

苍膝通痹胶囊治疗骨性关节炎的网络药理学机制与细胞验证

王象鹏^{1,2}, 罗孟雄¹, 毕亦飞³, 谢文鹏², 王宝安⁴, 毕荣修^{1,2}

(1. 山东中医药大学, 山东济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 山东济南 250014; 3. 山东中医药大学附属眼科医院, 山东济南 250002; 4. 山东商业职业技术学院, 山东济南 250103)

摘要:【目的】阐明苍膝通痹胶囊组方规律及治疗骨性关节炎的分子机制。【方法】通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库寻找该方相应药物独活、威灵仙、苍术、葶藶、鸡血藤、桑寄生、川牛膝、骨碎补及川续断的化合物成分, 采用药物口服生物利用度(OB)、药物相似性(DL)、化合物相对分子质量(MW)、脂-水分配系数(AlogP)等药理学核心参数对药物化合物进行评价, 构建药物-成分-靶点-疾病网络, 探析药物干预靶点后的作用机理, 综合分析“君臣佐使”的药物分布规律及原因。再通过分子对接技术进一步验证其治疗骨性关节炎的作用机制, 对多成分、多通路、多靶点的配合治疗进行分析验证。采用酶联免疫吸附分析(ELISA)检测软骨细胞上清中炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 含量, 以验证网络药理学预测治疗效果及分子对接结果。【结果】独活、威灵仙MW均高于桑寄生, 独活AlogP最高, 且与威灵仙、鸡血藤、桑寄生近似, 与其他药物明显不同。通过TCMSP数据库共寻找到相关化合物472个, 根据药理学OB、DL等相关参数阈值要求筛选后, 符合治疗要求的化合物共有27个。进行药物-成分-靶点-疾病网络可视化的构建, 共有222个靶点, 781条边, 27个有效成分及1个疾病名称。分子对接结果显示, 苍膝通痹胶囊有27种化学成分与骨性关节炎关键炎症因子结合能较为理想。ELISA法检测结果显示, 苍膝通痹胶囊可降低软骨细胞上清中IL-1 β 、TNF- α 的含量, 与分子对接结果相同。【结论】苍膝通痹胶囊组方“君臣佐使”药味分布较为合理, 君臣两药互相弥补, 互相辅助, 增其药性, 佐使之药除其辅助之功外还可提供与疾病相关的其他证型需要, 为药物综合治疗某种疾病提供帮助。苍膝通痹胶囊可有效治疗骨性关节炎, 其作用机制具有多成分、多靶点的特点。

关键词: 苍膝通痹胶囊; 骨性关节炎; 独活; 威灵仙; 桑寄生; 鸡血藤; 网络药理学; 分子对接; 细胞验证

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2022)03-0647-10

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2022.03.030

Network Pharmacological Mechanism and Cellular Validation of Cangxi Tongbi Capsules in the Treatment of Osteoarthritis

WANG Xiang-Peng^{1,2}, LUO Meng-Xiong¹, BI Yi-Fei³, XIE Wen-Peng²,
WANG Bao-An⁴, BI Rong-Xiu^{1,2}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014 Shandong, China; 3. Affiliated Ophthalmic Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002 Shandong, China; 4. Shandong Institute of Commerce and Technology, Jinan 250103 Shandong, China)

Abstract: Objective To scientifically elucidate formula rule of *Cangxi Tongbi* Capsules and the molecular mechanism of its treatment of osteoarthritis. **Methods** The TCMSP database was used to search for the compound compositions of the corresponding drugs in this formula, including Radix Angelicae Pubescentis, Radix Clematidis, Rhizoma Atractylodis, Rhizoma Dioscoreae Septemlobae, Caulis Spatholobi, Herba Taxilli, Radix Cyathulae, Rhizoma Drynariae and Radix Dipsaci Asperoidis, and several pharmacological parameters such as OB, DL, MW and AlogP were used to evaluate the drug compounds. The drug-component-target-disease network was constructed to explore the mechanism of action of the drug after interfering with the target, and to

收稿日期: 2020-07-08; 修回日期: 2021-09-22

作者简介: 王象鹏(1990-), 男, 博士研究生, 讲师, 主治医师; E-mail: doctorwangxp@163.com

通讯作者: 毕荣修(1962-), 男, 教授, 博士研究生导师; E-mail: birongxiu@163.com

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(编号: 82104897); 山东省自然科学基金资助项目(编号: ZR2020MH099); 山东省自然科学基金青年项目(编号: ZR2020QH312); 山东省医药卫生科技发展计划项目(编号: 202104070423)

analyse the distribution pattern of the drug and the reasons for the TCM prescription theory “monarch, minister, assistant and guide”. The mechanism of action of the drug in the treatment of osteoarthritis was further validated by molecular docking technology, and the multi-component, multi-pathway and multi-target combination therapy was analysed and validated. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of the inflammatory factors interleukin (IL)-1 β and tumour necrosis factor (TNF)- α in chondrocyte supernatants to verify the predicted therapeutic effects of network pharmacology and the molecular docking results. **Results** The molecular weight (MW) of Radix Angelicae Pubescentis and Radix Clematidis were both higher than that of Herba Taxilli, with AlogP of Radix Angelicae Pubescentis being the highest and similar to Radix Clematidis, Caulis Spatholobi and Herba Taxilli, and significantly different from the other drugs. A total of 472 relevant compounds were screened out through the TCMSP database, and a total of 27 compounds met the therapeutic requirements after screening according to the threshold requirements of relevant parameters such as pharmacological OB and DL. The construction of drug-component-target-disease network visualization was carried out with a total of 222 targets, 781 edges, 27 active components and one disease name. The results of molecular docking showed that the 27 chemical components of *Cangxi Tongbi* Capsules were able to make an ideal bind with key inflammatory factors in osteoarthritis. And the ELISA results showed that the *Cangxi Tongbi* Capsules reduced the levels of IL-1 β and TNF- α in chondrocyte supernatants with the same result of molecular docking. **Conclusion** The distribution of herbal drugs in the prescription of “monarch, minister, assistant and guide” for *Cangxi Tongbi* Capsules is reasonable, with the monarch and the minister complementing and assisting each other to increase their medicinal properties. The adjuvant medicines also provide for the needs of disease related syndrome types and help in the comprehensive treatment of a disease. *Cangxi Tongbi* Capsules has significant effect on treating osteoarthritis, and its mechanism of action is multi-component and multi-targeted.

