

生信分析肾阳虚型绝经后骨质疏松症分子机制 及淫羊藿的靶向治疗机制

蒋 俊,毛国庆

(南京中医药大学附属医院骨伤科,江苏 南京 210000)

摘要:目的 基于生物信息学方法探究肾阳虚型绝经后骨质疏松症的分子机制及淫羊藿的治疗靶点。方法 通过 GEO 挖掘阳虚型绝经后骨质疏松症患者与健康人群的差异基因,运用 GeneCards 及 OMIM 预测绝经后骨质疏松症靶点,通过匹配筛选出肾阳虚型绝经后骨质疏松症靶点;通过 String 构建蛋白互作网络,采用 DAVID 进行富集分析,利用分子对接预测淫羊藿治疗肾阳虚型骨质疏松症的靶点。结果 共得到差异基因 509 个,其中下调基因 313 个,上调基因 196 个;绝经后骨质疏松症靶点 1187 个,筛选得到阳虚型绝经后骨质疏松症靶点 48 个;GO 富集分析这些靶点主要涉及细胞增殖、细胞迁移等生物过程,KEGG 信号通路中差异基因主要富集于 PI3K-Akt 信号通路、Th17 细胞分化等信号通路调节;分子对接显示淫羊藿 3 种有效成分槲皮素、木犀草素、山柰酚能够作用于 EGF、CRP、FOS 等核心蛋白。结论 肾阳虚型绝经后骨质疏松症可能主要由 PI3K-Akt 信号通路、Th17 细胞分化等信号通路调控,淫羊藿可能靶向 EGF、CRP 等蛋白,通过 PI3K-Akt、Th17 细胞分化信号通路调节骨代谢,从而实现防治阳虚型绝经后骨质疏松症。

关键词:绝经后骨质疏松;肾阳虚;淫羊藿

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.04.004

文章编号:1006-1959(2023)04-0021-06

Bioinformatics Analysis of the Molecular Mechanism of Postmenopausal Osteoporosis with Kidney-yang Deficiency and the Targeted Treatment Mechanism of Epimedium Herb

JIANG Jun,MAO Guo-qing

(Department of Orthopedics,Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine,Nanjing 210000,Jiangsu,China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of postmenopausal osteoporosis with kidney-yang deficiency and the therapeutic target of epimedium herb based on bioinformatics methods.**Methods** The differential genes between postmenopausal osteoporosis patients with kidney-yang deficiency and healthy people were excavated by GEO, and the targets of postmenopausal osteoporosis were predicted by GeneCards and OMIM. The protein interaction network was constructed by String, and DAVID was used for enrichment analysis. Molecular docking was used to predict the target of epimedium herb in the treatment of osteoporosis with kidney-yang deficiency.**Results** A total of 509 differential genes were obtained, including 313 down-regulated genes and 196 up-regulated genes; 1187 targets for postmenopausal osteoporosis, and 48 targets for postmenopausal osteoporosis of kidney-yang deficiency were screened. GO enrichment analysis showed that these targets were mainly involved in biological processes such as cell proliferation and cell migration. The differential genes in KEGG signaling pathway were mainly enriched in PI3K-Akt signaling pathway and Th17 cell differentiation. Molecular docking showed that quercetin, luteolin and kaempferol could act on core proteins such as EGF, CRP and FOS.**Conclusion** Postmenopausal osteoporosis with kidney-yang deficiency may be mainly regulated by PI3K-Akt signaling pathway, Th17 cell differentiation and other signaling pathways. Epimedium herb may target EGF, CRP and other proteins to regulate bone metabolism through PI3K-Akt and Th17 cell differentiation signaling pathways, so as to prevent and treat postmenopausal osteoporosis with kidney-yang deficiency.

