

网络药理学视角下杜仲抗骨质疏松的作用机制研究

刘凡杰¹ 殷颖² 安建鹏¹ 王丹丹¹ 甘东浩³ 师彬^{1△}

[摘要] **目的:**基于网络药理学方法,根据杜仲活性化合物结构预测其作用靶点,与骨质疏松(OP)相关治疗靶点进行扩展后映射,拓扑出 Hub 节点并进行富集分析,揭示杜仲抗 OP 的物质基础及作用机制。**方法:**通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP),根据药代动力学特征筛选出杜仲的主要活性成分,并使用有机小分子生物活性数据库(PubChem)和 Swiss Target Prediction 数据库,根据化合物结构相似性预测出可能作用靶点,然后通过 Drugbank 搜集目前 OP 治疗药物及其相关靶点,结合预测靶点分别进行扩展后取交集,将所得重合靶点借助 CytoNCA 软件,根据相关节点参数拓扑出相互作用的关键节点,再导入 String 构建蛋白质相互作用网络图,最后通过 DAVID 数据库对关键节点进行生物功能及代谢通路分析。**结果:**筛选出 15 个杜仲活性成分,根据靶点预测技术预测出相关靶点 196 个;检索出 OP 相关靶点 43 个,经扩展-取交集-拓扑分析后共得 152 个 Hub 节点,根据 String 数据库构建蛋白质相互作用网络,富集分析显示杜仲可能通过多条主流信号通路及细胞代谢全过程对 OP 产生调控作用。**结论:**杜仲可能通过直接或间接作用于靶点,参与调控上下游多条信号通路以干预 OP 的进展,为揭示其抗 OP 的机制及后续研究奠定了基础。

[关键词] 杜仲;骨质疏松;网络药理学;作用机制

[中图分类号] R274.39 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)01-0043-06

Anti-osteoporosis Mechanism of Eucommia Ulmoides from the Perspective of Network Pharmacology

LIU Fanjie¹ YIN Ying² AN Jianpeng¹ WANG Dandan¹ GAN Donghao³ SHI Bin^{1△}

¹ Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases of Shandong Province, Back and Neck Pain Hospital, Shandong Medicinal Biotechnology Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250012, China;

² Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;

³ Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.

Abstract Objective: Based on the network pharmacology method, the target was predicted according to the active compound structure of Eucommia ulmoides, and the therapeutic targets related to osteoporosis(OP) were expanded and intersected with those. The Hub node was topologically analyzed and enriched to reveal the material basis of anti-OP of Eucommia ulmoides. **Methods:** The main active ingredients of Eucommia ulmoides was screened according to the pharmacokinetic

characteristics by traditional Chinese medicine database and analysis platform system pharmacology (TCMSP), and organic small molecule biological active database (PubChem) and Swiss Target Prediction database was used to predict possible targets according to the compound structure similarity. Current OP therapeutic drugs and its related targets were collected by means of the Drugbank, and then combine the predicted targets to expand respectively to take the intersection. The Hub nodes were extracted from the obtained coincident targets of the interaction according to the relevant node parameters by CytoNCA software and imported into String to construct the protein interaction network diagram.

基金项目:泰山学者特聘专家计划(ts201511074)

山东省自然科学基金面上项目(ZR2019MH134)

山东省重点研发计划项目(2016GSF202042)

山东第一医科大学学术提升计划(2019QL003)

¹ 山东省罕见病重点实验室,山东省医学科学院颈肩腰腿痛医院,山东省医药生物技术研究中心,山东第一医科大学(山东省医学科学院)(济南,250012)

² 山东中医药大学附属医院

³ 山东中医药大学

[△]通信作者 E-mail:sdyky-shibin@163.com

Finally the DAVID database was used to perform analysis of biological functions and metabolic pathways of Hub nodes. **Results:** 15 active components of *Eucommia ulmoides* were selected and 196 targets were predicted according to the target prediction technology. 43 OP-related targets were retrieved, and 152 Hub nodes were obtained after extension-intersection and topological analysis. Protein interaction network was constructed according to String database. Enrichment analysis showed that *Eucommia ulmoides* may exert regulatory effects on OP through multiple mainstream signal pathways and the whole process of cell metabolism. **Conclusion:** Based on the network pharmacology research, it is suggested that *Eucommia ulmoides* may be involved in the regulation of multiple signaling pathways in the upstream and downstream to interfere with the progress of OP through direct or indirect targets, which lays a foundation for revealing and further studying the anti-OP mechanism.