Keywords: *Cangxi Tongbi* Capsules; osteoarthritis; Radix Angelicae Pubescentis; Radix Clematidis; Herba Taxilli; Caulis Spatholobi; network pharmacology; molecular docking; cellular verification

骨性关节炎(osteoarthritis)是以关节软骨退变、关节滑膜炎性病变及关节疼痛为主要特征的中老年常见退行性骨关节疾病。流行病学研究^[1-2]显示,我国骨性关节炎患者40岁以上约占30%,65岁以上占比高达70%,主要临床表现为关节疼痛,X线片显示关节形变,同时,随着患者年龄的增加症状也会增加,严重影响患者的正常生活。骨性关节炎的发病机制尚未完全明确,多数学者认为与性别、年龄、外伤、机体炎症、遗传及生物力学等因素共同作用导致关节软骨细胞、细胞外基质以及关节软骨下骨发生降解及偶联失衡有关^[3]。目前,治疗骨性关节炎的方法主要包括饮食调节、运动调控、相关药物防治以及手术介入等,临床治疗骨性关节炎的药物主要以西药对症治疗为主,虽然具有见效快的特点,但并不能有效阻止骨性关节炎的发展,并且存在副作用大、病患耐受性差、靶点单一等缺点^[4]。而中医药

治疗因“简便效廉”的特性,治疗各类骨性关节炎具有一定的优势。

骨性关节炎归属于中医学“骨痹”“痹证”的范畴^[5],与肝、肾、脾三脏关系密切,主要因肝肾亏虚、气血不足致筋脉失养,“风”“寒”“湿”“瘀”致筋脉不通等引起。苍膝通痹胶囊是山东中医药大学附属医院骨科积累多年临床经验与中医经典总结而成的特色中医复方药物,已获山东省药监局批准(批号:鲁药制字Z20130043),其由独活、威灵仙、桑寄生、苍术、草薢、鸡血藤、川牛膝、骨碎补及川续断等9味中药组成,诸药合用,共同发挥补益肝肾气血、祛散风寒湿邪的功效。前期研究表明,苍膝通痹胶囊对骨性关节炎具有良好的临床效果,但对其组方的科学依据、各类药物产生的药效物质基础和分子机制尚不明确。因此,本研究采用网络药理学与分子对接技术探讨苍膝通痹胶囊对骨性关节炎关节软骨的保

护作用机制,现将研究结果报道如下。

1 材料与amp;方法

1.1 网络药理学预测

1.1.1 基于化合物群单体功能比较研究分析 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库寻找本方中独活、威灵仙、桑寄生、苍术、萆薢、鸡血藤、川牛膝、骨碎补及川续断等9味中药的化合物成分。为了阐明中药之间的化学、药理学上的空间差异,采用药物口服生物利用度(OB)、药物相似性(DL)、化合物相对分子质量(MW)、H-键配位电子供体数目(nHdon)、H-键配位电子受体数目(nHacc)、脂-水分配系数(AlogP)等^[5]6项药理学核心参数对药物化合物进行评价,对其数据进行分布分析,并对所在相应区间进行*T*检验。

1.1.2 苍膝通痹胶囊中药物活性成分的筛选及治疗靶点 检索TCMSP数据库获得苍膝通痹胶囊化学成分的数据,依据药物动力学^[6]进行筛选,其中必要条件为 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18^{[7-8]}$ 。

1.1.3 苍膝通痹胶囊活性成分-靶点网络的构建 检索TCMSP数据库查找苍膝通痹胶囊化学成分相关的蛋白靶点,同时运用Uniprot数据库查找基因名称。将苍膝通痹胶囊化学成分及其对应的作用靶点基因导入到Cytoscape 3.6.1软件,构建苍膝通痹胶囊活性成分与靶点的生物信息网络。

1.1.4 已知骨性关节炎相关疾病靶点的检索 以“osteoarthritis”作为关键词,检索Therapeutic Target Database(TTD)、Drug Bank、Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM)、Genetic Association Database(GAD)和Pharm GKB等5个数据库中已知的骨性关节炎靶点,删除重复所获得的靶点,即为骨性关节炎发病过程已知的靶点。

1.1.5 药物成分与靶点的构建 将“1.1.3”项中挖掘的药物靶点与“1.1.4”项中挖掘的疾病靶点合并,去除重复项,合并上述靶点并筛选共同靶点。应用Cytoscape软件构建构建“药物-成分-靶点-疾病”网络。

1.1.6 分子对接 采用分子对接技术验证苍膝通痹胶囊的有效活性成分与关键靶点分子对接的可靠性。检索PDB数据库获取所需要的化合物蛋白结构,运用AutoDock Vina软件,将苍膝通痹胶囊的有效活性成分与靶点的空间腔相对接,以结合

的最佳构象进行分析。

1.1.7 靶点的基因本体论(GO)分析及信号通路的京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析 应用Clue GO、KEGG分析插件富集分析“1.1.5”项数据挖掘所获得的关键靶点及通路。其中,类型相同的采取相同颜色在图中表示,其对接相关显著性用节点的大小进行表示,信号通路的显著性越高则在网络中的相关节点越大,反映该通路具有十分重要的作用及相关性。

