doi:10.11659/jjssx.05E021050

·基础研究·

基于网络药理学和分子对接探讨蠲痹汤治疗骨关节炎的机制

翁晨祎[1],孟 林[2],叶来生[1],翁华宏[1] (1.广西中医药大学瑞康临床医学院,广西 南宁 530011;2.广西骨伤医院关节科,广西南宁 530012)

[摘 要] **目的** 采用网络药理学和分子对接探讨蠲痹汤治疗骨关节炎的机制。**方法** 应用TCMSP数据库获取蠲痹汤的活性成分和对应靶点,检索GeneCards数据库、OMIM数据库、PharmGkb数据库和TTD数据库获得骨关节炎的治疗靶点。运用R语言软件(版本4.0.2)获得蠲痹汤治疗骨关节炎的交集靶点,使用Cytoscape软件(版本3.8.0)构建"活性成分—治疗靶点"网络并将关键成分进行排序,同时通过蛋白质相互作用(PPI)网络筛选出其核心靶点。运用R语言软件对蠲痹汤治疗骨关节炎的作用靶点进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。运用AutoDockVina(版本1.1.2)等软件对上述核心靶点及关键成分进行分子对接验证。**结果** 应用TCMSP数据库共得到蠲痹汤活性成分165个及对应靶点2 529个,药物药效靶点与骨关节炎治疗靶点取交集得到115个靶点,关键成分有槲皮素、山柰酚、柚皮素等,核心靶点有STAT3、TNF、MAPK14等。GO富集分析得到2 306个生物过程条目,144个分子功能条目,69个细胞组成条目;KEGG富集分析得到TNF信号通路、IL-17信号通路、PI3K-AKT信号通路等相关通路。分子对接结果显示,蠲痹汤治疗骨关节炎的关键成分槲皮素、山柰酚、柚皮素、甘草酮A、刺芒柄花素与其对应的核心靶点有较好的结合性。**结论** 蠲痹汤可能通过多成分、多靶点、多通路的相互作用发挥对骨关节炎的治疗作用。

[关键词] 骨关节炎;网络药理学;分子对接;蠲痹汤;活性成分;作用靶点;信号通路
[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-05-19

Mechanism of Juanbi decoction for osteoarthritis based on network pharmacology and molecular docking

WENG Chen-yi[1], MENG Lin[2], YE Lai-sheng[1], WENG Hua-hong[1] (1. Ruikang Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi 530011, China; 2. Department of Joint, Guangxi Orthopedics Hospital, Nanning Guangxi 530012, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of Juanbi decoction in the treatment of osteoarthritis by network pharmacology and molecular docking. **Methods** The active ingredients and corresponding targets of Juanbi decoction were obtained from TCMSP database, and the therapeutic targets of osteoarthritis were obtained by searching GeneCards database, OMIM database, PharmGkb database and TTD database. The intersection targets of Juanbi decoction in the treatment of osteoarthritis were obtained from R language software (version 4.0.2). The Cytoscape software (version 3.8.0) was used to construct the network of 'active ingredient-therapeutic target', and ranked the key ingredients, meanwhile, the protein-protein interaction (PPI) network was used to screen the core targets. Gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis on the active targets of Juanbi decoction in the treatment of osteoarthritis were performed by using R language software. AutoDockVina (version 1.1.2) and other software were used to verify the molecular docking of the above core targets and key ingredients. **Results** A total of 165 active ingredients and 2 529 corresponding targets in Juanbi decoction were obtained from TCMSP database, and 115 targets were obtained from the intersection of drug efficacy targets and therapeutic targets of osteoarthritis, including key ingredients such as quercetin, kaempferol, naringenin, etc, and core targets such as STAT3, TNF, MAPK14, etc. GO enrichment analysis yielded 2 306 biological process items, 144 molecular function items and 69 cellular ingredient items; KEGG enrichment analysis yielded TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway, PI3K-AKT signaling pathway and other related pathways. The results of molecular docking showed that quercetin, kaempferol, naringenin, licochalcone A and formononetin were the key ingredients of Juanbi decoction in the treatment of osteoarthritis, which had good binding properties with their corresponding core targets. **Conclusion** Juanbi decoction may play a role in the treatment of osteoarthritis through the interaction of multiple ingredients, multiple targets and multiple pathways.

Keywords: osteoarthritis; network pharmacology; molecular docking; Juanbi decoction; active ingredient; active target; signaling pathway

骨关节炎是一种以关节疼痛、压痛、活动受限、畸形为主要特征的关节退行性疾病,其病因尚未完全明确,多与年龄、肥胖、炎症、创伤及遗传易感性等有关。流行病学调查显示,骨关节炎好发于中老年人群,在65岁以上的人群中超过50%为骨关节炎患者[1]。目前骨关节炎的治疗主要通过应用非甾体抗炎药和镇

[基金项目] 全国中医药创新骨干人才培训项目(国中医药人教函[2019]128号);广西中医药民族医药适宜技术推广课题(GZSY20-08)

[通信作者] 孟 林,E-mail:14262618@qq.com

痛药、局部使用皮质类固醇和黏性补充剂,控制疼痛和改善关节功能,但存在引发上消化道、脑、肾、心血管疾病的风险[1]。相比于上述治疗方法,中医药治疗骨关节炎具有简便易行、价格低廉、副作用小的优势[2]。蠲痹汤出自《医学心悟》,由当归、独活、肉桂、秦艽、海风藤、羌活、川芎、桑枝、乳香、甘草、木香组成,主治风寒湿三气合而成之痹者,对治疗骨关节炎具有较大的优势及潜力[3]。但蠲痹汤为中药复方,成分、靶点较为复杂,其治疗骨关节炎的机制尚未阐明。网络药理学是从药物、靶点和疾病之间的相互关系出发,进行体外虚拟筛选潜在的药物活性成分、作用靶点、信号通路,构建"药物—靶点—疾病"的网络联系,初步预测药物的药效物质基础和作用机制的学科[4]。分子对接是一项通过计算机程序辅助来预测大分子受体和小分子配体之间的结合模式及亲和力的技术[5]。本研究基于网络药理学和分子对接技术,借助网络生物、药物数据库,预测蠲痹汤治疗骨关节炎的关键成分、核心靶点和主要通路,构建"活性成分—治疗靶点"的网络关系图,分析蠲痹汤潜在的作用机制,以期为未来实验研究及与其他临床治疗手段联合使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 蠲痹汤活性成分与作用靶点的筛选