Key words: Postmenopausal osteoporosis; Kidney-yang deficiency; Epimedium herb

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是指女性绝经后发生骨组织结构改变、骨量减少及骨的脆性增强的一种疾病,其原因是雌激素水平的下降,多于女性绝经后 5~10 年发生^[1]。

骨折是 PMOP 并发症中最严重的一种,在缩短患者生存周期的同时,严重影响患者的身心健康。2018 年全国首次骨质疏松流行病学调查结果显示^[2],我国 50 岁以上男性骨质疏松患病率仅为 6.0%,而同年龄段女性患病率高达 32.1%。因此,PMOP 的防治不仅是一个健康问题,而且是一个社会问题。传统医学中没有“骨质疏松”的病名记载,但根据其病因病机、发病特点及临床症状,目前常认为其属于中医“骨痿”“骨枯”“骨蚀”等范畴。中医认为骨质疏松发生的根本病因是肾虚。《黄帝内经》中提及:“肾主骨,

作者简介:蒋俊(1996.9-),男,江苏宜兴人,硕士研究生,主要从事中医药防治骨质疏松研究

通讯作者:毛国庆(1979.10-),男,江苏仪征人,博士,主任中医师,主要从事创伤及骨质疏松防治研究

生髓。”因此,肾虚会导致生髓功能的减弱,进而引起骨髓空虚,骨强度减弱,最终导致骨质疏松症。根据相关统计^[3],淫羊藿在防治 PMOP 的中药复方中占很大比例,许多临床防治 PMOP 的验方中都含有淫羊藿,其使用频率仅次于熟地黄位居第 2 位,是治疗肾阳虚型 PMOP 的最基础药物。淫羊藿属于小蘗科植物,亦称“仙灵脾”,《中国药典》中记载其性味辛甘温,归肝肾经,有壮肾阳、强筋骨、祛风湿的功效。淫羊藿中有效成分复杂。现代药理学研究发现^[4],淫羊藿苷是淫羊藿中含量最高的成分,能够抑制卵巢摘除大鼠的骨丢失,减缓骨密度下降,改善骨骼力学性能和骨小梁微结构。尽管目前有很多关于淫羊藿与 PMOP 相关的研究报道,但其治疗肾阳虚型 PMOP 的作用机制仍不是十分明确。因此,本研究借助网络药理学深入分析其作用靶点及作用通路,从整体论治淫羊藿与肾阳虚型 PMOP 的关联性,为临床应用和后续试验研究提供新的方向。

1 资料与方法

1.1 资料来源及差异基因分析 在公共基因芯片数据库 (gene expression omnibus, GEO) 中,以“postmenopausal osteoporosis”“kidney yang deficiency”为检索词,设定筛选条件为人 (*Homo sapiens*) 进行搜索,检索到 GSE56116 芯片数据集。该数据集由 13 例样本构成,其中 10 例绝经后骨质疏松症患者分为肾阴虚 (4 例)、肾阳虚 (3 例)、非肾虚 (3 例) 3 组,另外 3 例为绝经后健康妇女。从 GEO 数据库中下载 GSE132550 的基因表达谱,利用 limma 包对绝经后健康妇女及肾阳虚绝经后骨质疏松症妇女进行差异基因分析,标准设定为 $|\log_2 \text{FC}| \geq 1$ 且 $P < 0.05$,结果以火山图呈现。

1.2 肾阳虚型 PMOP 靶点获取 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 及 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 中,以“postmenopausal osteoporosis”为关键词进行检索并收集 PMOP 的相关基因,结果与 1.1 中的差异基因进行匹配,得到重合部分基因即为肾阳虚型 PMOP 的靶点。

1.3 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络构建 将获得的肾阳虚型 PMOP 靶点输入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 中,选择物种为人类 (*Homo sapiens*),隐藏未连接的节点,其他参数选择默认设置,进行蛋白互作分析,结果导入 3.9.0 版本 Cytoscape 软件中可视化,利用 Cytoscape 软件 cyto-

Hubba 插件获得连接度值前 10 的核心靶点。

1.4 GO 及 KEGG 富集分析 将肾阳虚型 PMOP 的靶点输入到 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 中,选择人类 (*Homo sapiens*) 且 $P < 0.01$,进行 GO 生物过程和 KEGG 通路富集分析,分析肾阳虚型 PMOP 的潜在病理机制。