1.2 体外细胞实验

1.2.1 试剂与仪器 DMEM完全培养基[中科迈晨(北京)科技有限公司];胎牛血清(FBS,美国Gibco公司);大鼠白细胞介素 1β (IL- 1β)细胞因子冻干粉(美国R&D Systems公司);IL- 1β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(联科生物科技有限公司)。SW-CJ-1FD型超净工作台(苏净安泰公司);NanoDrop2000型超微量分光光度计(美国Thermo公司);Axiovert 40型显微镜(德国Zeiss公司)。

1.2.2 药物及制备 苍膝通痹胶囊原方由独活15 g、威灵仙12 g、苍术12 g、萆薢15 g、鸡血藤15 g、桑寄生12 g、川牛膝15 g、骨碎补12 g、川续断12 g组成,以上中药材均购于山东中医药大学附属医院。将苍膝通痹胶囊原方组成中的中药材制作成干粉,使用时,取100 mg,加入到100 mL完全培养基中,用涡旋振荡器充分溶解,0.22 μ m无菌滤网过滤,配制成1 mg/mL的母液,然后根据所需苍膝通痹胶囊的浓度进行稀释。

1.2.3 软骨细胞的提取 选用1周龄SD雄性大鼠[购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,生产许可证号:SCXK(鲁)20140007],处死,清理毛发,用75%酒精浸泡。取股骨髁部及胫骨平台部位的关节软骨,用含有1%双抗(青霉素-链霉素)的PBS溶液冲洗,将组织剪成碎块,体积约为1 mm³,再以2.5 g/L胰蛋白酶进行消化,耗时30 min,后采用II型胶原酶溶液消化4 h。待细胞密度达到 2×10^5 个/mL时,将处理后的细胞接种于25 cm²培养瓶中,置于恒温培养箱(5% CO₂、37 $^{\circ}$ C),最后,通过分离获得原代细胞。取第2代细胞作为实验对象,当软骨细胞生长铺满瓶底(达到瓶底面积80%)时进行细胞传代,比例1:3。

1.2.4 骨性关节炎细胞模型的制备 用20 μ L灭

菌水完全溶解 10 μg 大鼠 IL-1 β 细胞因子冻干粉, 再加入 80 μL 含 5% 海藻糖的稀释液, 稀释成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 IL-1 β 溶液。使用时, 将每管 (10 mL) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 IL-1 β 溶液加入到 100 mL 完全培养基 (取 89 mL DMEM 培养基, 加入 1 mL 双抗溶液和 10 mL 胎牛血清, 配制成含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的完全培养基, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用) 中, 配成 10 ng/mL 的 IL-1 β 溶液。将其加入干预正常培养的软骨细胞, 置于培养箱中培养 24 h, 得到退变软骨细胞。

1.2.5 甲苯胺蓝染色法进行软骨细胞鉴定 软骨细胞提取完毕后, 按 5×10^4 个/孔的密度接种于六孔板内。观察数量超过培养瓶一半面积后, 用多聚甲醛固定, 然后冲洗 5 min, 均匀加入甲苯胺蓝染液, 染色 15 min 后冲洗, 至深蓝色消失, 最后漂洗至无色进行观察。

1.2.6 分组 将细胞分为空白组、模型组、DMSO 组、中药组、阻滞剂组。除空白组外, 其余各组均按“1.2.4”项所示方法用 IL-1 β 构建骨性关节炎细胞模型。空白组、模型组加入完全培养基 (DMEM) 培养, DMSO 组加入含有 0.1% DMSO 的完全培养基, 中药组加入含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苍膝通痹胶囊的完全培养基, 阻滞剂组为含有 50 ng/mL COX-2 抑制剂塞来昔布的完全培养基。

1.2.7 ELISA 法检测上清液炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 水平 根据 ELISA 试剂盒描述方法, 用酶标仪测定各指标每孔 450 nm 波长处的光密度 (OD) 值。

1.3 统计方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 所得数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有数据均采用正态分布检验其正态性, 对于符合

正态分布的多组间数据资料, 采用单因素方差分析进行组间比较。进一步两两比较, 方差齐则采用 LSD 检验, 方差不齐则采用 Games-Howell 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 相关药物单体功能比较结果 对 9 味中药的 4 项具有重要意义的药理学相关描述, 即 MW、nHdon、nHacc、AlogP, 进行统计学比较分析, 表 1 结果显示: ①MW: 独活低于苍术、萆薢、鸡血藤、川牛膝、骨碎补及川续断, 而威灵仙低于萆薢、川牛膝、骨碎补, 高于苍术、鸡血藤、川续断、桑寄生。研究发现独活、威灵仙相对分子质量均高于桑寄生。②nHdon: 川续断平均值远高于独活 ($P = 0.00$)、威灵仙 ($P = 0.026$)、苍术 ($P = 0.00$)、萆薢 ($P = 0.39$)、鸡血藤 ($P = 0.001$)、桑寄生 ($P = 0.00$)、川牛膝 ($P = 0.69$)、骨碎补 ($P = 0.96$); ③nHacc: 川续断远高于独活 ($P = 0.00$)、威灵仙 ($P = 0.042$)、苍术 ($P = 0.00$)、萆薢 ($P = 0.721$)、鸡血藤 ($P = 0.001$)、桑寄生 ($P = 0.00$)、川牛膝 ($P = 0.21$)、骨碎补 ($P = 0.58$)、川续断 ($P = 0.38$)。④AlogP: 苍术平均 AlogP 最高, 川牛膝最低。此外, 各药物成分之间 OB 与 DL 也存在明显差异。独活 OB 平均值最高, 与威灵仙、鸡血藤、桑寄生近似; 相反, 独活 DL 平均值最低, 与威灵仙有显著性差异 ($P = 0.006$)。

2.2 药物化合物筛选 在 TCMSP 数据库共寻找到相关化合物 472 个, 经根据药理学 OB、DL 等相关参数阈值要求筛选后, 符合上述筛选要求的化合物共有 27 个。

