下调表达 基因数
痰瘀阻络证-对照	3 044	1 864	1 180
经脉痹阻证-对照	5 290	3 382	1 908
肝肾亏虚证-对照	5 212	3 400	1 812

2.3 痰瘀阻络证相关核心基因与健脾活骨方相关核心靶标筛选

2.3.1 痰瘀阻络证相关核心基因筛选 基于TCMIP v2.0的疾病表型相关分子数据库,共筛选了

445个痰瘀阻络证临床表型相关基因。整合痰瘀阻络证相关核心差异基因与痰瘀阻络证临床表型相关基因,去冗余后基因后,共获得541个痰瘀阻络证相关基因。利用STRING数据库分析541个痰瘀阻络证相关基因的相互作用信息,其中包含478个节点和3 143条边,以网络拓扑特征值的中位数为卡值,筛选到155个痰瘀阻络证相关核心基因。

基于京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库,获得上述痰瘀阻络证相关核心基因参与的通路信息。其核心证候基因参与的通路主要与肌肉、骨代谢,如:磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B信号通路(P13K/Akt signaling pathway), Ras信号通路(Ras signaling pathway),酪氨酸激酶受体2信号通路(ErbB signaling pathway),破骨细胞分化(osteoclast differentiation),细胞凋亡(apoptosis),自然杀伤细胞介导的细胞毒性(natural killer cell mediated cytotoxicity),肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway),环磷酸腺苷信号通路(cAMP signaling pathway),三磷酸腺苷通道的炎性介质调节(inflammatory mediator regulation of TRP channels),内分泌和其他因子调节的钙重吸收(endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption),钙信号通路(calcium signaling pathway),腺苷酸活化蛋白激酶信号通路(AMPK signaling pathway),肌动蛋白细胞骨架的调节(regulation of actin cytoskeleton);和调节脂质代谢相关,如脂质体脂肪细胞的调控(regulation of lipolysis in adipocytes),脂肪细胞因子信号通路(adipocytokine signaling pathway),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路(mTOR signaling pathway);并参与调节机体“免疫-炎症系统”平衡,如:趋化因子信号通路(chemokine signaling pathway),T细胞受体信号通路(T cell receptor signaling pathway),丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway),

Fc gamma R 介导的吞噬作用 (Fc gamma R-mediated phagocytosis),核转录因子- κ B 信号通路 (NF- κ B signaling pathway), Fc epsilon RI 信号通路 (Fc epsilon RI signaling pathway), B 细胞受体信号通路 (B cell receptor signaling pathway), Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway), 白细胞跨内皮迁移 (leukocyte transendothelial migration), 产生免疫球蛋白 (Ig)A 的肠道免疫网络 (intestinal immune network for IgA production), NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway); 和调节机体血液循环相关, 如 FoxO 信号通路 (FoxO signaling pathway), 鞘磷脂信号通路 (sphingolipid signaling pathway), 血小板活化 (platelet activation), 补体和凝血级联 (complement and coagulation cascades), 血管平滑肌收缩 (vascular smooth muscle contraction)。

2.3.2 健脾活骨方相关核心靶标筛选 基于 TCMIIP V2.0 的药物靶标预测工具, 获得痰瘀阻络证对证方药-健脾活骨方的候选靶标谱[预测准确性 > 0.8, 选择中药所含化学成分成药性 (QED weight 值在 0.49~1.0) 为中~高级], 合并去冗余后, 共获得 1 010 个健脾活骨方候选靶标。利用 STRING 数据库分析 1 010 个健脾活骨方候选靶标的相互作用信息, 其中包含包含 916 个节点和 8 071 条边, 以网络拓扑特征值的中位数为卡值, 筛选到 308 个健脾活骨方相关核心靶标筛选。

基于 KEGG 数据库, 获得健脾活骨方相关核心靶标基因参与的通路信息。其核心靶标基因参与的通路主要与健骨, 活骨等成骨功效相关, 如多巴胺能突触 (dopaminergic synapse), 谷氨酸能突触 (glutamatergic synapse), Ras signaling pathway, 血清素能突触 (serotonergic synapse), MAPK signaling pathway, 催乳素信号通路 (prolactin signaling pathway), osteoclast differentiation, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (cysteine and methionine metabolism), 花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism), ErbB signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway, 黏着斑 (focal adhesion), endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption, 酪氨酸代谢 (tyrosine metabolism), natural killer cell mediated cytotoxicity, 苯丙氨酸代谢 (phenylalanine metabolism), 视黄醇代谢 (retinol metabolism), AMPK signaling pathway, 亚油酸代谢 (linoleic acid metabolism), 嘧啶代谢 (pyrimidine metabolism), 色氨酸代谢

