

· 基础研究 ·

基于网络药理学、分子对接和实验验证的补骨脂
效应成分及其抗骨质疏松作用机制探讨[△]王镜勋¹, 张方晴¹, 李如灿¹, 李秋月^{2*}, 石钺^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

2. 中国中医科学院 望京医院, 北京 100102

[摘要] 目的: 基于网络药理学、分子对接技术探讨补骨脂效应成分抗骨质疏松的作用机制, 并进行实验验证。方法: 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱飞行时间质谱法表征补骨脂水提取物的化学成分, 结合 SymMap、Herb、TCM-ID、GEO 数据库, STRING 平台和 Cytoscape 软件, 筛选了补骨脂抗骨质疏松 (OP) 的核心药效成分与重要靶点, 并进行基因本体 (GO) 功能富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析; 利用 AutoDock 软件对核心药效成分与重要靶点进行分子对接验证, 通过体外细胞实验进行了初步验证。结果: 共筛选得到补骨脂效应成分 31 个、重要靶点 256 个, 其中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG) 为核心靶点。GO 分析和 KEGG 信号通路分析分别筛选出符合条件的 417 个生物过程和 123 条信号通路, 其中有 8 条核心靶点参与的通路。采用分子对接实验和体外细胞实验对其中腺嘌呤核苷一磷酸激活的蛋白激酶 (AMPK) 关键信号通路进行验证。分子对接结果显示, 补骨脂治疗 OP 的主要活性成分补骨脂甲素、甲基补骨脂黄酮与蛋白质-蛋白质相互作用网络筛选出的核心靶点蛋白 PPARG 结合活性较好; 细胞实验表明, 2 个成分可以促进成骨细胞的增殖和分化, 对部分 AMPK 通路相关基因有上调的作用。结论: 应用网络药理学和生物信息学方法, 结合分子对接和细胞实验, 可揭示补骨脂有效成分通过 AMPK 信号通路治疗 OP 的潜在作用机制, 为补骨脂的药效物质基础研究提供了新思路。

[关键词] 补骨脂; 骨质疏松症; 网络药理学; 腺嘌呤核苷一磷酸激活的蛋白激酶; 作用机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2024)04-0653-12

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20231128005

Exploring Active Components and Mechanism in Treating Osteoporosis of Psoraleae Fructus Based on Network Pharmacology, Molecular Docking, and Experimental ValidationWANG Jing-xun¹, ZHANG Fang-qing¹, LI Ru-can¹, LI Qiu-yue^{2*}, SHI Yue^{1*}

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

[Abstract] **Objective:** To explore the active components and mechanism of Psoraleae Fructus (PF) in treating osteoporosis (OP) based on network pharmacology and molecular docking, and validate the prediction results by experiments. **Methods:** The chemical components of PF aqueous extract were characterized by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field-Orbitrap time-of-flight mass spectrometry. Core active components and important targets of PF in combating OP were retrieved from SymMap, Herb, TCM-ID, GEO, STRING, and Cytoscape. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were conducted. Molecular docking of core active components with key targets was performed in AutoDock. Furthermore, the prediction results were validated by cell experiments. **Results:** Thirty-one active components and 256 important targets were screened out, among which

[△] **[基金项目]** 中国中医科学院科技创新工程课题 (CI2021A04901); 中国中医科学院望京医院苗圃培育项目 (WJYY-YJKT-2022-04)

* **[通信作者]** 石钺, 研究员, 研究方向: 中药药效物质基础; E-mail: shiyue1029@126.com
李秋月, 副研究员, 研究方向: 基于多组学的中药药理分子机制; E-mail: liqiuyue1012@126.com

peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARG) was a core target. The GO and KEGG pathway enrichment analyses yielded 417 biological processes and 123 signaling pathways, respectively, with 8 core target-involved pathways. Molecular docking and cell experiments were conducted focusing on the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. The docking results showed that main active components of PF in treating OP, bavachin and bavachinin, had good binding affinity with PPARG identified from the protein-protein interaction (PPI) network. Cell experiments indicated that the two components promoted the proliferation and differentiation of osteoblasts and up-regulated the expression of some genes in the AMPK pathway. **Conclusion:** By employing network pharmacology, bioinformatics methods, molecular docking, and cell experiments, this study reveals the mechanism of the active components of PF in treating OP via the AMPK signaling pathway, giving insights into the pharmacological basis of PF.

[Keywords] Psoraleae Fructus; osteoporosis; network pharmacology; AMPK; mechanism

骨质疏松症 (OP) 会导致骨组织微结构恶化和骨量减少, 继而导致骨硬度降低, 增加骨折的风险^[1]。我国人口老龄化现象严重, 老年人患 OP 的比例逐年增加, 患病率已达 37.7%^[2]。OP 产生的主要原因之一是成骨细胞参与的骨形成与破骨细胞调节的骨吸收之间的失衡, 破骨细胞过度吸收, 而成骨细胞没有生成相应数量的新生骨, 会导致骨质丢失和骨质疏松。目前临床上抗 OP 药物主要包括抗炎镇痛类药物、改善骨吸收和骨代谢平衡药物、骨活化剂和骨吸收抑制药物^[3], 常见的化学药有复方雌激素、双磷酸盐类、降钙素、甲状腺旁腺激素、雷洛昔芬等^[4], 这些药物普遍不良反应较大且价格较贵, 而中药在治疗 OP 的过程中逐渐发挥更多的作用。中医学将原发性 OP 归属为“骨痿”“骨痹”“骨枯”等范畴, 是一种由于肾精不足、骨失滋养而导致的全身骨骼慢性退行性疾病^[5]。中医理论认为, OP 的基本病机以肾精亏虚、骨髓化源不足、骨骼失去滋养为主, 需要补肾健肝、健脾益气、活血化痰^[6]。补骨脂 (Psoraleae Fructus) 是一种常用的中药, 具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻作用, 是诸多中医治疗 OP 的重要处方成分, 但其治疗 OP 的确切有效成分及作用机制尚未完全阐明。目前, 中药药效物质基础研究方法的核心在于建立活性成分与药效、作用机制的关联, 而网络药理学方法通过对复杂多层次相互作用的各种网络的分析^[7], 可直观地表明成分与作用机制间的关系, 有助于快速发现中药潜在有效成分^[8]。本研究在对补骨脂水提物化学成分分析的基础上, 采用网络药理学和生物信息学方法, 通过对成分靶点及疾病基因共有靶点的基因本体 (GO) 功能富集分析、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析及网络拓扑分析, 确定补骨脂治疗 OP 的关键靶点及相应作用成分, 最后结合分子对

接和细胞实验对相关机制进行验证。

1 材料

1.1 细胞

MC3T3-E1 Subclone 14 小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14 细胞 (广州小凡科技有限公司)。

1.2 样品

补骨脂药材购于中国中医科学院望京医院中草药房, 经中国医学科学院药用植物研究所林雨霖研究员鉴定为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实。

1.3 仪器

UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪 (美国戴安公司) 串联 Q Exactive™ Plus Orbitrap™ 型四级杆-静电场轨道阱飞行时间质谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); AB135-S 型十万分之一分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); Vortex-2 Genie 型涡旋混合器 (美国 Scientific Industries 公司); TGL16M 型低温离心机 (德国 Eppendorf 公司); KQ-250DE 型超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); NanoDrop 2000 型紫外-可见光分光光度计 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; MCO-18AC 型 CO₂ 细胞培养箱 (松下健康医疗器械株式会社); CKX41 型倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); CFX-96 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 仪 (美国 Thermal Cycler 公司); Synergy2 型多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); Milli Q Advantage A10 型超纯水机 (德国 Merck Millipore 公司)。

