基于网络药理学和分子对接探讨熊果酸治疗骨质疏松的分子机制Δ

赵　俊*，孙加琳，刘洪玲，刘广伟，李祥鹏，仓怀芹，梁　瑜，张传洲，韩　冰，隋忠国#（青岛大学附属医院药学部，山东 青岛　266003）

中图分类号　R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2021）17-2066-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2021.17.04

摘　要　目的：探讨熊果酸治疗骨质疏松症（OP）的潜在分子机制。方法：运用中药系统药理学分析平台数据库、PubMed数据库、UniProt数据库筛选单体化合物熊果酸的作用靶点基因，借助GeneCards数据库检索OP相关靶点基因，并运用Venny 2.1在线作图工具获取成分-疾病的共有靶点基因；运用STRING数据库构建成分-疾病共有靶点基因的蛋白质-蛋白质相互作用关系（PPI）网络并进行拓扑学分析，筛选度值大于平均度值的核心靶点基因；使用DAVID数据库对成分-疾病共有靶点基因进行基因本体（GO）功能注释和KEGG通路富集分析。以核心靶点基因编码蛋白为受体、熊果酸为配体，采用AutoDock Vina 1.1.2软件进行分子对接。结果：共挖掘出熊果酸相关靶点基因55个、OP相关靶点基因4 273个，两者共有靶点基因44个。上述共有靶点基因的PPI网络共包含节点44个、边513条，平均节点度值为23.3；核心靶点基因共24个，包括*VEGFA*、*TP*53、*IL*6、*CASP*3等。共富集到GO功能条目340个（校正后*P*值小于0.05），其中生物过程263个（涉及凋亡过程的负调控等）、分子功能25个（涉及蛋白质结合等）、细胞组分52个（涉及胞质溶胶等）；共富集到KEGG信号通路90条（校正后*P*值小于0.05），如癌症通路、乙型肝炎、肿瘤坏死因子（TNF）信号通路、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（PI3K/Akt）信号通路等。熊果酸与*TP*53等6个核心靶点基因编码蛋白的结合能均低于－5 kcal/mol，有较强的结合活性。结论：熊果酸对OP的治疗作用可能是通过调控*VEGFA*、*TP*53、*IL*6、*CASP*3、*JUN*等核心靶点基因，作用于癌症通路、乙型肝炎、TNF信号通路等多条关键通路而实现的。

关键词　熊果酸；骨质疏松症；网络药理学；分子对接；分子机制

Molecular Mechanism of Ursolic Acid in the Treatment of Osteoporosis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

ZHAO Jun, SUN Jialin, LIU Hongling, LIU Guangwei, LI Xiangpeng, CANG Huaiqin, LIANG Yu, ZHANG Chuanzhou, HAN Bing, SUI Zhongguo (Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266003, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To explore the potential molecular mechanism of ursolic acid in the treatment of osteoporosis (OP). METHODS: TCMSP, PubMed database and UniProt database were used to screen potential targets of monomer compound ursolic acid. OP related target genes were searched with GeneCards database. The common target genes of component-disease were obtained by Venny 2.1 online mapping tool. The protein-protein interaction (PPI) network of component-disease common target genes was constructed by using STRING database, and topological analysis was carried out; the core target genes, whose degree value was greater than the average degree value, were screened. GO functional annotation and KEGG pathway enrichment analysis of component-disease common target genes were carried out by DAVID database. AutoDock Vina 1.1.2 software was used for molecular docking, using protein encoded by the core target gene as receptor and ursolic acid as ligand. RESULTS: A total of 55 ursolic acid related target genes and 4 273 OP related target genes were excavated, with a total of 44 common target genes. PPI network with above common target genes included 44 nodes and 513 edges, with an average node degree of 23.3. There were 24 core target genes, including *VEGFA*, *TP*53, *IL*6, *CASP*3. There were 340 GO functional items were enriched (corrected $P<0.05$), including 263 biological processes (negative regulation of apoptosis, etc.), 25 molecular functions (protein binding, etc.) and 52 cell components (cytosol, etc.). There were 90 KEGG signaling pathways (corrected $P<0.05$), such as tumor pathway, hepatitis B pathway, TNF signaling pathway, viral carcinogenesis and phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K-Akt) signaling pathway. The binding energy between ursolic acid and 6 proteins encoded by core target genes such as *TP*53 was lower than －5 kcal/mol, which had strong binding activity. CONCLUSIONS: The therapeutic effect of ursolic acid on OP may be achieved by regulating *VEGFA*, *TP*53, *IL*6, *CASP*3, *JUN* and other core target genes and acting on multiple key pathways such as cancer pathway, hepatitis B and TNF signaling pathway.

KEYWORDS　Ursolic acid; Osteoporosis; Network pharmacology; Molecular docking; Molecular mechanism

Δ 基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.81903872）；青岛市中医药科技项目（No.2021-zyyq23）；青岛大学附属医院青年科研基金项目（No.QDFY201919）

＊主管药师，硕士。研究方向：内分泌临床药理学。E-mail：zhaojun198612@sina.com

通信作者：主任药师，硕士。研究方向：临床药学。E-mail：sz_guo65@163.com

随着人口增长及老龄化的加剧，骨质疏松症（osteoporosis，OP）的发病率也逐年上升，已成为我国主要的公共卫生问题[1]。并且，该症还有诱发其他疾病的可能，给患者家庭和社会均造成了沉重的经济负担[2]。老年人是OP的主要患病人群，目前临床上治疗OP的药物大多以调节骨代谢的化学药为主，但其可引起肾损伤等一系列不良反应，使得其临床应用受限[3]。OP在祖国医学中属于“骨痿”范畴，《素问》中载“肾气热，则腰脊不举，骨枯而髓减，发为骨痿”，中医治疗以补肾益精、活血祛瘀为基本原则[4]。但中医药治疗OP的相关分子机制并未完全阐明，这制约了相关中医药理论向临床实践的进一步转化。