(tryptophan metabolism), 黏附连接 (adherens junction); 并参与健脾, 化痰相关通路, 如 regulation of lipolysis in adipocytes, adipocytokine signaling pathway, mTOR signaling pathway; 活血, 通络, 止痛相关通路, 如 GABA 能突触 (GABAergic synapse), vascular smooth muscle contraction, platelet activation, 血管内皮生长因子信号通路 (VEGF signaling pathway), inflammatory mediator regulation of TRP channels, FoxO signaling pathway, 氨酰基-tRNA 的生物合成 (aminoacyl-tRNA biosynthesis); 提高机体免疫功能, 减轻炎症反应功效相关通路, 如 T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, chemokine signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, TNF signaling pathway; 和调节机体代谢相关通路, 如: 催产素信号通路 (oxytocin signaling pathway), cGMP-PKG 信号通路 (cGMP-PKG signaling pathway), 嘌呤代谢 (purine metabolism), 碳代谢 (carbon metabolism), adipocytokine signaling pathway, 胆汁分泌 (bile secretion), apoptosis, cAMP signaling pathway, 逆行内源性大麻素信号 (retrograde endocannabinoid signaling), regulation of lipolysis in adipocytes, 柠檬酸盐循环 (TCA cycle), 半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (cysteine and methionine metabolism)。痰瘀阻络证相关生物学基础与对证方药健脾活骨方作用机制解析图谱见图 1。

2.4 经脉痹阻证相关核心基因与活血通痹方相关核心靶标筛选

2.4.1 经脉痹阻证相关核心基因筛选 基于 TCMIIP v2.0 的疾病表型相关分子数据库, 共筛选了 628 个经脉痹阻证临床表型相关基因。整合经脉痹阻证相关核心差异基因与经脉痹阻证临床表型相关基因, 去冗余后基因后, 共获得 768 个经脉痹阻证相关基因。利用 STRING 数据库分析 768 个经脉痹阻证相关基因的相互作用信息, 其中包含 702 个节点和 6 312 条边, 以网络拓扑特征值的中位数为卡值, 筛选到 217 个经脉痹阻证相关核心基因。

基于 KEGG 数据库, 获得上述经脉痹阻证相关核心基因参与的通路信息。其核心证候基因参与的通路主要与血液循环受阻, 如: platelet activation, VEGF signaling pathway, 缺氧诱导因子 1 α 信号通路 (HIF-1 signaling pathway), complement and coagulation cascades, vascular smooth muscle

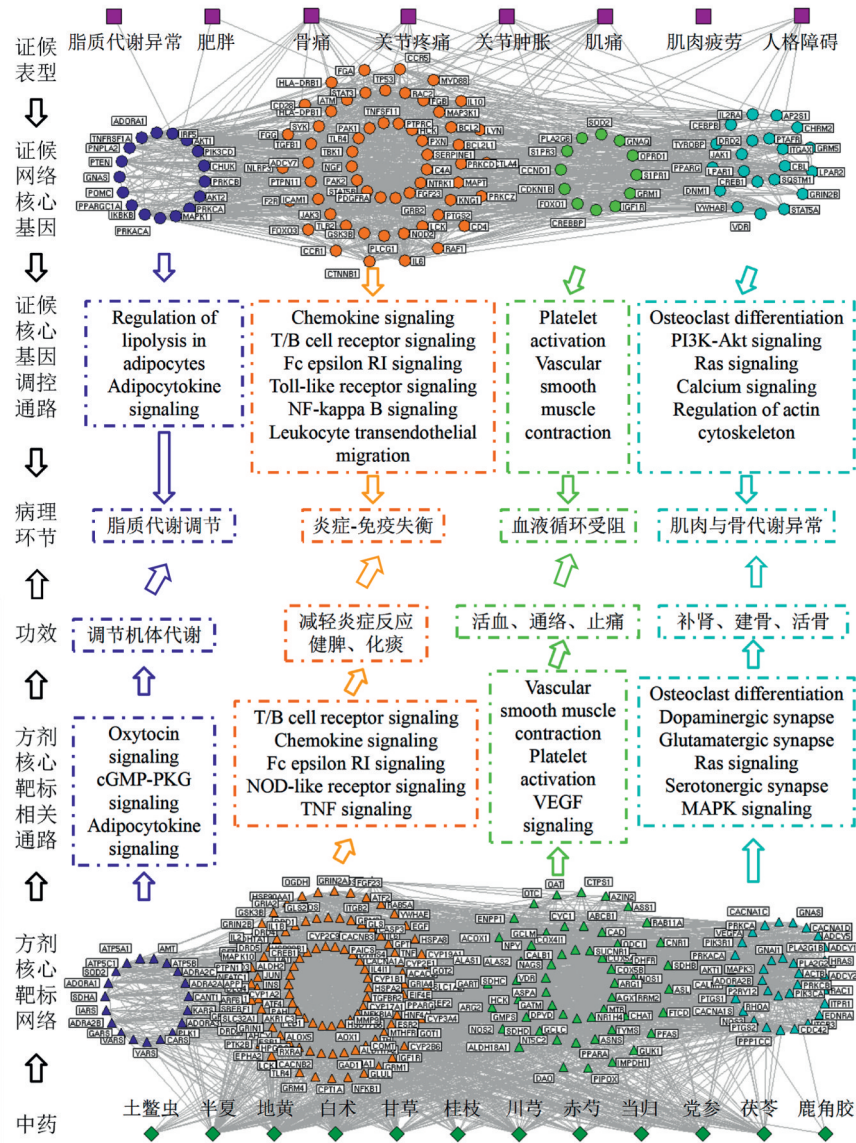


图 1 非创伤性股骨头坏死瘀痰阻络证的证候分子网络和对证方药健脾活骨方靶标网络的核心基因及其功能诠释

Fig. 1 Function of crucial genes associated with the phlegm-stasis blocking collateral syndrome and candidate targets of the corresponding prescription-Jianpi Huogu prescription