1.4 试药

补骨脂甲素 (批号: C13869992, 纯度 ≥99%, 北京奇松生物科技有限公司); 补骨脂二氢黄酮甲醚

(批号: Q22Y0903, 纯度 $\geq 99\%$, 创融科技有限公司); 成骨诱导完全培养基(基础培养基为 α -MEM, 批号: AAPR99-C500)、 α -MEM培养基(批号: SH30265.01)、磷酸盐缓冲液(PBS, 批号: BL316A)均购于广州宝汇生物科技有限公司; 胰蛋白酶(批号: 25200056)、青霉素-链霉素混合液(批号: 15140122)均购于美国Gibico公司; 无水乙醇(天津市北联精细化学品开发有限公司, 批号: 20230520); 胎牛血清(FBS, 批号: 10099-141)、动物组织/细胞/昆虫总RNA快速提取试剂盒(批号: BIO9206-50)、Amp[™] SYBR[®] Green qPCR Mix(批号: BIO9508)、RT III All-in-One Mix with dsDNase(批号: BIO9293)均购自北京百奥曼科技有限公司; 乙腈(色谱级, 批号: 225022)、甲酸(色谱级, 批号: MF152380)、甲醇(色谱级, 批号: 207343)均购自美国Thermo Fisher公司; 去离子水由Milli Q Advantage A10型超纯水机制备。

2 方法

2.1 补骨脂水提取物成分分析

2.1.1 供试品溶液制备 将补骨脂加8倍量蒸馏水浸泡2 h, 煮沸提取3次, 每次1 h, 滤过, 得提取液, 合并3次滤液, 减压浓缩, 干燥, 得补骨脂水提取物。称取上述提取物粉末约10 mg, 溶于50%甲醇水溶液1 mL, 超声10 min, $14\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径为155 mm), 取上清液置入进样瓶中, 待超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱飞行时间质谱法(UPLC-QE-Orbitrap-MS)分析。

2.1.2 色谱及质谱条件

2.1.2.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 100%~70%A; 10.0~25.0 min, 70%~60%A; 25.0~30.0 min, 60%~50%A; 30.0~40.0 min, 50%~30%A; 40.0~45.0 min, 30%~0A; 45.0~60.0 min, 0A; 60.0~60.5 min, 0~100%A; 60.5~70.0 min, 100%A); 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 10 μL ; 流速: 0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.1.2.2 质谱条件 使用Q-Exactive Orbitrap高分辨率质谱仪执行质谱分析。Full MS-ddMS²检测, 正、负离子模式, 扫描质量范围为 m/z 100~1200; 一级质谱分辨率为70 000, 二级质谱分辨率为

17 500; 离子源电压为3.2 kV; 毛细管温度为320 $^{\circ}\text{C}$; 辅助气体加热温度为350 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气和辅助气流速分别为40、15 L $\cdot\text{min}^{-1}$; 自动增益控制(AGC)目标值为 1×10^6 ; 顶部N(TopN)模式为5; MS²扫描的碰撞能量通过阶梯状碎裂电压归一化碰撞能量(NCE)进行调控, 设定值分别为30、40、50。

2.1.3 化合物鉴定分析 使用Compound Discover 3.2软件进行原始质谱数据特征峰提取, 设定质量偏差均为 5×10^{-6} , 包括特征峰元素匹配、分子式预测及同位素分布匹配。为了进行特征峰的鉴定, 结合mzCloud在线数据库(<https://www.mzcloud.org/>)和本地自建的mzVault bestmatch数据库, 制订了阳性结果的筛选标准为质量偏差 $<5\times 10^{-6}$, 并且符合同位素分布及mzVault bestmatch数据库匹配得分 >70 , 初步筛选可能存在于补骨脂中的化合物。采用ThermoXcalibur 2.2软件对质谱数据进行进一步分析和处理。通过高分辨质谱信息进行分子式的校正, 确保偏差不超过 5×10^{-6} 。参考文献中化合物的相对分子质量及碎片信息, 以及数据库中对于药材成分的记录, 最终确定补骨脂中的主要化学成分^[9-10]。

2.2 网络药理学研究

2.2.1 OP差异表达基因分析 以“osteoporosis”为关键词在高通量基因表达数据库(GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中检索有关OP的基因芯片数据集, 获得满足条件的数据集编号为GSE230665, 其中包含了12例绝经后OP患者和3例健康的绝经后妇女。利用GEO数据库在线分析功能分析芯片数据, 并结合 P 值和差异倍数(FC)进行筛选, 其中显著差异基因的筛选条件为 $P<0.05$, $|\log_2\text{FC}|>1$, 最终获得OP的差异表达基因。

2.2.2 OP疾病靶基因预测 以“osteoporosis”为关键词, 基于TTD(<http://bidd.nus.edu.sg/bidd.databases/ttd/ttd.asp>)、GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://www.omim.org/>)、PharmGKB(<https://www.pharmgkb.org/>)、DrugBank(<https://go.drugbank.com/drugs>)数据库收集OP相关人源基因^[11]。为避免假阳性靶点, 剔除GeneCards中相关得分 <5.0 的基因。

2.2.3 补骨脂活性成分筛选及靶点预测 使用SymMap(<https://www.symmap.org/>)、Herb(<http://herb.ac.cn/>)、TCM-ID(<http://tcm.cz3.nus.edu.sg/>)

group/tcm-id/tcmid.asp)数据库收集成分,再结合补骨脂液质分析定性结果汇总补骨脂成分,利用SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>)数据库,根据是否满足类药性五原则(LR)^[12]对所有成分进行筛选,得到活性成分。采用SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)对补骨脂中活性成分的作用靶点进行预测,收集概率值 ≥ 0 的靶点^[13];将得到的所有靶点导入UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>),提取其Gene Name和Gene ID。

2.2.4 映射靶基因获取 将所筛选出的补骨脂活性成分的作用靶点、OP疾病靶基因、OP差异表达基因交叉生成韦恩图,得出补骨脂与OP的映射靶基因。

2.2.5 补骨脂成分-疾病靶点网络构建 将映射靶基因导入Cytoscape 3.7.2软件,构建补骨脂有效成分-疾病靶点网络图,并进行网络拓扑分析。

2.2.6 构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络 抽取映射靶基因,借助Cytoscape 3.7.2软件构建补骨脂治疗OP的PPI网络,根据节点连接度(degree)值的大小排名顺序进行筛选,得到补骨脂治疗OP的关键靶基因。

2.2.7 GO分析及KEGG通路富集分析 将目标基因映射到DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因功能的注释。选用标识符为“uniprot_accession”,将分析范围限定为人类(homo sapiens)基因,设定显著性阈值为 $P < 0.05$,得到GO条目,选取其中排名前10位的条目,利用微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制柱状图。使用Cytoscape 3.7.2软件构建KEGG富集网络。应用微生信平台,针对与核心靶蛋白密切相关的通路绘制富集分析气泡图。

