中图分类号：R969.3　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)10－0066－09
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.10.014

补中益气汤治疗骨质疏松症网络药理学研究*

齐晓艳[1]，寇祥伟[1]，吴亚东[2,3△]，范晓慧[1]，孙　敏[1]

（1. 山东省日照市人民医院，山东 日照　276826；2. 山东中医药大学，山东 济南　250014；3. 山东省日照市中医医院，山东 日照　276800）

摘要：目的　探讨补中益气汤治疗骨质疏松症（OP）的作用机制。**方法**　通过中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP）结合文献筛选补中益气汤的主要活性成分，通过SwissTargetPrediction数据库获得成分靶点。通过药物靶标数据库（TTD），DisGeNET、Drugbank、在线人类孟德尔遗传（OMIM）数据库及GeneCards数据库筛选疾病靶点。取共有靶点绘制韦恩图，借助String数据库绘制蛋白相互作用（PPI）网络图，并筛选核心靶点。共有靶点上传至Metascape数据库，进行基因本体论（GO）功能富集分析及京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析。采用Cytoscape 3.10软件构建“药物－靶点－通路”网络图。采用AutoDock 4.2.6软件对接核心靶点和成分分子，并通过PyMOL软件可视化。验证试验中，制备补中益气汤含药血清，CCK－8法检测0（空白对照），5%，10%，20%含药血清作用24，48 h时成骨细胞增殖率，流式细胞术检测上述含药血清对成骨细胞及肿瘤坏死因子－α（TNF－α）诱导的成骨细胞凋亡的影响。**结果**　获得活性成分163个、靶点210个，疾病靶点1 922个，共有靶点69个。PPI分析得到TNF、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶（AKT1）、白细胞介素6（IL－6）等17个核心靶点。GO富集显示，靶点作用过程主要集中在对激素反应、细胞迁移的正向调节、脂质反应、上皮细胞增殖调控、细胞群增殖负调控等过程；KEGG富集显示，晚期糖基化终末产物/糖基化终末产物受体（AGE/RAGE）、低氧诱导因子－1（HIF－1）、白细胞介素17（IL－17）、TNF－α信号通路可能为潜在靶点作用通路。药物－靶点－通路网络图显示各靶点通路互相联系，以槲皮素、山柰酚、柚皮素、川陈皮素、刺芒柄花素较明显。核心靶点与成分分子对接性能均良好。与体积分数为0时比较，10%补中益气汤含药血清作用48 h可明显促进成骨细胞增殖（$P<0.001$）。流式细胞术检测结果显示，10%含药血清可抑制成骨细胞及TNF－α诱导的成骨细胞凋亡（$P<0.05$），但对后者作用弱于AGE/RAGE抑制剂FPS－ZM1。**结论**　补中益气汤可能通过活性成分槲皮素、山柰酚、柚皮素、川陈皮素、刺芒柄花素作用于TNF－α、AKT1、IL－6、TP53、VEGFA等靶点，通过AGE－RAGE、HIF－1等通路改善骨质疏松。其中抑制AGE/RAGE通路介导的TNF－α水平降低进而减少成骨细胞凋亡可能是其主要机制之一。

关键词：补中益气汤；骨质疏松症；网络药理学；分子对接；作用机制

*基金项目：山东省自然科学基金创新发展联合基金项目[ZR2021LZY006]；山东省中医药科技项目[2020M166]。
第一作者：齐晓艳，女，硕士，副主任药师，研究方向为临床药学，（电子信箱）sdqxy2008@163.com。
△通信作者：吴亚东，男，副主任中医师，研究方向为中医骨伤科，（电子信箱）wydzy6677@163.com。

[20] LUO Y, CHEN J, KUAI L, et al. Chinese Herbal Medicine for Psoriasis: Evidence from 11 High－Quality Randomized Controlled Trials[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 599433.
[21] 陈亚丽，胡丹华，孙艳杰，等. 京万红软膏联合如意金黄散治疗老年皮肤溃疡的临床研究[J]. 现代药物与临床，2022，37(3)：572－575.
[22] 刘亚驹. 表皮生长因子和京万红软膏对皮肤损伤的临床疗效研究[D]. 广州：华南农业大学，2019.
[23] SAFDARPOUR S, EFTEKHARI Z, EIDI A, et al. Encapsulated saponin by ferritin nanoparticles attenuates the murine pneumococcal pneumonia [J]. Microb Pathog, 2022, 172: 105731.
[24] HUTAPEA TPH, MADURANI KA, SYAHPUTRA MY, et al. Albumin: source, preparation, determination, applications, and prospects [J]. Journal of Science: Advanced Materials and Devices, 2023, 8: 100549.
[25] 许秋桂，林裕锋，黎杨杨，等. 血清总胆固醇、白蛋白与胆碱酯酶联合检测在肝炎肝硬化患者中的诊断价值[J]. 中国当代医药，2023，30(5)：148－151.
[26] RAEESZADEH－SARMAZDEH M, DO LD, HRITZ BG. Metalloproteinases and their inhibitors: potential for the development of new therapeutics[J]. Cells, 2020, 9(5): 1313.
[27] QUINTERO－FABIÁN S, ARREOLA R, BECERRIL－VILLANUEVA E, et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2019, 9: 1370.
[28] 侯金秋，邹　楠，袁今奇，等. 左旋紫草素抑制NF－κB信号通路保护LPS/D－GalN诱导的小鼠急性肝损伤[J]. 中国药理学通报，2023，39(1)：130－138.
[29] 谢庆云. IL－17信号通路关键基因DNA甲基化在骨关节炎软骨炎症中的作用及机制研究[D]. 上海：第二军医大学，2017.
[30] 行　敏，任宏伟，屈慧明，等. 寻常型银屑病患者血清中IL－17的表达及紫草素对IL－17刺激HaCaT细胞分泌IL－6和IL－23的影响[J]. 吉林大学学报（医学版），2017，43(5)：958－962.
[31] 王文杰，白金叶，刘大培，等. 紫草素抗炎及对白三烯B_4生物合成的抑制作用[J]. 药学学报，1994(3)：161－165.
[32] 童文婷，何莲花. 紫草素通过MAPK1/MAPK通路对小鼠胶原诱导型关节炎中滑膜炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(22)：56－63.