contraction; 和机体“免疫-炎症系统”失衡相关, 如: chemokine signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, MAPK signaling pathway, ras signaling pathway, NF- κ B signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, TNF signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, Fc gamma R-mediated phagocytosis, leukocyte transendothelial migration, JAK/STAT 信号通路 (Jak-STAT signaling pathway), NOD-like receptor signaling pathway, adipocytokine signaling pathway, inflammatory mediator regulation

of TRP channels, RIG-I-like receptor signaling pathway。并参与脂质代谢失调和骨代谢, 肌肉代谢相关通路, 如 Rap1 signaling pathway, FoxO signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway, focal adhesion, osteoclast differentiation, sphingolipid signaling pathway, cAMP signaling pathway, Wnt signaling pathway, adherens junction, regulation of lipolysis in adipocytes, AMPK signaling pathway, oxytocin signaling pathway, mTOR signaling pathway, cGMP-PKG signaling pathway, Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption。

2.4.2 活血通痹方相关核心靶标筛选 基于TCMIP v2.0的药物靶标预测工具,获得经脉痹阻证对证方药-活血通痹方的候选靶标谱,合并去冗余后,共获得1 010个活血通痹方候选靶标。利用STRING数据库分析691个活血通痹方候选靶标的相互作用信息,其中包含包含621个节点和4 061条边,以网络拓扑特征值的中位数为卡值,筛选到184个活血通痹方相关核心靶标筛选。

基于KEGG数据库,获得活血通痹方相关核心靶标基因参与的通路信息。其核心靶标基因参与的通路主要与增加免疫功能,减轻炎症反应,成骨相关,如Rap1 signaling pathway, calcium signaling pathway, Ras signaling pathway, MAPK signaling pathway, inflammatory mediator regulation of TRP channels, Fc gamma R-mediated phagocytosis, chemokine signaling pathway, PPAR signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, TNF signaling pathway, mTOR signaling pathway, natural killer cell mediated cytotoxicity, PI3K/Akt signaling pathway, osteoclast differentiation, leukocyte transendothelial migration, Toll-like receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, regulation of actin cytoskeleton;并参与补气功效相关(机体能量代谢),如cAMP signaling pathway, oxytocin signaling pathway, cGMP-PKG signaling pathway, regulation of lipolysis in adipocytes, arachidonic acid metabolism, 醛固酮合成与分泌(aldosterone synthesis and secretion),胰岛素分泌(insulin secretion),胰液分泌(pancreatic secretion), bile secretion, linoleic acid metabolism, gastric acid secretion, adipocytokine signaling pathway, prolactin signaling pathway, insulin signaling pathway, 胰高血糖素信号通路(glucagon signaling pathway);和活血,通痹功效相关,如platelet activation, GABAergic synapse, VEGF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway。经脉痹阻证相关生物学基础与对证方药活血通痹方作用机制解析图谱见图2。

2.5 肝肾亏虚证相关核心基因与补肾壮骨方相关核心靶标筛选

2.5.1 肝肾亏虚证相关核心基因筛选 基于TCMIP v2.0的疾病表型相关分子数据库,共筛选了1 551个肝肾亏虚证临床表型相关基因。整合肝肾

亏虚证相关核心差异基因与肝肾亏虚证临床表型相关基因,去冗余后基因后,共获得1 634个肝肾亏虚证相关基因。利用STRING数据库分析1 634个肝肾亏虚证相关基因的相互作用信息,其中包含1 552个节点和14677条边,以网络拓扑特征值的中位数为卡值,筛选到506个肝肾亏虚证相关核心基因。

基于KEGG数据库,获得上述肝肾亏虚证相关核心基因参与的通路信息。其核心证候基因参与的通路主要与骨,肌肉和脂质代谢失调,如PI3K/Akt signaling pathway, FoxO signaling pathway, focal adhesion, cAMP signaling pathway, osteoclast differentiation, regulation of actin cytoskeleton, regulation of lipolysis in adipocytes, 缝隙连接(Gap junction), sphingolipid signaling pathway, citrate cycle, Wnt signaling pathway, 细胞外基质受体间的相互作用(ECM-receptor interaction), JAK/STAT signaling pathway, oxytocin signaling pathway, 转化生长因子- β 信号通路(TGF-beta signaling pathway), mTOR signaling pathway, 氧化磷酸化信号通路(oxidative phosphorylation), cGMP-PKG signaling pathway, Notch信号通路(Notch signaling pathway), 和“免疫-炎症”系统失衡相关,如chemokine signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, MAPK signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, Rap1 signaling pathway, TNF signaling pathway, Ras signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, NF- κ B signaling pathway, Fc gamma R-mediated phagocytosis, NOD-like receptor signaling pathway, adipocytokine signaling pathway, natural killer cell mediated cytotoxicity, Calcium signaling pathway, leukocyte transendothelial migration, inflammatory mediator regulation of TRP channels, RIG-I-like receptor signaling pathway;并参与血液循环受阻相关通路,如HIF-1 signaling pathway, VEGF signaling pathway, platelet activation, 和神经系统异常相关通路,如ErbB signaling pathway, 神经营养因子信号通路(neurotrophin signaling pathway)。

2.5.2 补肾壮骨方相关核心靶标筛选 基于TCMIP V2.0的药物靶标预测工具,获得肝肾亏虚证对证方药-补肾壮骨方的候选靶标谱,合并去冗余后,共获得495个补肾壮骨方候选靶标。利用