2.2.8 分子对接 将2.2.6项中筛选出的核心靶点与核心成分进行分子对接。从PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载核心靶点的蛋白质结构,用PyMOL 2.4.0软件对核心蛋白进行去水、去配体等操作。通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索核心成分的结构,下载.sdf格式文件并用OpenBabel 3.1.1软件转换成.pdb格式。采用AutoDock 4.2.6软件对蛋白受体和小分子配体进行处理,保存为.pdbqt格式文件,进行分子对接与结合能的计算^[14],使用PyMOL 2.4.0软件对部分结果进行可视化处理。

2.3 细胞实验验证

2.3.1 细胞培养 配制含有10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 α -MEM基础培养基,用于MC3T3-E1细胞系培养。细胞板均放置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱。在细胞生长、融合至80%~90%时,使用胰蛋白酶消化及分瓶培养,用于后续实验。

2.3.2 CCK8检测细胞增殖 将MC3T3-E1细胞接种于96孔板中,每孔3000个,置于培养箱中生长24h贴壁后分别加入不同浓度的补骨脂甲素、甲基补骨脂黄酮(5.00、2.50、1.00、0.75、0.50、0.25、0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行干预,每个浓度梯度设3个复孔。使用CCK8法在干预后的72h检测细胞活力。在每个培养孔加入CCK8试剂10 μL 后,放置培养箱中避光孵育4h,在酶标仪450nm处测定每孔的吸光度(A)。

2.3.3 钙化结节分析 将MC3T3-E1细胞接种于24孔板,每孔 5×10^4 个,置于培养箱中生长24h贴壁,分别加入含1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 补骨脂甲素和1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基补骨脂黄酮的成骨诱导培养基1mL,每隔3d换液1次,于成骨性诱导第14天,采用茜素红染色法进行钙化结节的组织化学染色。PBS洗2遍,4%多聚甲醛固定5min。加入茜素红染色剂,37℃孵育30min,镜下观察矿化结节的形成情况,拍照保存结果,随机取5个视野用Image J软件对钙化结节数量进行半定量分析。

2.3.4 qRT-PCR分析 将MC3T3-E1细胞接种于6孔板中,每孔 2×10^5 个,干预措施同2.3.3项下。细胞干预14d后,根据RNA提取试剂盒说明书提取细胞总RNA,使用无RNA酶水溶解后测定浓度。使用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。扩增cDNA反应条件为95℃预变性30s,95℃变性10s,60℃退火、延伸30s,共40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参计算腺嘌呤核苷一磷酸激活的蛋白激酶 α (AMPK α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、运行结构相关转录因子2(Runx2)、 β 环连蛋白(β -catenin)、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)mRNA表达水平,引物序列见表1。

2.3.5 统计学处理 使用GraphPadPrism 8软件进行数据分析,数值变量资料均以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 MC3T3-E1细胞中各蛋白检测引物序列

编号	引物名称	序列 (5'→3')	碱基数
1	AMPK α -F	GCCGAGAAGCAGAAGCACGAC	21
2	AMPK α -R	GCTTGCCACCTTCACTTTCCC	22
3	Runx2-F	ATGCTTCATTGCCTCACAAAC	22
4	Runx2-R	CCAAAAGAAGTTTGTGCTGACATGG	24
5	β -catenin-F	CTTACCTGACAGATCCAAGTC	22
6	β -catenin-R	CCTTCCATCCCTTCTGTTTAG	22
7	BMP-2-F	AGGATTAGCAGGTCTTTG	18
8	BMP-2-R	TACTGAAGTCCACATAC	18
9	PPARG-F	CGCCAAGGTGCTCCAGAAGATG	22
10	PPARG-R	AGGGTGAAGGCTCATATCTGTCTCC	25
11	GAPDH-F	ATCACTGCCACCCAGAAG	18
12	GAPDH-R	TCCACGACGGACACATTG	18
13	mTOR-F	GCGTATTGTAGAGGACTGGCAG	22
14	mTOR-R	GTCAAGTTGGCGAGATGGATC	21

3 结果

3.1 UPLC-QE-Orbitrap-MS 检测结果

对补骨脂水提取物进行分析,采集到正、负离子模式下的基峰色谱图(图1),共鉴定出12个化合物,各化合物理论相对分子质量、实测相对分子质

量、碎片离子等信息见表2。

3.2 OP相关差异表达基因筛选

通过OP差异表达基因分析结果显示,共有10 258个差异表达基因,用GEO数据库在线分析工具绘制火山图(图2)。

3.3 OP疾病靶基因预测

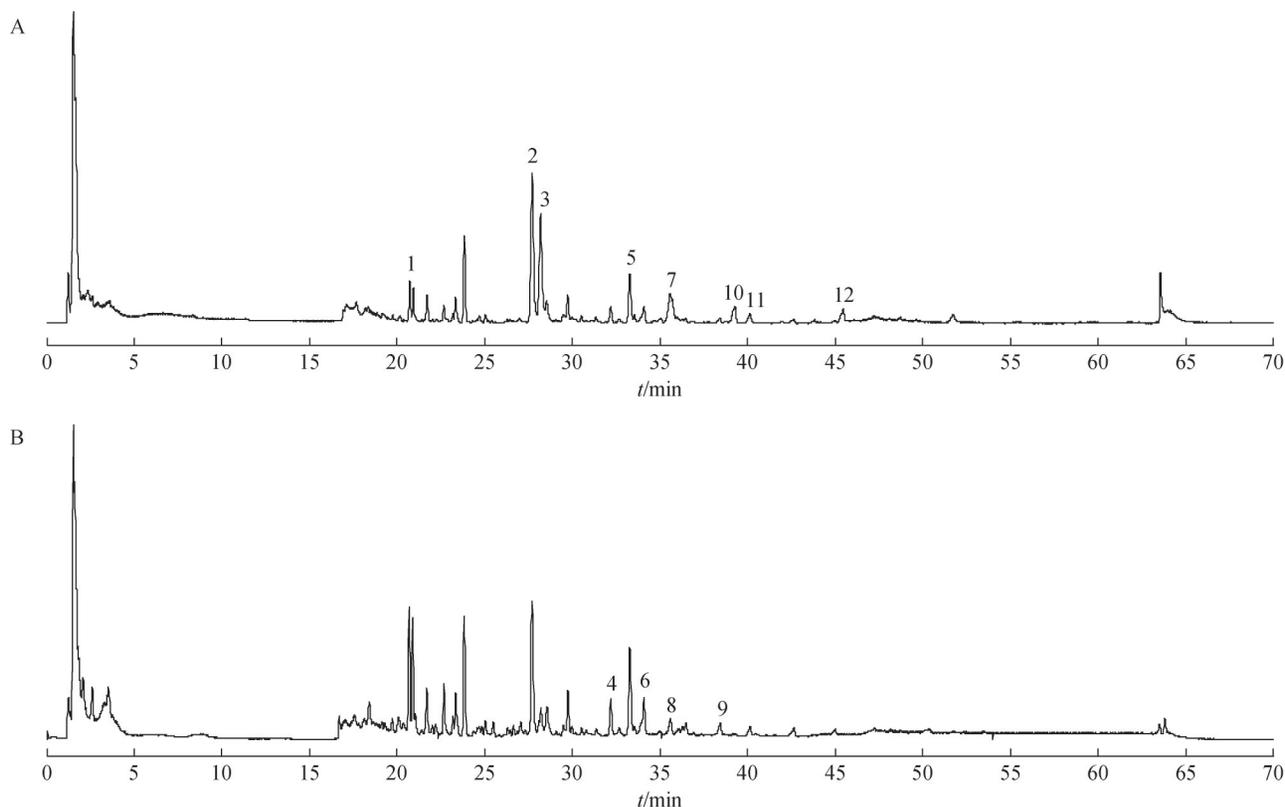
通过TTD、GeneCards、OMIM、PharmGKB、DrugBank数据库共获取了OP相关基因584个。其中TTD数据库29个、OMIM数据库45个、PharmGKB数据库3个、GeneCards数据库374个、DrugBank数据库199个。