熊果酸（ursolic acid）具有抗氧化、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种功效，在自然界分布广泛，同时因其价格低廉、疗效稳定且不良反应少而备受关注[5]。相关研究表明，熊果酸具有明显改善肾损伤的作用[6]。而祖国医学认为，肾虚是OP的主要病机，且中医主张OP治疗应与肾功能保护进程并行[7]。因此，根据中医“补肾壮骨”理论，熊果酸可能具有潜在的OP改善作用。网络药理学是利用计算机科学、分子生物学、药学等学科的成果，对传统中药成分的潜在靶点、药理作用进行多基因、多靶点、多途径的系统研究，可为中医药现代化研究提供新的思路[8]。分子对接则是通过受体与药物分子之间的相互作用方式来预测其结合模式和亲和力的一种理论模拟方法[9]。本研究拟利用网络药理学方法和分子对接技术，初步探讨熊果酸治疗OP的潜在作用靶点及通路，以期为进一步阐明熊果酸治疗OP的分子机制提供依据。

1　资料与方法

1.1　熊果酸作用靶点基因的提取

通过中药系统药理学分析平台数据库（TCMSP，https://tcmspw.com/tcmsp.php）检索熊果酸的潜在作用靶点蛋白，并在PubMed数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/）中进行结构比对。通过UniProt数据库（https://www.uniprot.org/）将上述靶点对应的蛋白转换成种属为人的基因，构建熊果酸单体化合物及其作用靶点基因的数据库。

1.2　OP相关靶点基因的筛选

以“osteoporosis”为关键词，在Gene Cards数据库（https://www.genecards.org/）中进行人类基因检索，以获取OP的疾病靶点基因；同时，在该数据库中以相关性分数（relevance score）的中位值进行筛选，以期获得更多的疾病相关靶点基因。

1.3　成分-疾病共有靶点基因的筛选

将“1.1”“1.2”项下筛选出的两组靶点分别输入Venny 2.1在线作图工具（https:// bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html）以绘制韦恩图，得到成分-疾病的共有靶点基因。

1.4　共有靶点基因的蛋白质-蛋白质相互作用关系网络的构建及拓扑学分析

将成分-疾病的共有靶点基因导入STRING数据库（https://string-db.org/cgi/input.pl），设定生物种类为“homo sapiens（智人）”，构建共有靶点基因的蛋白质-蛋白质相互作用关系（PPI）网络，并将构建结果导入Cytoscape 3.8.0软件中进行可视化展示。可视化网络图中，以节点表示共有靶点基因，其颜色越深、形状越大表示对应靶点基因的度值（degree）越大，即此靶点基因越重要；以边表示共有靶点基因之间的关联，其线条越粗表示靶点基因间的结合分数（combine score）越大，即靶点基因与靶点基因之间的相关性越显著[10]。

借助Cystoscape 3.8.0软件中的“network analyzer”工具对PPI网络进行拓扑学分析。以度值、介数中心性（betweenness centrality）、接近中心性（closeness centrality）等3个参数的中位值为参考指标。其中，介数中心性代表经过某一节点的最短路径的数量，介数中心性越大，该节点影响力越大[11]；接近中心性代表节点与网络中其他节点的平均距离，接近中心性越大的节点其信息流动性越佳[12]；选取度值大于平均度值的靶点基因作为核心靶点基因[13]，并选取度值、介数中心性、接近中心性均排名前10位的核心靶点基因的拓扑学分析结果进行展示。

1.5　基因本体功能注释及KEGG通路富集分析

使用DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/）对成分-疾病的共有靶点基因进行基因本体（GO）功能注释和KEGG通路富集分析。其中，GO功能注释分析涉及生物过程（BP）、分子功能（MF）、细胞组分（CC）等功能。设置物种为“homo sapiens（智人）”、标识符（identifier）为“official gene symbol（官方名称）”，保留校正后P值小于0.05的条目，并按照校正后P值从小到大进行排序。选择排名前20位的条目导入RStudio 3.6.3软件中，实现富集结果的可视化。

1.6　成分-核心靶点基因编码蛋白的分子对接实验

从PDB数据库（https://www.rcsb.org/）下载核心靶点基因编码蛋白的三维（3D）结构，保存为“PDB”格式，作为蛋白受体。使用AutoDock Tools 1.5.6软件对蛋白受体进行去除水分子、分离蛋白质、添加非极性氢等处理，并计算其结构的Gasteiger电荷以确保原子遵循AutoDock中的原子类型，然后将其保存为“pdbqt”格式文件。从PubChem数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）中下载熊果酸的二维（2D）结构，保存为“mol2”格式，使用AutoDock Tools 1.5.6软件进行加氢、加电荷、检测配体分子的中心节点以及进行可旋转键的搜寻与定义后，保存为“pdbqt”格式文件，作为配体。将受体设置为刚性，配体设置为柔性，采用AutoDock Vina 1.1.2软件对核心靶点基因编码蛋白受体和熊果酸配体进行分子对接。通过结合能来评估配体和受体的结合

能力，结合能小于0则表示配体与受体能够自发结合，且其值越小表示两者的结合活性越高[14]。采用PyMOL 2.3软件进行对接结果的可视化展示（本文仅对结合能从小到大排名前6位的化合物的对接结果进行可视化展示）。

2 结果

2.1 熊果酸与OP相关靶点基因的筛选结果

经检索及汇总删重后，共获得熊果酸相关靶点基因55个；在GeneCards数据库中共检索到OP相关靶点基因4 273个。将上述靶点基因输入Venny 2.1软件中，共得到成分-疾病的共有靶点基因44个，详见图1。

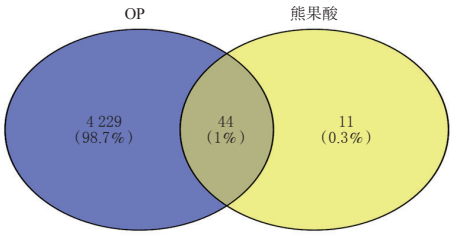


图1 熊果酸与OP共有靶点基因筛选的韦恩图

Fig 1 Venn diagram of screening common target genes of ursolic acid and OP

2.2 共有靶点基因PPI网络构建及核心靶点基因筛选结果

成分-疾病共有靶点基因的PPI可视化网络见图2。由图2可见，该网络中共有节点44个、边513条，平均节点度值为23.3。网络中未出现孤立节点，且各节点之间连通性良好，表明熊果酸可通过多靶点的协同调控发挥其治疗OP的作用。