Keywords: *Eucommia ulmoides*; osteoporosis; network pharmacology; mechanism

骨质疏松 (Osteoporosis, OP) 是一种全身性骨骼疾病, 以骨微结构破坏、骨的脆性提高为特征, 具有高发病率、高致残率特点^[1]。OP 作用机制复杂, 目前的抗 OP 药物多为促进成骨、抑制破骨和促进钙化等, 作用靶点单一, 难以改善或兼顾骨代谢的动态平衡, 中药抗骨质疏松的作用机制逐步进入研究者的视野^[2]。

杜仲作为传统骨伤科要药, 具有补益肝肾、强筋健骨功效, 现代研究表明, 杜仲及其提取物具有改善血、尿骨代谢指标和骨微结构、增加骨密度, 促进成骨分化、抑制成脂表达的作用^[3-6]。但杜仲有效成分众多^[7], 作用靶点丰富, 分子机制尚不明确。本研究运用网络药理学方法, 筛选其先导化合物, 并根据分子结构预测相关靶点, 与现有治疗 OP 药物进行靶点比对, 探索杜仲抗 OP 的可能作用机制, 既可在整体上揭示杜仲抗 OP 的作用机制, 又可提高发掘新药效率。

1 材料与方法

1.1 杜仲活性物质筛选

通过检索中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP)^[8] 获取杜仲的活性化合物, 根据成分药动学吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 参数^[9,10] 进行筛选, 筛选条件为药物口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 药物相似性 (DL) ≥ 0.18 ^[11], 并查阅相关文献和有机小分子生物活性数据库 (PubChem)^[12] 获得杜仲入血活性成分及其相应的典型 SMILES 结构。

1.2 杜仲活性物质靶点预测

将从 PubChem 获得的各化合物 SMILES 结构导入 Swiss Target Prediction 网络数据库^[13] 预测靶标, 筛查可能性高的预测靶点, 并通过 Cytoscape^[14] 对上述所得数据构建 Compound-Target 网络图, 最后将预测靶点经 Bisogenet 进行扩展。

1.3 OP 治疗靶点查询

通过 Drugbank 以 “osteoporosis” 作为关键词对 OP 相关治疗药物进行检索、筛查, 获得治疗 OP 药物的已知的靶点。再将所得靶点导入 Bisogenet 进行扩展, 获得可能治疗 OP 的直接和间接靶点。

1.4 筛选中心节点并构建蛋白相互作用网络

将上述所得杜仲活性成分预测靶点和 OP 可能治疗靶点导入 Cytoscape 取交集, 即可初步得到杜仲治疗 OP 的直接和间接靶点调控网络图, 再借助网络拓扑分析插件 CytoNCA^[15] 并结合文献, 根据度中心性 (DC)、特征向量中心性 (EC)、介度中心性 (BC) 等参数进行拓扑, 其中 DC 值大于所有节点 DC 值中位数 2 倍^[16] 的节点为网络中的重要节点 (即 “Big Hubs”), 再筛选其余指标大于所有节点中位数的节点^[17] (即关键靶点)。以尽可能在网络中获得更多节点的传递信息和更高的节点信息传递效率, 深入挖掘杜仲抗 OP 关键的直接或间接作用靶点, 再通过 String 数据库^[18] 对所得关键靶点构建蛋白相互作用 (PPI) 网络图。