3.4 补骨脂有效成分筛选及靶点预测

利用SwissADME对补骨脂成分进行筛选,共获得符合筛选条件的药效成分31个(表3),从SwissTargetPrediction数据库检索到成分靶点共389个。

3.5 映射靶基因获取

将筛选所得的389个补骨脂成分靶点、584个

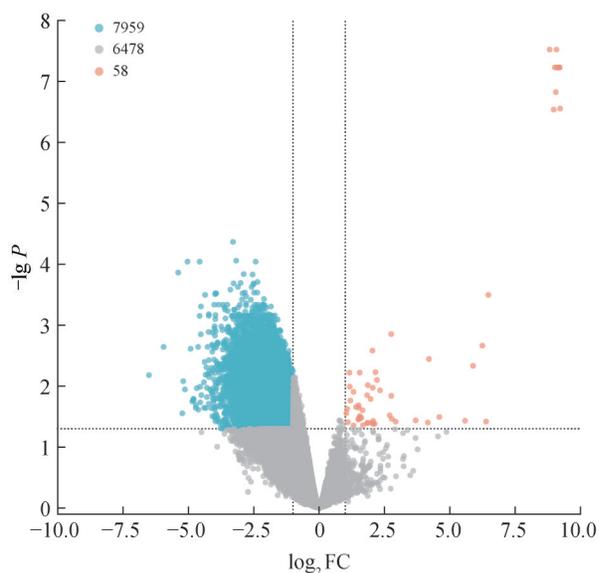


注: A. 正离子模式; B. 负离子模式。

图1 补骨脂水提取物正离子和负离子基峰色谱图

表2 补骨脂水提取物中的主要成分

编号	化合物	分子式	t_R /min	电离模式	母离子 m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS^2 m/z
					理论值	实测值		
1	补骨内酯 (psoralen)	$C_{11}H_6O_3$	20.68	[M+H] ⁺	187.039 0	187.038 9	0.53	131.049 1, 143.049 1, 115.054 2, 159.044 0
2	异补骨脂素 (isopsoralen)	$C_{11}H_6O_3$	27.74	[M+H] ⁺	187.039 0	187.038 9	0.53	160.047 6, 131.049 1, 115.054 2, 103.054 1
3	花椒毒素 (xanthotoxin)	$C_{12}H_8O_4$	28.34	[M+H] ⁺	217.049 5	217.049 4	0.46	198.112 3, 189.054 2, 161.059 6, 111.044 1
4	补骨脂乙素 (isobavachalcone)	$C_{20}H_{20}O_4$	32.20	[M-H] ⁻	323.127 8	323.128 3	1.55	119.050 0, 157.065 8, 222.085 0
5	新补骨脂异黄酮 (neobavaisoflavone)	$C_{20}H_{18}O_4$	33.30	[M+H] ⁺	323.127 8	323.127 5	0.93	267.065 0, 255.065 0
6	补骨脂甲素 (bavachin)	$C_{20}H_{20}O_4$	34.11	[M-H] ⁻	323.127 8	323.128 4	1.86	119.050 0, 145.029 3, 203.071 1
7	补骨脂宁 (corylin)	$C_{20}H_{16}O_4$	35.61	[M+H] ⁺	321.112 1	321.111 8	0.93	137.023 3, 195.080 6, 223.075 3
8	补骨脂定 (psoralidin)	$C_{20}H_{16}O_5$	36.49	[M-H] ⁻	335.091 4	335.092 1	2.09	312.027 4, 280.037 3
9	异补骨脂二氢黄酮 (isobavachin)	$C_{20}H_{20}O_4$	38.44	[M-H] ⁻	323.127 8	323.128 4	1.86	119.050 0, 203.071 2, 157.065 5
10	甲基补骨脂黄酮 (bavachinin)	$C_{21}H_{22}O_4$	39.29	[M+H] ⁺	339.159 1	339.158 8	0.88	271.096 2, 219.101 4, 147.044 0
11	次苷酸查耳酮 (corylifol A)	$C_{25}H_{26}O_4$	40.03	[M+H] ⁺	391.190 4	391.190 1	0.77	267.064 9, 255.064 7, 239.069 9
12	补骨脂酚 (bakuchiol)	$C_{18}H_{24}O$	44.93	[M+H] ⁺	257.190 0	257.189 6	1.56	107.049 0, 81.069 8, 133.064 7



注：红色代表上调；蓝色代表下调；灰色代表变化不显著。

图2 OP相关差异表达基因

OP相关基因和10 258个转录组差异基因交叉生成韦恩图(图3),其中补骨脂与OP相关基因交集69个,补骨脂与转录组差异基因交集共100个,提示这些基因为补骨脂治疗骨质疏松相关靶点,补骨脂与OP相关基因及差异基因三者交集共17个,提示为补骨脂治疗骨质疏松的关键靶基因。

3.6 补骨脂有效成分-靶点网络图构建

借助Cytoscape 3.7.2软件构建补骨脂有效成分-靶点网络(图4)。按照度值排名顺序排名前5位的有效成分为补骨脂甲素、甲基补骨脂黄酮、异补骨脂查耳酮、异补骨脂素、异补骨脂黄酮。这5个有效成分与多个作用靶点相互关联,说明其为补骨脂

治疗OP的主要有效成分。

3.7 PPI网络图构建及分析

经STRING数据库获得了补骨脂治疗OP关键作用靶点的PPI关系,将其导入Cytoscape 3.7.2进行可视化(删除了2个离群的靶基因),见图5。网络中包含15个功能蛋白、25种相互作用关系,以节点度值为评价参数,其越高说明在网络中越重要。其中度值排名第一的靶点为PPARG,与其相互作用的化学成分为补骨脂甲素及甲基补骨脂黄酮,恰好为核心成分中排名第一和第二的成分,且2个成分均在补骨脂水提取物中发现,提示这2个成分很可能通过PPARG靶点发挥治疗OP的作用。

3.8 GO分析及KEGG通路富集分析

对3.5项下获得的映射靶基因采用DAVID数据库进行GO生物过程和KEGG信号通路分析,得到分子功能(MF)、生物过程(BP)和细胞组分(CC)条目,以P值升序排列,分别筛选出符合条件的10个条目(图6),筛选出与核心靶点PPARG相关的所有通路(图7)。GO功能富集分析结果主要参与的细胞过程包括雌二醇对细胞调控、细胞凋亡调控、平滑肌细胞增殖调控、雌激素调控、细胞对活性氧的反应等,细胞组分富集分析包含内质网膜、髓鞘、线粒体、轴突等,分子功能包含酶结合、血红素结合、类固醇结合、锌离子结合、铁离子结合等;KEGG通路富集分析主要涉及雌激素信号通路、催乳素信号通路、松弛素信号通路、脂质与动脉粥样硬化、肿瘤坏死因子信号通路、AMPK信号