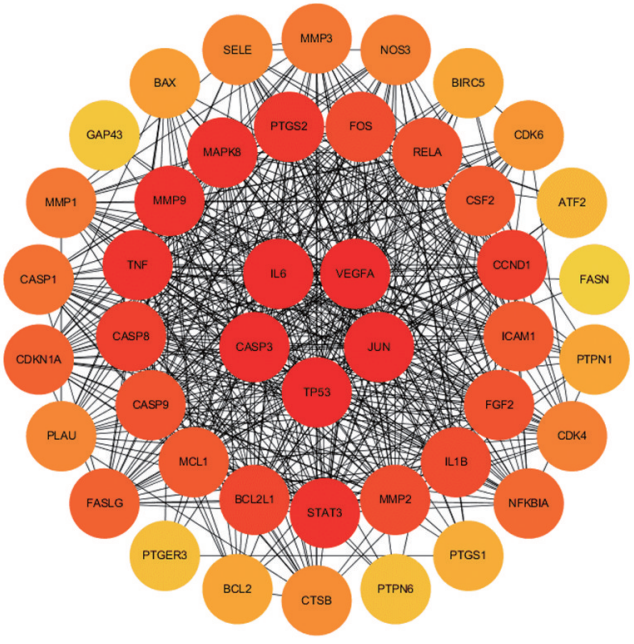


图2 成分-疾病共有靶点基因的PPI可视化网络图

Fig 2 PPI visual network of component-disease common target gene

网络拓扑学分析结果显示，该网络中节点度值大于平均度值（23.318）的核心靶点基因共有24个，度值、介数中心性、接近中心性同时排名前10位的核心靶点基因分别为*VEGFA*、*TP53*、*IL6*、*CASP3*、*JUN*、*MMP9*、*STAT3*、*TNF*、*MAPK8*和*PTGS2*，其拓扑学分析结果见表1。

表1 熊果酸治疗OP作用的核心靶点基因的拓扑学分析结果（排名前10位）

Tab 1 Topological analysis result of core target gene of ursolic acid in treatment of OP (top 10)

核心靶点基因	度值	介数中心性	接近中心性
VEGFA	38	79.957 74	40.5
TP53	38	97.059 37	40.5
IL6	36	85.290 57	39.5
CASP3	36	65.389 27	39.5
JUN	36	66.255 98	39.5
MMP9	35	50.317 75	39.0
STAT3	35	47.803 22	39.0
TNF	35	38.348 47	39.0
MAPK8	35	40.741 08	39.0
PTGS2	33	38.681 16	38.0

2.3 GO功能富集分析结果

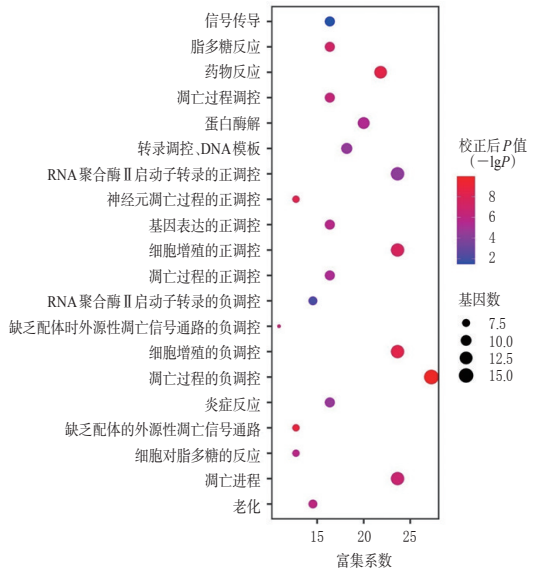
按校正后P值小于0.05的标准进行筛选，共富集到GO功能条目340个，BP、MF、CC分别有263、25、52个。其中，BP主要涉及凋亡过程的负调控（15个）、细胞增殖的负调控（13个）、凋亡进程（13个）、细胞增殖的正调控（13个）、RNA聚合酶Ⅱ启动子转录的正调控（13个）、药物反应（12个）等；CC主要涉及胞质溶胶（30个）、细胞核（29个）、细胞质（28个）、质膜（20个）等；MF主要涉及蛋白质结合（47个）、相同蛋白质结合（13个）、蛋白激酶结合（11个）、蛋白质异二聚化活性（11个）、蛋白质同二聚化活性（11个）等。GO功能富集分析的气泡图（校正后*P*值排名前20位）见图3。

2.4 KEGG通路富集分析结果

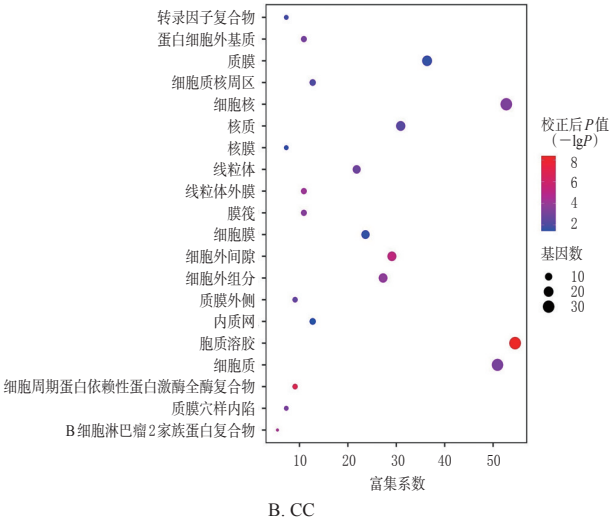
按校正后P值小于0.05的标准进行筛选，共富集到KEGG信号通路90条。校正后P值排名前20位的条目的可视化展示结果见图4，其具体信息见表2。由图4、表2可知，熊果酸治疗OP的潜在靶点包括癌症通路、乙型肝炎、肿瘤坏死因子（TNF）信号通路、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（PI3K/Akt）信号通路、人类嗜T淋巴细胞白血病病毒Ⅰ型（HTLV-Ⅰ）感染等多条通路。