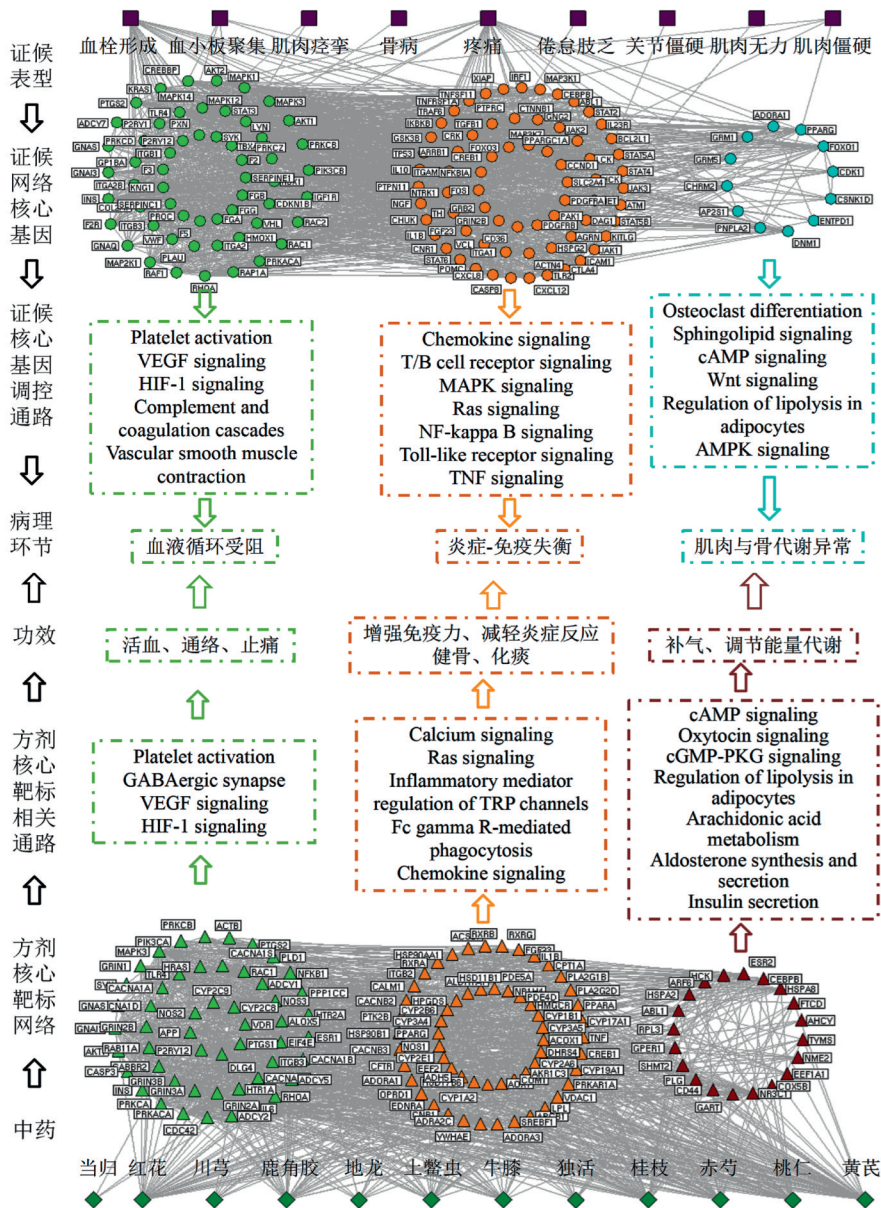


图 2 非创伤性股骨头坏死经脉痹阻证的证候分子网络和对证方药活血通痹方靶标网络的核心基因及其功能诠释

Fig. 2 Function of crucial genes associated with phlegm-stasis blocking collateral syndrome and candidate targets of corresponding prescription-Huoxue Tongbi prescription

STRING 数据库分析 495 个补肾壮骨方候选靶标的相互作用信息,其中包含包含 425 个节点和 2 461 条边,以网络拓扑特征值的中位数为卡值,筛选到 114 个补肾壮骨方相关核心靶标筛选。

基于 KEGG 数据库,获得补肾壮骨方相关核心靶标基因参与的通路信息。其核心靶标基因参与的通路主要与增强免疫功能和减轻炎症反应,如 inflammatory mediator regulation of TRP channels, Rap1 signaling pathway, TNF signaling pathway, Ras signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, Fc

gamma R-mediated phagocytosis, chemokine signaling pathway, natural killer cell mediated cytotoxicity, Fc epsilon RI signaling pathway, leukocyte transendothelial migration, NFκB signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, MAPK signaling pathway; 和强筋,壮骨相关,如 cAMP signaling pathway, 胰岛素抵抗 (insulin resistance), arachidonic acid metabolism, oxytocin signaling pathway, gap junction, linoleic acid metabolism, 类固醇激素生物合成 (steroid hormone biosynthesis),

insulin secretion, cGMP-PKG signaling pathway, AMPK signaling pathway, endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption, PI3K/Akt signaling pathway, osteoclast differentiation, PPAR signaling pathway, insulin signaling pathway, regulation of actin cytoskeleton, retinol metabolism, focal adhesion, regulation of lipolysis in adipocytes, sphingolipid signaling pathway, mTOR signaling pathway, adipocytokine signaling pathway, 甲状腺激素合成