1.5 淫羊藿活性成分及潜在靶点筛选 在 TCMSp 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 搜索淫羊藿 (*Epimedium Herba*) 的化学成分,设置筛选条件:口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 及类药性 (DL) ≥ 0.18 ,初步筛选出淫羊藿的活性成分及其作用靶点。运用 R 软件对连接度值前 10 的肾阳虚型 PMOP 核心靶点进行匹配映射,获得潜在治疗靶点。

1.6 计算机分子对接 在 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 及 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中,分别下载潜在治疗靶点蛋白 3D 结构 pdb 格式文件及化合物 3D 结构的 sdf 格式。使用 DockThor 进行分子对接。

2 结果

2.1 差异表达基因 在 GEO 数据库中最终得到肾阳虚型 PMOP 的基因表达芯片 (GEO 编号: GSE56116), 对其进行分析,结果显示肾阳虚型 PMOP 患者低表达基因有 313 个,高表达 196 个,见图 1。

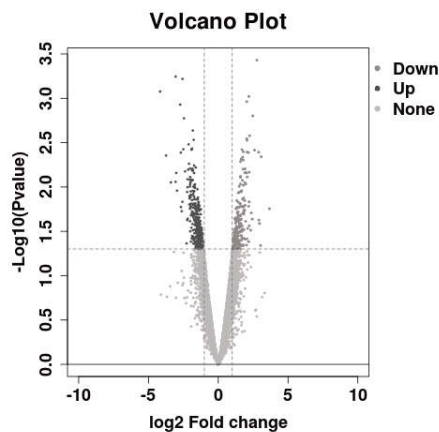


图 1 差异表达基因火山图

2.2 肾阳虚型 PMOP 靶点 在 GeneCards 数据库获得肾阳虚型 PMOP 靶点 1153 个、OMIM 数据库获得肾阳虚型 PMOP 靶点 45 个,去除重复,共得到 PMOP 相关靶点 1187 个,将肾阳虚型 PMOP 差异表达基因与 PMOP 靶点导入 Venny 2.1,获得 48 个交集靶点,即为肾阳虚型 PMOP 的靶点,见图 2。

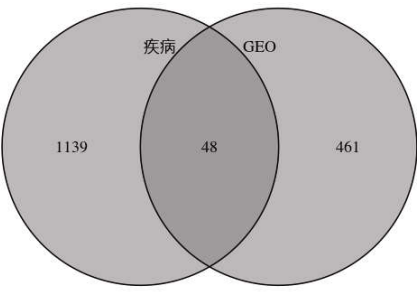


图 2 肾阳虚型 PMOP 靶点

2.3 PPI 网络 将 48 个肾阳虚型 PMOP 靶点基因导入 STRING 数据库在线进行互作分析,共得到 35 个节点,90 条连线,见图 3,其中连线表示蛋白质与蛋白质之间的相互作用的证据,节点表示蛋白质,相互关系计数越多,说明该靶点基因在治疗肾阳虚型 PMOP 中起到的作用越重要,利用 Cytoscape 软件 cytoHubba 插件筛选出连接度值前 10 的核心靶点基因,见表 1。

2.4 富集分析结果 GO 富集分析得到 42 个结果,分别选择展示前 5 个基因功能,见图 4,生物学过程主要为参与细胞增殖、细胞迁移过程调节等;细胞组分

主要有细胞外区域、外泌体等;分子功能主要有蛋白酶结合、整合素结合等。KEGG 通路富集分析得到 6 个结果,见图 5,富集的通路有 PI3K-Akt 信号通路、Th17 细胞分化、化学致癌受体激活、脂质与动脉粥样硬化、哮喘、类风湿性关节炎相关通路。

2.5 淫羊藿活性成分及潜在靶点筛选 按条件筛选获得淫羊藿活性成分 23 种,治疗靶点 467 个,将治疗靶点与连接度前 10 的肾阳虚型 PMOP 核心靶点导入 Venny 2.1,得到潜在治疗靶点 EGF、CRP、FOS、MMP1,对应活性成分为槲皮素(quercetin)、山柰酚(kaempferol)、木犀草素(luteolin)。