2.5 成分-核心靶点基因编码蛋白的分子对接结果

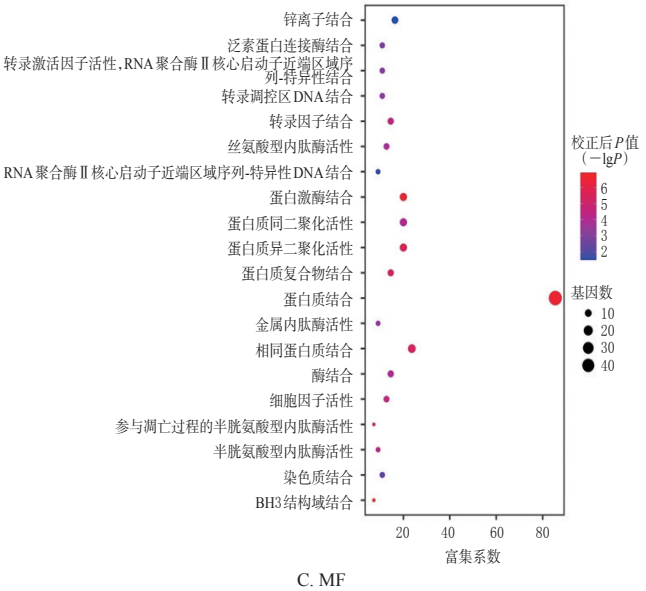
熊果酸与核心靶点基因*CASP3*、*IL6*、*MAPK8*、*JUN*、*TP53*、*VEGFA*编码蛋白的结合能分别为－5.20、－5.43、－6.68、－5.80、－6.89、－5.36 kcal/mol（1 kcal＝4.186 kJ），均低于－5 kacl/mol，这提示熊果酸与核心靶点基因编码蛋白之间有较强的结合活性[15]。以熊果酸与*TP53*基因编码蛋白（p53）的结合为例，两者的结合能为－6.89 kcal/mol，熊果酸与p53的氨基酸残基GLY-1683可通过氢键连接（作用距离为2.5 Å），可得到较为稳定的复合物。熊果酸与核心靶点基因编码蛋白的分子对接结果（结合能排名前6位）见图5。



A. BP



B. CC



C. MF

图3　GO功能富集分析的气泡图(校正后*P*值排名前20位)

Fig 3　Bubble diagram of GO functional enrichment analysis (top 20 in corrected *P* value)

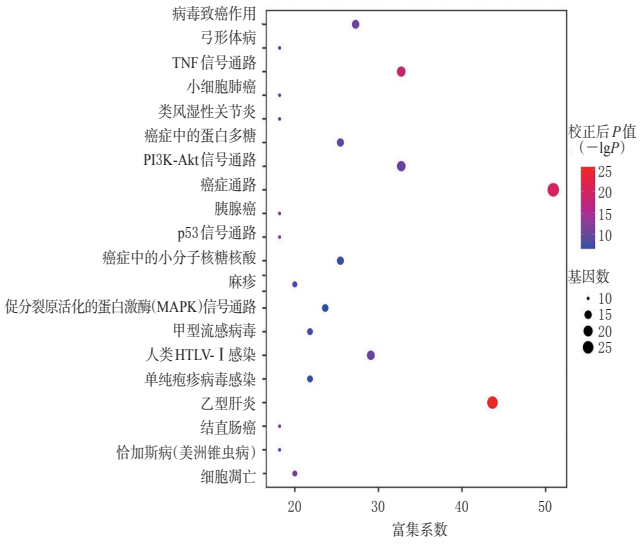


图4　KEGG通路富集分析气泡图(校正后*P*值排名前20位)

Fig 4　Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis (top 20 in corrected *P* value)

3　讨论

OP是一种全身性骨疾病,其特征是患者骨量逐渐减少、骨质脆弱、骨折易发[16]。据首个中国OP流行病学调查结果显示:OP已成为我国中老年人群的重要健康问题,50岁以上人群的OP患病率为19.2%;且在中老年女性中尤为严重,65岁以上女性的OP患病率更是达到了51.6%,严重影响了老年人群的生活质量[17−18]。因此,OP的相关研究受到越来越多学者的关注。

目前临床针对OP的药物治疗仍以化学药为主,包括雌激素、选择性雌激素受体调节剂、双膦酸盐类、降钙素和骨形成促进剂等[19]。临床数据显示,化学药的大量使用除了会造成一定程度的肾损伤外,还存在诱发乳腺癌和子宫内膜癌等严重副作用,从而制约了其临床应用[19]。我国传统中医药在多种疾病的治疗中均具有显著的效果,且副作用小,特别适合于治疗肾脏代谢功能衰退的老年性疾病[20]。因此,传统中药在防治肾损伤、改善OP方面具有广阔的潜力和应用前景。

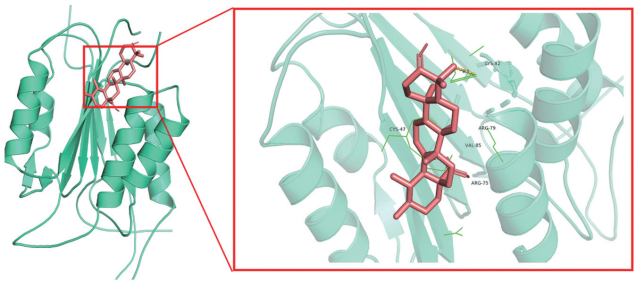
熊果酸属于乌苏烷型五环三萜类化合物,存在于熊果、女贞子、野蔷薇果、白花蛇舌草、车前草等自然界广泛分布的天然药物中,具有抗氧化、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种功效,并且已有多年的应用历史[21]。相对于目前化学药治疗OP致肾损伤等一系列不良反应,熊果酸对肾损伤具有明显的改善作用[6]。中医认为,肾藏精,精生髓,髓居于骨腔中以滋养骨骼,当肾精亏虚时,则骨枯髓减,故肾脏在骨骼的生长和发育中起到至关重要的作用[22]。由以上研究结果和中医理论可见,熊果酸具有潜在的治疗OP作用。

本研究共挖掘出熊果酸相关靶点基因55个,OP相关靶点基因4 273个;经韦恩图分析,获得成分-疾病的

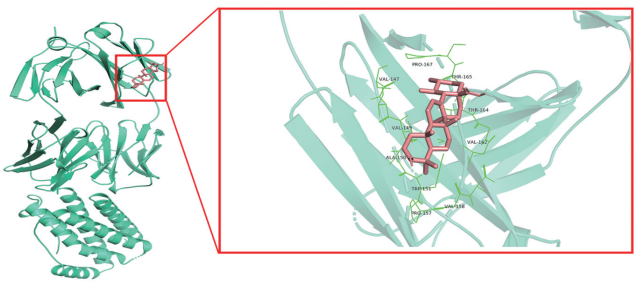
表2　熊果酸治疗OP的KEGG富集分析结果（校正后*P*值排名前20位）

Tab 2　KEGG enrichment analysis result of ursolic acid in treatment of OP（top 20 in corrected *P* value）