（收稿日期：2023－12－14；修回日期：2024－12－09）

Mechanism of Buzhong Yiqi Decoction in the Treatment of Osteoporosis Based on Network Pharmacology

QI Xiaoyan[1], KOU Xiangwei[1], WU Yadong[2,3], FAN Xiaohui[1], SUN Min[1]

(1. People's Hospital of Rizhao, Rizhao, Shandong, China 276826; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong, China 250014; 3. Rizhao Traditional Chinese Medicine Hospital, Rizhao, Shandong, China 276800)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Buzhong Yiqi Decoction in the treatment of osteoporosis (OP). **Methods** The main active ingredients of Buzhong Yiqi decoction were screened by Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and literature review, obtained component targets through SwissTargetPrediction database. Screened disease targets through Therapeutic Target Database (TTD), DisGeNET, Drugbank, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), GeneCards databases. The Venn diagram was drawn to screen common targets, the protein - protein interaction (PPI) network diagram was draw by String database, and then screened for core targets. Uploaded common targets to the Metascape database for Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. A drug - target - pathway network diagram was constructed by the Cytoscape 3.10 software. Core targets and component molecules were docked by AutoDock 4.2.6 software, and visualized by PyMOL software. Prepared the Buzhong Yiqi Decoction mediceted serum in the validation experiment, and the proliferation rate of osteoblasts was detected by CCK - 8 method after 24 and 48 hours of treatment with 0 (blank control), 5%, 10%, and 20% medicated serum. The effect of the above medicated serums on osteoblasts and tumor necrosis factor - α (TNF - α) - induced apoptosis of osteoblasts was detected by flow cytometry. **Results** A total of 163 active components, 210 drug targets and 1 922 disease targets, with 69 common targets were obtained. PPI analysis identified 17 core targets, including TNF, serine threonine protein kinase (AKT1), and interleukin - 6 (IL - 6), etc. GO enrichment showed that the target action process mainly focused on the positive regulation of hormone response, positive regulation of cell migration, lipid response, epithelial cell proliferation regulation, and negative regulation of cell population proliferation; while KEGG enrichment showed signaling pathways of advanced glycation endproducts / receptor of advanced glycation endproducts (AGE / RAGE), hypoxia inducible factor - 1 (HIF - 1), interleukin - 17 (IL - 17), and TNF - α might be potential target pathways. The drug - target - pathway internet diagram showed that each target pathway was interconnected, with quercetin, kaempferol, naringenin, naringenin, and formononetin being more prominent. The docking performance between the core target and component molecules was good. Compared with those which had a volume fraction of 0, the 10% Buzhong Yiqi Decoction medicated serum could significantly promote osteoblast proliferation after 48 hours of treatment ($P < 0.001$). The results of flow cytometry detection showed that 10 % madicated serum could inhibit osteoblast and TNF - α - induced osteoblast apoptosis ($P < 0.05$), but its effect on the latter one was weaker than that of the late glycation pathway (AGE / RAGE) inhibitor FPS - ZM1. **Conclusion** Buzhong Yiqi Decoction may act on targets such as TNF - α, AKT1, IL - 6, TP53, and VEGFA through active ingredients such as quercetin, kaempferol, naringenin, nobiletin, and formononetin, and improve osteoporosis through pathways such as AGE / RAGE and HIF - 1. One of the main mechanisms may be the inhibition of the AGE / RAGE pathway mediated decrease in TNF - α levels, leading to a reduction in osteoblast apoptosis.

Key words: Buzhong Yiqi Decoction; osteoporosis; network pharmacology; molecular docking; mechanism

骨质疏松症属慢性进展性疾病，目前已成为全球面临的严峻公共卫生问题，最新流行病学资料显示，我国65岁及以上人口骨质疏松患病率达32%[1]，由此带来的高致残率、高致死率[2]给患者家庭和社会带来沉重负担。中医认为，该病病机为“脾肾亏虚，骨削肉减，髓空骨枯”，脾胃生化无力是其主要发病原因，健脾益气法亦为目前该病的经典治法。补中益气汤出自金代李杲《内外伤辨惑论》，有补中益气、升阳举陷功效。研究显示，该方治疗绝经后[3]、老年性[4]及糖尿病性[5]骨质疏松症临床效果较好。本课题组前期研究中发现，补中益气汤可改善骨质疏松症患者的骨代谢及骨密度[6]，但临床机制尚不明确，也未见相关网络药理学研究。鉴于此，本研究中对补中益气汤治疗骨质疏松症的机制进行了网络药理学研究，并通过实验验证，以为临床应用提供一定参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 活性成分与靶点收集

在中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP，https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php）检索黄芪、白术、陈皮、升麻、柴胡、人参、甘草、当归，限定口服生物利用度（OB）≥30%、药物相似性（DL）≥0.18筛选活性成分，并查询CNKI、万方、CBM数据库自建库起至2023年12月相关文献确定补中益气汤主要活性成分。在Pubchem网站（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）及Openbabel软件获取活性成分的Smiles号，然后在SwissTargetPrediction数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/）根据Smiles号查找成分靶点，筛选可能性≥0.2的靶点。在Uniprot数据库（https://www.uni-

prot. org/)设定物种名称为“Human”，下载靶点，将补中益气汤作用靶点转换为标准基因名称。

1.2 疾病与成分共有靶点获取

在药物靶标数据库TTD(https://db.idrblab.net/ttd/)、DisGeNET(https://www.disgenet.org/)、Drugbank(https://go.drugbank.com/)、在线人类孟德尔遗传OMIM(http://www.omim.org/)、GeneCards(https://www.genecards.org/)数据库中以“osteoporosis”为检索关键词检索、去重后获得疾病靶点。将成分和疾病靶点上传到微生信平台绘制维恩图，获取成分与疾病的共有靶点。

1.3 蛋白相互作用(PPI)网络构建与核心靶点筛选

将共有靶点上传至STRING数据库，物种设为“Homo sapiens”，默认最高置信度>0.4，隐藏游离节点，导出TSV文件，后导入Cytoscape 3.10软件，绘制PPI网络图。运行Cytoscape中的Centiscape插件，根据度(degree)、紧密度(closeness)、介数中心性(betweeness)筛选核心靶点。

1.4 富集分析

将共有靶点去除PPI网络中孤立点后上传至Metascape进行基因本体论功能(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。其中GO功能富集分生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)3部分；并对KEGG排名前20的信号通路可视化绘制气泡图。

1.5 成分-靶点-通路可视化

根据有效成分、共有靶点、KEGG前20条关键信号通路，分别建立网络文件和属性文件。药材用药名缩写、每种药材成分用药材缩写加编号表示，共有成分使用统一编号，A1、A2、A3、A4为黄芪、甘草共有，B1为黄芪、白术共有，C1、C2为黄芪、甘草、柴胡共有，D1为黄芪、甘草、柴胡、人参共有，E1为陈皮、甘草、升麻共有，F1为陈皮、甘草共有，G1为人参、当归、升麻、柴胡共有，H1为人参、当归共有。数据导入Cytoscape 3.10软件，基因设置为菱形呈矩形分布，药物设置为正方形，中药成分设置为圆形并以药物为中心呈圆形分布，通路设置成三角形，构建“药物-成分-靶点-通路”网络图。