表 1 苍膝通痹胶囊各药物单体功能比较表

Table 1 Table of functional comparison of drug monomers in Cangxi Tongbi Capsules

中药	化合物相对分子质量 (MW)	H-键配位电子供体数目 (nHdon)	H-键配位电子受体数目 (nHacc)	脂-水分配系数 (AlogP)	口服生物利用度 (OB)/%	药物相似性 (DL)
独活	205.70	0.54	1.77	3.75	34.47	0.11
威灵仙	352.45	2.98	5.82	2.92	32.12	0.23
苍术	302.42	1.31	2.54	4.22	33.04	0.25
萆薢	565.34	3.50	7.50	3.33	29.32	0.61
鸡血藤	311.05	2.18	4.47	3.19	34.08	0.34
桑寄生	183.17	0.63	1.57	2.97	34.37	0.12
川牛膝	402.99	4.28	7.55	2.02	23.20	0.40
骨碎补	515.71	4.55	2.55	2.55	24.40	0.53
川续断	324.85	4.58	8.26	2.81	26.63	0.37

其中, 独活中5.1%的化学成分同时符合OB及DL两参数阈值要求, 这些化合物被看作是独活的活性成分并进行下一步的研究, 这些化合物包括异欧前胡素(Isoimperatorin)、诺巴托(Nodakenin)、 β -谷甾醇(beta-Sitosterol)等; 威灵仙中7.14%的化学成分同时符合OB及DL两参数阈值要求, 这些活性成分可进行下一步的研究, 包括邻苯二甲酸二庚酯(Diheptyl phthalate)、豆甾醇(Stigmasterol)等; 苍术同时符合阈值要求的化合物占4.17%, 包括 3β -乙酰氧基苍术酮(3β -Acetoxyatractylone)和沃贡宁(Wogonin); 葶藶中符合条件化合物占12.5%, 为薯蓣皂素(Diosgenin); 鸡血藤、桑寄生、川牛膝中符合条件的化合物分别占比为13.43%、4.44%及10.26%, 包括甜菜碱(Betavulgarin)、槲皮素(Quercetin)等, 骨碎补中符合条件的化合物成分占比为15.71%和12.9%, 包括圣草酚(Eriodictyol)、没食子酸(Digallic acid)、谷甾醇(Sitosterol)等。我们对上述符合条件的筛选后化合物进行进一步的数据分析研究。

2.3 疾病靶点和苍膝通痹胶囊治疗靶点映射的结果 对GeneCards数据库进行检索, 共检索到骨性关节炎相关基因2644个。采用Venny绘图软件对数据进行形象化处理, 将苍膝通痹胶囊的潜在靶点和骨性关节炎相关靶点基因进行映射, 取其交集, 共获得186个治疗靶点。见图1。

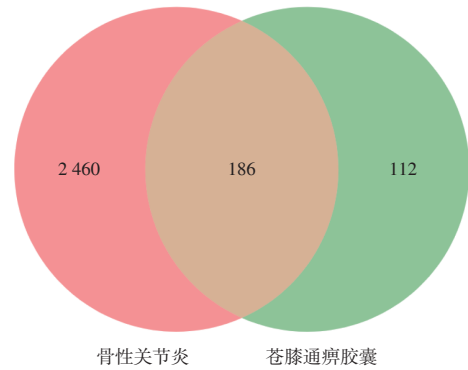


图1 苍膝通痹胶囊与骨性关节炎的靶点映射

Figure 1 Targets mapping of Cangxi Tongbi Capsules and osteoarthritis

2.4 药物-成分-靶点-疾病网络构建 网络共有222个靶点, 781条边, 27个有效成分及1个疾病名称; “V”形代表药物有效成分, 方形代表药物作用的靶点, 菱形代表药物单体, 圆形代表疾病名称。见图2。

在构建的网络中, 度(Degree)表示节点相连接的条数, 节点的介数则指不同节点之间最短通路的条数, 在研究中发现度值与介数存在密切的相关性, 且具有高介数的节点普遍存在向心性。而有一些节点, 可能度值低, 但具有较高的介数, 这说明此类化合物可能存在桥接关系, 加强了映射的作用。