以口服生物利用度≥30%、类药性≥0.18 作为药物活性成分的筛选指标,在 TCMSP 数据库检索筛选出当归、独活、肉桂、秦艽、海风藤、羌活、川芎、桑枝、乳香、甘草、木香这 11 味中药复方的活性成分,并通过 TCMSP 数据库检索筛选出中药复方活性成分的对应靶点。将上述得到的靶点名称通过 Uniprot 数据库和 Perl 语言软件(版本 5.30.0.1)进行处理转化为靶基因名称。

1.2 骨关节炎治疗靶点的筛选

通过 OMIM 数据库、GeneCards 数据库、PharmGkb 数据库和 TTD 数据库,以"osteoarthritis"为检索关键词,检索骨关节炎的治疗靶点。汇总 4 个数据库的靶点数,应用 R 语言软件(版本 4.0.2)合并去重得到骨关节炎的治疗靶点。

1.3 蠲痹汤交集治疗靶点的筛选

利用 R 语言软件绘制药物药效靶点与疾病治疗靶点的交集映射,得到"蠲痹汤—骨关节炎"交集靶点以及 venn 图。

1.4 蠲痹汤"活性成分—治疗靶点"网络图绘制

利用 Cytoscape 软件(版本 3.8.0)构建"活性成分—治疗靶点"的网络图,中药成分以节点 1 表示,治疗靶点以节点 2 表示,连线表示相互作用的关系。将连线交集数量前 5 的活性成分作为本研究的关键活性成分。

1.5 蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络的构建及核心靶点的筛选

将蠲痹汤—骨关节炎的交集靶点导入 String 数据库,以置信度得分 >0.9 分为条件筛选,并删除图中游离的蛋白节点,绘制 PPI 网络图。运用 Cytoscape 软件中 CytoNCA 插件对 PPI 网络进行分析,根据连接中心度、间距中心度、靠近中心度、特征向量中心度、网络核心地位性和局部边距连接度等指标进行筛选,首先筛选出在每个指标中大于中位值的靶点,得到次级核心靶点。将上述靶点再次进行筛选,得到蠲痹汤治疗骨关节炎的核心靶点。

1.6 基因本体(gene ontology,GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)富集分析

利用 R 语言软件将交集靶点基因转换为 entrezID 后,按照 $P<0.05$ 对其进行过滤和富集分析,得到 GO 富集分析和 KEGG 富集分析的具体数据,并分别绘制 barplot 柱状图。

1.7 分子对接

将"活性成分—治疗靶点"网络图中连线交集数量前 5 的活性成分与其对应的 12 个核心靶点进行分子对接(活性成分对应的治疗靶点中若不包含筛选出的核心靶点则不与其进行分子对接),取最低连结自由能作为分子对接的结果,药物小分子配体和靶点蛋白受体结合能越低,则配体和受体的结合力越强[5]。首先,通过 PubChem 数据库获取活性成分的小分子配体 2D 结构,利用 ChemBioOffice Ultra 软件(2014 版)将 2D 结构转换为 3D 结构;然后,通过 RCSB PDB 平台数据库获得靶点的蛋白受体结构,利用PyMOL软件(版本 2.4.0)优化去除水分子和小分子配体,利用 AutoDockTools 软件(版本 1.5.6)、AutoDockVina 软件(版本 1.1.2)将配体、受体格式转换为 pdbqt 格式,并确定活性口袋进行分子对接;最后,利用 PyMOL 软件(版本 2.4.0)输出图像文件。

2 结果

2.1 蠲痹汤活性成分及靶点筛选

通过 TCMSP 数据库共得到蠲痹汤活性成分 165 个;中药复方的对应靶点共 9 635 个,见表 1。利用 Perl 语言软件筛选出中药复方中活性成分的对应靶点共 2 529 个。

表 1　蠲痹汤“中药—活性成分—靶点基因”(个)

中药	归经	活性成分	靶点基因
当归	归肝、心、脾经	2	864
独活	归肾、膀胱经	9	650
肉桂	归肾、脾、心、肝经	0	824
秦艽	归胃、肝、胆经	2	157
海风藤	归肝经	21	372
羌活	归膀胱、肾经	15	1 243
川芎	归肝、胆、心包经	7	1 356
桑枝	归肝经	3	204
乳香	入心、肝、脾经	8	659
甘草	归心、肺、脾、胃经	92	2 506
木香	归脾、胃、大肠、三焦、胆经	6	800

2.2　蠲痹汤治疗骨关节炎的治疗靶点

本研究共得到疾病治疗靶点 1 844 个,同时将药物药效靶点和疾病治疗靶点取交集得到 115 个交集靶点,利用 R 语言软件输出 venn 图(图 1)。

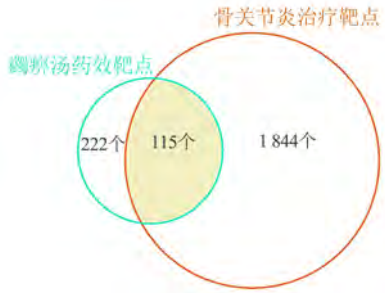


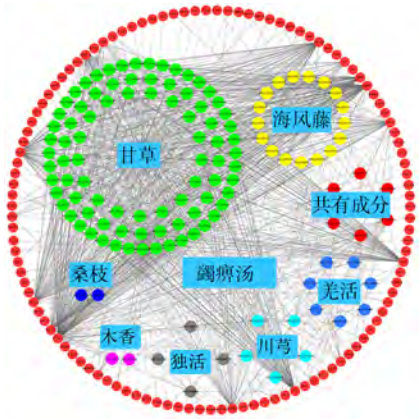
图 1　蠲痹汤与骨关节炎的疾病靶基因交集

2.3　蠲痹汤“活性成分—治疗靶点”网络图构建

将得到的 115 个交集靶点与 165 个活性成分输入 Cytoscape 软件,构建“活性成分—治疗靶点”网络,见图 2。根据连线交集数量分级排序,排序前 5 的活性成分为槲皮素(连线交集数量 83)、山柰酚(连线交集数量 32)、柚皮素(连线交集数量 21)、甘草酮 A(连线交集数量 18)、刺芒柄花素(连线交集数量 15)。提示这 5 个活性成分可能为蠲痹汤治疗骨关节炎的关键活性成分。

2.4　PPI 网络的构建和核心靶点的筛选

本研究共得到 PPI 的节点 105 个,边 476 条(边表示靶点蛋白的互作关系),见图 3a。将绘制的 PPI 网络导入 Cytoscape 软件,利用 CytoNCA 插件对 PPI 网络