1.5 Hub 节点富集分析

将所得中心 (Hub) 节点导入 DAVID 数据库进行基因富集分析 (GO) 和 KEGG 通路分析, 以分析关键靶点参与的主要分子生物过程或信号通路。

2 结果

2.1 杜仲活性成分筛选

通过检索 TCMSP 数据库, 共检索到杜仲化合物 147 个, 根据 OB 和 DL 等 ADME 参数初步筛选到生物活性成分 28 个, 再根据 PubChem 和 Swiss Target Prediction 数据库查找相关结构和靶点资料, 终筛后得到 15 个有对应靶点的活性成分 (见表 1)。

表 1 杜仲潜在活性成分及其 OB 和 DL 值表

化合物	OB/%	DL
山柰酚 (kaempferol)	41.88	0.24
槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28
丁子香酚 (Mairin)	55.38	0.78
皮树脂醇 (40957-99-1)	57.20	0.62
β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75
五加苷 B (Acanthoside B)	43.35	0.77
脱氢丁香酚 (Dehydrodieugenol)	30.10	0.24
京尼平龙胆双糖苷 (GBGB)	45.58	0.83
丁香黄素 (Syringetin)	36.82	0.37
8-羟基松脂醇 (AIDS214634)	92.43	0.55
环巴胺 (Cyclopamine)	55.42	0.82

桉脂素((+)-Eudesmin)	33.29	0.62
杜仲素 A(Eucommin A)	30.51	0.85
(9R)-6'-甲氧基奎宁-9-胺三盐酸盐	68.22	0.40

(续表 1)

化合物	OB/%	DL
去氢二松柏醇(4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol)	50.76	0.39

2.2 预测杜仲活性成分作用靶点

根据杜仲活性化合物的 SMILE 结构导入 Swiss Target Prediction 网站在线预测,筛选可能性较高并去重后共获得 196 个靶点,利用 Cytoscape 构建化合物-靶点(Compound-Target)作用网络见图 1.