1.6 分子对接验证

在Pubchem网站检索核心成分的3D结构，通过PyMOL软件加全氢键(H)并设为配体。从PDB库筛选核心靶点的蛋白晶体结构，通过PyMOL软件去除水和溶剂分子，加全H并设为受体。AutoDock 4.2.6软件进行半柔性对接，对成分和靶点进行分子对接分析，然后采用PyMOL软件进行分子对接可视化。

1.7 体外实验验证

1.7.1 材料

仪器：Thermo 311型CO_2培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)；BioTek Cytation型全波长酶标仪(美国BioTek公司)；Beckman CytoFLEX S型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)。

试药：CCK-8试剂盒(批号为FC0720)、流式细胞凋亡试剂盒(批号为ES-AP001/100)，均购自上海奕杉科技有限公司；TNF-α(美国PeproTech公司，批号为061454-1)；FPS-ZM1(上海奥默生物技术有限公司，批号为abs810156)；胎牛血清(FBS，北京利维宁生物科技，批号为11011-8611)；补中益气汤(组方，黄芪15 g，白术、甘草各9 g，人参、陈皮、升麻、柴胡各6 g，当归3 g)购于日照市中医医院。

动物：SPF级SD大鼠，雄性，8周龄，购自济南朋悦实验动物繁育有限公司，合格证号370726221101102416。本实验经山东中医药大学实验动物福利伦理审查(批准文号：SDUTCM20221007001)。

细胞株：鼠成骨细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司，批号为CL-0710)，用含5% FBS的α-MEM培养液培养。

1.7.2 含药血清制备

补中益气汤质量浓度为1 g/mL。大鼠分2组，各5只，分别灌胃等体积生理盐水或补中益气汤(每天1 mL)，连续7 d，末次灌胃1 h后，麻醉大鼠，于鼠腹主动脉采血，置无菌管静置30 min，3 500 r/min离心30 min，取上清液，56 ℃水浴箱灭活30 min，经0.22 μm微孔滤器滤过，取续滤液，即得。

1.7.3 检测指标

成骨细胞增殖能力：采用CCK-8法。取对数生长期细胞，按2×10^3个/孔密度铺于96孔板，贴壁后加入体积分数分别为20%，15%，10%，5%，0(空白对照)的补中益气汤含药血清。作用24 h、48 h后于450 nm波长处检测光密度(OD)值。

成骨细胞凋亡情况：采用流式细胞术。1)实验分为空白1组、空白血清1组、含药血清1组，取对数生长期细胞，按5×10^4个/孔密度铺于96孔板，分别加入培养液、生理盐水血清或10%含药血清干预48 h，消化细胞悬液1 mL，冷PBS洗涤，4 ℃下、600 *g*离心3~4 min，加入100 μL PBS液悬浮细胞，加入JC-1工作液，37 ℃孵育20 min，4 ℃下、600 *g*离心3~4 min，加入JC-1缓冲液，沉淀细胞，去除缓冲液，检测成骨细胞凋亡情况。

2)实验分为空白2组、模型组、含药血清2组、FPS-ZM1组、FPS-ZM1+含药血清组。TNF-α质量浓度为15 ng/mL，FPS-ZM1浓度为0.5 mmol/L。

1.8 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行可视化及分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示，多组间比较用单因素方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活性成分及靶点

共获得补中益气汤活性成分 163 个，靶点 210 个。其中槲皮素（黄芪、甘草、柴胡共有成分）、山柰酚（黄芪、甘草、柴胡、人参共有）、柚皮素（陈皮、甘草共有）、7－*O*－甲基异木豆醇（黄芪独有）、7－甲氧基－2－甲基异黄酮（甘草独有）、β－谷甾醇（人参、当归共有）等为补中益气汤的主要成分。主要成分基本信息详见表 1。

2.2 成分与疾病共有靶点

在 TTD、DisGeNET、Drugbank、OMIM、GeneCards 数据库分别获得疾病靶点 33，308，343，45，1 644 个，去重后得 1 922 个，成分靶点 210 个，取交集，得共有靶点 69 个，即为补中益气汤治疗骨质疏松症的潜在靶点。维恩图见图 1。

2.3 PPI 网络及核心靶点筛选

PPI 网络图（见图 2）包含 68 个节点、1 010 条边。筛选出 TNF、AKT1、IL－6、TP53、VEGFA、IL1B、EGFR、PTGS2、PPARG、MAPK3、STAT3、MMP9、ESR1、CXCL8、MYC、ADIPOQ、HMOX1，共 17 个核心靶点。

