

· 基础研究 ·

右归丸抗骨质疏松症的中药化合物及靶点网络药理学作用机制

李敏¹, 史晓林², 许超², 吴连国², 何滨², 李琰华¹, 梁博程²

(1. 浙江中医药大学附属第二医院全科医学科, 浙江 杭州 310005; 2. 浙江中医药大学附属第二医院骨伤科, 浙江杭州 310005)

【摘要】 目的: 基于中药网络药理学分析右归丸抗骨质疏松症的中药化合物、靶点及其作用机制。方法: 通过中药综合数据库(traditional Chinese medicine integrated database, TCMID)检索右归丸中已知有效化合物; 使用中医药分子机制生物信息学分析工具(bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine, BATMAN-TCM)预测各中药化合物的作用靶点; 使用 DisGeNET 和人工文献阅读的方式获取骨质疏松症和骨重建相关靶点; 采用 Cytoscape 3.7.1 软件及其插件 BiNGO 和 ClueGO 对相关靶点进行 GO 基因注释和信号通路的富集分析; 并采用课题组基于血清蛋白质组学建立的绝经后骨质疏松症疾病模型中的 87 个差异表达蛋白对右归丸所有预测靶点进行验证。结果: 在右归丸 10 味中药中, 共检索到 392 个化合物, 分别是君药(附子、肉桂和鹿角胶)83 个, 臣药(熟地黄、山茱萸、枸杞和山药)127 个, 佐药(菟丝子、杜仲和当归)182 个。其中君药与臣药含有 4 个相同化合物, 君药与佐药含有 1 个相同化合物, 臣药与佐药 14 个含有相同化合物; 共鉴定到 2 112 个可信靶点, 其中君药 775 个, 臣药共 1 483 个, 佐药共 1 491 个; 共筛选出右归丸抗骨质疏松症的靶点 227 个, 主要参与代谢过程、细胞分化和生物学过程调控等 20 种生物学过程, 数据挖掘发现涉及骨重建、骨矿化等的生物学行为; 细胞作用位点分布主要包含 9 种细胞组成; 主要具有 13 种分子功能; KEGG 代谢通路富集分析显示, 共 137 个信号通路被显著富集, 其中, 经典破骨细胞分化信号通路和与绝经后骨质疏松症的密切相关的雌激素调控信号通路在 27 个信号通路功能组中广泛分布; 靶点验证, 共筛选出 FGA、AGT、P4HB、RAB7A、APOE 和 DKK3 共 6 个靶点。结论: (1)初步阐释和明确了右归丸多靶点、多系统相互协同治疗骨质疏松症的特点。(2)右归丸中附子、肉桂、山茱萸、山药、枸杞子、杜仲和当归所含 36 种化合物靶向 FGA、AGT、APOE、DKK3、P4HB 和 RAB7A 共 6 个靶点发挥抗绝经后骨质疏松症作用。

【关键词】 骨质疏松; 中药药理学; 中草药

中图分类号: R96

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2020.10.009

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Mechanism action of Chinese herbal compound and target network pharmacology of *Yougui* (YG) pill for the treatment of osteoporosis LI Min, SHI Xiao-lin, XU Chao, WU Lian-guo, HE Bin, LI Yan-hua, and LIANG Bo-cheng*. *Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore compounds, targets and mechanism of *Yougui* (YG) pill in treating osteoporosis based on systemic pharmacology of traditional Chinese medicine. **Methods:** The known effective Chinese herbal compound of YG pill was searched from traditional Chinese medicine integrated database (TCMID). Bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine (BATMAN-TCM) was used to predict target of components; DisGeNET and artificial literature reading were used to obtain targets of osteoporosis and bone remodeling; Cytoscape 3.7.1 software and its plug-ins BiNGO and ClueGO were used to enrich the GO annotation and pathways of the related targets, and validation of the predicted target of YG pill were validated by 87 differentially expressed proteins in postmenopausal osteoporosis and postmenopausal osteoporosis disease models in postmenopausal patients with normal bone mass from the previous serum proteomics data. **Results:** Totally 392 compounds were retrieved from YG pill, including 83 sovereign drugs (monkshood, cinnamon, deerhorn gelatin), 127 ministerial drugs (prepared rehmannia root, dogwood, wolfberry fruit and Chinese yam) and 182 supplementary drugs