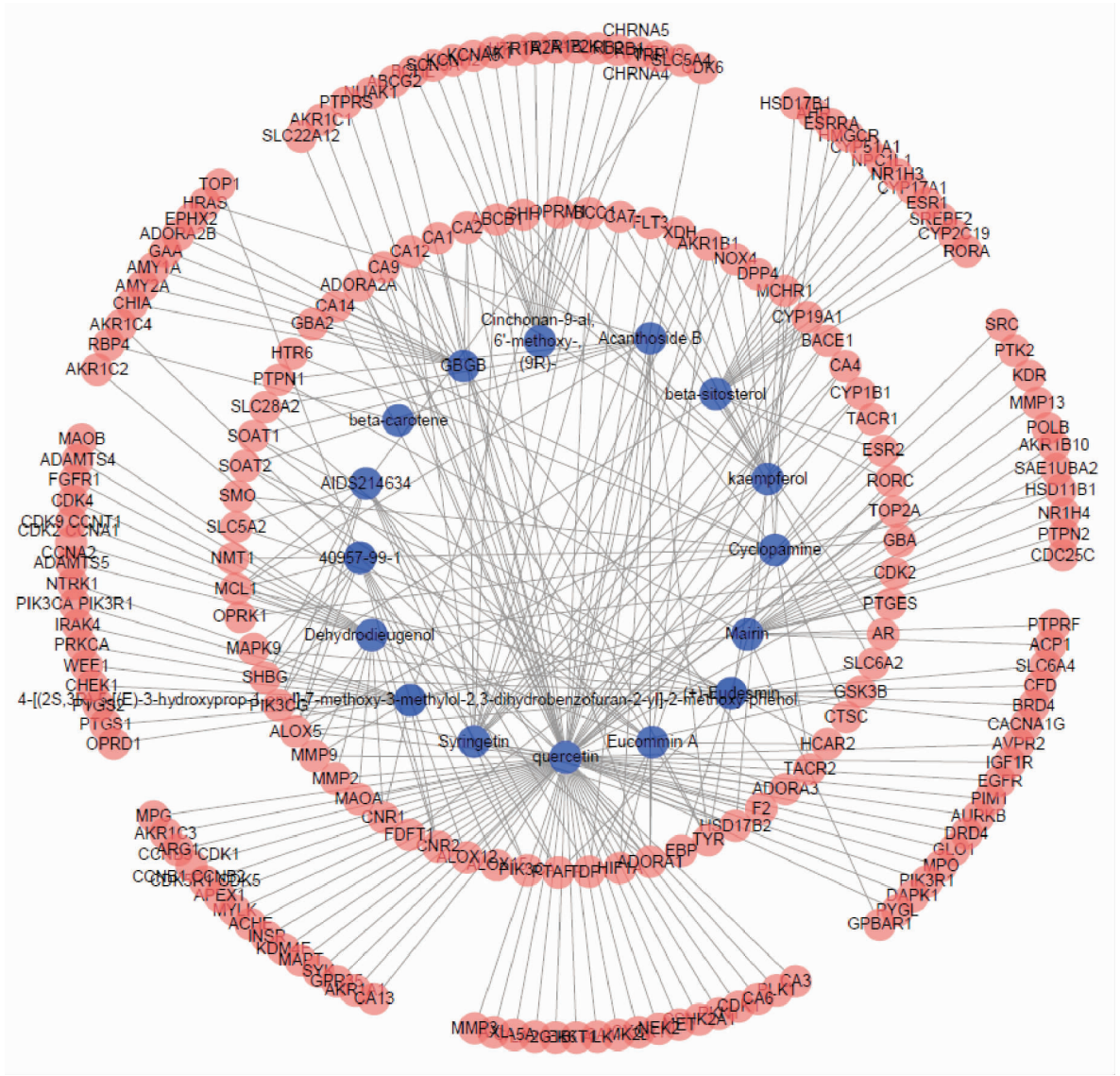


图 1 杜仲中 15 种活性成分及其 196 个预测的靶点网络图

2.3 检索 OP 治疗靶点

检索 Drugbank 数据库得到治疗 OP 相关药物,然后整合并去重筛选得到药物所对应的靶点共 43 个,用 Bisogenet 软件将 OP 治疗靶点扩展距离为 1 时共获得 1 233 个相关靶点。杜仲活性化合物预测靶点扩展距离为 1 时共获得 5 776 个节点,133 365 条相互作用关系。OP 治疗靶点扩展距离为 1 时共获得 1 233 个节点,22 010 条相互作用关系。经 Cytoscape 软件取交集后共得 1 049 个节点,18 893 条相互关系。经 CytoNCA 根据

DC,BC,EC 等参数拓扑后共得 152 个节点,将其全部导入 String 在线网络数据库构建 protein-protein interaction network(PPI 网络),见图 2.

2.4 对 Hub 节点进行富集分析

通过 DAVID 数据库对 Hub 节点进行 GO 分析,共富集出生物过程(Biological Process,BP)452 项,分子功能(Molecular Function,MF)82 项,细胞成分(Cellular Component,CC)60 项,排名前十的 GO 富集结果见图 3.对 Hub 节点进行 KEGG 富集分析,去除

广泛通路后,排名前十和骨质疏松相关通路主要包括: Cell cycle, 分泌型糖蛋白/ β -链蛋白(Wnt/ β -catenin) signaling pathway, 转化生长因子 β (TGF- β signaling pathway) 信号通路, 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK signaling pathway)信号通路, ErbB signaling

pathway,胰岛素(Insulin signaling pathway),Notch signaling pathway,B细胞受体信号通路(B cell receptor signaling pathway),趋化因子(Chemokine signaling pathway)信号通路和黏附斑(Focal adhesion)等关键通路。