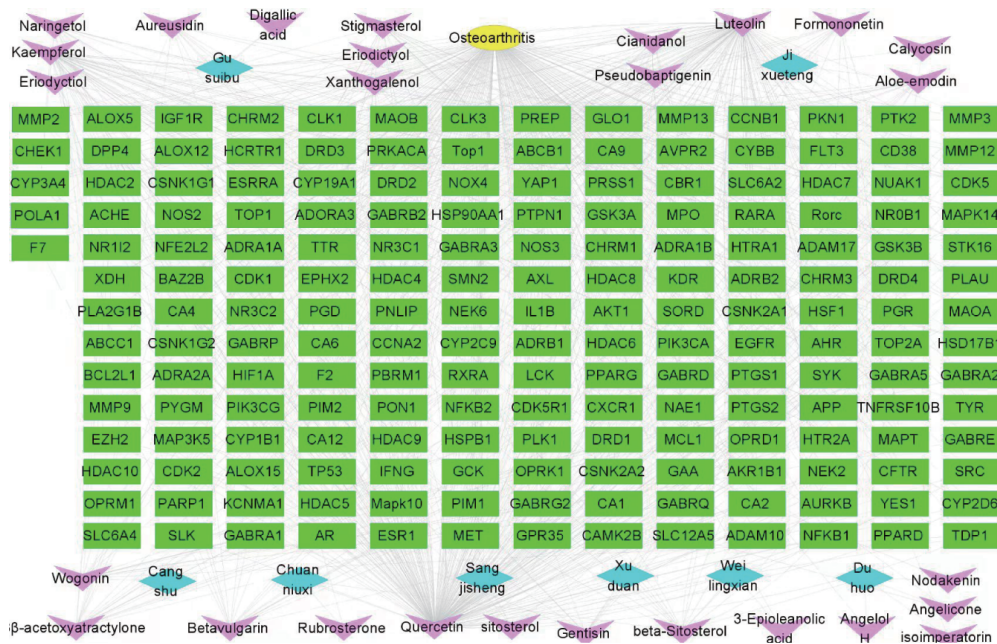


图2 药物-成分-靶点-疾病网络

Figure 2 Drug-component-target-disease network

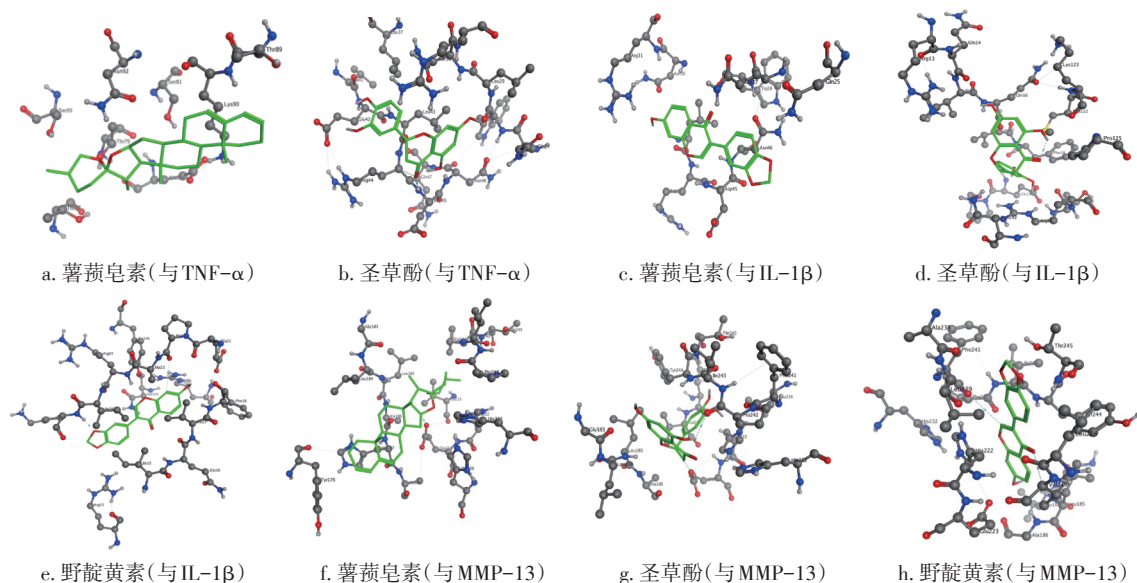
2.5 分子对接 应用 AutoDock Vina 软件对 27 个候选活性成分与 3 个骨性关节炎关键炎症因子靶点蛋白(TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13)进行分子对接,结果如表 2、图 3 所示。薯蓣皂素(Diosgenin)与 TNF- α 结合能最强,其占据 TNF- α 残基 Met122、Gln16、Glu11、Ile15 组成的空间腔,与 IL-1 β 的 Gln16、Glu12 及 Ile15 构成的空间腔相连,与 MMP-13

结合于 His187、Ala186、Val219 及 Glu223 组成的空间腔内; TNF- α 的 Thr208、Thr206、Pro141、Asn142 残基组成的活性腔与圣草酚(Eriodictyol)相对接,由 IL-1 β 的 Pro22、Glu21、Val17、Phe18 组成的活性腔很好地将圣草酚(Eriodictyol)包裹;野靛黄素(Pseudobaptigenin)与 TNF- α 对接于 Asn46、Trp28、Asp45 等残基,与 IL-1 β 的结合能是所有化

表 2 分子对接结合能统计表

Table 2 Statistical table of molecular docking binding energy

化合物	与 TNF- α 的结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	与 IL-1 β 的结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	与 MMP-13 的结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	化合物	与 TNF- α 的结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	与 IL-1 β 的结合能/ (kcal·mol ⁻¹)	与 MMP-13 的结合能/ (kcal·mol ⁻¹)
薯蓣皂素	-7.0	-8.7	-9.1	千金藤素	-6.3	-7.5	-8.0
3-表齐墩果酸	-6.4	-7.9	-9.1	紫花前胡苷	-6.6	-8.6	-10.6
芦荟大黄素	-6.1	-8.1	-9.4	野靛黄素	-6.3	-8.7	-11.4
金鱼草素	-6.0	-7.7	-10.0	邻苯二甲酸二庚酯	-5.1	-5.8	-6.7
9-羟基-7-(2-甲氧基苯基)吡喃并[2,3-f][1,3]苯并二氧戊环-8-酮	-6.4	-7.8	-8.9	异欧前胡素	-5.3	-7.9	-6.9
β -谷甾醇	-6.1	-7.4	-8.3	槲皮素	-6.1	-8.3	-9.7
毛蕊异黄酮	-6.1	-8.0	-11.1	红苜蓿酮	-6.2	-8	-7.2
儿茶素	-6.0	-7.3	-8.5	汉黄芩素	-6.2	-8.1	-8.8
没食子酸	-6.2	-7.7	-9.5	黄原花青素	-6.4	-7.3	-9.2
圣草酚	-6.3	-7.1	-8.4	豆甾醇	-5.9	-6.7	-8.2
刺芒柄花素	-6.0	-8.3	-10.5	谷甾醇	-5.9	-7.3	-8.2
山柰酚	-6.2	-7.8	-9.1	龙胆根素	-5.8	-7.7	-9.5
木犀草素	-6.4	-8.7	-10.1	当归酮	-5.6	-6.8	-7.7
				当归酰基戈米辛 H	-5.4	-7.1	-8.7

图 3 候选活性成分与 TNF- α 、IL-1 β 、MMP-13 的分子对接Figure 3 Molecular docking of candidate active ingredients with TNF- α , IL-1 β and MMP-13