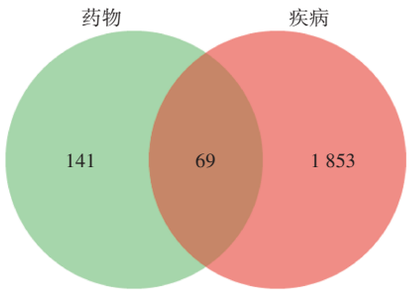


图 1 维恩图

Fig. 1 Venn diagram

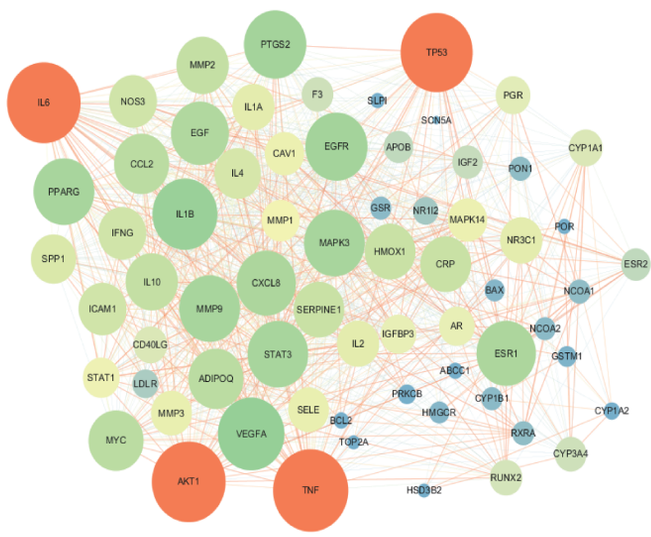


图 2 PPI 网络图

Fig. 2 Protein－protein interaction network diagram

表 1 补中益气汤主要成分基本信息

Tab. 1 Basic information of main components of Buzhong Yiqi Decoction

药材	MOL ID	标记	化合物名称	OB(%)	DL	药材	MOL ID	标记	化合物名称	OB(%)	DL
黄芪/甘草/柴胡	MOL000098	C2	quercetin	46.43	0.28	甘草	MOL000500	GC2	vestitol	74.66	0.21
黄芪/甘草/柴胡/人参	MOL000422	D1	kaempferol	41.88	0.24	人参	MOL000787	RS1	fumarine	59.26	0.83
陈皮/甘草	MOL004328	F1	naringenin	59.29	0.21	甘草	MOL004974	GC60	3′－methoxyglabridin	46.16	0.57
黄芪	MOL000378	HQ3	7－*O*－methylisomucronulatol	74.69	0.30	甘草	MOL004835	GC22	glypallichalcone	61.60	0.19
甘草	MOL003896	GC8	7－methoxy－2－methyl isoflavone	42.56	0.20	黄芪	MOL000371	HQ2	3,9－di－*O*－methylnissolin	53.74	0.48
						甘草	MOL004966	GC59	3′－hydroxy－4′－*O*－methylglabridin	43.71	0.57
人参/当归	MOL000358	H1	beta－sitosterol	36.91	0.75						
人参/当归/升麻/柴胡	MOL000449	G1	stigmasterol	43.83	0.76	甘草	MOL004959	GC57	1－methoxyphaseollidin	69.98	0.64
黄芪/甘草	MOL000392	A3	formononetin	69.67	0.21	甘草	MOL004908	GC43	glabridin	53.25	0.47
甘草	MOL000497	GC1	licochalcone a	40.79	0.29	黄芪	MOL000380	HQ5	(6*aR*,11*aR*)－9,10－dimethoxy－6*a*,11*a*－dihydro－6H－benzofurano[3,2－c]chromen－3－ol	64.26	0.42
陈皮	MOL005828	CP3	nobiletin	61.67	0.52						
黄芪/甘草/柴胡	MOL000354	C1	isorhamnetin	49.60	0.31	甘草	MOL004957	GC56	HMO	38.37	0.21
甘草	MOL004978	GC61	2－[(3*R*)－8,8－dimethyl－3,4－dihydro－2H－pyrano[6,5－f]chromen－3－yl]－5－methoxyphenol	36.21	0.52	甘草	MOL004991	GC67	7－acetoxy－2－methylisoflavone	38.92	0.26
						甘草	MOL004833	GC21	phaseolinisoflavan	41.61	0.42
						甘草	MOL005007	GC73	glyasperins M	72.67	0.59
甘草	MOL004891	GC38	shinpterocarpin	80.30	0.73	黄芪	MOL000296	HQ1	hederagenin	36.91	0.75
甘草	MOL002565	GC6	medicarpin	49.22	0.34	甘草	MOL004820	GC16	kanzonols W	50.48	0.52
甘草	MOL005003	GC72	licoagrocarpin	58.81	0.58						

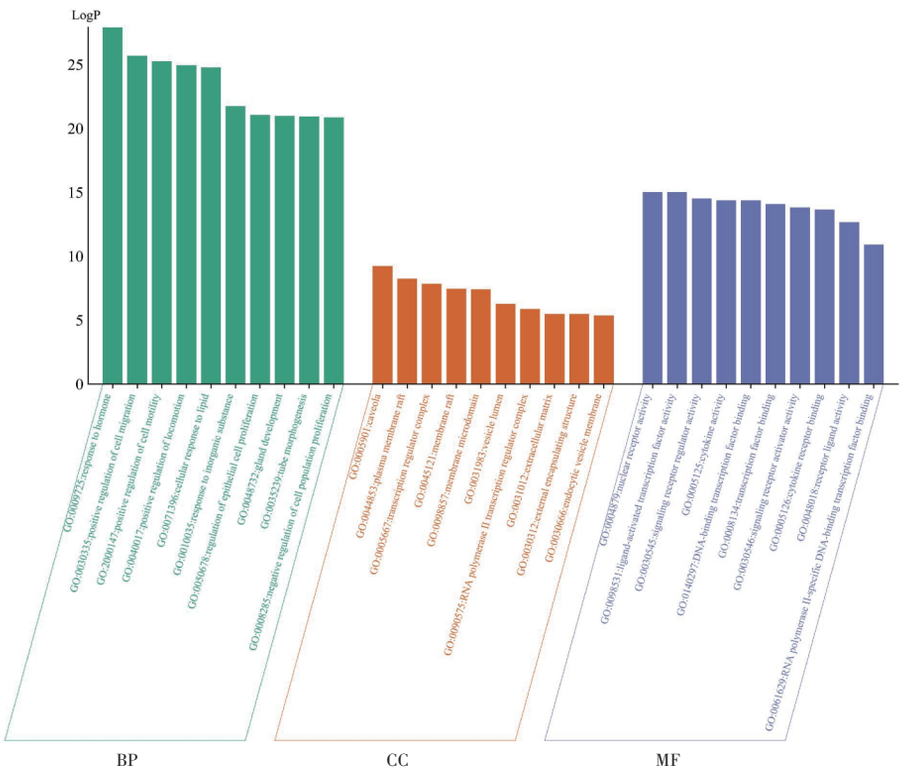


图 3 GO 功能富集柱状图

Fig. 3 GO function enrichment bar charts

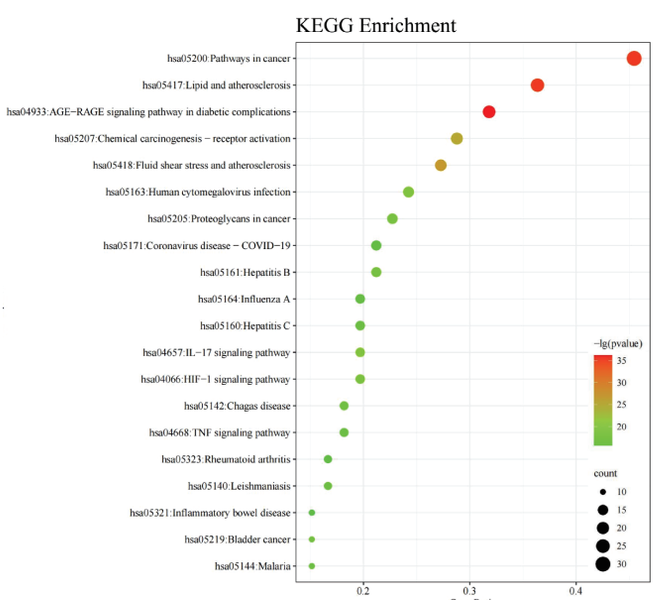


图 4 KEGG 通路富集气泡图

Fig. 4 KEGG pathway enrichment bubble charts

2.4 富集分析

GO 富集显示，靶点作用过程主要集中在对激素反应、细胞迁移的正向调节、脂质的反应、上皮细胞增殖调控、细胞群增殖负调控等过程。详见图 3。KEGG 通路富集分析获得 158 条信号通路（见图 4），提示癌症信号途径、血脂和动脉粥样硬化通路、晚期糖基化终末产物 / 糖基化终末产物受体（AGE / RAGE）信号通路、化学致癌 - 受体激活通路、低氧诱导因子 - 1（HIF - 1）信号通路、癌症中的蛋白聚糖、IL - 17、TNF、类风湿关节炎信号通路可能是潜在靶点干预骨质疏松的可能通路。