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 81803902); 浙江省中医药科学研究基金计划(编号: 2019ZQ026, 2016ZA102); 浙江中医药大学科研基金(编号: 2018ZD05)

Fund program: National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation Project (No. 81803902)

通讯作者: 梁博程 E-mail: lbocheng@163.com

Corresponding author: LIANG Bo-cheng E-mail: lbocheng@163.com

(*Cuscuta chinensis*, *Eucommia ulmoides* and *Chinese angelica*). Among them, there were 4 same compounds between sovereign drug and ministerial drug, 1 same compound between sovereign drug and supplementary drug, and 14 same compounds between ministerial drug and supplementary drug. Totally 2 112 trusted targets were identified, included 775 sovereign drugs, 1 483 ministerial drugs and 1 491 supplementary drugs; 227 targets were selected from YG pill for treating osteoporosis, which participate in nearly 20 process of metabolic process, cell differentiation and biology, and data mining revealed that the process involved bone remodeling and bone mineralization. Acting site of cell mainly included 9 kinds of cell which had 13 molecular function. Results of KEGG metabolic pathway enrichment analysis showed 137 signal passages were obviously enriched. Among them, classical osteoclast differentiation signal passages and relative estrogen regulates signaling pathways of menopause were widely distributed in 27 signal passages. Six targets were screened by target validation, such as AGT, FGA, APOE, DKK3, P4HB and RAB7A. **Conclusion:** The characteristics of multi-targets and multi-pathways of YG pill for the treatment of osteoporosis were clarified, which provided a clear direction for the in-depth research. The pharmacodynamic components of YG pill include 36 compounds, and their main action targets include FGA, AGT, APOE, DKK3, P4HB and RAB7A.

KEYWORDS Osteoporosis; Pharmacology; Drugs, Chinese herbal

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种多发因素为病因的增龄性机体衰老性骨代谢疾病。研究发现, 老年人 OP 发生率为 36%, 且女性高于男性^[1]。目前, 治疗骨质疏松的西药短期临床疗效确切, 但是长期药物疗效及不良反应尚存在争议。中医防治骨质疏松需辨证施治, 对于骨质疏松症肾阳虚证, 推荐右归丸加减。但是, 由于右归丸复方讲求君臣佐使药物配伍, 且中药成分复杂多样的特点, 以前无法进行多靶点、协同性机制分析, 使得右归丸治疗 OP 的作用机制尚不明确。中药系统药理学是选取特定信号节点对复方药物进行多靶点分子机制分析的新学科。采用中药系统药理学方法, 使中药及复方的作用多靶点机制研究具有一定的可行性。本研究通过中药系统药理学探讨右归丸治疗 OP 的化合物和靶点及其分子作用机制, 为进一步研究右归丸治疗 OP 作用机制的实验及临床合理用药提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

右归丸 (君药: 附子、肉桂、鹿角胶; 臣药: 熟地黄、山茱萸、枸杞子、山药; 佐药: 菟丝子、杜仲和当归) 的药效成分 (所含化合物) 和靶点及其作用分子机制。

1.2 研究工具

中药综合数据库 (traditional Chinese medicine integrated database, TCMID)^[2], 用于获取右归丸中中药所含已知化合物; 中医药分子机制生物信息学分析工具 (a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine, BATMAN-TCM)^[3], 用于中药所含已知化合物的靶点预测; 疾病基因网络数据库 (DisGeNET)^[4], 使用 DisGeNET 和人工文献阅读的方式获取骨质疏松症和骨重建相关靶点; 网络可视化分析软件 Cytoscape 3.7.1 软件^[5] (<http://www.cytoscape.org/>), 构建化合物-靶点相互作用网络, 其中使用 BiNGO 插件^[6] 工具对相关

靶点进行 GO 基因注释富集分析和可视化, 使用 ClueGO 插件^[7] 工具进行 KEGG 功能、功能组和关键 KEGG 通路进行富集和分析; Venny 2.1 软件 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 用于构建相关靶点交叠韦恩图。