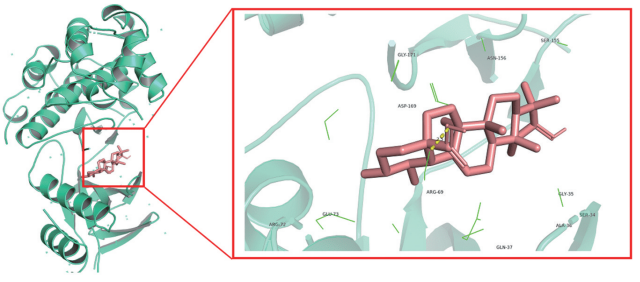
KEGG信号通路	基因数	校正后*P*值	基因名称
乙型肝炎(hepatitis B)	24	25.51	*PRKCG*, *ATF2*, *CDKN1A*, *JUN*, *STAT3*, *FASLG*, *FOS*, *TNF*, *MMP9*, *RELA*, *CASP9*, *NFKBIA*, *CREB3*, *IL6*, *MAPK8*, *CASP8*, *CDK6*, *CCND1*, *CDK4*, *CASP3*, *BCL2*, *BAX*, *BIRC5*, *TP53*
癌症通路(pathways in cancer)	28	20.45	*CDKN1A*, *PTGER3*, *FASLG*, *PTGS2*, *FGF2*, *RELA*, *CASP9*, *MAPK8*, *CASP8*, *CCND1*, *CASP3*, *PRKCG*, *JUN*, *MMP1*, *MMP2*, *STAT3*, *FOS*, *MMP9*, *VEGFA*, *NFKBIA*, *IL6*, *CDK6*, *CDK4*, *BCL2*, *BAX*, *BIRC5*, *TP53*, *BCL2L1*
TNF信号通路(TNF signaling pathway)	18	18.51	*ATF2*, *JUN*, *CSF2*, *MMP3*, *FOS*, *PTGS2*, *SELE*, *TNF*, *MMP9*, *RELA*, *ICAM1*, *NFKBIA*, *CREB3*, *IL6*, *MAPK8*, *CASP8*, *IL1B*, *CASP3*
细胞凋亡(cell apoptosis)	11	10.89	*NFKBIA*, *CASP9*, *CASP8*, *CASP3*, *BCL2*, *BAX*, *FASLG*, *TNF*, *TP53*, *RELA*, *BCL2L1*
病毒致癌作用(viral carcinogenesis)	15	9.99	*ATF2*, *CDKN1A*, *JUN*, *STAT3*, *RELA*, *NFKBIA*, *CREB3*, *CASP8*, *CDK6*, *CCND2*, *CCND1*, *CDK4*, *CASP3*, *BAX*, *TP53*
PI3K/Akt信号通路(PI3K/Akt signaling pathway)	18	9.93	*ATF2*, *CDKN1A*, *NOS3*, *FASLG*, *FGF2*, *RELA*, *VEGFA*, *CASP9*, *CREB3*, *IL6*, *CDK6*, *CCND2*, *CCND1*, *CDK4*, *BCL2*, *TP53*, *MCL1*, *BCL2L1*
人类HTLV-Ⅰ感染(HTLV-Ⅰ infection)	16	9.82	*ATF2*, *CDKN1A*, *JUN*, *CSF2*, *FOS*, *TNF*, *RELA*, *ICAM1*, *NFKBIA*, *IL6*, *CCND2*, *CCND1*, *CDK4*, *BAX*, *TP53*, *BCL2L1*
结直肠癌(colorectal cancer)	10	9.39	*CASP9*, *JUN*, *MAPK8*, *CCND1*, *CASP3*, *BCL2*, *BAX*, *BIRC5*, *FOS*, *TP53*
胰腺癌(pancreatic cancer)	10	9.20	*CASP9*, *MAPK8*, *CDK6*, *CCND1*, *CDK4*, *STAT3*, *TP53*, *RELA*, *BCL2L1*, *VEGFA*
p53信号通路(p53 signaling pathway)	10	9.08	*CASP9*, *CDKN1A*, *CASP8*, *CDK6*, *CCND2*, *CCND1*, *CDK4*, *CASP3*, *BAX*, *TP53*
癌症中的蛋白多糖(proteoglycans in cancer)	14	9.00	*PRKCG*, *CDKN1A*, *MMP2*, *STAT3*, *FASLG*, *FGF2*, *TNF*, *MMP9*, *VEGFA*, *CCND1*, *PLAU*, *CASP3*, *PTPN6*, *TP53*
小细胞肺癌(small cell lung cancer)	10	8.14	*NFKBIA*, *CASP9*, *CDK6*, *CCND1*, *CDK4*, *BCL2*, *PTGS2*, *TP53*, *RELA*, *BCL2L1*
类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)	10	8.01	*IL6*, *JUN*, *CSF2*, *MMP1*, *IL1B*, *MMP3*, *FOS*, *TNF*, *ICAM1*, *VEGFA*
麻疹(measles)	11	7.56	*NFKBIA*, *IL6*, *CDK6*, *CCND2*, *CCND1*, *CDK4*, *IL1B*, *STAT3*, *FASLG*, *TP53*, *RELA*
甲型流感病毒(influenza A)	12	7.50	*NFKBIA*, *CASP9*, *ATF2*, *IL6*, *JUN*, *MAPK8*, *IL1B*, *CASP1*, *FASLG*, *TNF*, *RELA*, *ICAM1*
美洲锥虫病 (American trypanosomiasis)	10	7.36	*NFKBIA*, *IL6*, *JUN*, *MAPK8*, *CASP8*, *IL1B*, *FASLG*, *FOS*, *TNF*, *RELA*
单纯疱疹病毒感染(herpes simplex infection)	12	7.28	*NFKBIA*, *IL6*, *JUN*, *MAPK8*, *CASP8*, *IL1B*, *CASP3*, *FASLG*, *FOS*, *TNF*, *TP53*, *RELA*
弓形体病(toxoplasmosis)	10	7.15	*NFKBIA*, *CASP9*, *MAPK8*, *CASP8*, *CASP3*, *STAT3*, *BCL2*, *TNF*, *RELA*, *BCL2L1*
癌症中的小分子核糖核酸(microRNAs in cancer)	14	7.12	*PRKCG*, *CDKN1A*, *STAT3*, *PTGS2*, *MMP9*, *VEGFA*, *CDK6*, *CCND2*, *CCND1*, *PLAU*, *CASP3*, *BCL2*, *TP53*, *MCL1*
MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)	13	6.78	*PRKCG*, *ATF2*, *JUN*, *FASLG*, *FOS*, *MAPK8IP2*, *FGF2*, *TNF*, *RELA*, *MAPK8*, *IL1B*, *CASP3*, *TP53*