2.5 药物 - 靶点 - 通路网络

网络中共有 229 个节点，1 118 条边，其中 8 个药材节点、133 个活性成分节点、68 个蛋白节点、20 个通路节点。详见图 5。各成分靶点通路间互相联系，表明补中益气汤多成分、多靶点、多通路的作用特点。成分中槲皮素、山柰酚、柚皮素、川陈皮素、刺芒柄花素连接边数较多，提示可能为补中益气汤发挥作用的核心成分。

2.6 分子对接结果

对补中益气汤度值排名前 5 的核心成分槲皮素、山柰酚、柚皮素、川陈皮素、刺芒柄花素分别与排名前 5 的核心靶点 TNF、AKT1、IL - 6、TP53、VEGFR 进行分子对接，结果显示，对接性能均良好（结合能 < 5 kJ / mol）。其中 TNF 与川陈皮素在 ARG - 32、TYR - A1、VAL - 150、GLN - 149、ALA - 18 处，与刺芒柄花素在 GLY - 148、VAL - 150 处形成氢键，AKT 与刺芒柄花素在 ARG - 48 处形成氢键，因此结合力最强。分子对接结果见图 6、图 7。

2.7 体外实验结果

对成骨细胞增殖作用的影响：在 0 ~ 10% 体积分数范围内，随着补中益气汤体积分数逐渐升高，成骨细胞增殖率也随之升高，在 10%~20% 范围内变化趋势则相反。详见图 8。

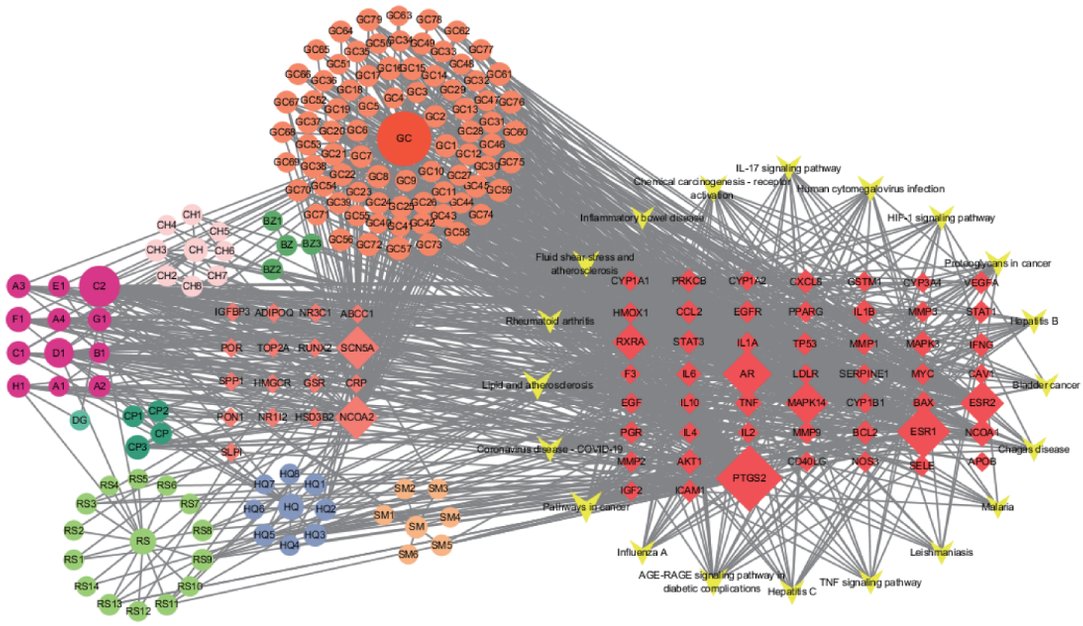
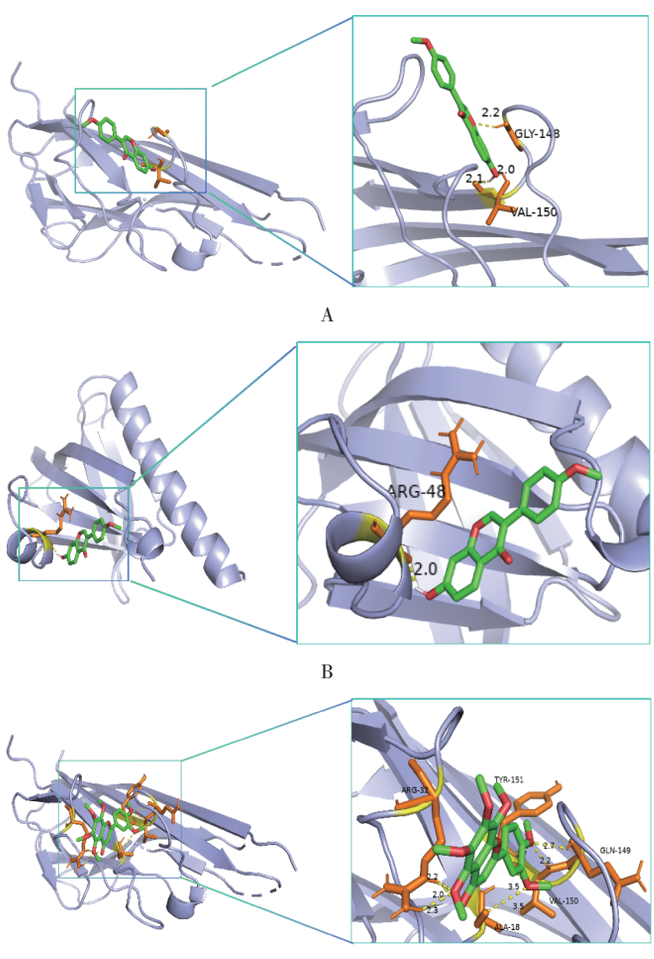


图 5　补中益气汤药物 – 靶点 – 通路网络图

Fig. 5　Drug – target – pathway internet network of Buzhong Yiqi Decoction



A. TNF – 刺芒柄花素　B. AKT – 刺芒柄花素　C. TNF – 陈皮素

图 6　分子对接模式图

A. TNF and formononetin　B. AKT and formononetin　C. TNF and nobiletin

Fig. 6　Molecular docking mode diagrams

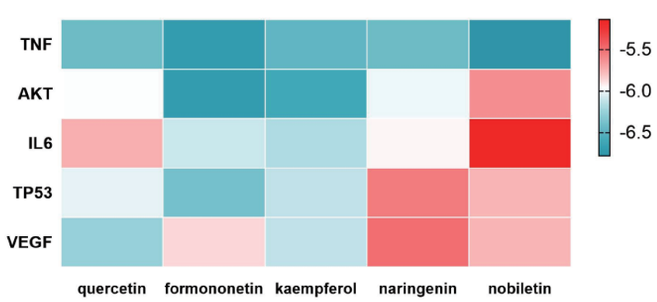
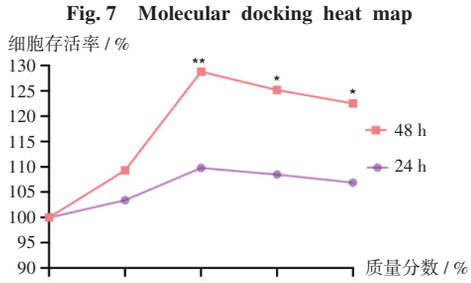