1.3 中药-化合物-靶点构建和作用机制构建分析流程

在 TCMID 数据库中确定右归丸中药, 进行归一化处理, 将右归丸中的 10 味中药在 BATMAN-TCM 数据库中进行检索, 导出其化合物成分, 经 Pubchem compound 数据库进行逐一的人工确认, 将右归丸 10 味草药对应化合物按配伍的君臣佐配伍关系输入 BATMAN 中的 3 个对应的检索框, 设置检索条件为: 得分 ≥ 20 , $P < 0.05$, 获取右归丸预测靶点。

1.4 靶点 GO 基因和 ClueGO 信号通路分析参数

靶点 GO 基因注释统计方法选择 Hypergeometric test 和 Benjamini and hochberg FDR correction; $P < 0.05$; GO 基因注释文件先后选择 GOSlim_GOA 和 GO_FULL, 生物族群选择: Homo Sapeins, ClueGO 插件版本为 2.5.3, ClueGO 信号通路分析选择功能性分析, 可视化风格选择 Groups 分类, KEGG 数据库更新时间为 2018.09.04, 选择 $P < 0.05$ 的信号通路进行分析。

2 结果

2.1 右归丸中药已知有效成分和靶点

对右归丸已知有效化合物检索, 共发现 392 个化合物, 分别是君药 (附子、肉桂和鹿角胶) 83 个、臣药 (熟地黄、山茱萸、枸杞和山药) 127 个和佐药 (菟丝子、杜仲和当归) 182 个。其中君药与臣药含有 4 个相同化合物、君药与佐药含有 1 个相同化合物, 臣药与佐药 14 个含有相同化合物 (图 1)。

对右归丸靶点预测, 共鉴定到 2 112 个可信靶点, 其中君药 775 个, 臣药共 1 483 个, 佐药共 1 491 个, 构建君臣佐药物预测靶点交叠韦恩图 (图 2)。

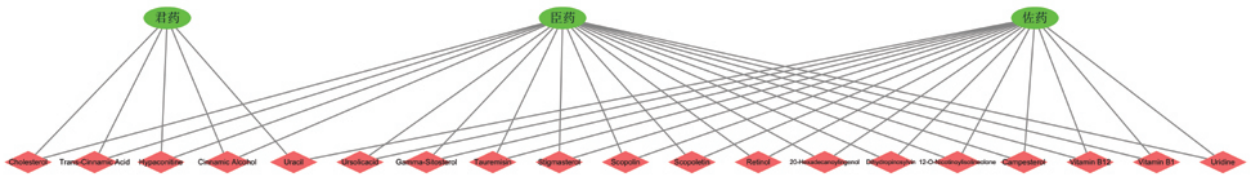
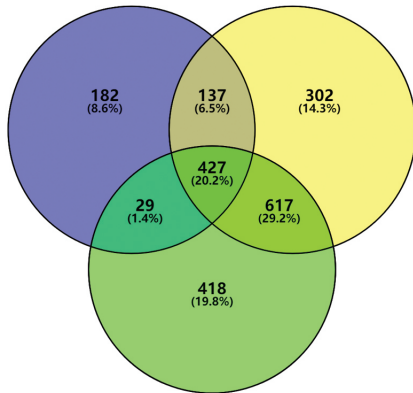


图 1 右归丸中中药-药效成分拓扑关系图

Fig.1 The relationships of between herbs and compounds in *Yougui* (YG) pill

君: 附子、肉桂和鹿角胶 臣: 熟地、山茱萸、枸杞子和山药



佐: 菟丝子、杜仲和当归

图 2 右归丸君臣佐药物预测靶点

Fig.2 Relationships of targets related to herbs in YG pill based on pharmacologic rule of traditional Chinese medicine

2.2 右归丸抗骨质疏松靶点筛选

首先, 利用 DisGeNET 数据库和人工文献阅读的方法对骨质疏松症的相关靶基因、蛋白进行查找, 经 UNIPROT 进行蛋白、基因名称统一转换, 共筛选到骨质疏松症已知相关靶点 687 个。

然后, 采用预测靶点与疾病已知靶点交叠的方法, 构建右归丸作用于骨质疏松症的靶点(图 3), 其中筛选出 ESR1、FAS、FGF23、IL6、INS、RAB7A、SMAD4、VDR、WNT4 等 227 个靶点。