表3 补骨脂药效成分

编号	编号	名称
1	BGZ1	异补骨脂素 ^{bcd}
2	BGZ2	补骨脂酚 ^{ac}
3	BGZ3	补骨脂呋喃查耳酮 (bakuchalcone) ^{cd}
4	BGZ4	(S)-补骨脂酚 [(S)-bakuchiol] ^{cd}
5	BGZ5	补骨脂查耳酮 (bavachalcone) ^{cd}
6	BGZ6	补骨脂甲素 ^{cd}
7	BGZ7	甲基补骨脂黄酮 ^{acd}
8	BGZ8	bavachromanol ^{cd}
9	BGZ9	补骨脂色烯查耳酮 (bavachromene) ^{cd}
10	BGZ10	bavacoumestan ^{acd}
11	BGZ11	bavacoumestan ^{bcd}
12	BGZ12	corylidin ^{bcd}
13	BGZ13	补骨脂乙素 ^{bcd}
14	BGZ14	补骨脂异黄酮 (corylin) ^{acd}
15	BGZ15	corylinal ^{cd}
16	BGZ16	异补骨脂查耳酮 (isobavachalcone) ^{acd}
17	BGZ17	异补骨脂黄酮 (isobavachin) ^{abcd}
18	BGZ18	isoneobavachalcone ^{cd}
19	BGZ19	isopsoralidin ^{bcd}
20	BGZ20	异补骨脂内酯 (isopsoralen) ^{ad}
21	BGZ21	肉豆蔻酸 (myristic acid) ^{bcd}
22	BGZ22	neobavachalcone ^{bcd}
23	BGZ23	新补骨脂异黄酮 ^{acd}
24	BGZ24	psoraldehyde ^{cd}
25	BGZ25	补骨脂素 (psoralen1) ^{bcd}
26	BGZ26	psoralenol ^{bcd}
27	BGZ27	补骨脂定 ^{acd}
28	BGZ28	sophoracoumestan ^{acd}
29	BGZ29	花椒毒素 ^{abcd}
30	BGZ30	isocorylifonol ^{cd}
31	BGZ31	neobavaisoflavone ^{cd}

注：a. 化合物源自 UPLC-QE-Orbitrap-MS 鉴定；b. 化合物源自 SymMap 数据库；c. 化合物源自 Herb 数据库；d. 化合物源自 TCM-ID 数据库。

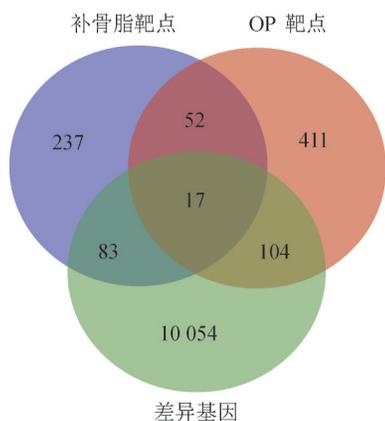
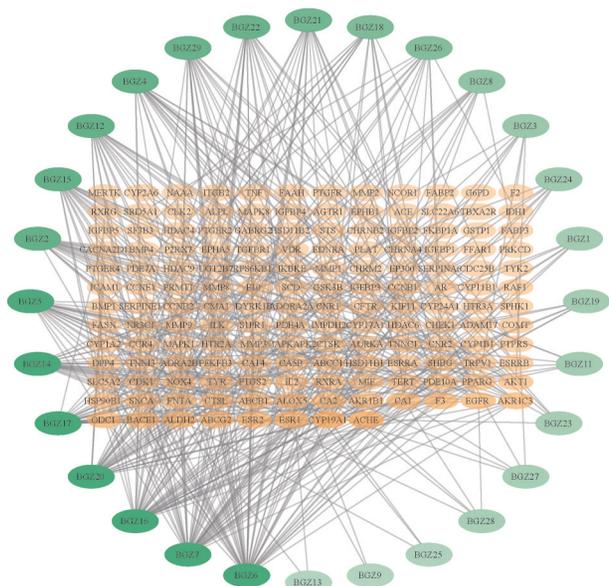
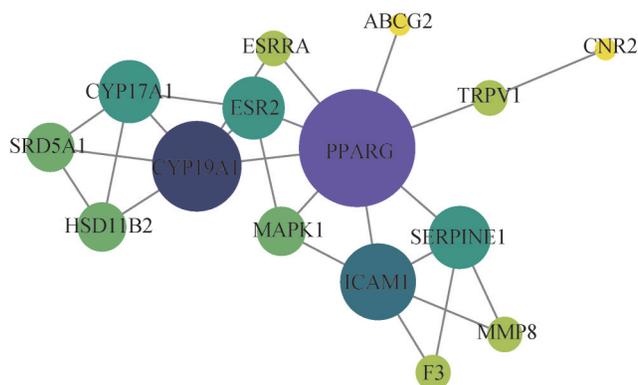


图3 补骨脂靶点-OP 疾病靶点-转录组差异基因韦恩图



注：颜色深浅代表相对重要程度，其中排名前五的成分为BGZ6、BGZ7、BGZ16、BGZ20、BGZ17。

图4 补骨脂有效成分-靶点网络



注：节点越大、颜色越深代表其度值越高。

图5 补骨脂治疗OP关键作用靶点的PPI网络

通路、血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路、表皮生长因子受体家族 (ErbB) 信号通路、细胞内的小 G 蛋白 1 (Rap1) 信号通路、糖尿病并发症中的高糖化终末产物-高级糖化终末产物受体 (AGE-RAGE) 信号通路、促性腺激素信号通路、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路等。其中，雌激素受体信号通路对成骨细胞的骨形成过程和破骨细胞的骨吸收过程发挥重要调节作用，从而影响成骨分化能力，HIF-1 信号通路中的 HIF-1 α 对骨代谢、骨血管生成起促进作用，进而治疗 OP^[15-17]。AMPK 信号通路影响成骨细胞的分化和矿化能力，还可以降低受体激活核转录因子- κ B (NF- κ B) 配体 (RANKL) 的表达来抑