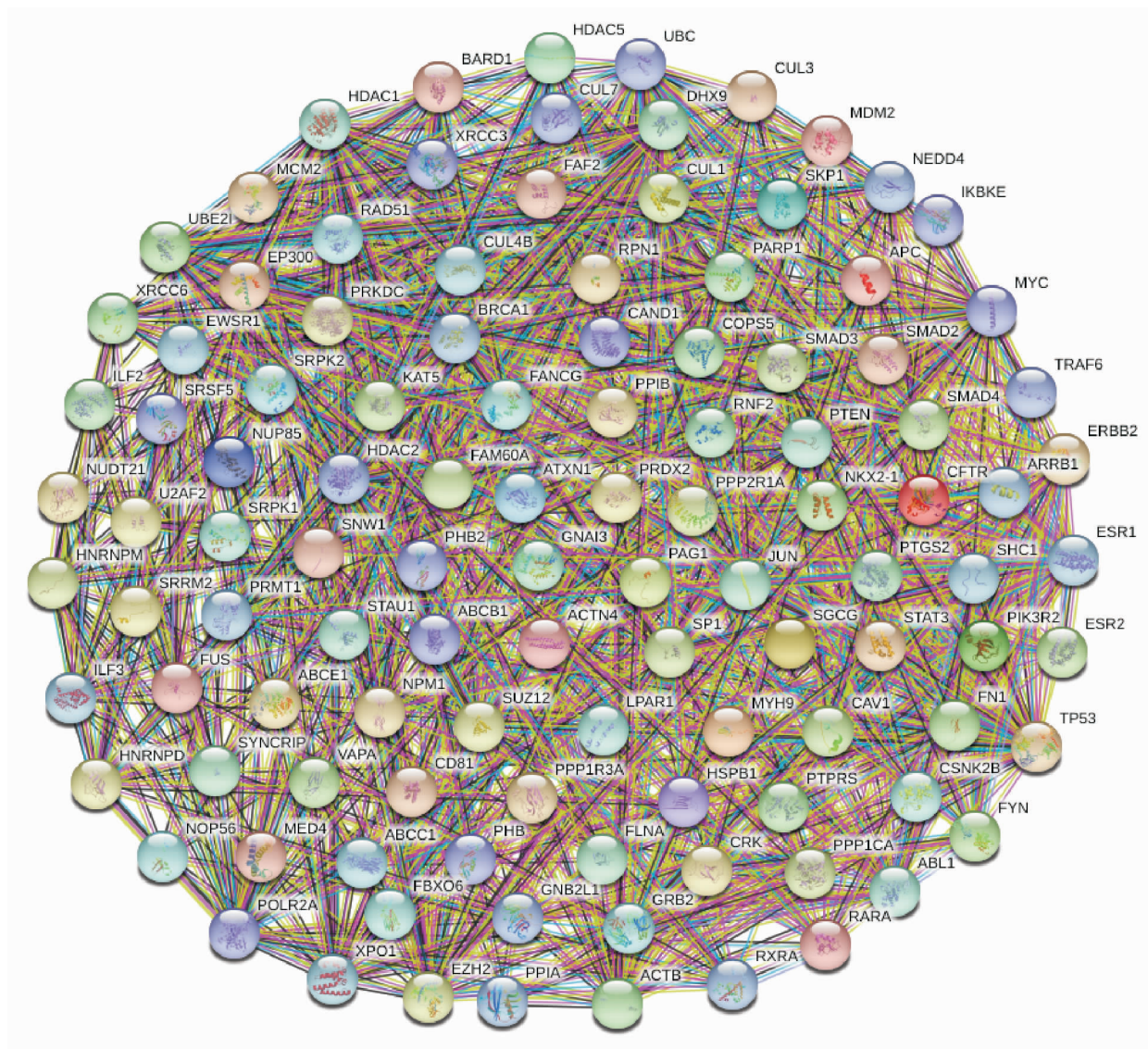
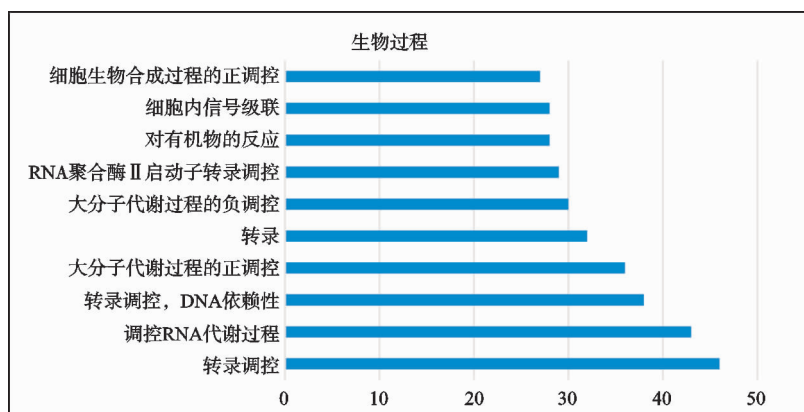