2.3 227 个靶点的 GO 注释分析

通过对 227 个右归丸干预骨质疏松症的靶点进行 GO 基因功能注释, 发现这些靶点主要参与 20 种生物学过程; 细胞作用位点分布主要包含 9 种细胞组成; 主要具有 13 种分子功能(图 4)。同时基于详细的 GO 生物学过程分析, 发现 227 个靶点涉及到骨重建、骨化、骨骼发育、破骨细胞分化调控、成骨细胞分化调控、骨矿化调节等骨质疏松症直接相关的生物学行为的调控(图 5)。

2.4 227 个靶点的信号通路分析

基于 GlueGo 的右归丸抗 OP 作用靶点的 KEGG 代谢通路富集分析结果显示, 破骨细胞分化、雌激素信号通路为核心的 24 个功能组被显著富集, 共

右归丸预测靶点 骨质疏松症已知靶点

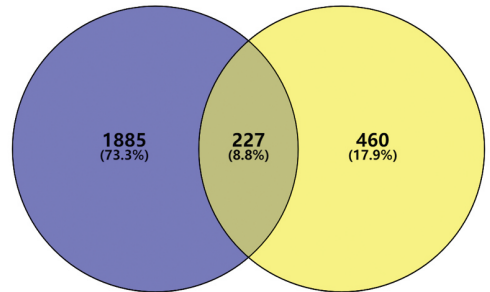


图 3 右归丸抗骨质疏松的靶点

Fig.3 Targets in YG pill for treating osteoporosis-related

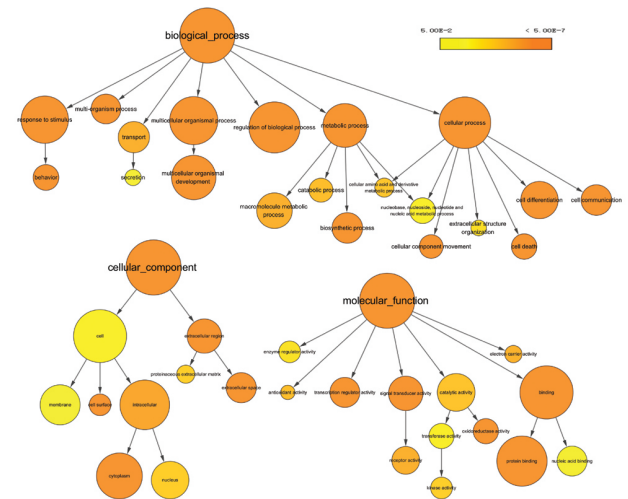


图 4 227 个靶点 GO 基因注释分析结果

Fig.4 Gene ontology of 227 anti-osteoporosis targets in YG pill

137 个信号通路被显著富集(图 6)。其中, 骨形成的经典破骨细胞分化信号通路和与绝经后骨质疏松症的密切相关的雌激素调控信号通路在 24 个功能组中广泛分布。该结果与 GO 功能注释的生物学行为结果一致。KEGG 代谢通路富集分析结果表明右归丸通过 227 个作用靶点经多达 137 个信号通路多靶点相互协调干预 OP 的作用机制。

2.5 靶点的临床验证和关键靶标筛选

为进一步验证已知化合物预测靶点的有效性, 选取我们课题组之前基于血清蛋白质组学绝经后骨质疏松症疾病模型获得的 87 个差异表达蛋白进行

其多靶点作用机制进行同时分析。

3.2 基于网络药理学的右归丸靶点及其功能分析

右归丸靶点的 GO 分析表明右归丸主要靶向 9 种细胞组成发挥作用,其靶点分子功能多样。生物学过程富集分析结果提示,其靶点涉及包括与骨质疏松症直接相关的骨重建,骨化,骨骼发育、破骨细胞分化调控,成骨细胞分化调控,骨矿化调节等多个生物过程。从右归丸靶点的 GO 生物学过程富集分析结果,发现右归丸还参与除骨重建外的大量生物学过程,为进一步研究其治疗骨质疏松症的多靶点、多系统协同调节的作用机制提供了思路 and 方向。

KEGG 信号通路分析结果显示,右归丸治疗骨质疏松症的 227 个靶点参与了 137 个显著富集的信号通路。其中破骨细胞分化、雌激素信号通路等骨代谢和骨免疫通路被显著富集,且信号通路间相互联系,关系密切。