合物对接 IL-1 β 结合能最强的。图中显示由 Arg67、Asn142、Lys24 及 Ala23 等组成的空间腔可以很好地与其对接，野靛黄素 (Pseudobaptigenin) 与 MMP-13 结合能是所有化合物与 MMP-13 结合能中最强的，占据 Ile243、Pro242、Val219、Leu184 等组成的空间腔。

2.6 GO富集分析与KEGG通路富集分析 共挖掘出苍膝通痹胶囊治疗骨性关节炎关键靶点 187 个，信号通路 40 余条。根据基因 GO 分析、KEGG 通路富集分析结果数据表明，其治疗的机制应该为对软骨细胞增殖和凋亡的干预。结果见图 4、图 5。



图4 苍膝通痹胶囊治疗骨性关节炎关键靶点的GO富集分析

Figure 4 GO enrichment analysis of the key targets of Cangxi Tongbi Capsules in the treatment of osteoarthritis

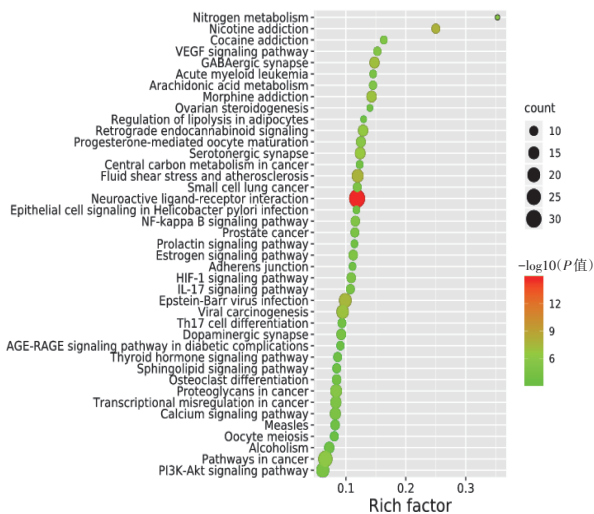
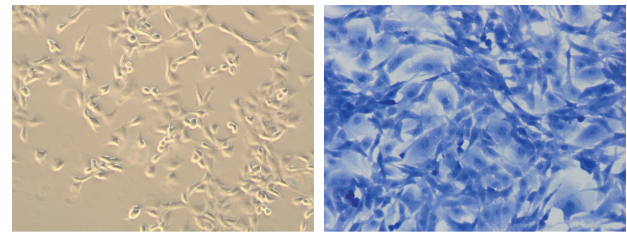


图5 苍膝通痹胶囊治疗骨性关节炎关键靶点的KEGG通路富集分析

Figure 5 KEGG pathway enrichment analysis of Cangxi Tongbi Capsules in the treatment of osteoarthritis

2.7 软骨细胞的鉴定结果 图6可见原代培养的软骨细胞，并经甲苯胺蓝染色鉴定为软骨细胞。



a. 原代软骨细胞 b. 甲苯胺蓝染色鉴定

图6 软骨细胞的鉴定结果(甲苯胺蓝染色法, $\times 100$)

Figure 6 Chondrocyte identification results (by toluidine blue staining, $\times 100$)

2.8 各组软骨细胞上清液中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达水平比较 表3结果显示：与空白组比较，模型组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平升高，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)；DMSO 组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平与模型组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与模型组比较，中药组、阻断剂组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平均降低，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表3 各组软骨细胞上清液中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达水平比较

Table 3 Comparison of expression levels of inflammatory factors IL-1 β and TNF- α in chondrocyte supernatant of various groups ($\bar{x} \pm s$, $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

组别	IL-1 β	TNF- α
空白组	44.91 \pm 0.42	31.03 \pm 0.81
模型组	80.15 \pm 1.02 ^①	47.53 \pm 0.89 ^①
DMSO组	79.33 \pm 1.93	46.17 \pm 1.03
中药组	63.53 \pm 0.25 ^②	37.84 \pm 0.92 ^②
阻断剂组	50.70 \pm 0.87 ^②	29.21 \pm 0.17 ^②

① $P < 0.01$ ，与空白组比较；② $P < 0.01$ ，与模型组比较

3 讨论

中药复方又被称为“方剂”，通常由复杂的多味单体中药组成，是中医学治疗疾病的主要理念^[9]。每个处方并非简单的中药杂乱堆积，而是结合中医中药理论，遵循中药配伍规则及相关配对相容性来治疗特定的疾病，其目的是将每味中药功效最大化，同时依靠相互作用降低本身的毒性。中药配伍原则基于“君臣佐使”规则，阐释着方剂中每味中药的功能以及所在方剂中的整体安排。近些年，对于方剂组成的科学性研究越来越

越重视,采用现代化药理技术研究越来越多,计算机建模、拆分等方法越来越受到广大学者的关注。本研究将系统药理学引入中药配伍分析,确定方剂中的活性成分,阐释各味中药之间的协同关系及相关疾病治疗的作用机制,并通过分子对接技术进一步验证了本方在骨性关节炎中的治疗作用。

本研究结果显示,苍膝通痹胶囊方剂组成中,君药存在2个明显的特征:药物化成分数量最大和药理学活性最活跃。其中,独活化成分最多,并且,根据其浓度独活的化成分活性在体内循环系统中也是最活跃的。通过网络的构建与分析,还可看出独活与相关靶点关系最为密切,且其中一些化合物还可作为药物-靶点网络图的中心,该中心的使用可能会对骨性关节炎治疗产生巨大的影响,这些都为独活在苍膝通痹胶囊中发挥巨大作用提供了依据。臣药威灵仙与独活存在许多相同的靶点,两药重叠靶点数量繁多,这也说明两药在药理学功能上存在相近之处。在临床中,因独活性善下行,所以一般单独使用独活不能完全地祛除体内风湿,而威灵仙性猛善行全身,通行十二经,上下皆可行,是辅助独活祛除体内风湿邪气之要药,并且通过药理学分析,二者结合可相应地增加溶解度,有助于提高功效,这些都可以科学地阐明威灵仙为什么可作为臣药来提高治疗能力。佐使药物在中医学中通常具有辅助提高、调和药性的作用,在药理学中佐使药一般活性成分相对较少,具有提高药理作用功能、改善药代动力学等作用,故认为,苍膝通痹胶囊中佐使药物含有淀粉、蛋白质、醇脂类物质,并且相对占比较高,这些可以提升君臣药物的成分溶解度,提高其吸收作用率,从而达到提高药理学功能的作用。