2.6 小分子结构文件获取及分子对接 将槲皮素、木犀草素、山柰酚分别与潜在靶点基因 EGF、CRP、FOS、MMP1 两两组合,进行分子对接,见表 2。一般默认当配体与受体结合的构象越稳定时,结合能值越小,发生作用的可能性越大,对接结果显示对接能量均低于-5 kJ/mol,说明药物活性成分与疾病靶点能够良好结合。根据最低结合能的结果,与槲皮素亲和力最高的是 EGF、与山柰酚亲和力最高的是 EGF、与木犀草素亲和力最高的是 CRP。

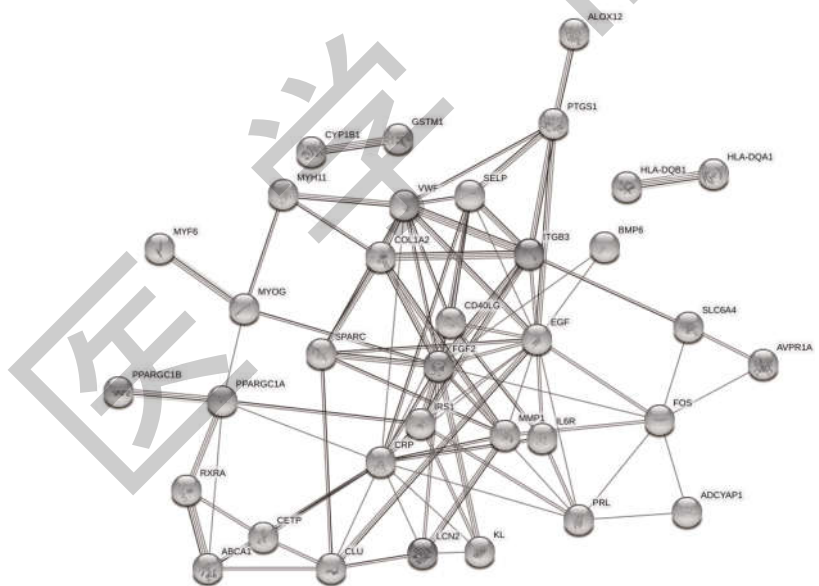


图 3 肾阳虚型 PMOP 靶点基因 PPI 网络

表 1 肾阳虚型 PMOP 核心靶点

编号	基因名	度值	编号	基因名	度值
1	EGF	15.0	6	IRS1	7.0
2	FGF2	15.0	7	MMP1	7.0
3	CRP	15.0	8	SELP	7.0
4	VWF	10.0	9	FOS	7.0
5	ITGB3	8.0	10	PRL	7.0