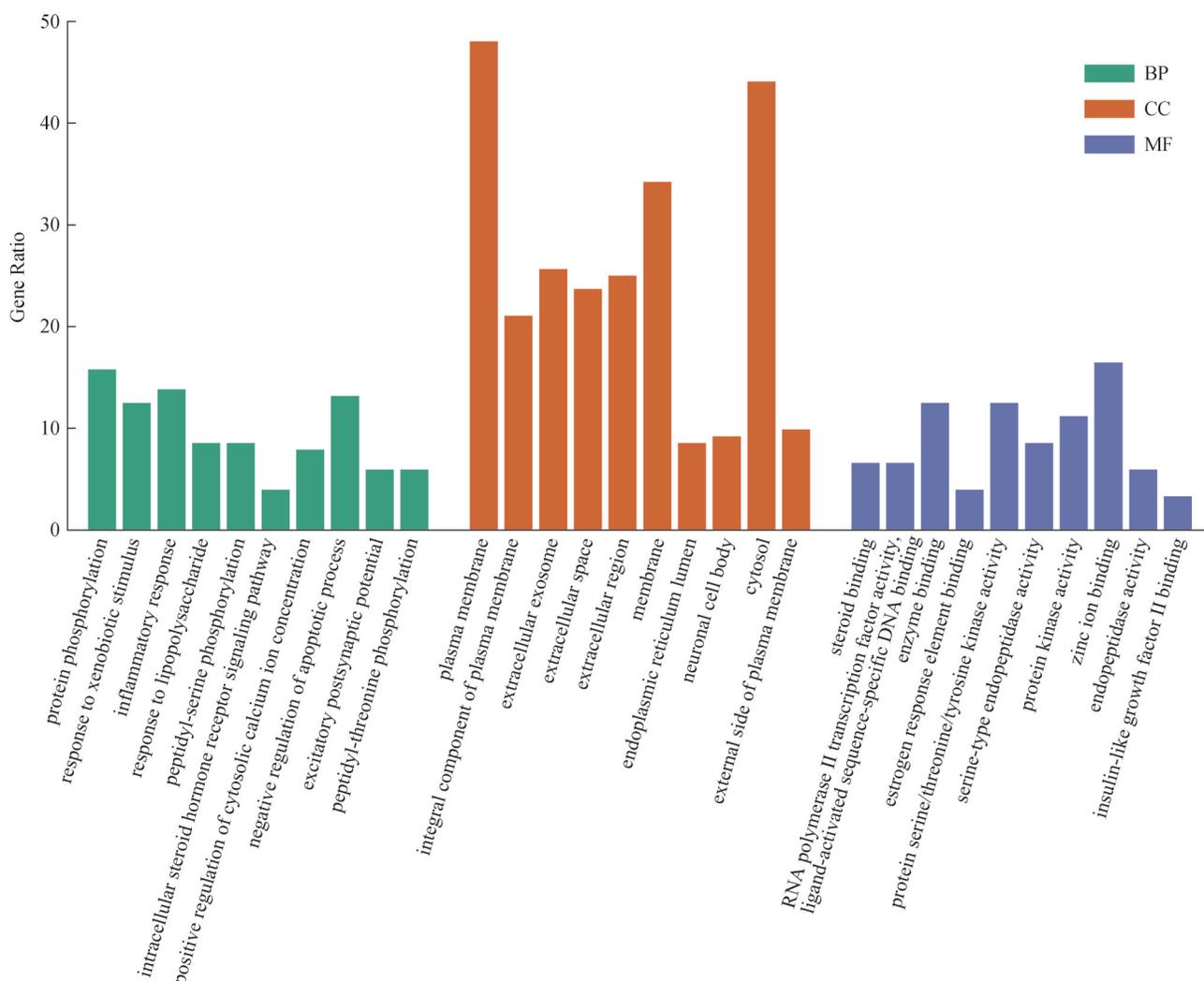


图6 补骨脂治疗OP关键作用靶点GO分析

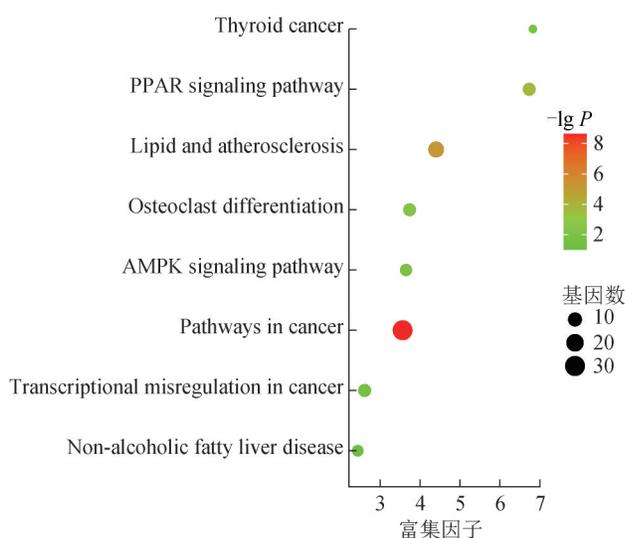


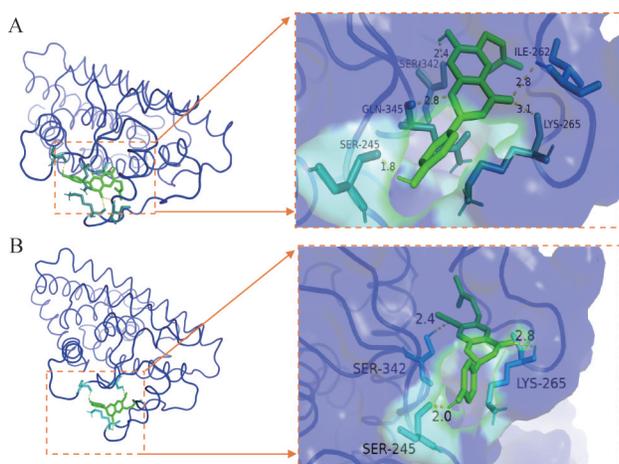
图7 补骨脂治疗OP关键通路KEGG分析

制破骨细胞分化，AMPK活化还可以抑制血管钙化，通过促进巨噬细胞向抗炎功能表型极化起到抗炎的

作用^[18]。其中AMPK信号通路与核心靶蛋白PPARG密切相关，提示补骨脂成分可能通过PPARG来激活AMPK从而治疗OP，后续通过实验进行初步验证。

3.9 分子对接验证

为了进一步明确补骨脂治疗OP的关键靶点与活性成分之间的结合效能，选择PPI网络分析度值最高的核心靶点PPARG进行分子对接。通常结合能 $< 0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal}=4.184 \text{ J}$)说明分子之间具有结合活性，结合能 $< -5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 说明分子之间具有较强的结合活性^[19]，且值越小表示结合能力越强。将2个活性成分与靶蛋白对接后，发现补骨脂甲素与甲基补骨脂黄酮均与PPARG有较强的结合能力，结合能分别达到 -7.0 、 $-7.23 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，对接的结合模式见图8。



注: A. 补骨脂甲素-PPARG结果; B. 甲基补骨脂黄酮-PPARG结果。

图8 补骨脂治疗OP的成分-靶点分子对接

3.10 细胞实验验证

3.10.1 不同浓度补骨脂甲素、甲基补骨脂黄酮对MC3T3-E1细胞增殖的影响 补骨脂甲素组与甲基补骨脂黄酮组在给药剂量范围内都对MC3T3-E1细胞有增殖促进作用,其中 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 达到最佳促进效果(表4),后续皆使用此剂量进行实验。

表4 不同浓度药物对细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A
补骨脂甲素组	0	0.695±0.043
	0.10	0.764±0.031
	0.25	0.816±0.025
	0.50	0.943±0.018**
	0.75	0.973±0.035***
	1.00	1.060±0.124***
	2.50	1.004±0.111***
	5.00	0.870±0.026*
甲基补骨脂黄酮组	0	0.699±0.034
	0.10	0.787±0.049
	0.25	0.930±0.037***
	0.50	0.985±0.058***
	0.75	0.994±0.050***
	1.00	1.013±0.058***
	2.50	0.962±0.016***
	5.00	0.859±0.025**