注:外圈圆形代表靶点,内部圆形代表活性成分,矩形代表药物

图 2　蠲痹汤“活性成分—治疗靶点”网络图

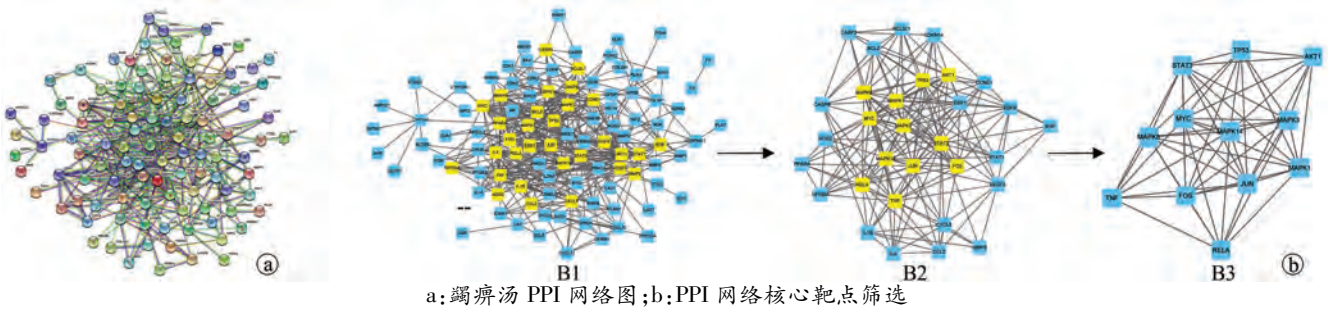
进行筛选,经过两次筛选得到核心靶点 12 个,见图 3b。

2.5　GO 富集分析

GO 富集分析共得到 2 519 个条目($P<0.05$),其中生物过程 2 306 个,分子功能 144 个,细胞组成 69 个。在 GO 富集分析中,蠲痹汤治疗骨关节炎的生物过程主要体现为脂多糖反应、细胞的氧化应激反应、活性氧类反应等;分子功能主要体现为细胞因子受体结合、蛋白酶结合、RNA 聚合酶Ⅱ特异性等;细胞组成主要体现为薄膜筏、胞质囊腔、转录调节复合物、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物等,取生物过程、分子功能、细胞组成中基因富集程度排名前 10 的条目制成柱状图,见图 4。

2.6　KEGG 富集分析

KEGG 富集分析共得到 162 条信号通路($P<0.05$),列举排名靠前的 30 条通路(图 5)以及富集程度排名前 5 的关键通路所涉及的基因,主要为 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K-AKT 信号通路(表 2)。IL-17信号通路是在蠲痹汤治疗骨关节炎过程中联系最为广泛的通路,以此为例在该通路中标记蠲痹汤治疗骨关节炎发挥调控作用的靶点(图 6)。



a:蠲痹汤 PPI 网络图;b:PPI 网络核心靶点筛选

图 3　PPI 网络的构建和核心靶点的筛选

2.7 分子对接

5 个关键活性成分和与之有映射的 12 个核心靶点的结合能均 < −6 kcal · mol^{-1}(表 3),表明蠲痹汤治疗骨关节炎的关键活性成分能与其对应的核心靶点稳定结合。将结果输入 PyMOL 软件,优化图形并输出分子对接 3D 图形,白色为小分子配体,其余为蛋白受体,选择结合能最高的甘草酮 A 和 STAT3 进行分子对接作为示例,见图 7。