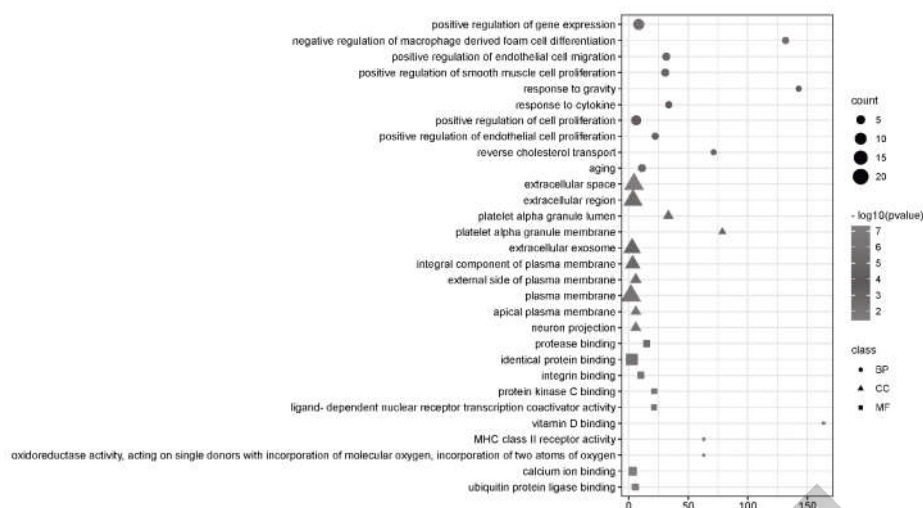


图 4 GO 富集分析

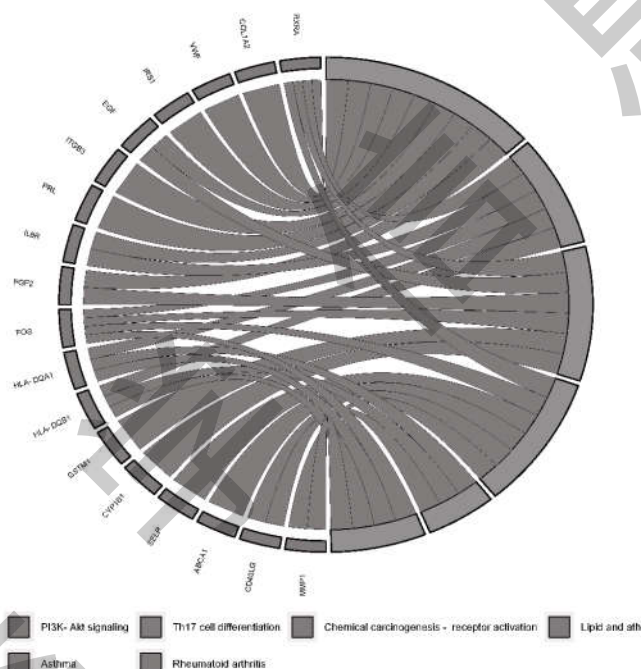


图 5 KEGG 富集分析

表 2 分子对接结果(kJ/mol)

基因名	quercetin	luteolin	kaempferol
FOS	-6.564	-6.667	-6.606
MMP1	-6.104	-5.896	-6.112
CRP	-6.875	-6.951	-6.781
EGF	-7.007	-6.937	-7.291

3 讨论

传统医学没有“绝经后骨质疏松”的病名记载,但根据其周身疼痛,弯腰驼背,不能负重,易发骨折等表现,常常将其归于“骨痿”“骨枯”“骨蚀”“骨疏”

等范畴,其中尤其与“骨痿”类似。《素问·上古天真论》所载:“女子七七,任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭。”故中医理论认为女子绝经后,天癸衰竭,肾虚精亏,骨髓化源不足,骨骼失于营养,导致骨量减少,发为本病。《景岳全书·痿论》中说:“肾者,水脏也,今水不胜火,则骨枯而髓虚,故足不任身,发为骨痿。”亦认为 PMOP 的根本病因是肾精亏虚,肾虚则不能生髓,髓不能养骨则骨枯,最终发展为骨痿。淫羊藿作为治疗肾虚型 PMOP 的常用药物,疗效显著,但其具有多成分、多靶点相互作用的特点,活性成分群与作用机制尚不清晰,限制了其临床推广使用。本研