图 7　分子对接热图

Fig. 7　Molecular docking heat map



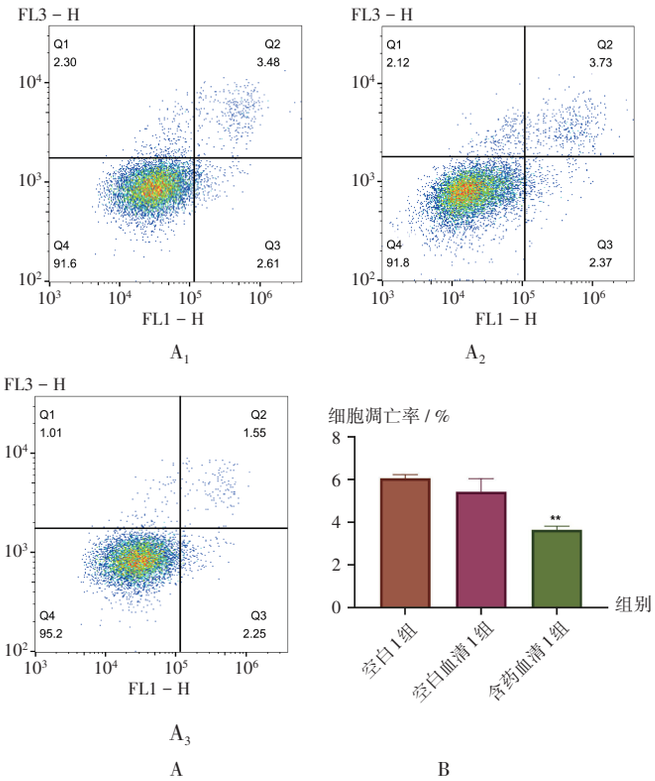
注：与体积分数为 0 时比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图 8　补中益气汤对成骨细胞存活率影响

Note: Compared with those that had a volume fraction of 0, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 8　Effect of Buzhong Yiqi Decoction on the survival of osteoblast

对成骨细胞凋亡的影响：用 10% 含药血清处理细胞 48 h。与空白对照比较，10% 含药血清处理细胞后凋亡率明显下降（$P < 0.01$），提示补中益气汤可抑制成骨细胞凋亡。与空白 2 组比较，模型组细胞凋亡率明显升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，FPS – ZM1 组及 FPS – ZM1 + 含药血清组细胞凋亡率均明显下降，但 FPS – ZM1 + 含药血清组细胞凋亡率高于 FPS – ZM1 组（$P <$



A. 流式细胞图（A_1. 空白 1 组；A_2. 空白血清 1 组；A_3. 含药血清 1 组） B. 数据统计

注：与空白 1 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。图 10 同。

图 9 补中益气汤对成骨细胞凋亡的影响

A. Flow cytometry (A_1. Blank group 1; A_2. Blank serum group 1; A_3. Medicated serum group 1) B. Data statistics

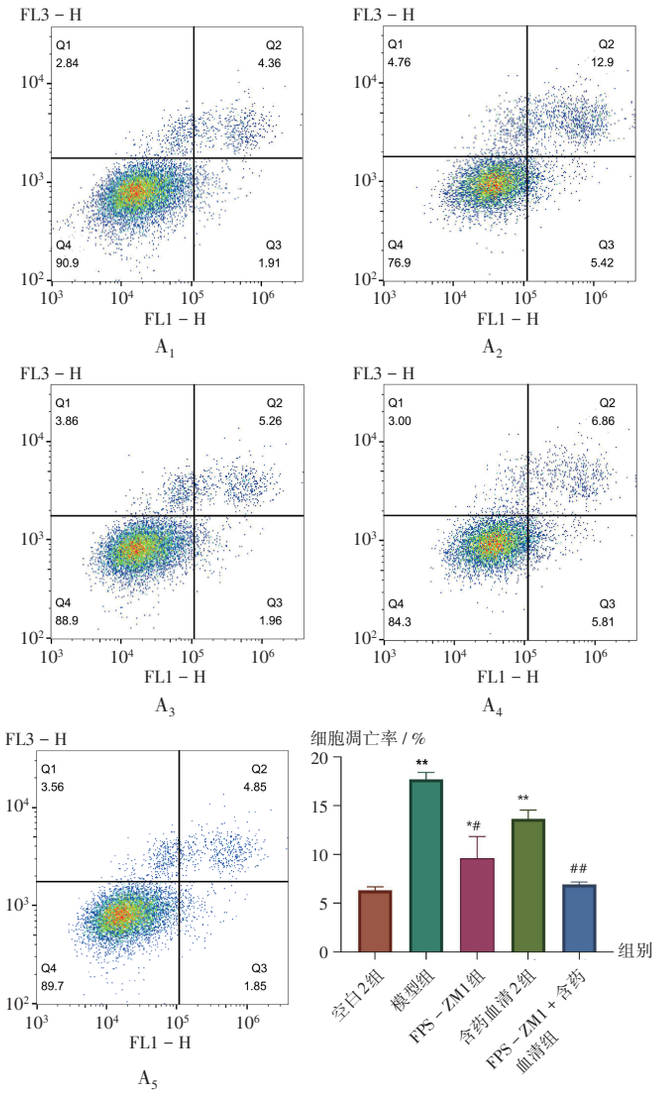
Note: Compared with those in the blank group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (for Fig. 9 – 10).

Fig. 9 Effect of Buzhong Yiqi Decoction on the apoptosis of osteoblast

0.05）。提示补中益气汤具有 AGE / RAGE 通路抑制剂的抑制成骨细胞凋亡的类似作用，但效果弱于抑制剂。含药血清与 FPS – ZM1 联用有协同增效的作用，可增强 FPS – ZM1 的抑制成骨细胞凋亡的效果。详见图 9、图 10。

3 讨论

骨质疏松属中医“骨痿”或“骨痹”，《黄帝内经》中记载“腰背不举，骨枯而髓减”，认为禀赋不足、调养失宜、年老体衰是本病主要病机[7-8]。李东垣认为，骨质疏松是脾土与肾水失衡所致，治则当以益气升阳为主。补中益气汤是治脾名方，方中黄芪、人参、白术、炙甘草健脾益气、燥湿化浊，当归养血和营，配合人参可气血双补，陈皮理气和胃，调和诸药补而不滞，升麻、柴胡配合人参、白术等可益气升阳，调节脾土与肾水关系。本课题组前期以补中益气汤为基础方化裁治疗骨质疏松症，取得较好临床疗效[6]。相关文献也证明，补中益气汤可改善各种类型尤其是脾虚型骨质疏松症[3-5]。