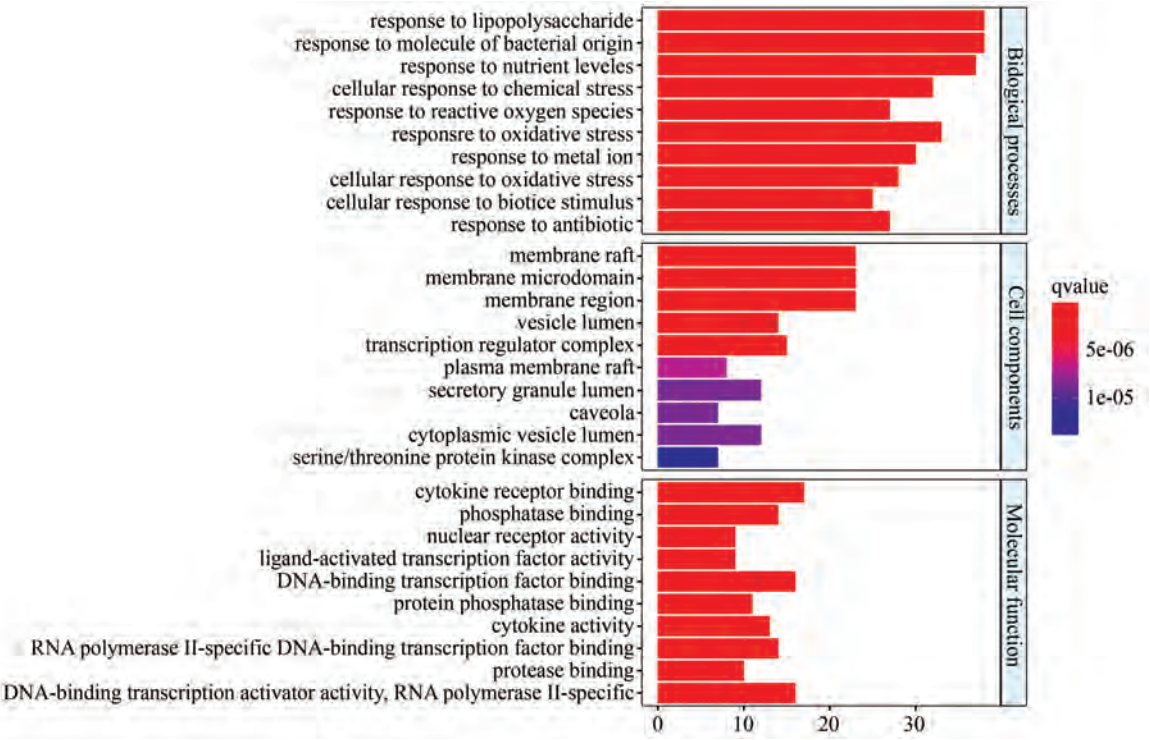


图 4 交集靶点 GO 富集分析柱状图

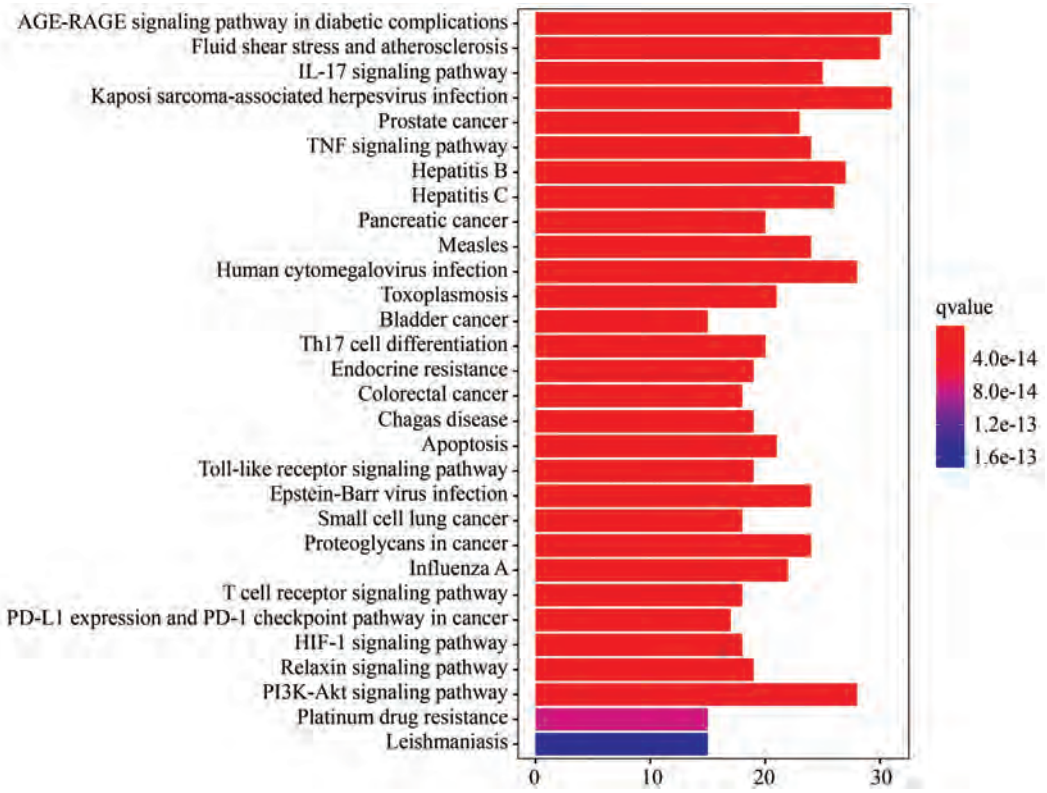
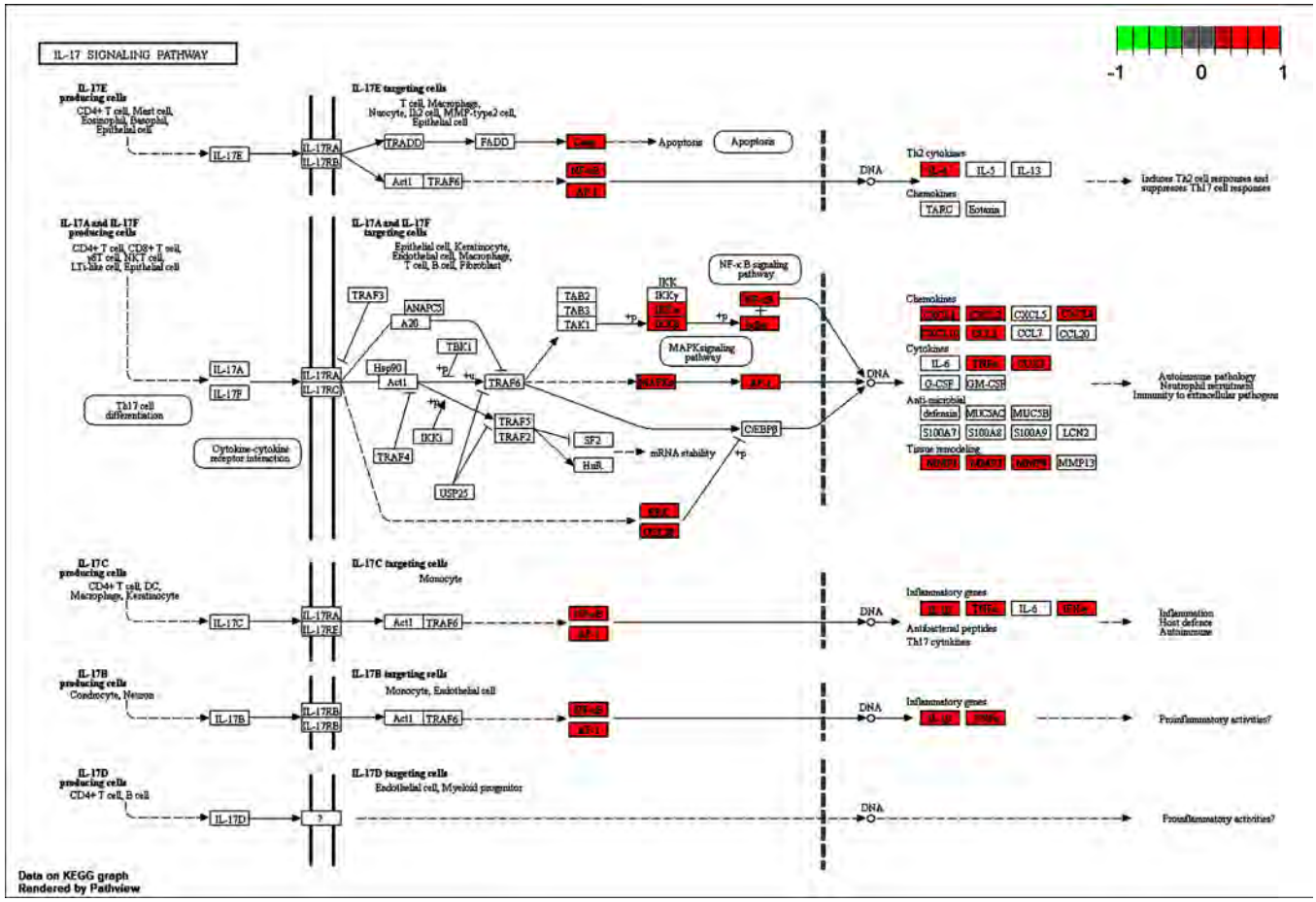