(thyroid hormone synthesis); 并参与活血, 止痛相关通路, 如 vascular smooth muscle contraction, HIF-1 signaling pathway, platelet activation, VEGF signaling pathway, 肾素分泌 (renin secretion), 和调节神经系统相关通路, 如 serotonergic synapse, calcium signaling pathway, aldosterone synthesis and secretion, glutamatergic synapse, GABAergic synapse。肝肾亏虚证相关生物学基础与对证方药补肾壮骨方作用机制解析图谱见图 3。

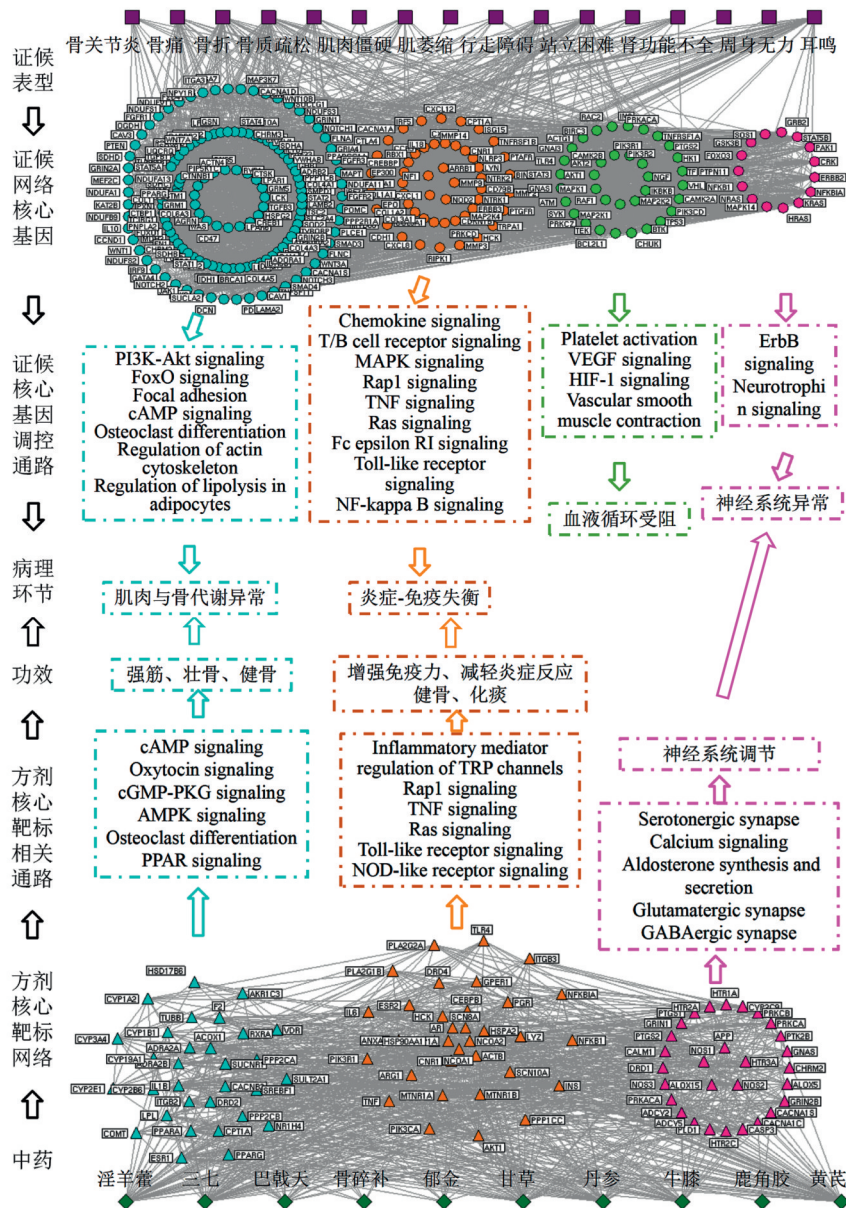


图 3 非创伤性股骨头坏死肝肾亏虚证的证候分子网络和对证方药补肾壮骨方靶标网络的核心基因及其功能诠释

Fig. 3 Function of crucial genes associated with liver and kidney deficiency syndrome and candidate targets of corresponding prescription-Bushen Zhuanggu prescription

3 讨论

本课题组早在 20 世纪 90 年代中期就提出了

“本病之病因病机皆因瘀, 瘀而致痹, 故三期用药重在活血”的观点, 治疗股骨头坏死重用活血药物取

得了一定的效果^[28]。通过多年的临床实践中,我们发现NONFH除了有“瘀”,同时兼有关节沉重、喜食肥腻、苔腻、脉滑等“痰”的表现。此后,通过分析NONFH患者血脂与凝血相关理化指标检测发现, NONFH患者普遍存在高脂血症与高凝状态并存的“痰瘀互结”,且与不同时期NONFH中医证候存在相关性^[29-32]。ONFH证素聚类研究发现, ONFH病位证素主要有脾、肾、肝和筋骨,其中脾在早期出现频率最高,肾在中晚期出现频率较高,肝在晚期出现频率最高。主要病性证素痰湿在早中期的出现