A.熊果酸与*CASP3*基因编码蛋白



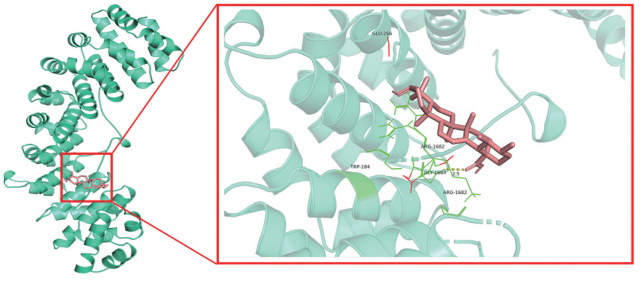
B.熊果酸与*IL6*基因编码蛋白



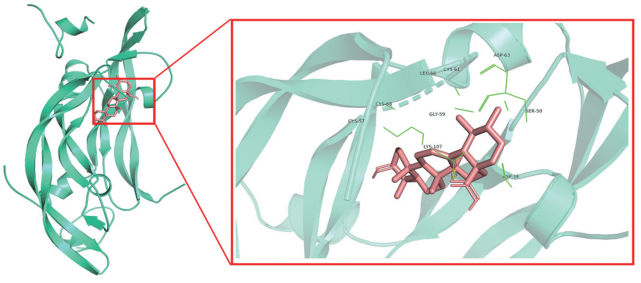
C.熊果酸与*MAPK8*基因编码蛋白



D.熊果酸与*JUN*基因编码蛋白



E.熊果酸与*TP53*基因编码蛋白



F.熊果酸与*VEGFA*基因编码蛋白

图5　熊果酸与6个核心靶点基因编码蛋白的分子对接模式图

Fig 5　Molecular docking pattern diagrams of ursolic acid and proteins encoded by 6 core target genes

共有靶点基因44个。上述共有靶点基因的PPI网络显示，靶点基因之间相互联系、共同作用；网络拓扑学分析结果显示，熊果酸治疗OP的核心靶点基因主要包括*VEGFA*、*TP*53、*IL*6、*CASP*3、*JUN*、*MMP*9、*STAT*3、*TNF*、*MAPK*8、*PTGS*2等。

OP的发生发展与多种炎性细胞因子关系密切。有研究指出，白细胞介素6（IL-6）、TNF-α被证实为参与骨吸收的重要炎性细胞因子，可促进骨吸收并加重患者的病情发展[23-24]。其中，IL-6是一种多效应性炎性细胞因子，可参与炎症反应、免疫应答、造血调节和肿瘤发生等多个过程[25]。研究表明，IL-6能通过多种信号通路调控成骨细胞的凋亡与分化，促进破骨细胞的形成，从而促进骨吸收，最终导致OP的发生[26]。此外，IL-6还能够诱导激活Janus激酶（JAK）家族的3个成员[信号转导及转录激活因子3（STAT3）、MAPK和PI3K]，而这3个因子均与OP的发生发展密切相关[27-29]。TNF-α既可以通过诱导成骨细胞表达核因子κB（NF-κB）受体活化因子配体（RANKL）表达，也可以直接作用于RANKL来诱导破骨细胞的形成和促进骨吸收[30]。刘雁飞等[31]研究发现，熊果酸可显著降低慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠血液中细胞因子TNF-α、IL-1β的水平。以上内容提示，IL-6、TNF-α是熊果酸治疗OP的潜在靶点。

MAPK8属于MAPK家族成员，在调节炎症和免疫反应中具有重要作用。一方面，MAPK对于破骨细胞的形成和活化具有重要作用，并且能够通过介导NF-κB信号通路来影响OP的发展[32]；另一方面，活化的MAPK可促进成骨细胞的生成，从而发挥其改善OP症状的作用[33]。前列腺素可诱导巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）和RANKL表达，还可促进破骨细胞分化并抑制骨细胞功能[34]。前列腺素内过氧化物酶2（PTGS2）为前列腺素生成的限速酶，对前列腺素的上述活性有一定的抑制作用[35]。血管内皮生长因子（VEGF）兼具支持血管生成和促进成骨细胞功能的作用，可部分通过自分泌、内分泌机制以及旁分泌机制来调节成骨细胞、破骨细胞的功能，促进骨形成及减少骨吸收[36]。胱天蛋白酶（caspase）家族是调节细胞凋亡过程中的关键因子，其中caspase3（CASP3基因表达产物）是该家族中最关键的凋亡效应因子之一，被认为是凋亡的执行者，一旦caspase3被激活，细胞凋亡将不可被逆转[37]。

本研究通过对共有靶点的GO功能注释分析发现，GO生物过程主要集中在凋亡进程、细胞增殖调控、药物反应等。通过对共有靶点基因的KEGG通路富集分析发现，其主要富集在肿瘤通路、TNF信号通路、乙型肝炎、PI3K/Akt信号通路、人类HTLV-Ⅰ感染等多条通路。其中，PI3K/Akt信号通路与骨组织代谢关系密切[38]。激活PI3K/Akt信号通路可刺激成骨细胞的增殖和分化，同时抑制其凋亡；另外，PI3K可刺激破骨细胞肌动蛋白丝的形成，具有调节细胞趋化、附着和扩散等功能，抑制PI3K表达可减少成熟破骨细胞的骨吸收[39]。多项研究证实，熊果酸可抑制PI3K/Akt信号通路的传导，从而导致其下游促凋亡蛋白表达上调、内质网应激通路活化，最终促进细胞凋亡[40-41]。相关研究证实，慢性乙型肝炎病毒感染与OP之间关系密切，其作用机制可能与该病毒感染后会引起慢性炎症有关[42]。乙型肝炎病毒感染可诱导TNF-α、IL-1、IL-6等炎性细胞因子分泌，可增加RANKL表达而刺激骨吸收[43]。上述炎性细胞因子的综合作用是慢性乙型肝炎病毒感染致OP的主要原因，其可导致骨形成减少和骨吸收增加，从而降低骨矿物质密度[44]。另外，乙型肝炎病毒感染会抑制肝内25-羟维生素D的生成以及维生素D的摄取，从而增加骨丢失并减少骨形成[45]。长期乙型肝炎病毒感染导致的肝脏失代偿会通过抑制纤维细胞生长来影响骨基质的胶原合成，同时可通过增加癌胚纤维连接蛋白的表达来共同抑制成骨细胞的功能[46]。本研究采用分子对接技术分别将熊果酸与核心靶点基因*CASP*3、*IL*6、*MAPK*8、*JUN*、*TP*53、*VEGFA*的编码蛋白进行分子对接验证。结果显示，熊果酸与上述核心靶点基因编码蛋白均有较强的对接活性（结合能均小于－5.0 kcal/mol），这进一步说明了熊果酸可与核心靶点基因编码蛋白受体稳定结合并发挥其治疗OP的作用。该结果初步验证了上述网络药理学预测结果的可靠性，可为后续熊果酸治疗OP的作用机制研究奠定基础。