图 5 交集靶点 KEGG 富集分析柱状图

表 2 蠲痹汤治疗骨关节炎前 5 条关键通路涉及的基因分布

序号	ID	通路	基因数	基因分布
1	hsa04933	AGE-RAGE 信号通路	31	MAPK14/BCL2/BAX/JUN/CASP3/PRKCA/RELA/AKT1/TNF/MAPK8/STAT1/ICAM1/SELE/VCAM1/MAPK3/MAPK1/STAT3/CCND1/CDK4/VEGFA/MMP2/F3/IL1B/CCL2/CXCL8/NOS3/THBD/SERPINE1/COL1A1/IL1A/COL3A1
2	hsa04151	PI3K-AKT 信号通路	28	KDR/GSK3B/CDK2/BCL2/CASP9/PRKCA/RELA/IL4/IKBKB/AKT1/MAPK3/MAPK1/CCND1/CDK4/EGFR/VEGFA/BCL2L1/CDKN1A/EGF/TP53/ERBB2/MYC/NOS3/IL2RA/COL1A1/CHUK/SPP1/IGF2
3	hsa04657	IL-17 信号通路	25	PTGS2/MAPK14/GSK3B/JUN/CASP3/CASP8/RELA/IL4/IKBKB/TNF/MAPK8/MMP1/MAPK3/MAPK1/MMP3/FOS/MMP9/NFKBIA/IL1B/CCL2/CXCL8/IFNG/CXCL2/CXCL10/CHUK
4	hsa04668	TNF 信号通路	24	PTGS2/MAPK14/JUN/CASP3/CASP8/RELA/IKBKB/AKT1/TNF/MAPK8/ICAM1/SELE/VCAM1/MAPK3/MAPK1/MMP3/FOS/MMP9/NFKBIA/IL1B/CCL2/CXCL2/CXCL10/CHUK
5	hsa04066	HIF-1 信号通路	18	NOS2/BCL2/PRKCA/RELA/AKT1/HMOX1/MAPK3/MAPK1/STAT3/EGFR/VEGFA/CDKN1A/EGF/HIF1A/ERBB2/NOS3/SERPINE1/IFNG



注:红色为上调,绿色为下调

图 6 KEGG 富集分析中交集靶点参与 IL-17 信号通路图

表 3 活性成分与核心靶点结合能(kcal · mol^{-1})

活性成分	TP53	JUN	MAPK14	AKT1	MAPK8	RELA	TNF	MAPK1	STAT3	MAPK3	FOS	MYC
刺芒柄花素	–	-9	-7.8	–	–	–	–	–	–	–	–	–
山柰酚	–	-9.2	–	-6.8	-7.1	-9.2	–	–	–	–	–	–
甘草酮 A	–	–	-7.8	–	–	-7.1	–	-7.9	-6.4	–	–	–
柚皮素	–	–	–	-7.6	–	-7.2	–	-7.7	–	-8.7	–	–
槲皮素	-8.3	–	–	-7.0	–	-7.2	-9.2	-8.4	–	–	-10.2	-7.3

注:“–”表示活性成分与核心靶点没有连接映射,无结合能

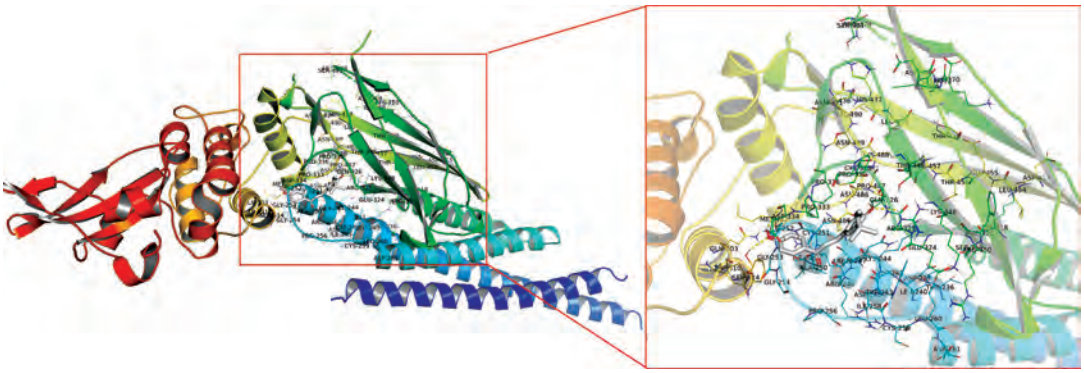


图 7 甘草酮 A 和 STAT3 的分子对接图

3 讨论

3.1 骨关节炎的中医治疗

中医认为“骨痹”有两个重要成因:一为风邪、寒邪、湿邪外邪作祟,外邪致气血瘀塞不通,故而导致痹症;二为七情内伤内因所困,其内情志不舒则气血运行不畅而致痹症。蠲痹汤具有祛风除湿、蠲痹止痛的功效[6]。在近年的临床研究中,蠲痹汤对治疗“骨痹”有着较好的疗效,并且应用也逐渐广泛[3],但其潜在的药理学机制尚未明确,因此,本研究通过运用网络药理学方法和分子对接技术来探讨蠲痹汤治疗骨关节炎的潜在药理学机制。

3.2 蠲痹汤通过抗炎、抗凋亡、调控软骨细胞代谢和促进软骨下骨重建等治疗骨关节炎

本研究通过构建“活性成分—治疗靶点”网络图,筛选出槲皮素、山柰酚、柚皮素、甘草酮 A、刺芒柄花素可能为蠲痹汤治疗骨关节炎的关键活性成分,通过 PPI 网络的构建与核心靶点的筛选,得到 STAT3、TNF、MAPK14 等 12 个有潜力治疗骨关节炎的核心靶点。