频率最高,血瘀则贯穿于疾病全过程,揭示了NONFH“早期在脾、晚期在肾”的证候规律以及“脾虚生痰,由痰致瘀,因瘀致痹”的病机特点^[33],由此建立了早、中、晚“三期”和气滞血瘀、痰瘀阻络、经脉痹阻、肝肾亏虚“四型”的股骨头坏死中医辨证分型方法^[6]及“痰瘀同治”的基本治则^[34-35]。本研究结果显示, NONFH中医证候核心证候基因均参与血液循环、骨代谢、脂肪代谢、炎症免疫反应相关通路,然而不同中医证候的核心证候基因主要参与的通路则各有侧重。见图4。

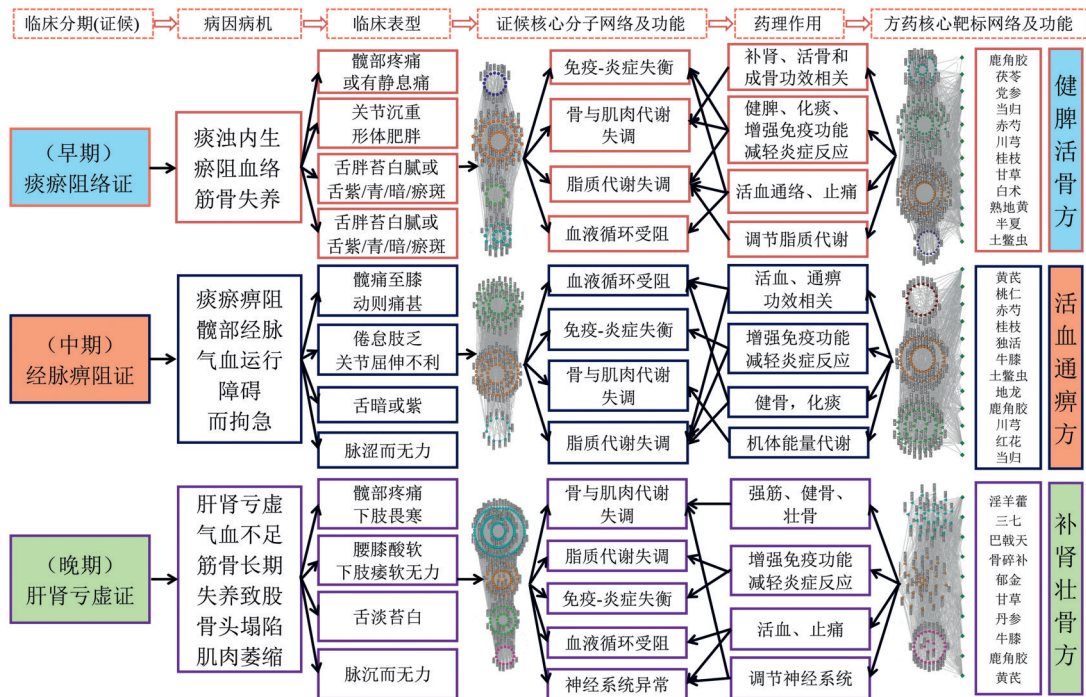


图4 非创伤性股骨头坏死全病程中医证候和对证方药靶标网络的核心基因及其功能诠释

Fig. 4 Biological basis underlying different syndromes of NONFH and corresponding prescriptions

痰瘀阻络证常见于早期NONFH,多因应用糖皮质激素和饮酒导致血脂水平的升高,升高的血脂相当于中医“痰浊”,痰为体内病理产物,随气血循行周身,阻于局部血络,致使正常气血不能营养股骨头,而致股骨头发生坏死。本研究中,痰瘀阻络证相关分子网络分析结果显示,其核心证候基因参与的通路主要与调节骨代谢(如PI3K/Akt signaling pathway, osteoclast differentiation, Ras signaling pathway),脂质代谢(如regulation of lipolysis in adipocytes, adipocytokine signaling pathway, mTOR signaling pathway)相关,并参与调节机体“免疫-炎症系统”平衡(如chemokine signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, T cell receptor signaling pathway)和调节与血液循环(如FoxO

signaling pathway, platelet activation, vascular smooth muscle contraction)。本课题组前期研究发现,痰瘀阻络证患者普遍存在脂质代谢紊乱与血液高凝状态^[29-32]等中医“痰瘀”的病理改变,说明脂质代谢紊乱与血液高凝状态是早期痰瘀阻络证ONFH“痰瘀”的主要病理基础。早期股骨头坏死CT影像表现为负重区骨小梁紊乱,部分吸收,股骨头密度不均匀;MRI可见骨坏死灶有骨髓水肿,局部充血等炎症病理改变^[36],说明痰瘀阻络证主要病理表现为骨吸收与炎症反应。健脾活骨方是陈卫衡教授总结多年的ONFH诊疗经验形成的治疗早期ONFH的临床验方,具有健脾化痰,活血通络的作用。相应地,痰瘀阻络证对证方剂--健脾活骨方相关靶标网络分析结果显示,其核心靶标基因参与的通路主

要与成骨相关(如 PI3K/Akt signaling pathway, osteoclast differentiation, Ras signaling pathway),并参与化痰(如 regulation of lipolysis in adipocytes, adipocytokine signaling pathway, mTOR signaling pathway),活血(如 VEGF signaling pathway, vascular smooth muscle contraction, platelet activation),止痛(如 GABAergic synapse, inflammatory mediator regulation of TRP channels),调节机体代谢(如 cGMP-PKG signaling pathway, cAMP signaling pathway, cysteine and methionine metabolism),提高免疫功能(如 T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, chemokine signaling pathway),减轻炎症(如 TNF signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway)等相关机能,其核心靶标基因参与的通路与痰瘀阻络证生物学基础相匹配。