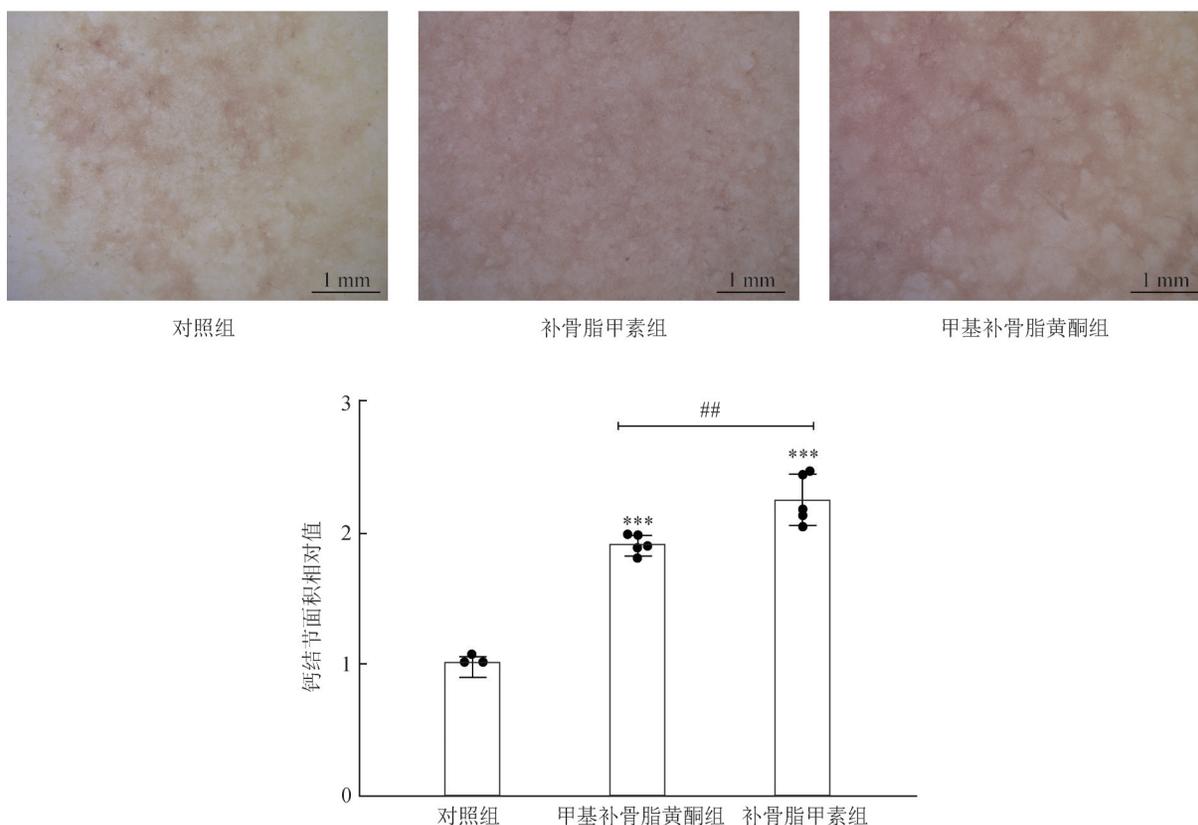
注:与 $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

3.10.2 茜素红染色结果 诱导培养14 d时,对照组细胞的钙化结节明显较少,而且不够成熟,茜素红染色着色较浅,补骨脂甲素组和甲基补骨脂黄酮组形成较多的成熟钙化结节,着色较深,其中补骨脂甲素组的钙化结节最多(图9)。

3.10.3 qRT-PCR检测结果分析 *Runx2* (*Cbfa1*)是runt域基因家族的一员,通过增加*Osx*、*OC*和骨唾液酸蛋白(*BSP*)基因的表达来控制骨骼发育和成骨细胞分化,补骨脂甲素组*Runx2*蛋白转录水平较对照组显著上调($P<0.001$);网络药理学分析结果中,2个化合物的结合靶点PPARG的转录水平结果显示,补骨脂甲素组较对照组显著上调($P<0.01$);甲基补骨脂黄酮显著上调骨形态发生蛋白2(*BMP-2*)的mRNA表达($P<0.001$);AMPK的激活主要通过AMPK α 亚基内的Thr-172磷酸化^[20-21],药物对于AMPK的影响包括对其表达水平的上调以及对其磷酸化水平的促进,本研究结果表明,AMPK在给药组的表达水平差异无统计学意义,提示可能通过增加AMPK的磷酸化来调控成骨(表5)。

4 讨论

在本研究中,结合对补骨脂水提取物的定性分析及网络药理学筛选预测AMPK信号通路为补骨脂治疗OP的核心通路。已有多篇文献报道,PPARG作为AMPK的上游靶点可以起到激活AMPK信号通路的作用^[22-24]。也有研究表明,AMPK对于成骨具有促进作用,骨细胞分化受各种激素、细胞因子和多种转录因子的严格调控^[25-30]。骨形态发生蛋白(*BMP*)是多功能蛋白,在胚胎发生、细胞生长和分化、骨骼发育和骨折修复的各种细胞功能中发挥重要作用。AMPK的激活可以诱导*BMP2*的表达,增加骨量,改善骨质量。在成骨细胞中,*BMP*信号由2种类型的丝氨酸-苏氨酸激酶受体(I型和II型)转导,其激活Smad1/5/8的磷酸化。复合物可以与Smad4一起转移到细胞核中并激活目标基因*Distal-less homeobox 5* (*Dlx5*)的转录。*Dlx5*是一种骨诱导同源结构域转录因子,受*BMP2*、*BMP*受体组成型活性形式的过表达、Smad1和/或Smad5的过表达调节。*Dlx5*基因缺陷小鼠表现出严重的颅面异常、颅骨骨化延迟和成骨异常。*Dlx5*的过表达导致几种成骨细胞标志物的表达并加速成骨细胞分化。*Dlx5*表达的敲低抑制*BMP2*诱导的*Runx2*、*osterix* (*Osx*)和骨钙素(*OC*)表达,其中*Runx2*是runt域基因家族的一员,通过增加*Osx*、*OC*和骨唾液酸蛋白(*BSP*)基因的表达来控制骨骼发育和成骨细胞分化。此外,*Runx2*在体外诱导间充质细胞和成骨细



注：与对照组比较，*** $P < 0.001$ ；与甲基补骨脂黄酮组比较，## $P < 0.01$ 。

图9 药物促成骨作用染色结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表5 药物对成骨相关基因的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Runx2	β -catenin	AMPK α
对照组	1.000 ± 0.031	1.002 ± 0.066	1.012 ± 0.152
补骨脂甲素组	2.084 ± 0.122***	1.230 ± 0.109	1.219 ± 0.105
甲基补骨脂黄酮组	0.633 ± 0.060**	0.853 ± 0.085	1.129 ± 0.059

组别	BMP-2	PPARG	mTOR
对照组	1.024 ± 0.219	1.007 ± 0.119	1.006 ± 0.148
补骨脂甲素组	1.946 ± 0.137	1.560 ± 0.049**	1.162 ± 0.186
甲基补骨脂黄酮组	15.310 ± 2.259***	1.189 ± 0.081	1.100 ± 0.193

注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ 。

胞中的碱性磷酸酶 (ALP) 活性、骨基质蛋白基因的表达和基质矿化。人参皂苷 Rd 以浓度依赖性方式诱导 BMP-2 的 mRNA 表达并且导致相应蛋白质分泌到培养基中，磷酸化 AMPK (pAMPK) 的水平也被 Rd 以时间和浓度依赖性方式上调。Rd 还可以诱导 Smad1/5 的磷酸化水平，并且当用靶向 Smad4 的 siRNA 转染细胞时这种作用被阻断，表明 Smad1/5 必须与 Smad4 形成复合物才能转位到细胞核中并调节成骨基因的转录。综上，AMPK 的激活通过调节成骨转录因子 Smad1/5/8、Dlx5 和 Runx2 来刺激成骨