图2 110个Hub节点直接交互作用的PPI网络图(包括110个关键节点和1076个关系,节点表示蛋白质,边代表功能相关性;不同颜色代表相关性的类型,边宽度表示数据支持强度)



生物过程	基因数
细胞生物合成过程的正调控	~650
细胞内信号级联	~650
对有机物的反应	~650
RNA聚合酶 II 启动子转录调控	~700
大分子代谢过程的负调控	~700
转录	~750
大分子代谢过程的正调控	~850
转录调控, DNA依赖性	~900
调控RNA代谢过程	~950
转录调控	~1000

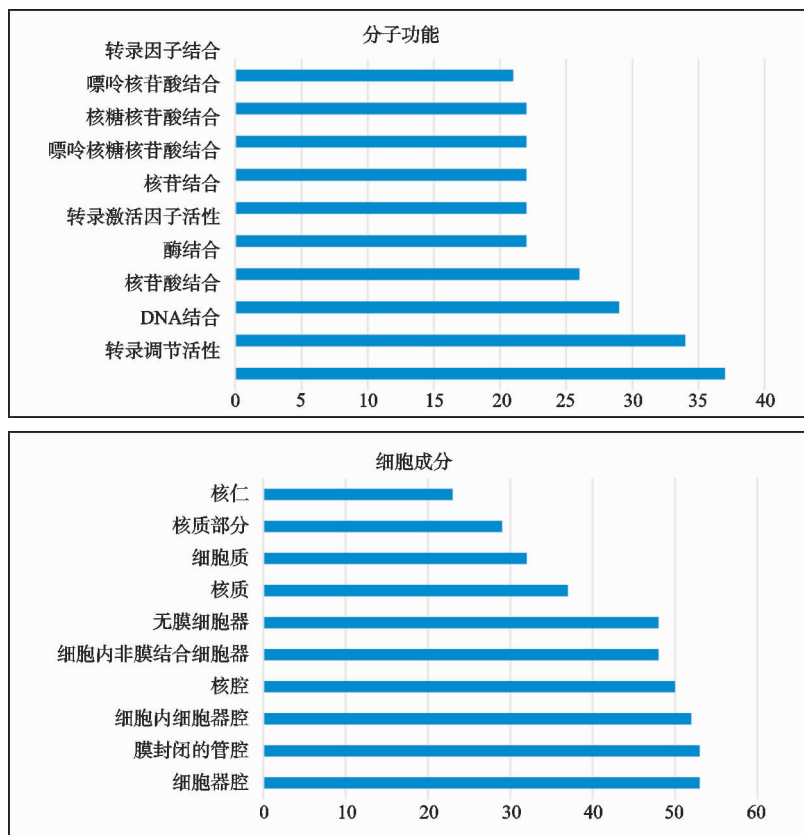


图 3 对拓扑出来的关键节点进行 GO 富集分析(生物过程,分子功能和细胞成分 3 个层次前十位的富集结果条形图)

3 讨论

骨质疏松发病机制复杂,与干细胞分化、增殖、成骨-破骨偶联失衡、免疫炎症等上下游机制密切相关,目前抗 OP 药物机制单一,疗效不确切,而中药经过长时间的代际验证,疗效较为明确,而指导用药的中医整体理论,则为复杂疾病的诊治提供了新的治疗理念。

作为传统补肝肾、强筋骨药物,杜仲具有明显的抗 OP 作用,动物水平能够改善大鼠血清骨代谢指标,提高骨密度,降低骨髓脂肪含量^[19,20];细胞水平可促进成骨细胞增殖,促进成骨表达,抑制破骨和成脂活性^[20,21];在筛选的杜仲 15 个先导化合物中,已有文献证实槲皮素、山柰酚等活性成分具有抗 OP 的作用^[22,23]。基于化合物结构预测靶点中,有 14 个化合物都与其他化合物有共同靶点,这提示杜仲的活性成分作用协同性和疗效集成性等特点。