A. 流式细胞图（A_1. 空白 2 组；A_2. 模型组；A_3. FPS – ZM1 组；A_4. 含药血清 2 组；A_5. FPS – ZM1 + 含药血清组） B. 数据统计

注：与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

图 10 补中益气汤对 TNF – α 诱导的成骨细胞凋亡的影响

A. Flow cytometry (A_1. Blank group 2; A_2. Model group; A_3. FPS – ZM1 group; A_4. Medicated serum group 2; A_5. FPS – ZM1 + medicated serum group) B. Data statistics

Note: Compared with those in the model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

Fig. 10 Effect of Buzhong Yiqi Decoction on the apoptosis of osteoblast induced by TNF – α

本研究中获得的补中益气汤成分主要为黄酮类、糖类、皂苷类等。通过成分 – 靶点 – 通路网络分析可知，主要活性成分为槲皮素、山柰酚、柚皮素、川陈皮素、刺芒柄花素等。其中槲皮素为黄芪、甘草、柴胡，山柰酚为黄芪、甘草、人参、柴胡，柚皮素为甘草、柴胡，刺芒柄花素为甘草、黄芪的共有成分，提示补中益气汤主要通过其君药黄芪，臣药甘草、人参，并在使药柴胡的作用下发挥作用。研究发现，槲皮素可显著改善患者骨代谢指标，治疗骨质疏松症[9]，其机制可能与雌激素受

体(ER)通路介导的成骨细胞凋亡有关[10-11]。山柰酚可通过影响mTORC1[12]、Wnt/β-catenin[13]、RANKL/RANK[14]、PI3K/Akt[15]、JNK/JUN[16]等信号通路调控成骨细胞及破骨细胞的增殖分化从而改善骨质疏松症。柚皮素可通过抑制P38[17]、促进SDF-1/CXCR4[18]信号通路治疗骨质疏松症。川陈皮素可通过抑制STING/NF-κB信号通路促进骨质疏松性骨折愈合[19]。刺芒柄花素可通过调控P38MAPK/MMP-9信号通路抑制破骨细胞的骨吸收[20]。挖掘补中益气汤上述有效物质基础对于阐明其作用机制具有关键作用。

PPI网络分析提示,补中益气汤可能通过TNF、AKT1、IL-6、TP53、VEGFA、IL1-β、PTGS2等多种核心靶点发挥治疗骨质疏松症的作用。TNF、IL-6及IL1-β均为促炎细胞因子,其中TNF有TNF-α和TNF-β两种亚型,TNF-α可调节成骨细胞和破骨细胞骨代谢[21]。IL-6属前吸收性细胞因子,可通过刺激破骨细胞活性,抑制成骨细胞活性诱发骨质疏松[22]。AKT1为人类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,也是成骨和破骨细胞功能调节的因子[23]。抑癌基因TP53可能通过激活β-catenin信号通路及自噬调控促进成骨分化。本研究中对主要核心成分槲皮素、山柰酚、柚皮素、川陈皮素、刺芒柄花素和靶点TNF、AKT1、IL-6、TP53、VEGFA进行分子对接,对接性能均良好,进一步验证了补中益气汤通过多成分多靶点发挥作用的特点。其中TNF与川陈皮素对接性能最低,提示TNF可能是补中益气汤治疗骨质疏松最具潜力的作用靶点。

段志胜[24]的研究显示,血脂、硬化斑块是骨密度降低的独立危险因素。AGEs可破坏骨基质蛋白的结构完整性,AGEs与受体RAGE结合可促进机体氧化应激反应和细胞自噬,或激活NF-κB通路,促进骨吸收[25]。HIF-1作为缺氧反应的主要调节因子,可通过调控成骨-血管耦合、雌激素分泌等过程调节成骨细胞-破骨细胞代谢平衡[26];骨质疏松症的发生与体内促炎因子升高刺激破骨细胞有关,IL-17信号通路可通过上调破骨细胞NF-κB受体,促进破骨细胞分化[27]。类风湿关节炎信号通路中激活蛋白(AP-1)、TNF可通过RANKL/RANK通路调控破骨细胞的分化。KEGG及GO富集分析提示,补中益气汤可能通过血脂和动脉粥样硬化通路、AGE-RAGE、HIF-1、IL-17、TNF、类风湿关节炎信号通路介导的血脂、衰老、激素、炎性因子水平变化等途径干预骨质疏松。

目前认为,骨质疏松是成骨细胞和破骨细胞失衡引起,TNF-α、IL-1β等炎性因子可由此导致骨质疏松。本研究中发现,补中益气汤可促进成骨细胞增殖。为进一步研究其作用机制,以核心靶点促炎因子TNF-α(文献表明其可作为成骨细胞凋亡的有效诱导剂[28])干预,发现补中益气汤可抑制TNF-α引起的凋亡,其作用与AGE/RAGE通路抑制剂作用类似,且与抑制剂有协同增效的作用。推测其可能通过抑制AGE/RAGE通路介导的TNF-α下降抑制成骨细胞凋亡发挥改善骨质疏松的作用。

李东垣认为"百病皆由脾胃衰而生"。现代研究提示,内质网应激、线粒体损伤等可能是脾虚致衰老的机制[29]。体内AGES积累是机体衰老的重要因素之一[30],AGEs与受体RAGE结合激活AGE/RAGE信号通路通过一系列反应引起体内TNF-α、IL-1和IL-6等炎性因子的升高[31]。研究表明,补中益气汤有健脾抗衰老功效,其机制可能与抑制海马AGES/RAGE/NF-kB信号通路过度激活有关[32-33]。本研究结果初步表明,补中益气汤改善骨质疏松与AGE/RAGE通路有关,与其健脾抗衰老的中医作用机制不谋而合。

综上,补中益气汤可能通过其主要活性成分槲皮素、山柰酚、柚皮素、川陈皮素、刺芒柄花素作用于TNF、AKT1、IL-6、TP53、VEGFA等靶点,通过血脂和动脉粥样硬化通路、AGE-RAGE、HIF-1、IL-17、TNF、类风湿关节炎等信号通路改善骨质疏松。其中抑制AGE/RAGE通路介导的衰老可能是其主要作用机制之一。本研究结果可为补中益气汤改善骨质疏松症的临床研究提供一定参考依据。由于成骨细胞的凋亡涉及多个信号通路,AGE/RAGE通路激活后可触发多条下游细胞内信号级联反应,如P38MARK、JAK/STAT、NF-κB等,补中益气汤具体作用机制与途径还需进一步深入研究。另外,由于TCMSP库对药物作用机制的模拟预测作用存在一定局限性,具体的活性成分及药物作用机制还需体内外试验进一步验证。

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(2022)[J]. 中国全科医学,2023,26(14):1671-1691.