本研究应用网络药理学数据挖掘技术共挖掘出苍膝通痹胶囊治疗骨性关节炎的关键靶点187个,信号通路40余条,基因GO分析、KEGG通路富集分析结果数据表明,其治疗的机制应为对软骨细胞增殖和凋亡的干预。关节软骨是骨性关节炎发生、发展过程中极易侵犯的部位,而软骨细胞作为关节软骨内合成软骨基质的唯一细胞,在关节软骨正常结构的保护维持及关节软骨功能保护方面重要的病理特征^[10]。当软骨细胞受到炎症因子、

机械应力等刺激时,会发生细胞内的信号转导,将信号传递给相关转录因子,激活其介导的相应生物学效应。软骨细胞凋亡是骨性关节炎发病过程中重要的病理特征。已有研究表明,炎症因子TNF- α 和IL-1 β 在骨性关节炎发生及发展过程中起到关键的作用,在骨性关节炎的实验动物模型以及患者中均检测出高表达的TNF- α 和IL-1 β ,二者干预关节软骨细胞代谢,抑制细胞外基质蛋白的合成,促进分解酶的释放,使软骨细胞逐渐遭到破坏^[11-12]。IL-1 β 是重要的炎症介质,在人体关节液中占主要成分,骨性关节炎患者的IL-1 β 表达与其病情呈正相关;TNF- α 可刺激滑膜产生前列腺素E2(PGE2),继而加重软骨下骨的吸收,引发关节软骨的II型胶原破坏。骨性关节炎发生时,软骨组织大量地分泌TNF- α ,诱导成纤维增生,形成血管翳,久之造成关节破坏^[13]。TNF- α 和IL-1 β 还是上述KEGG分析结果中信号通路的主要上游炎症因子,可激活软骨细胞基质金属蛋白酶(MMP)通路诱导其合成,促关节损坏^[14]。MMPs是一类能够降解基质中各型胶原纤维的蛋白酶,在细胞外基质的生理性和病理性降解过程中起重要作用。在软骨的退化性变过程中,MMPs对II型胶原纤维的降解起主要作用,其中,MMP-13对II型胶原纤维的降解能力是其他MMPs的10~30倍,而其他胶原纤维酶发挥降解作用也需要MMP-13的参与^[15]。

本研究对187个靶点涉及的信号通路进行了KEGG分析,结果显示,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、核因子kappaB(NF- κ B)信号通路、低氧诱导因子(HIF)-1信号通路等软骨细胞凋亡相关信号通路被显著富集。MAPK信号通路是介导骨性关节炎软骨损伤重要的信号转导系统,其激活可引起MMP表达增加、软骨细胞凋亡、软骨受损等一系列反应^[16]。NF- κ B病理性的激活参与了多种炎症反应和骨性关节炎的发生与发展^[17],其在调节炎症反应的同时调节软骨细胞的凋亡^[18]。HIF是在低氧状态下机体调节的关键转录因子,可调节血管生成、细胞凋亡、细胞迁移、血管舒缩、能量代谢等相关基因^[19]。软骨细胞的增殖与分化可影响机体组织的生长发育和逆转骨性关节炎进程^[20]。苍膝通痹胶囊作用靶点富集分析结果显示,DNA复制、Notch信号通路及Wnt信号通路是其重要的调控软骨细胞增殖的信号通路。Notch信号通

路能够维持软骨细胞表型,平衡软骨基质代谢,在调控软骨细胞的增殖和分化方面起着重要的作用^[21]。Wnt/ β -catenin信号通路主要通过多种具有差异的方式来调控机体发育过程中的细胞增殖与分化^[22]。故苍膝通痹胶囊治疗骨性关节炎的主要作用机制是多因素诱导的综合效应,与多条信号通路密切相关,相关信号通路之间在细胞内即各自独立,又相互联系,形成一个复杂的交联关系。

苍膝通痹胶囊治疗骨性关节炎活性成分共27个,相对应的治疗靶点187个,由于靶点数目繁多,本研究对187个靶点进行了数据统计,度的平均值为6,我们选取大于度平均值的20个靶点进行GO分析,将27种主要药物化学成分与骨性关节炎关键炎性因子IL-1、TNF及MMP-13进行分子对接。结果显示,各成分对接后获得结合能十分理想,均小于结合能标准值-5,说明苍膝通痹胶囊可降低炎性诱导因子表达,对骨性关节炎具有明显的治疗作用,可保护骨性关节炎关节软骨。我们进一步行体外细胞实验,采用ELISA法检测细胞上清液中IL-1 β 、TNF- α 的表达水平。结果显示,空白组IL-1 β 、TNF- α 表达水平最低,模型组最高,表明10 ng/mL的IL-1 β 可以引起软骨细胞退变;与模型组的炎性因子表达相比,DMSO组与前者表达近似,二者无明显统计学差异,表明DMSO对骨性关节炎软骨细胞炎性因子无影响,在浓度低于0.1%时应用DMSO溶液作为溶剂是合理的。与模型组的炎性因子表达水平相比,苍膝通痹胶囊药物组、塞来昔布组均可以有效降低退变软骨细胞炎性因子的表达,表明苍膝通痹胶囊与环氧合酶2(COX2)抑制剂塞来昔布作用相似,具有治疗骨性关节炎保护关节软骨的作用。