究借助网络药理学的方法,拟阐明淫羊藿的作用,探讨其干预肾阳虚型 PMOP 的作用机制。

本研究发现,肾阳虚型 PMOP 患者血液样本中表达下调基因有 313 个,上调基因有 196 个,将其与 PMOP 相关基因进行映射匹配,结果得到肾阳虚型 PMOP 相关的靶基因 48 个,对获得的 48 个靶点构建 PPI 网络。结果显示,EGF、FGF2、CRP、VWF、ITGB3、IRS1、MMP1、SELP、FOS、PRL 等靶点具有较高值,可能是肾阳虚型 PMOP 的核心靶点。研究证明^[5],EGF 是一种单链低分子多肽,能够与受体 EGFR 结合促进细胞增殖和组织修复。当 EGF 与 EGFR 相结合时,EGFR/MEK/ERK1/2 信号通路会被激活,进而诱导成骨细胞增殖^[6]。CRP 是一种炎症因子,能够代表机体的炎症水平。韩学明等^[7]发现,hs-CRP 水平与绝经后女性的骨密度存在高度相关性。同时既往研究发现慢性炎症疾病可造成 RANK-RANKL-OPG 轴失衡,促进破骨细胞生成,增强骨吸收,最终导致 PMOP 的发生^[8,9]。MMP1 则是一种基质金属蛋白酶,由成骨细胞分泌。有研究发现 MMP1 水平与骨质疏松存在相关性^[10]。朱伟等^[11]发现 MMP1 可以促进成骨细胞的分化和改善骨质疏松。杨全增等^[12]通过实验验证了 MMPs 表达量的上调可以抑制骨基质和 I 型胶原的过度降解,维持骨重建平衡。FOS 是一种核内磷酸蛋白,有研究证明其表达受 RANKL 调控,当 RANKL 与受体结合时,能够刺激 C-FOS 的生成,整个过程能够刺激破骨细胞分化增加,影响骨吸收,导致骨质疏松^[13]。Takayanagi H 等^[14]发现抑制 C-FOS 的表达可以减少促炎因子生成,阻止炎症发生及进展,进而抑制破骨细胞活化,最终改善骨质疏松。

本研究通过 GO 富集分析及 KEGG 通路分析发现,肾阳虚型 PMOP 与 PI3K-Akt 信号通路、Th17 细胞分化、化学致癌受体激活、脂质与动脉粥样硬化、哮喘、类风湿性关节炎通路有关。其中 PI3K-Akt、Th17 细胞分化信号通路通过多种方式参与信号传导,与骨质疏松关系密切^[15,16]。现代研究发现^[17],PI3K-Akt 通路是参与炎症反应及骨代谢失衡的关键通路之一,激活 PI3K-Akt 通路可引起成骨细胞凋亡、破骨细胞生成及骨吸收控制节点失衡,导致骨代谢异常及骨质疏松的发生。另有研究发现^[18],Th17 细胞分化通路亦与骨质疏松存在联系。女性绝经后雌激素缺乏能够增强 Th17 细胞分化功能,进而导

致 IL-17 分泌增多,而 IL-17 能够增加来自成骨细胞的促破骨细胞因子来诱导骨丢失,加剧骨量的减少,最终导致 PMOP 的发生。

本研究得到淫羊藿的 23 种活性成分,对应 467 种治疗靶点。其中槲皮素、山柰酚、木犀草素可能作用于 EGF、CRP、FOS、MMP1 发挥抗骨质疏松的作用。槲皮素、山柰酚、木犀草素均为黄酮类化合物,具有抗骨质疏松的作用。实验研究发现^[19,20],槲皮素能够促进 BMSCs 增殖和成骨分化,抑制骨丢失,增加骨密度,改善骨质疏松。山柰酚可能通过下调 c-Fos 的表达减少破骨细胞的生成,治疗骨质疏松^[21]。木犀草素可能通过激活 PI3K-Akt 信号通路从而改善 PMOP 大鼠的骨丢失^[22]。本研究选取活性成分槲皮素、山柰酚、木犀草与潜在治疗靶点 EGF、CRP、FOS、MMP1 进行对接,结果显示,对接能量均低于-5 kJ/mol,可知药物的主要有效成分进入机体后能与潜在治疗靶蛋白有良好的亲和力,表明淫羊藿以多成分协同的形式作用于多个关键靶点,发挥治疗肾阳虚型 PMOP 的作用。

综上所述,淫羊藿中的槲皮素、山柰酚、木犀草素可能通过 EGF、CRP、FOS、MMP1 靶点与 PI3K-AKT、Th17 细胞分化通路治疗肾阳虚型 PMOP。

参考文献:

- [1]中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中华内分泌代谢杂志,2017,33(10):890-913.
- [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]连李荣,梁家畅,赵恒侠,等.中医药治疗围绝经期骨质疏松症用药规律的数据挖掘[J].广州中医药大学学报,2022,39(7):1703-1709.
- [4]马登磊,张兰,李林.淫羊藿提取物的抗炎作用及其机制[J].生物化学与生物物理进展,2020,47(8):685-699.
- [5]陈洁,金绍林.应用纳米银敷料联合表皮生长因子凝胶治疗小面积骨外露创面[J].生物医学工程与临床,2021,25(1):62-65.
- [6]张晨颖,石丹宁,赵丕文.基于 GPER 介导的 EGFR/MEK/ERK 途径探讨四物汤含药血清促进成骨细胞增殖的分子机制[J].中华中医药杂志,2022,37(9):5100-5103.
- [7]韩学明,孙忠良,徐建华,等.老年人血清炎症因子与骨密度变化及骨吸收相关性研究[J].中国骨质疏松杂志,2020,26(2):221-226.
- [8]孔劲松,阮建伟,黄杨,等.老年骨质疏松症患者骨代谢指标变化、生长分化因子 15 及其炎症因子水平分析[J].中国卫生

检验杂志,2020,30(14):1710-1712.

[9]Udagawa N,Koide M,Nakamura M,et al.Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways[J].J Bone Miner Metab,2021,39(1):19-26.

[10]Liang L,Zhu DP,Guo SS,et al.MMP-1 gene polymorphism in osteoporosis[J].Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(3 Suppl):67-72.

[11]朱伟,李伶,杨刚毅,等.重组人甲状旁腺素(1-34)对绝经后骨质疏松患者血基质金属蛋白酶 1 及其组织抑制因子的影响[J].中国新药与临床杂志,2011,30(1):20-23.

[12]杨全增,张成俊,丁宁,等.ERK5 信号通路介导流体剪切力对 MC3T3-E1 成骨细胞 MMPs、TIMPs 表达的影响[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(5):588-593.

[13]苏娟娟,朱永翠,张文玲,连翘苕对牙周炎大鼠 p38 MAPK/c-Fos 信号通路及破骨细胞活化的影响[J].口腔医学研究,2021,37(1):33-38.

[14]Takayanagi H,Kim S,Matsuo K,et al.RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos dependent induction of interferon- β [J].Nature,2002,416(6882):744-749.

[15]Xi JC,Zang HY,Guo LX,et al.The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis[J].J Recept Signal Transduct Res,2015,35(6):640-645.

[16]Huang F,Wong P,Li J,et al.Osteoimmunology: The correlation between osteoclasts and the Th17/Treg balance in osteoporosis[J].J Cell Mol Med,2022,26(13):3591-3597.

[17]Tang S,Xin Y,Yang M,et al.Osteoprotegerin promotes islet β cell proliferation in intrauterine growth retardation rats through the PI3K/AKT/FoxO1 pathway[J].International Journal of Clinical and Experimental Pathology,2019,12(6):2324-2338.

[18]Tyagi AM,Srivastava K,Mansoori MN,et al.Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis[J].PLoS One,2012,7(9):e44552.

[19]Wang N,Wang L,Yang J,et al.Quercetin promotes osteogenic differentiation and antioxidant responses of mouse bone mesenchymal stem cells through activation of the AMPK/SIRT1 signaling pathway[J].Phytother Res,2021,35(5):612-622.

[20]顾艺婧,傅稼耀,武文婧,等.槲皮素通过抗骨相关细胞衰老作用治疗雌激素缺乏骨质疏松症的初步研究[J].同济大学学报(医学版),2019,40(3):274-280.

[21]Pang JL,Ricupero DA,Huang S,et al.Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells[J].Biochem Pharmacol,2006,71(6):818-826.

[22]许勇,谢贤斐,颜威,等.木犀草素调控 PI3K/AKT 通路改善绝经后骨质疏松症大鼠模型骨丢失的机制[J].热带医学杂志,2022,22(5):639-643,688,744.

收稿日期:2022-10-16;修回日期:2022-11-14

编辑/成森