经脉痹阻证常见于中期 ONFH,多因早期治疗不及时,随着病情发展,气血及痰瘀不但郁阻于局部,而且向外痹阻于经过髋部的经脉,经脉不能正常运行气血而拘急,因髋部肌肉缺少气血的濡养故见髋关节功能活动明显受限。经脉痹阻证相关分子网络分析结果显示,其核心证候基因参与的通路主要与调节血液循环(如 VEGF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, platelet activation)和机体“免疫-炎症系统”平衡(如 chemokine signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway)相关,并参与调节脂质代谢(regulation of lipolysis in adipocytes, mTOR signaling pathway, sphingolipid signaling pathway)和骨代谢(如 PI3K/Akt signaling pathway, osteoclast differentiation, Wnt signaling pathway)。本课题组前期股骨头坏死中医证候与相关理化指标研究^[31]发现经脉痹阻证的血小板计数大于痰瘀阻络证与肝肾亏虚证两种证候,且在总胆固醇,甘油三酯等血脂指标也存在差异,说明经脉痹阻证血液循环障碍最重并伴有不同程度的脂质代谢紊乱。骨髓水肿被认为与髋关节局部炎症反应密切相关,随着病情发展,修复性肉芽组织增生及炎性细胞浸润,可导致骨髓水肿加重,而项目组前期研究发现经脉痹阻证骨髓水肿程度重于痰瘀阻络证与肝肾亏虚证两种证候^[37]。相应地,活血通痹方是治疗中期 ONFH 经脉痹阻证的经方,其相关靶标网络分析结果显示,核心靶标基因参与的通路主要与提高免疫

功能(如 T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, chemokine signaling pathway),减轻炎症(如 TNF signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway),成骨(如 PI3K/Akt signaling pathway, osteoclast differentiation, Rap1 signaling pathway)相关,并参与补气(如 cGMP-PKG signaling pathway, cAMP signaling pathway, aldosterone synthesis and secretion),活血通痹(如 VEGF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, platelet activation)等相关机能。

肝肾亏虚证常见于晚期 ONFH,病至后期,气血不足,肝肾亏虚,肌肉萎缩,经脉进一步痹阻不通,股骨头长期没有气血的营养,又加上长期负重,导致股骨头塌陷,髋关节功能进一步受限,屈伸不利,关节强直,治当补益肝肾佐以活血化瘀。本研究通过肝肾亏虚证相关分子网络分析发现,其核心证候基因参与的通路主要与调节骨代谢(PI3K/Akt signaling pathway, osteoclast differentiation, Notch signaling pathway),机体“免疫-炎症系统”平衡(如 chemokine signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway)和脂质代谢(如 regulation of lipolysis in adipocytes, mTOR signaling pathway, adipocytokine signaling pathway)相关,并参与调节血液循环(如 HIF-1 signaling pathway, VEGF signaling pathway, platelet activation)。本课题组前期 ONFH 理化指标研究发现,肝肾亏虚证也存在不同程度的脂代谢紊乱与血液高凝状态^[30]。补肾壮骨方是著名骨伤科专家王和鸣教授治疗晚期 ONFH 肝肾亏虚证的验方,具有补益肝肾,活血化瘀的作用。本研究所构建补肾壮骨方相关靶标网络显示,其核心靶标基因参与的通路主要与提高免疫功能(如 Toll-like receptor signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, chemokine signaling pathway),减轻炎症(如 TNF signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway),强筋壮骨(如 PI3K/Akt signaling pathway, osteoclast differentiation, Wnt signaling pathway)相关;并参与活血(如 HIF-1 signaling pathway, platelet activation, VEGF signaling pathway),止痛(如 serotonergic synapse, calcium signaling pathway, GABAergic synapse)相关机能,与肝肾亏虚证生物学基础相应。

综上所述,ONFH 不同证候生物学基础各有

侧重,其中,疾病早期的痰瘀阻络证以调节骨代谢和脂质代谢相关通路异常为主,中期的经脉痹阻证在机体“免疫-炎症系统”失衡基础上,呈现血液循环调节通路异常,发展到疾病后期,肝肾亏虚证出现了骨和脂质代谢失调、机体“免疫-炎症系统”失衡和血液循环调节多通路异常等现象。值得注意的是,针对上述不同证候的相关方药的核心靶标均体现出了与其对应证候生物学基础匹配的作用特点。本研究结果将有助于阐述以股骨头坏死为代表的难治性骨关节疾病不同证候动态演变网络的生物学内涵以及方证相应的网络调控机制,为中医药理论基础研究提供新的思路参考。

[参考文献]