[2] QASEEM A, FORCIEA MA, MCLEAN RM, et al. Treatment of low bone density or osteoporosis to prevent fractures in men and women: A clinical practice guideline update from the American College of Physicians[J]. Annals of Internal Medicine, 2017, 167(12):899.

[3] 安玉兰,曹昌霞,田玉梅,等. 金匮肾气丸合补中益气汤加减治疗绝经后骨质疏松症的疗效及对免疫炎症因子的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(6):69-75.

[4] 马清华,张 竞. 补中益气汤加减对老年性骨质疏松(脾肾两虚证)的临床疗效分析[J]. 中医药临床杂志,2017,29(1):551-553.

[5] 刘 莹,周 晶,刘 艳. 补中益气汤联合钙剂、活性维生素D治疗糖尿病性骨质疏松症疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2018,27(22):2224-2230.
[6] 吴亚东,郭振光,邓文杰,等. 基于"脾主肌肉"探讨补中益气汤对骨质疏松椎体压缩性骨折术后临床疗效及骨转换标志物的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(17):91-97.
[7] 张云飞,安军伟,龚幼波,等. 原发性骨质疏松症的中医药防治研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2019,25(4):554-557.
[8] 尚 奇,任 辉,沈耿杨,等. 基于肾主骨生髓理论探讨老年性骨质疏松症的中医治疗[J]. 中医杂志,2017,58(16):1433-1435.
[9] 刘 军,刘 峰,闫楚奇,等.槲皮素对双膦酸盐治疗老年性骨质疏松患者骨代谢指标改善效果的分析[J]. 中国骨质疏松杂志,2020,26(7):1044-1048.
[10] 李小云,杨 丽,张荣华.雌激素受体信号通路介导的槲皮素调控骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化研究[J]. 中华中医药杂志,2020,35(12):6011-6014.
[11] 游镇君,蒋 毅,吴可沁,等. 槲皮素对钛颗粒诱导的成骨细胞凋亡抑制作用研究[J]. 中国现代医生,2023,61(29):48-55.
[12] 崔琳娜,蒋校文,黄华庆,等. 山柰酚通过mTORC1信号促进牵张力下小鼠骨髓间充质细胞成骨分化机制研究[J]. 口腔疾病防治,2021,29(4):234-240.
[13] 戴 燚,范彦博,刘 静,等. 山柰酚通过Wnt/β-catenin信号通路调节骨细胞合成代谢进而改善骨质疏松的作用机制[J]. 中国老年学杂志,2023,43(12):3001-3005.
[14] XIE B, ZENG Z, LIAO S, et al. Kaempferol ameliorates the inhibitory activity of dexamethasone in the osteogenesis of MC3T3-E1 cells by JNK and p38-MAPK pathways[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 739326.
[15] 李秋霞,王广谋,陈 健,等. 山柰酚调节PI3K/Akt信号通路对亚硒酸盐致白内障大鼠晶状体组织损伤的影响[J]. 东南大学学报(医学版),2023,42(3):362-369.
[16] BEHL T, MEHTA K, SEHGAL A, et al. Exploring the role of polyphenols in rheumatoid arthritis[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(19): 5372-5393.
[17] WANG W, WU C, TIAN B, et al. The inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis through the suppression of p38 signaling pathway by naringenin and attenuation of titanium-particleinduced osteolysis[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(12): 2113-2134.
[18] WANG Y, BAI S, CHENG Q, et al. Naringenin promotes SDF-1/CXCR4 signaling pathway in BMSCs osteogenic differentiation[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2021, 59(1): 66-73.
[19] 方红育,黄 涛,周少怀,等. 川陈皮素通过抑制STING/NF-κB信号通路促进骨质疏松大鼠的骨折愈合[J]. 免疫学杂志,2023,39(10):857-864.
[20] 喻琴云,詹晓峰,黄 彦. 刺芒柄花素对去势骨质疏松大鼠P38MAPK/MMP-9信号通路的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2017,22(12):1371-1376.
[21] KIM DE, KIM JK, HAN S K, et al. Lactobacillus planta rum NK3 and Bifidobacterium longum NK49 alleviate bacterial vaginosis and osteoporosis in mice by suppressing NF-κB linked TNF-αexpression[J]. J Med Food, 2019, 22(10): 1022-1031.
[22] CHEN B, LI HZ. Association of IL-6 174G/C (rs1800795) and 572C/G (rs1800796) polymorphisms with risk of osteoporosis: a meta-analysis BMC [J]. Musculoskelet Disord, 2020, 21: 330.
[23] YANG HL, WANG LJ, SHIGLEY C, et al. Protein tyrosine phosphatases in skeletal development and diseases[J]. Bone Reserch, 2022, 10(1): 10.
[24] 段志胜. 老年2型糖尿病患者颈动脉粥样硬化与骨密度的相关性研究[D]. 昆明:昆明医科大学,2014.
[25] 孙 菁,朱媛媛,郭海英,等. 基于AGEs/RAGE/NF-κB通路探讨老年性骨质疏松症发病机制[J]. 中国骨质疏松杂志,2020,26(6):919-923.
[26] 柳 颖,安方玉,颜春鲁,等. 骨质疏松症中HIF-1α诱导的骨细胞铁死亡机制研究进展[J]. 中国现代应用药学,2023,40(11):1556-1562.
[27] ADAMOPOULOS IE, CHAO CC, GEISSLER R, et al. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappa B on osteoclast precursors[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(1): R29.
[28] ALIKHANI M, ALIKHANI Z, RAPTIS M, et al. TNF-alpha *in vivo* stimulates apoptosis in fibroblasts through caspase-8 activation and modulates the expression of pro-apoptotic genes[J]. J Cell Physiol, 2004, 201(3): 341-348.
[29] POWERS ET, MORIMOTO RI, DILLIN A, et al. Biological and chemical approaches to diseasesof proteostasis deficiency[J]. Annu Rev Biochem, 2009, 78: 959-991.
[30] SEMBA RD, NICKLETT EJ, FERRUCCI L. Does accumulation of advanced glycation endproducts contribute to the aging phenotype?[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2010, 65(9): 963-975.
[31] CHEN JH, LIN X, BU C, et al. Role of advanced glycation end products in mobility and considerations in possible dietary and nutritional intervention strategies[J]. Nutr Metab (Lond), 2018, 15: 72.
[32] 邢文婷,张李峰,程卫东,等. 含红芪和含黄芪的补中益气汤含药血清对老龄小鼠脾淋巴细胞抗氧化损伤作用的比较[J]. 中药材,2014,37(2):299-302.
[33] 朱昊如. 基于衰老分子机制探讨脾虚证-补中益气汤相关的生物学基础[D]. 北京:北京中医药大学,2020.

(收稿日期:2024-03-27;修回日期:2024-12-09)