综上所述,本研究通过系统药理学技术,分析苍膝通痹胶囊组方依据,探讨其治疗骨性关节炎的作用机制,利用分子对接技术和动物体外实验证明其治疗作用的确切性。结果表明,苍膝通痹胶囊多种成分可作用于同一个靶点,同一成分参与了多个靶点的治疗,提示苍膝通痹胶囊是通过多成分、多靶点进行骨性关节炎治疗及关节软骨保护的。今后,本课题组将根据网络对接获得的靶点进行进一步的体内实验研究,以期为苍膝通痹胶囊治疗骨性关节炎提供更多的实验及临床

依据。

参考文献:

- [1] FELSON D T. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(8): 841-848.
- [2] YAN M, ZHANG J, YANG H, et al. The role of leptin in osteoarthritis[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2018, 97(14): e0257.
- [3] 徐戡,李可. 膝骨性关节炎治疗进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(12): 219-222.
- [4] 杨山辉,陶树青. 膝关节骨性关节炎的非手术治疗进展[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2017, 36(4): 677-680.
- [5] YU G, LUO Z, ZHOU Y, et al. Uncovering the pharmacological mechanism of *Carthamus tinctorius* L. on cardiovascular disease by a systems pharmacology approach [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109094.
- [6] TIAN S, WANG J, LI Y, et al. Drug-likeness analysis of traditional Chinese medicines: prediction of drug-likeness using machine learning approaches[J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(10): 2875-2886.
- [7] TIAN S, LI Y, WANG J, et al. ADME evaluation in drug discovery. 9. Prediction of oral bioavailability in humans based on molecular properties and structural fingerprints [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(3): 841-851.
- [8] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [9] 文跃强,贾波,沈涛,等. 方剂功效概念浅析[J]. *中国医学创新*, 2015, 12(34): 96-98.
- [10] 秦梦,王和鸣,娄玉铃. 骨痹舒片对实验性膝骨关节炎病理形态及自由基的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2011, 19(3): 1-3.
- [11] KILLOEK D. Osteoimmunology: could inhibition of IL-1 and TNF improve healing of meniscal lesions and prevent the development of osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*(1), 2011, 8(1): 4.
- [12] SCHEPENS S L, KRATZ A L, MURPHY S L. Fatigability in osteoarthritis: effects of an activity bout on subsequent symptoms and activity[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012, 67(10): 1114-1120.
- [13] KOBAYASHI M, SQUIER G R, MOUSA A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(1): 128-135.
- [14] HUI W, ROWAN A D, RICHARDS C D, et al. Oncostatin M in combination with tumor necrosis factor (induces cartilage damage and matrix metalloproteinase expression in vitro and in vivo)[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 489(12): 3404-3418.
- [15] 乔长峰,杨开舜. MMP-13、TIMP-1在兔骨关节炎模型的表达及其意义[J]. *中国现代医生*, 2009, 47(3): 39-41.
- [16] SUN H Y, HU K Z, YIN Z S. Inhibition of the p38-MAPK

- signaling pathway suppresses the apoptosis and expression of proinflammatory cytokines in human osteoarthritis chondrocytes [J]. Cytokine, 2017, 90: 135-143.
- [17] 周庄, 张柳. NF- κ B 信号通路在骨性关节炎发生发展中作用机制的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(1): 78-82.
- [18] MALDONADO M, NAM J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 284873.
- [19] HUANG X, XI Y, PAN Q, et al. Caffeic acid protects against IL-1 β -induced inflammatory responses and cartilage degradation in articular chondrocytes [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 433-439.
- [20] MEO S D, REED T T, VENDITTI P, et al. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 1245049.
- [21] BAGI C M, ZAKUR D E, BERRYMAN E, et al. Correlation between μ CT imaging, histology and functional capacity of the osteoarthritic knee in the rat model of osteoarthritis [J]. J Transl Med, 2015, 13: 276.
- [22] WENG X, LIN P, LIU F, et al. Achyranthes bidentata polysaccharides activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote chondrocyte proliferation [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(4): 1045-1050.

【责任编辑：侯丽颖】

警示：钓鱼网站 <http://www.gzzyydxxb.cn/> 为假冒本刊网站

尊敬的作者、读者、专家：

现网上诈骗、虚假网站盛行，假冒本刊网站的钓鱼网站甚至冠以本刊官网实施诈骗，其中主要的诈骗网站有：(1) <http://www.gzzyydxxb.cn/>；(2) <http://gzzyydxxb.yixue.org.cn/>，其目的在于骗取作者的审稿费、版面费！请大家警惕！

本刊已采用在线投稿，不接受邮箱投稿。本刊与作者联系的邮件为系统发送邮件，编辑部邮箱以网上公布的为准。并请作者注意，本刊来稿不收审稿费，录用后收取一定版面费。涉及到收取版面费的账号户名只有“广州中医药大学”，其他一切要求个人账户汇款者均为诈骗账户，切莫上当受骗。

现网络鱼龙混杂，验证是否本刊真实网站的简单办法：

1. 本刊官方网站只有一个，从本刊正式发行的刊物版权页可识别。本刊“编辑部远程稿件处理系统”网址（2016年5月15日正式启用）：<http://xb.zyxy.com.cn>。

2. 本刊由广州中医药大学主办，在大学网站（www.gzucm.edu.cn）主页有链接，点击www.gzucm.edu.cn→机构→教辅→期刊中心→《广州中医药大学学报》。

3. 虚假的网站都是做贼心虚！钓鱼网站不敢留真实的固定电话和编辑部联系方式。本刊固定电话：020-39354129，欢迎查询验证！

4. 最好的办法：订阅本刊杂志即可一目了然。

·《广州中医药大学学报》编辑部·