综上所述，熊果酸对OP的治疗作用可能是通过调控*VEGFA*、*TP*53、*IL*6、*CASP*3、*JUN*、*MMP*9、*STAT*3、*TNF*、*MAPK*8、*PTGS*2等核心靶点基因，作用于肿瘤通路、乙型肝炎、TNF信号通路等多条关键通路而实现的。其作用机制涉及了多个治疗靶点及信号通路，体现出了中药多靶点、多通路治疗疾病的特点。但针对本研究预测的熊果酸治疗OP的潜在靶点及通路，尚有待进一步通过相关实验予以验证。

参考文献

[1] 白璧辉，谢兴文，李鼎鹏，等.我国近5年来骨质疏松症流行病学研究现状[J].中国骨质疏松杂志，2018，24(2)：253-258.

[2] 王笑哥.阿仑膦酸钠治疗绝经后骨质疏松症的临床疗效观察[J].中国医药指南，2019，17(14)：80.

[3] 王芳芳，陈维红，何志强，等.注射用唑来膦酸药品不良反应文献及临床病例分析[J].中国药物警戒，2019，4(16)：223-227.

[4] 平利峰，于笑霞，章鹏，等.坚骨胶囊联合常规方案治疗强直性脊柱炎合并骨质疏松的临床观察[J].中国药房，2014，25(20)：1864-1867.

[5] 王鹏，张忠义，吴忠.熊果酸在药用植物中的分布及药理作用[J].中药材，2000，23(11)：717-722.

[6] ZHAO J，ZHENG H，SUI Z，et al. Ursolic acid exhibits an-

ti-inflammatory effects through blocking TLR4-MyD88 pathway mediated by autophagy[J]. Cytokine, 2019, 123(11): 154726-154734.
[7] 刘钫,刘和娣,李恩.肾虚与骨质疏松及补肾中药的作用[J].中国骨质疏松杂志,2000,6(4):83-86.
[8] 付海荣,庞毅,谭家华,等.山豆根治疗白血病作用机制的网络药理学研究[J].中国药房,2019,30(24):3392-3398.
[9] 汤威威,赵宏,孔令洲,等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨沙棘治疗阿尔茨海默病的作用机制[J].中国药房,2019,31(19):2325-2332.
[10] MOMOTA R, OHTSUKA A. Network of anatomical texts (NAnaTex), an open-source project for visualizing the interaction between anatomical terms[J]. Anat Science Int, 2018, 93(1): 149-153.
[11] 周文霞,王同兴,程肖蕊,等.网络药理学研究中的网络分析技术[J].国际药学研究杂志,2016,43(3):399-409.
[12] 郝民琦,王佳慧,李晓玲,等.基于网络药理学与分子对接探讨黄芪治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J].中国药房,2021,32(10):1215-1223.
[13] 钟远鸣,何炳坤,吴卓檀,等.芍药甘草汤治疗腰椎间盘突出症早期疼痛作用机制的网络药理学分析[J].中国组织工程研究,2021,25(20):3194-3201.
[14] 庄莉,翟园园,姚卫峰,等.基于网络药理学的二至丸对肾脏保护作用的机制研究[J].药学学报,2019,54(5):877-885.
[15] DENNIS G J R, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery[J]. Genome Biol, 2003, 4(5): P3-P8.
[16] STRAKA M, STRAKA-TRAPEZANLIDIS M, DEGLOVIC J, et al. Periodontitis and osteoporosis[J]. Neuro Endocrinol Letter, 2015, 36(5): 401-406.
[17] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2019,12(4):317-318.
[18] BACCARO L F, CONDE D M, COSTA-PAIVA L, et al. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil[J]. Clin Interv Aging, 2015, 10(3): 583-591.
[19] Drugs for postmenopausal osteoporosis[J]. Med Lett Drugs Ther, 2017, 59(1536): 203-210.
[20] WHAYNE T F. Hypertriglyceridemia: an infrequent, difficult-to predict, severe metabolic and vascular problem associated with estrogen administration[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2020, 18(3): 254-261.
[21] SHANMUGAM M K, DAI X, KUMAR AP, et al. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(11): 1579-1587.
[22] 覃小燕,韩晓玲,张媛,等.基于网络药理学的女贞子抗骨质疏松作用机制研究[J].中国药学杂志,2021,56(5): 368-378.
[23] LIN C C, LI T C, LIU C S, et al. Associations of TNF-α and IL-6 polymorphisms with osteoporosis through joint effects and interactions with LEPR gene in Taiwan: Taichung Community Health Study for Elders (TCHS-E)[J]. Mol Biol Rep, 2016, 43(10): 1179-1191.
[24] LIU X H, KIRSCHENBAUM A, YAO S, et al. The role of the interleukin-6/gp130 signaling pathway in bone metabolism[J]. Vitam Horm, 2006, 74(10): 341-355.
[25] SANG C, ZHAGN J, ZHAGN Y, et al. TNF-α promotes osteoclastogenesis through JNK signaling-dependent induction of Semaphorin 3D expression in estrogen-deficiency induced osteoporosis[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(12): 3396-3408.
[26] YAN L, HU R, TU S, et al. Meta-analysis of association between IL-6-634C/G polymorphism and osteoporosis[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 19225-19232.
[27] 吴景华,郭佳培,王志刚,等. IL-6-JAK2/STAT3信号途径在骨质疏松症的作用机制研究[J].现代预防医学,2016,43(14):2621-2623.
[28] 张波,耿彬,谭小义,等. MAPK信号通路与骨质疏松关系的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2014,22(23):2161-2164.
[29] 陈亚辉,龚忠勤,崔燎,等. PI3K/Akt信号通路在骨质疏松病理过程中的作用[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(3):356-360.
[30] 赵玉鸣,葛立宏,GRIGORIADIS A E.肿瘤坏死因子α对小鼠破骨细胞分化的影响[J].北京大学学报(医学版),2005,37(4):433-435.
[31] 刘雁飞,韩盼,赖永继.熊果酸对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠的治疗作用[J].医药导报,2015,34(10):1292-1295.
[32] XING L Z, NI H J, WANG Y L. Quercitrin attenuates osteoporosis in ovariectomized rats by regulating mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89(5): 1136-1141.
[33] KIM H K, KIM M, LEEM K. Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis[J]. Molecules, 2013, 18(12): 15474-15489.
[34] WONG R W K, RABIE A B M. Effect of quercetin on bone formation[J]. J Orthop Res, 2010, 26(8): 1061-1066.
[35] CUI J, JIA J. Natural COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: an update[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(18): 3622-3646.
[36] CLARKIN C E, GERSTENFELD L C. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication[J]. Cell Biochem Funct, 2013, 31(1): 1-11.