3.3 基于骨质疏松临床蛋白质组学模型的右归丸关键靶点验证和筛选

靶点临床数据验证研究表明,FGA、AGT、APOE、DKK3、P4HB 和 RAB7A 6 个靶点被验证。其中拓扑网络结构显示 AGT 位于整个网络的核心,AGT 为血管紧张素原,其水平与雌激素有关,研究表明血管紧张素转换酶抑制剂的使用与较高的 BMD 有关,肾素-血管紧张素系统可通过 RANKL 诱导激活破骨细胞加速骨质疏松症^[10],对于其在右归丸抗骨松中的重要作用,值得进一步研究。同时,验证结果表明基于中药系统药理学的方法预测右归丸靶点及作用机制是可行的,同时提示 FGA、AGT、APOE、DKK3、P4HB 和 RAB7A 6 个靶点作为右归丸治疗绝经后 OP 的靶点或血清标志物。

综上所述,通过挖掘中药-化合物-靶点-功能分析-临床数据验证为研究中药复方提供了可行技术。本研究中,对右归丸物质基础、靶点及其作用机制的研究,初步明确了右归丸多靶点、多系统相互协同干预骨质疏松症的基础和数据支持。中药复方系统药理学作为新兴领域,虽然存在很多方面的局限性和问题,但其多靶点协同分析的能力,为解决中药复方多组分,多靶点的研究难题提供了可行的解决方案,通过对右归丸的多靶点机制分析为进一步研究

其治疗骨质疏松症提供了一定的研究基础和新思路。

参考文献

- [1] 马远征,王以朋,刘强,等. 中国老年骨质疏松诊疗指南(2018) [J]. 中国老年学杂志,2019,39(11):2557-2575.
MA YZ,WANG YP,LIU Q,et al. 2018 China guideline for the diagnosis and treatment of senile osteoporosis[J]. Zhongguo Lao Nian Xue Za Zhi,2019,39(11):2557-2575. Chinese.
- [2] Huang L,Xie D,Yu Y,et al. TCMID 2.0:a comprehensive resource for TCM[J]. Nucleic Acids Research,2018,46:D1117-D1120.
- [3] Liu Z,Guo F,Wang Y,et al. BATMAN-TCM:a Bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. Sci Rep,2016,6:21146.
- [4] Piñero J,Bravo À,Queralt-Rosinach N,et al. DisGeNET:a comprehensive platform integrating information on human disease associated genes and variants[J]. Nucleic Acids Res,2017,45(D1):D833-D839.
- [5] Franz M,Lopes CT,Huck G,et al. Cytoscape.js:a graph theory library for visualisation and analysis[J]. Bioinformatics,2016,32(2):309-311.
- [6] Maere S,Heymans K,Kuiper M. BiNGO:a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks[J]. Bioinformatics,2005,21(16):3448-3449.
- [7] Bindea G,Mlecnik B,Hackl H,et al. ClueGO:a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks[J]. Bioinformatics,2009,25(8):1091-1093.
- [8] 史晓林,梁博程,姚建亮,等. 基于 TMT 标记联合 LC-ESI-MS/MS 技术筛选绝经后骨质疏松症的血清分子标志物研究[J]. 中华骨科杂志,2015,35(10):1004-1010.
SHI XL,LIANG BC,YAO JL,et al. Serum protein biomarkers of postmenopausal osteoporosis based on TMT labeling and LC-ESI-MS/MS technology[J]. Zhonghua Gu Ke Za Zhi,2015,35(10):1004-1010. Chinese.
- [9] 张玉卓,任辉,江晓兵,等. 左归丸与右归丸对骨髓间质干细胞成骨分化的影响[J]. 中华中医药杂志,2018,33(5):1997-2001.
ZHANG YZ,REN H,JIANG XB,et al. Comparison of effects of Zuogui Pills and Yougui Pills on osteogenic differentiation of BMSCs [J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi,2018,33(5):1997-2001. Chinese.
- [10] 周峰,荣春,王恺,等. 培哚普利对兔糖皮质激素性骨质疏松症干预作用的实验研究[J]. 中国骨伤,2016,29(1):52-57.
ZHOU F,RONG C,WANG K,et al. Investigation on the role on perindopril for prevention and treatment of glucocorticoid induced osteoporosis in rabbits[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2016,29(1):52-57. Chinese with abstract in English.

(收稿日期:2019-08-19 本文编辑:李宜)