- [1] 赵德伟,杨磊,田丰德,等. 大连市潜水员股骨头坏死发病率的流行病学调查报告[J]. 中华骨科杂志, 2012,32(6):521-525.
- [2] ZHAO D W, YU M, HU K, et al. Prevalence of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head and its associated risk factors in the chinese population: results from a nationally representative survey [J]. Chin Med J, 2015, 128(21):2843-2850.
- [3] 李子荣. 晚期股骨头坏死人工关节置换术的选择[J]. 中华关节外科杂志:电子版, 2008,2(1):51-52.
- [4] KUBO T, UESHIMA K, SAITO M, et al. Clinical and basic research on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in Japan[J]. J Orthop Sci, 2016, 21(4):407-413.
- [5] 何伟. 科学看待中医药治疗非创伤性股骨头坏死[J]. 中华关节外科杂志:电子版, 2013, 7(3):284-286.
- [6] 陈卫衡,刘道兵,张洪美,等. 股骨头坏死的三期四型辨证思路[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003,9(12):51-52.
- [7] 李泰贤,陈志伟,王荣田,等. 基于文献计量学分析中医药治疗股骨头坏死的研究现状[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017,25(4):41-46.
- [8] 陈卫衡,何伟,童培建,等. 股骨头坏死中医辨证标准(2019年版)[J]. 中医正骨, 2019,31(6):1-2.
- [9] 李泰贤,张彦琼,薛志鹏,等. 激素性股骨头坏死不同中医证型相关基因表达谱的鉴定及其候选标志分子的发现与验证[J]. 中华中医药杂志, 2019,34(10):4536-4542.
- [10] 陈卫衡,周宇,何海军,等. 健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死临床回顾性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013,33(8):1054-1058.
- [11] 陈卫衡,周宇,何海军,等. 健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死的前瞻性临床研究[J]. 中华关节外科杂志:电子版, 2013,7(3):287-293.
- [12] 邹海鹏,陈卫衡. 中晚期股骨头坏死中医综合治疗的临床研究[J]. 北京中医药, 2010,29(1):45-47.
- [13] 赵宝祥. 中医辨证治疗股骨头坏死临床研究[J]. 中医学报, 2015,30(8):1208-1210.
- [14] 李文顺,孙克民,王和鸣,等. 复方巴戟天合剂治疗股骨头缺血性坏死的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006,14(2):48-50.
- [15] 孔祥英,万蓉,李莉,等. 不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡成骨相关因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2011,36(5):614-617.
- [16] 万蓉,李莉,孔祥英,等. 不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡股骨头 OPG, RANKL mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(8):149-153.
- [17] 王荣田,林诗富,万蓉,等. 不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡血脂、血黏度、凝血及纤溶功能的影响[J]. 中医正骨, 2013,25(3):21-30.
- [18] 万蓉,林诗富,林娜,等. 不同治法方药对激素性股骨头坏死的骨组织形态学影响[J]. 中国骨伤, 2010,23(12):915-919.
- [19] 白玉,卢中道,王迪. 激素性股骨头坏死中药治疗实验研究[J]. 医药论坛杂志, 2007,28(10):40-41.
- [20] 曾荣香,徐志毅,雷凯君,等. 补阳还五汤对激素性股骨头坏死大鼠血液流变学、凝血及纤溶的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012,30(8):1852-1854.
- [21] 孙克民,王和鸣,王平,等. 复方巴戟天合剂对激素性股骨头坏死大鼠模型血液流变学和血脂的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011,19(5):1-3.
- [22] 陈泽荣,邱慈鑫,陈晨,等. 温阳补肾方含药血清对破骨细胞骨吸收功能的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015,30(4):1245-1248.
- [23] HOPKINS A L. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007,25(10):1110-1111.
- [24] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11):682-690.
- [25] 谢盈彧,刘璐,李渊芳,等. 基于网络药理学的四妙勇安汤在血管新生中的作用机制研究[J]. 中草药, 2018,49(18):4319-4330.
- [26] MONT M A, HUNGERFORD D S. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg(Am), 1995,77(3):459-474.
- [27] LI T, ZHANG Y, WANG R, et al. Discovery and validation an eightbiomarker serum gene signature for the diagnosis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Bone, 2019,122:199-2008.
- [28] 郭效东,陈卫衡,赵永刚,等. 股骨头无菌性坏死三期

- 辨证论治的临床研究[J]. 中国骨伤, 1995, 8(6): 19-20.
- [29] 陈卫衡, 林娜, 郭效东, 等. 非创伤性股骨头坏死与血浆脂蛋白的相关性研究[J]. 中国骨伤, 2003, 16(2): 69-70.
- [30] 汪晓燕, 陈卫衡, 宋剑南, 等. 非创伤性股骨头坏死及其证候与血脂代谢的关系[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(5): 368-369.
- [31] 陈卫衡, 刘道兵, 孙凯, 等. 股骨头坏死中医证型与相关理化指标关系的研究[J]. 中国骨伤, 2005, 18(9): 513-516.
- [32] 陈永德, 郭洁, 陈卫衡. 非创伤性股骨头坏死患者血脂变化[J]. 中国医学检验杂志, 2005, 6(1): 62-62.
- [33] 王荣田, 林娜, 陈卫衡, 等. 股骨头坏死的证素辨证初步研究[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(7): 495-499.
- [34] 刘道兵, 王荣田, 陈卫衡. 从“痰瘀同病”论股骨头坏死的中医药治疗[J]. 中医杂志, 2013, 54(19): 1644-1646.
- [35] 陈卫衡. 股骨头坏死“痰瘀同治”的理论基础[J]. 江苏中医药, 2008, 40(5): 3-4.
- [36] 王祝平. 早期股骨头坏死影像表现特点及鉴别诊断[J]. 影像视觉, 2016, 17(1): 26-27.
- [37] 金智勇, 陈卫衡, 王琪, 等. 髋关节骨髓水肿与股骨头坏死中医证候的相关性研究[J]. 北京中医药, 2010, 29(2): 86-87.

[责任编辑 孙丛丛]