木香烃内酯对乳腺癌SK-BR-3细胞周期分布及凋亡的影响Δ

马　强[1,2*]，陈　洁[1]，苗加伟[1]，熊　书[1]，庞　毅[1,2]，邓雪松[1,2#]（1.重庆三峡医药高等专科学校基础医学部，重庆 404120；2.三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室，重庆　404120）

中图分类号　R737.9；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2021）17-2073-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2021.17.05

摘　要　目的：研究木香烃内酯（COS）对人乳腺癌SK-BR-3细胞周期分布及凋亡的影响，并探讨其机制。方法：将人乳腺癌SK-BR-3细胞分为空白对照组和COS 10、20、30、40、50 μmol/L组，用MTT法检测COS对细胞增殖的影响。另将细胞分为空白对照组和COS低、中、高浓度组（10、20、30 μmol/L），培养24 h后，采用流式细胞仪检测细胞周期分布情况，采用Hoechst 33258荧光染色检测细胞凋亡情况，采用Western blot法检测抑癌因子p53、胱天蛋白酶3（caspase-3）、B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子1A（p21）、周期蛋白依赖性激酶2（CDK2）和细胞周期蛋白E（cyclinE）蛋白的表达情况。结果：与空白对照组比较，COS可显著抑制SK-BR-3细胞的增殖（$P<0.05$或$P<0.01$），且呈浓度和时间依赖趋势。低、中、高浓度的COS均可诱导细胞凋亡并阻滞细胞周期于G_1/S期（$P<0.05$或$P<0.01$）；并可显著上调p53、caspase-3、Bax、p21蛋白的表达（$P<0.05$或$P<0.01$），显著下调Bcl-2、CDK2、cyclinE蛋白的表达（$P<0.01$）。结论：COS能抑制人乳腺癌SK-BR-3细胞的增殖，并诱导细胞凋亡和周期阻滞；其作用机制可能与调控p53/Bax/Bcl-2/caspase-3凋亡信号通路有关。

关键词　木香烃内酯；SK-BR-3细胞；细胞增殖；细胞周期；细胞凋亡

Effects of Costunolide on Cell Cycle Distribution and Apoptosis of Breast Cancer SK-BR-3 Cells

MA Qiang[1, 2], CHEN Jie[1], MIAO Jiawei[1], XIONG Shu[1], PANG Yi[1, 2], DENG Xuesong[1, 2]（1. Dept. of Basic Medicine, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Development and Utilization of Genuine Medicinal Materials in Three Gorges Reservoir Area, Chongqing 404120, China）

[37] HENGARTNER M O. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407 (6805): 770-776.

[38] LI H, LI T, FAN J, et al. miR-216a rescues dexamethasone suppression of osteogenesis, promotes osteoblast differentiation and enhances bone formation, by regulating c-Cbl-mediated PI3K/Akt pathway[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(12): 1935-1945.

[39] 史东梅，董明，陆颖，等. PI3K/Akt信号通路与骨破坏：问题与机制[J].中国组织工程研究，2020，24(23)：3716-3722.

[40] 宗彦红，霍丽静，常胜.熊果酸对人肝癌HepG2细胞凋亡及PI3K/Akt信号通路的影响[J].医学研究杂志，2020，49(9)：107-111，115.

[41] 施凤，何文华，朱萱，等.熊果酸（UA）对大鼠活化型肝星状细胞（HSC）的NADPH氧化酶（NOX）亚基及PI3K/Akt、P38MAPK信号通路活化的影响[J].复旦学报（医学版），2014，41(3)：328-334，339.

[42] CHEN S J, LIN C S, LIN C L, et al. Osteoporosis is associated with high risk for coronary heart disease: a population-based cohort study[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(27): e1146- e1152.

[43] GONZALEZ-CALVIN J L, GALLEGO-ROJO F, FERNANDEZ-PEREZ R, et al. Osteoporosis, mineral metabolism, and serum soluble tumor necrosis factor receptor p55 in viral cirrhosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(9): 4325-4330.

[44] CHANG K H, CHANG M Y, MUO C H, et al. Exposure to air pollution increases the risk of osteoporosis: a nationwide longitudinal study[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(17): e733- e739.

[45] 黄陈恕，汤荣睿，易小翠.慢性乙型肝炎与骨质疏松相关性初步探讨[J].中国骨质疏松杂志，2016，22(9)：1136-1139.

[46] NAKCHBANDI I A. Osteoporosis and fractures in liver disease: relevance, pathogenesis and therapeutic implications[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(28): 9427-9438.

（收稿日期：2021-04-13　修回日期：2021-07-26）
（编辑：林　静）

Δ 基金项目：重庆市基础研究与前沿探索项目（重庆市自然科学基金）（No.cstc2018jcyjAX0469）；重庆市教育委员会科学技术研究项目（No.KJQN201902701，No.KJQN202002701）

＊讲师，硕士。研究方向：抗肿瘤活性药物筛选及其应用。电话：023-58556819。E-mail：cjmaqiang@163.com

＃通信作者：副教授，硕士。研究方向：肿瘤的发生与防治。电话：023-58556819。E-mail：71425996@qq.com