细胞分化^[25-27]。AMPK 还可以磷酸化 β -连环蛋白 Ser552 残基， β -连环蛋白的这个位点的磷酸化增强了其稳定性和转录活性， β -连环蛋白在细胞核中积累并与淋巴样增强因子 (LEF) / T 细胞因子 (TCF) 转录因子结合，LEF/TCF 转录因子的激活则促进成骨特异性基因的表达^[28-30]。总机制见图 10。

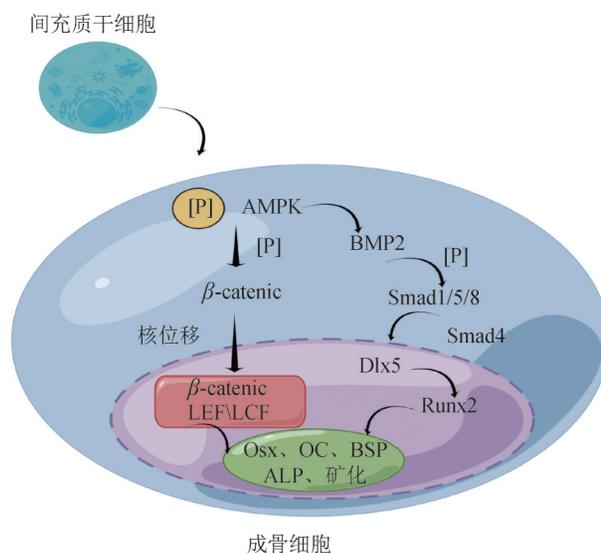


图10 AMPK 信号通路调控成骨细胞成骨机制

本研究通过分子对接实验及体外细胞实验,初步验证了补骨脂甲素和甲基补骨脂黄酮在 AMPK 相关通路上对 AMPK、PPARG、Runx2、 β -catenin、BMP-2、m-TOR 几种关键基因的影响,为补骨脂治疗 OP 的分子机制研究提供了依据,也为补骨脂甲素和甲基补骨脂黄酮的成药性研究提供了参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] ZENG Q, LI N, WANG Q Q, et al. The prevalence of osteoporosis in China, a nationwide, multicenter DXA survey[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(10):1789-1797.
- [2] 朱洁云,高敏,宋秋韵,等. 中国老年人骨质疏松症患病率的 Meta 分析[J]. 中国全科医学, 2022, 25(3): 346-353.
- [3] 彭永德. 骨质疏松症的药物治疗进展[J]. 中国临床保健杂志, 2022, 25(1):17-21.
- [4] 刘宇航,王建华. 骨质疏松症的药物治疗进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2021, 42(9):792-795.
- [5] 张润云,倪青,张新菊,等. 骨质疏松症中医药防治研究浅析[J]. 中国临床保健杂志, 2022, 25(1):34-36.
- [6] 刘佩,梁润英. 中医药防治原发性骨质疏松症研究进展[J]. 中医学报, 2022, 37(10):2122-2130.
- [7] 韩利文,陈善军,董榕,等. 网络药理学在中药复杂作用模式研究中的应用进展[J]. 山东科学, 2021, 34(6): 22-31.
- [8] 庄延双,蔡宝昌,张自力. 网络药理学在中药研究中的应用进展[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1):156-160.
- [9] LUAN L J, SHEN X Y, LIU X S, et al. Qualitative analysis of Psoraleae Fructus by HPLC-DAD/TOF-MS fingerprint and quantitative analysis of multiple components by single marker[J]. Biomed Chromatogr, 2018, 32(2):4059.
- [10] YAN D M, CHANG Y X, KANG L Y, et al. Quality Evaluation and Regional Analysis of Psoraleae Fructus by HPLC-DAD-MS/MS plus Chemometrics [J]. Chin Herb Med, 2010, 2(3):216-223.
- [11] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54:1. 30. 1-1. 30. 33.
- [12] 张洁,谭初兵,徐为人. Lipinski 五规则的研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(6):451-455.
- [13] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1):W357-W364.
- [14] JAGHOORI M M, BLEIJLEVENS B, OLABARRIAGA S D. 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening[J]. J Comput Aided Mol Des, 2016, 30(3): 237-249.
- [15] 邵佳乐,周建,李志忠,等. 雌激素受体信号通路与骨质疏松症相关性的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(8):956-960.
- [16] COSTA V, RAIMONDI L, CONIGLIARO A, et al. Hypoxia-inducible factor 1A may regulate the commitment of mesenchymal stromal cells toward angiogenesis by mirna-675-5P[J]. Cytotherapy, 2017, 19(12):1412-1425.
- [17] MIYAUCHI Y, SATO Y, KOBAYASHI T, et al. HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(41):16568-16573.
- [18] 李钺,谢炜星,晋大祥,等. 激活 AMPK 保护氧化应激条件下成骨细胞的作用机制[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(3):407-410.
- [19] HSIN K Y, GHOSH S, KITANO H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. PLoS ONE, 2013, 8(12): e83922.
- [20] 张宸崧,王子涵,陈燕雯,等. 单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK):能量、葡萄糖感受器和代谢性疾病治疗靶标[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2022, 61(3): 325-345.
- [21] HAWLEY S A, PAN D A, MUSTARD K J, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase[J]. Cell Metab, 2005, 2(1):9-19.
- [22] HE S M, HE S Q, CHEN Y K, et al. Beta-sitosterol modulates the migration of vascular smooth muscle cells via the PPARG/AMPK/mTOR pathway [J]. Pharmacology, 2022, 107(9/10):495-509.
- [23] CHEN G H, LUO Z, HOGSTRAND C, et al. SREBP1, PPARG and AMPK pathways mediated the Cu-induced change in intestinal lipogenesis and lipid transport of yellow catfish Pelteobagrus fulvidraco [J]. Food Chem, 2018, 269:595-602.
- [24] SHEN J, LIU Y P, WANG Q, et al. Integrated network pharmacology, transcriptomics, and metabolomics analysis to reveal the mechanism of salt *Eucommiae cortex* in the treatment of chronic kidney disease mineral

- bone disorders via the PPAR γ /AMPK signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 314:116590.
- [25] KANAZAWA I, TAKENO A, TANAKA K I, et al. Osteoblast AMP-activated protein kinase regulates postnatal skeletal development in male mice [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(2):597-608.
- [26] HUANG C Y, LEE C Y, CHEN M Y, et al. Adiponectin increases BMP-2 expression in osteoblasts via AdipoR receptor signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 224(2):475-483.
- [27] KIM D Y, PARK Y G, QUAN H Y, et al. Ginsenoside Rd stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells by activating AMP-activated protein kinase via the BMP-2 signaling pathway[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1):215-222.
- [28] JANG W G, KIM E J, LEE K N, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) positively regulates osteoblast differentiation via induction of Dlx5-dependent Runx2 expression in MC3T3E1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(4):1004-1009.
- [29] WANG D W, MA W P, WANG F, et al. Stimulation of Wnt/ β -catenin signaling to improve bone development by naringin via interacting with AMPK and Akt[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4):1563-1576.
- [30] ZHANG R R, OYAJOB I B O, HARRIS S E, et al. Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts [J]. *Bone*, 2013, 52(1):145-156.

(收稿日期: 2023-11-28 编辑: 田苗)