在骨关节炎的病理进程中,始终围绕着几个密不可分的因素:炎症反应、软骨的破坏、软骨下骨重建以及软骨细胞的代谢与凋亡[7],而本研究筛选出的 5 个关键活性成分在这一病理进程中分别能起到不同的作用。首先,软骨细胞的凋亡是骨关节炎的主要诱因之一,而氧化应激和内质网应激则会介导细胞凋亡[8]。一项骨关节炎大鼠模型研究表明,槲皮素抗凋亡效应中的一个潜在机制是能通过调节 SIRT1-AMPK 信号通路抑制氧化应激诱导的内质网应激反应,从而在一定程度上减缓软骨细胞凋亡[8]。炎症反应除了会促进软骨细胞的凋亡,也会促进骨关节炎的进展。在多种促炎因子的影响下,骨关节炎患者的软骨细胞和软骨微环境会发生改变,从而导致软骨细胞功能障碍[9]。山柰酚除了具有抗细胞凋亡的作用外[10],还可预防脂多糖引起的炎症反应,其作用机制可能与山柰酚下调 miR-146a 保护软骨 ATDC5 细胞免受脂多糖介导的炎症反应,以及抑制核心蛋白聚糖的表达有关[11]。而在抗炎作用方面,有研究表明甘草酮 A 可以通过激活 Nrf2 信号通路介导抑制 IL-1β 诱导的炎症反应[12]。另有研究表明,刺芒柄花素能有效拮抗 IL-1β 诱导的分解代谢,通过抑制软骨降解酶、炎症介质、促炎细胞因子来延缓关节软骨退变的进展,从而发挥治疗骨关节炎的作用[13]。在动物实验研究构建的小鼠骨关节炎模型中,柚皮素被证明可通过调节 NF-κB 通路来抑制 MMPs 介导的关节软骨退变,从而减轻骨关节炎的症状[14]。本研究 PPI 网络表明,TNF、STAT3 可能是蠲痹汤治疗骨关节炎的核心靶点。TNF 作为骨关节炎的主要致炎细胞因子,与推动炎症级联反应有关[7,15]。在 STAT3 信号通路诱导软骨细胞分解代谢过程中,STAT3 为 IL-6 下游的主要信号因子,可促进 MMP-3、MMP-13、ADAMTS-4 以及 ADAMTS-5 的表达,从而加速软骨退化[15]。IL-6 是人软骨细胞中NF-κB通路的直接靶基因,而柚皮素可以通过此通路发挥治疗骨关节炎的作用[14]。因此,蠲痹汤可能通过柚皮素作用于 NF-κB 通路并下调 IL-6 来抑制 STAT3 信号因子,进而延缓软骨退化进程,达到治疗骨关节炎的目的。基于以上结果可推测,蠲痹汤主要通过槲皮素、山柰酚、甘草酮 A、刺芒柄花素和柚皮素发挥抗凋亡、抗炎、调控软骨细胞代谢等作用,从而实现对骨关节炎的治疗。同时,结合本研究“活性成分—治疗靶点”网络可以发现,不同活性成分有共同的治疗靶点,且不同靶点之间存在复杂的关联。蠲痹汤治疗骨关节炎并不是通过单一靶点或单一活性成分发挥调控作用,而是在“多成分—多靶点”共同调控下治疗骨关节炎。本研究中蠲痹汤的 5 个关键活性成分和与之有映射的 12 个核心靶点对接的结合能均 < -6 kcal·mol^{-1},说明该中药复方的关键成分与其核心靶点有较好的结合能力,可稳定地协同发挥治疗作用。

本研究 KEGG 富集分析结果显示,蠲痹汤和多条

信号通路有关,其中与骨关节炎相关的主要有 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、HIF-1 信号通路、AGE-RAGE 信号通路。TNF 信号通路可通过调控 NF-κB 和 MAPK 两条关键信号通路减少炎症因子的分泌,从而延缓骨关节炎的进展[16]。IL-17 信号通路则可通过调控 IL-17 来减缓 MMPs 的合成以及 IL-6 的产生,从而在一定程度上阻止软骨被破坏[17-19]。而 p38-MAPK 则被认为可能是 IL-17 和 TNF-α 之间协同信号的靶点[20],除了影响转录和 RNA 的稳定性,还可能会影响染色质重塑、细胞因子分泌和其他基因或蛋白水平的调节,对软骨下骨重建起着关键作用[21]。因此,通过调控 IL-17 信号通路可减少炎症因子和蛋白水解酶的合成,并促进软骨下骨重建,对于延缓和治疗骨关节炎具有重要作用。PI3K-AKT-mTOR 信号通路在延缓炎症、调节软骨细胞凋亡等方面起着关键作用[22]。PI3K 激活可导致下游 AKT 磷酸化,进而调节 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 等凋亡相关因子的表达[23]。mTOR 是 AKT 的下游靶点和自噬的负调节因子[24],且 mTOR 通路的失活会诱导自噬,这对细胞的新陈代谢和稳定性至关重要[25-26]。因此,通过调控 PI3K-AKT 信号通路可以下调该通路相关凋亡因子并诱导自噬,清除软骨细胞受损的细胞器和长效大分子,维持软骨细胞内稳态,增加基质合成,从而减缓骨关节炎进展。在 HIF-1 信号通路中,有研究认为HIF-1α诱导自噬的机制可能与调控 Beclin-1/Bcl2 复合体以及 AMPK 酶的激活有关,从而抑制 mTOR[27-28]。自噬除了上述提到的作用,也可能通过作用于线粒体代谢从而减少相关氧化应激反应,因此恢复自噬也可以被认为是一定程度上延缓了骨关节炎的发展[26,29]。有研究发现,肥胖能够引起炎症反应,并且增加 2 型糖尿病发生的风险,AGE-RAGE信号通路中的关键成分 AGEs 及 RAGE 则被认为是引起糖尿病以及促进炎症发展的关键因素之一[30-32]。糖尿病会损害骨细胞的新陈代谢和功能[33],但是肥胖与骨关节炎之间的具体机制尚不完全清楚。有研究表明,机械因素和代谢因素是骨关节炎的主要诱因,肥胖患者的骨关节长时间暴露于沉重的机械压力下,负荷增加会抑制软骨基质的合成,并诱导促炎因子和 Ca^{2+}-ERK-NF-κB 信号通路,加快骨关节炎的进展[34]。因此,蠲痹汤通过调控 AGE-RAGE 信号通路来治疗肥胖患者代谢性骨关节炎值得进一步研究。以上结果显示,蠲痹汤可通过调控 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、HIF-1 信号通路、AGE-RAGE信号通路参与抗凋亡、抗炎、调控软骨细胞的代谢和促进软骨下骨重建,从而发挥对骨关节炎的治疗作用。同时,结合本研究排名前 5 的关键通路所涉及的基因和 IL-17 信号通路图可以发现,治疗骨关节炎的同一靶点在不同通路中都起着调控作用,由此可以推测,蠲痹汤可能通过多靶点、多通路协同发挥治疗作用。

3.3 中药与组织工程研究

近年来中药(包含蠲痹汤在内的众多复方)联合应用组织工程技术能很好地解决单独应用组织工程技术时出现的部分问题[35]。而基于网络药理学和分子对接技术的探究则可以为找到合适的中药复方提供指导。

间充质干细胞是一种多能基质细胞,能够自我更新并分化为间充质组织谱系,包括骨、软骨、脂肪、肌腱、肌肉和骨髓基质,是组织工程中理想的软骨修复种子细胞[36-37]。目前,间充质干细胞已被证明对骨关节炎有较好的临床疗效[38],但也存在软骨修复率低、软骨细胞表型不稳定、异体移植排斥等问题[37]。IL-35 是新近发现的一种细胞因子,其可通过增强调节性 T 细胞的功能,抑制辅助性 T 细胞 1 和辅助性 T 细胞 17 的增殖能力,发挥免疫抑制作用,有 IL-35 表达的间充质干细胞有望成为治疗同种异体移植排斥反应的新途径[39]。有研究表明,蠲痹汤在治疗局部炎症的同时还能够提高 IL-35 的水平[40]。在下一步的临床试验中,蠲痹汤联合间充质干细胞异体移植修复骨关节软骨损伤将会是一个新的可行的研究思路。

3.4 小结

综上所述,蠲痹汤可能通过多成分、多靶点、多通路的相互作用发挥对骨关节炎的治疗作用。这为蠲痹汤下一步的基础研究及临床应用提供了新的研究思路。本研究也存在以下不足:由于中医辩证论治的特点,蠲痹汤治疗不同证型骨关节炎的具体剂量比例会有变化,进而在一定程度上会导致功效不同;未收集到足够临床数据将骨关节炎模型进一步细化,将不同证型与不同方药剂量进行对应加权处理。中药复方并不是简单的单个活性成分的叠加,而是多成分—多靶点的协同作用,多个活性成分之间的协同作用以及活性成分对靶点的激活或抑制都需要发展相对应的网络算法来进行量化标准[41],这将是网络药理学未来需完善的方向。相信随着人工智能、网络药理学和分子对接技术的日趋进步,中药及其复方能更好地与组织工程相结合运用于临床。

[参考文献]

[1] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南(2018 年版)[J]. 中华骨科杂志,2018,38(12):705 - 715. doi:10.3760/cma.j.issn.0253 - 2352.2018.12.001.