基于已经证实的治疗 OP 作用靶点,本研究将杜仲活性成分预测靶点与已知药物靶点进行扩展比对,发掘杜仲抗 OP 的直接或间接靶点,经拓扑分析后根据 PPI 网络图发现: TP53, EP300, HDAC1, UBC, KAT5 及 POLA2R 等可能是发挥作用的关键靶点。GO 富集分析表明杜仲可能通过上调氮化合物及大分子代谢、细胞及生物过程等多生物过程作用于 OP;分子功能层面表明杜仲可能通过影响 DNA 结合、转录因子结合、酶结合以及蛋白质结构域特异性结合等分子途径发挥抗 OP 作用;细胞成分层面显示细胞核、细胞器和蛋白质复合物等细胞组分可能和杜仲抗 OP 机制相关。

对 Hub 节点进行 KEGG 富集分析显示,杜仲可能通过上下游多条通路,涉及细胞周期、细胞分化、炎症和糖代谢等多途径干预 OP,Wnt 通路在 OP 的发病过程中具有重要作用,与细胞的分化作用密切相关^[24,25],杜仲提取物可通过 Wnt 通路调控 BMSCs 的分化^[26]。MAPK 通路可能通过调控破骨细胞分化影响 OP 的进展^[27,28],杜仲提取物槲皮素通过 MAPK 通路促进 BMSCs 的增殖^[29]。TGF- β 在 OP 的病理进程中起到了重要作用,促进成骨及改善骨代谢方面起到了重要作用^[30,31]。绝经后 OP 患者 BMSCs 中 Notch 信号表达显著减弱,其可能在绝经后 OP 的发生过程中起着重要作用^[32]。高浓度葡萄糖可促进破骨细胞的早期诱导分化^[33],胰岛素通路在 OP 的进展中也起着重要作用。各种通路在干细胞成骨/成脂分化、骨细胞增殖、破骨细胞分化过程中起着不同的作用,各通路之间又相互交联,形成一个复杂的调控网络,杜仲中的多种活性成分,可能通过多靶点协同调控 OP 过程中的通路失衡,发挥抗 OP 作用。

综上所述,杜仲具有多种活性成分,可通过多靶点、多途径干预 OP 的进展,本研究初步揭示其发挥抗 OP 的可能物质基础和作用机制,为后续开发杜仲抗 OP 活性成分及发掘新药提供了新的思路。

参考文献

- [1] RACHNER T D,KHOSLA S,HOFBAUER L C. Osteoporosis:now and the future[J]. The Lancet, 2011, 377 (9773):1276-1287.
- [2] XU Z,MAO C,FENG X,et al. Herb medicines against