[2] 郭梦如,何东仪. 骨关节炎治疗的中医药研究进展[J]. 风湿病与关节

炎,2019,8(1):73-75. doi:10.3969/j.issn.2095-4174.2019.01.018.
[3] 仲 超,马 勇,周雪添,等.蠲痹汤及其变方在骨伤科的临床应用与实验研究进展[J].现代中西医结合杂志,2019,28(7):795-798. doi:10.3969/j.issn.1008-8849.2019.07.031.
[4] 董培良,李 慧,韩 华.中药网络药理学的应用与思考[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(17):204-211. doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20201740.
[5] Trott O,Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem,2010,31(2):455-461. doi:10.1002/jcc.21334.
[6] 雷长国,覃建锋,梁子聪,等.程氏蠲痹汤对类风湿关节炎SD大鼠血清白细胞介素-17和-35水平的影响[J].中国老年学杂志,2019,39(12):2991-2995. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2019.12.052.
[7] Kapoor M,Martel-Pelletier J,Lajeunesse D,et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiologyof osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol,2011,7(1):33-42. doi:10.1038/nrrheum.2010.196.
[8] Feng K,Chen Z,Liu P,et al. Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model[J]. J Cell Physiol,2019,234(10):18192-18205. doi:10.1002/jcp.28452.
[9] Liu-Bryan R,Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol,2015,11(1):35-44. doi:10.1038/nrrheum.2014.162.
[10] Wang J,Li T,Feng J,et al. Kaempferol protects against gamma radiation-induced mortality and damage via inhibiting oxidative stress and modulating apoptotic molecules in vivo and vitro[J]. Environ Toxicol Pharmacol,2018,60:128-137. doi:10.1016/j.etap.2018.04.014.
[11] Jiang R,Hao P,Yu G,et al. Kaempferol protects chondrogenic ATDC5 cells against inflammatory injury triggered by lipopolysaccharide through down-regulating miR-146a[J]. Int Immunopharmacol,2019,69:373-381. doi:10.1016/j.intimp.2019.02.014.
[12] Jia T,Qiao J,Guan D,et al. Anti-inflammatory effects of licochalcone A on IL-1β-stimulated human osteoarthritis chondrocytes[J]. Inflammation,2017,40(6):1894-1902. doi:10.1007/s10753-017-0630-5.
[13] Cho IA,Kim TH,Lim H,et al. Formononetin antagonizes the interleukin-1β-induced catabolic effects through suppressing inflammation in primary rat chondrocytes[J]. Inflammation,2019,42(4):1426-1440. doi:10.1007/s10753-019-01005-1.
[14] Wang CC,Guo L,Tian FD,et al. Naringenin regulates production of matrix metalloproteinases in the knee-joint and primary cultured articular chondrocytes and alleviates pain in rat osteoarthritis model[J]. Braz J Med Biol Res,2017,50(4):e5714. doi:10.1590/1414-431X20165714.
[15] Latourte A,Cherifi C,Maillet J,et al. Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis,2017,76(4):748-755. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209757.
[16] Wang T,He C. Pro-inflammatory cytokines: the link between obesity and osteoarthritis[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2018,44:38-50. doi:10.1016/j.cytogfr.2018.10.002.
[17] Wojdasiewicz P,Poniatowski ŁA,Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. Mediators Inflamm,2014,2014:561459. doi:10.1155/2014/561459.
[18] Ruddy MJ,Wong GC,Liu XK,et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members[J]. J Biol Chem,2004,279(4):2559-2567. doi:10.1074/jbc.M308809200.
[19] Eickelberg O,Pansky A,Mussmann R,et al. Transforming growth factor-beta1 induces interleukin-6 expression via activating protein-1 consisting of JunD homodimers in primary human lung fibroblasts[J]. J Biol Chem,1999,274(18):12933-12938. doi:10.1074/jbc.274.18.12933.
[20] Tokuda H,Kanno Y,Ishisaki A,et al. Interleukin (IL)-17 enhances tumor necrosis factor-alpha-stimulated IL-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in osteoblasts[J]. J Cell Biochem,2004,91(5):1053-1061. doi:10.1002/jcb.20004.
[21] Gaffen SL. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17--a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis[J]. Arthritis Res Ther,2004,6(6):240-247. doi:10.1186/ar1444.
[22] Sun W,Li Y,Wei S. miR-4262 regulates chondrocyte viability,apoptosis,autophagy by targeting SIRT1 and activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rats with osteoarthritis[J]. Exp Ther Med,2018,15(1):1119-1128. doi:10.3892/etm.2017.5444.
[23] Wu Z,Lu H,Yao J,et al. GABARAP promotes bone marrow mesenchymal stem cells-based the osteoarthritis cartilage regeneration through the inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. J Cell Physiol,2019,234(11):21014-21026. doi:10.1002/jcp.28705.
[24] Xie S,Chen M,Yan B,et al. Identification of a role for the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in innate immune cells[J]. PLoS One,2014,9(4):e94496. doi:10.1371/journal.pone.0094496.
[25] Chagin AS. Effectors of mTOR-autophagy pathway: targeting cancer,affecting the skeleton[J]. Curr Opin Pharmacol,2016,28:1-7. doi:10.1016/j.coph.2016.02.004.
[26] D'Adamo S,Cetrullo S,Minguzzi M,et al. MicroRNAs and autophagy: fine players in the control of chondrocyte homeostatic activities in osteoarthritis[J]. Oxid Med Cell Longev,2017,2017:3720128. doi:10.1155/2017/3720128.
[27] Bohensky J,Shapiro IM,Leshinsky S,et al. HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway[J]. Autophagy,2007,3(3):207-214. doi:10.4161/auto.3708.
[28] Bohensky J,Leshinsky S,Srinivas V,et al. Chondrocyte autophagy is stimulated by HIF-1 dependent AMPK activation and mTOR suppression[J]. Pediatr Nephrol,2010,25(4):633-642. doi:10.1007/s00467-009-1310-y.
[29] Caramés B,Hasegawa A,Taniguchi N,et al. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis,2012,71(4):575-581. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200557.
[30] Schmidt AM. 22016 ATVB plenary lecture: receptor for advanced glycation endproducts and implications for the pathogenesis and treatment of cardiometabolic disorders: spotlight on the macrophage[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2017,37(4):613-621. doi:10.1161/ATVBAHA.117.307263.
[31] Ott C,Jacobs K,Haucke E,et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling[J]. Redox Biol,2014,2:411-429. doi:10.1016/j.redox.2013.12.016.
[32] Huang Z,Kraus VB. Does lipopolysaccharide-mediated inflammation have a role in OA? [J]. Nat Rev Rheumatol,2016,12(2):123-129. doi:10.1038/nrrheum.2015.158.
[33] Asadipooya K,Uy EM. Advanced Glycation End Products (AGEs),receptor for AGEs,diabetes,and bone: review of the literature[J]. J Endocr Soc,2019,3(10):1799-1818. doi:10.1210/js.2019-00160.

doi:10.11659/jjssx.09E021031

·基础研究·

层递探查法探查下颌第一恒磨牙近中中央根管成功率的体外评价

赖 静,余 昕,郭姗姗,柏 银,卢美玲,王雪蔓 (重庆牙科医院口腔内科,重庆 400010)

[摘 要] **目的** 探讨体外三阶段层递探查法探查离体下颌第一恒磨牙近中中央根管(MMC)的成功率,并研究下颌第一恒磨牙 MMC 的解剖形态学特征。**方法** 收集近期拔除的下颌第一恒磨牙 60 颗,采用肉眼直视下探针探查、显微镜辅助探查、显微镜辅助超声预备三阶段层递探查法探查下颌第一恒磨牙 MMC,最终对未发现 MMC 的离体牙采用透明牙染色法,以此为对照评价上述三阶段探查 MMC 的成功率;分析 MMC 的形态分类以及在各年龄段中的分布情况。**结果** 层递探查法各阶段探查离体牙 MMC 的发现率分别为 5.3%(3 颗)、8.8%(5 颗)、21.1%(12 颗);经透明牙染色法确认后,有 1 颗离体牙的 MMC 被遗漏;体外三阶段各自的探查成功率分别为 23.1%、38.5%、92.3%;第一、二阶段 MMC 发现率比较差异无统计学意义($P>0.05$),第三阶段与第一、二阶段比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);MMC 的根管解剖学分型多为融合型(3-2 型、3-1 型);MMC 在 21~40 岁组中的发现率最高(33.3%)。**结论** 体外三阶段层递探查法能有效提高下颌第一恒磨牙中 MMC 的发现率,在显微镜辅助超声预备下探查 MMC 的成功率明显较高;MMC 的解剖形态相对复杂,与近中主根管间的联系紧密,且随着年龄的增长,MMC 的发现率逐渐降低。

[关键词] 近中中央根管;显微超声技术;下颌第一恒磨牙;根管探查;透明牙染色法

[中图分类号] R781.2;R323 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-09-07

Evaluation of the success rate about detecting the middle mesial canal of mandibular first permanent molars by stratification in vitro

LAI Jing, YU Xin, GUO Shan-shan, BAI Yin, LU Mei-ling, WANG Xue-man (Department of Stomatology, Chongqing Dental Hospital, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the success rate of middle mesial canal (MMC) in extracted mandibular first permanent molars by the three-stage stratification in vitro, and to analyze their anatomical and morphological characteristics. **Methods** A total of 60 mandibular first permanent molars extracted recently were collected, and the MMC of the mandibular first permanent molar was explored with three-stage stratification by an endodontic explorer under direct vision, microscope-assissted exploration, and the microscope-assisted ultrasound troughing. The teeth without MMC after three stages were reconfirmed by the canal staining and clearing technique, which was taken as the criterion to evaluate the success rate of the exploration of the three stages. The morphological classification of MMC and its distribution in each age group were analyzed. **Results** The discovery rate of MMC in the isolated teeth at each stage of stratification was 5.3% (3 teeth), 8.8% (5 teeth), and 21.1% (12 teeth); the canal staining and clearing technique confirmed that the MMC in 1 isolated tooth was missed. The success rates of MMC exploration at the three stages in vitro were 23.1%, 38.5% and 92.3%, respectively. There was no statistically significant difference in the discovery rate of MMC between the first and second stages ($P>0.05$), there was statistically significant difference

[基金项目] 重庆市渝中区科学技术委员会基础研究与前沿探索项目(20180143)

[通信作者] 王雪蔓,E-mail:771478334@qq.com

[34] Zhuo Q, Yang W, Chen J, et al. Metabolic syndrome meets osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(12): 729-737. doi: 10.1038/nrrheum.2012.135.

[35] 李 姣,黄委委,陶 林,等. 中药促骨髓间充质干细胞成骨分化的研究进展[J]. 吉林中医药,2021,41(4):544-548. doi:10.13463/j.cnki.jlzyy.2021.04.033.

[36] Lin W, Xu L, Lin S, et al. Characterisation of multipotent stem cells from human peripheral blood using an improved protocol[J]. J Orthop Translat, 2019, 19: 18-28. doi: 10.1016/j.jot.2019.02.003.

[37] 杨腾云,李彦林,刘德健,等. 外周血源性间充质干细胞修复骨关节炎软骨损伤的应用前景与问题[J]. 中国组织工程研究,2021,25(19):3071-3076.

[38] 王文晟,孔冰洁,唐超智,等. 骨关节炎间充质干细胞治疗进展[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2019,47(6):82-88. doi:10.16366/j.cnki.1000-2367.2019.06.013.

[39] Wang W, Zhao N, Li B, et al. Inhibition of cardiac allograft rejection in mice using interleukin-35-modified mesenchymal stem cells[J]. Scand J Immunol, 2019, 89(4): e12750. doi: 10.1111/sji.12750.

[40] 崔 樱,高 晖,胡美兰,等. 乌龙蠲痹汤内服外敷治疗类风湿性关节炎的临床效果及对细胞因子 IL-17、IL-35 的影响研究[J]. 中外医学研究,2016,14(9):51-52. doi:10.14033/j.cnki.cfmr.2016.9.028.

[41] 孟凡翠,汤立达. 中药网络药理学研究中存在的问题与发展展望[J]. 中草药,2020,51(8):2232-2237. doi:10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.034.

(编辑:贺绍梅)