- osteoporosis; active compounds & relevant biological mechanisms[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2017, 17(15):1670-1691.
- [3] 袁真, 闵珺, 王恺, 等. 杜仲黄酮类 3 种药物成分治疗大鼠骨质疏松的比较研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(2):244-248.
 - [4] 骆瑶, 陈兰英, 官紫祎, 等. 杜仲提取物对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢、骨密度及骨微结构的影响[J]. *中药材*, 2016, 39(11):2624-2628.
 - [5] 张贤, 蔡建平, 张艳红, 等. 杜仲诱导大鼠间充质干细胞成骨分化中成骨与成脂相关转录因子的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(19):3523-3526.
 - [6] PAN Y, NIU Y, LI C, et al. Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) prevents disuse-induced osteoporosis in hind limb suspension rats [J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2014, 42(1):143-155.
 - [7] 雒晓梅, 宿美凤, 常晓燕, 等. 基于 LC-MS 联用的杜仲主要化学成分定性及定量分析[J]. *中国现代中药*, 2019, 21(8):1029-1040.
 - [8] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *Journal of Cheminformatics*, 2014, 6(1):13-18.
 - [9] LIU H, WANG J, ZHOU W, et al. Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: an example using licorice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 146(3):773-793.
 - [10] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(6):6964-6982.
 - [11] LI J, ZHAO P, LI Y. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:15290.
 - [12] WANG Y, SUZEK T, ZHANG J, et al. PubChem BioAssay: 2014 update [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(1):1075-1082.
 - [13] GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, et al. Swiss Target Prediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42:32-38.
 - [14] SHANNON P. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11):2498-2504.
 - [15] TANG Y, LI M, WANG J, et al. CytoNCA: a cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks[J]. *Biosystems*, 2015, 127:67-72.
 - [16] LI S, ZHANG Z Q, WU L J, et al. Understanding ZHENG in traditional Chinese medicine in the context of neuro-endocrine-immune network[J]. *IET Systems Biology*, 2007, 1(1):51-60.
 - [17] WANG Y, LIU Z, LI C, et al. Drug target prediction based on the herbs components: the study on the multitargets pharmacological mechanism of qishenkeli acting on the coronary heart disease[J]. *Evidence-based Complementary & Alternative Medicine*, 2012(2):698531.
 - [18] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(1):362-368.
 - [19] 赵亮, 陈志明. 盐炙杜仲对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢生化指标的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(3):587-588.
 - [20] 张贤, 蔡建平, 赵春, 等. 杜仲对去势大鼠股骨与腰椎骨的显微和超微结构的影响研究[J]. *中国药房*, 2009, 20(24):1855-1857.
 - [21] 兰波, 刘亭, 谢玉敏, 等. 两种杜仲黄酮类化合物对成骨细胞 OPG/RANKL 及成骨相关转录因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(22):180-184.
 - [22] XING L Z, NI H J, WANG Y L. Quercitrin attenuates osteoporosis in ovariectomized rats by regulating mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 89:1136-1141.
 - [23] KUMAR A, GUPTA G K, KHEDGIKAR V, et al. In vivo efficacy studies of layer-by-layer nano-matrix bearing kaempferol for the conditions of osteoporosis: a study in ovariectomized rat model[J]. *European Journal of Pharmacology & Biopharmaceutics*, 2012, 82(3):508-517.
 - [24] TELLA S H, GALLAGHER J C. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 142:155-170.
 - [25] BARON R, GORI F. Targeting WNT signaling in the treatment of osteoporosis[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2018, 40:134-141.
 - [26] 张贤, 朱丽华, 钱晓伟, 等. 杜仲醇提取物诱导骨髓间充质干细胞成骨分化中的 Wnt 信号途径[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(45):8520-8523.
 - [27] CONG Q, JIA H, LI P, et al. p38 α MAPK regulates proliferation and differentiation of osteoclast progenitors and bone remodeling in an aging-dependent manner[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:45964.
 - [28] MA J, MA Y, LIU X, et al. Gambogic acid inhibits osteoclast formation and ovariectomy-induced osteoporosis by suppressing the JNK, p38 and Akt signalling pathways [J]. *Biochemical Journal*, 2015, 469(3):399-408.
 - [29] 陈林攀, 邓鸣涛, 杜川, 等. 杜仲叶提取物槲皮素通过激活 ERK 磷酸化促进 BMSCs 增殖的研究[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(12):2845-2847.
 - [30] MACFARLANE E G, HAUPT J, DIETZ H C, et al. TGF- β family signaling in connective tissue and skeletal diseases[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2017, 9(11):a022269.
 - [31] NISHIMURA R, HATA K, IKEDA F, et al. Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation [J]. *Journal of Bone & Mineral Metabolism*, 2008, 26(3):203-212.
 - [32] 范金柱, 杨柳, 罗卓荆, 等. 雌激素对绝经后骨质疏松患者骨髓间充质干细胞 Notch 信号通路的影响[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2013, 6(3):232-239.
 - [33] 孙彦, 李兴, 朱亦崑. 不同浓度葡萄糖对大鼠骨髓破骨细胞分化的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(4):239-242.

(收稿日期:2019-08-01)