木犀草素对骨缺损成骨修复的作用及机制研究Δ

汤胜尧[1*]，胡珉华[1]，周若愚[1]，孙伟鹏[1]，唐鑫陶[1]，林海雄[2,3]，姜自伟[4#]（1.广州中医药大学第一临床医学院，广州 510405；2.宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院，银川 750021；3.香港中文大学组织工程与再生医学研究所，香港 999077；4.广州中医药大学第一附属医院一骨科，广州 510405）

中图分类号 R965；R285　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2023）07-0807-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.07.08

摘　要　目的 探讨木犀草素对骨缺损成骨修复的作用及机制。**方法** 通过网络药理学方法筛选木犀草素治疗骨缺损的作用靶点及潜在通路，利用Hub基因筛选排名前2位的靶点进行分子对接验证，以结合能作为评判标准。对大鼠骨髓间充质干细胞（BMSC）及脐静脉内皮细胞（RUVEC）进行体外实验，采用碱性磷酸酶染色、茜素红S染色、体外血管形成实验进行表型验证，采用Western blot法检测磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）、蛋白激酶B1（Akt1）蛋白的表达情况，以验证木犀草素对BMSC成骨分化及RUVEC体外血管形成的作用机制。**结果** 网络药理学结果显示，木犀草素对骨缺损的血管形成和骨修复作用主要与Akt1、SRC蛋白、雌激素受体1、表皮生长因子受体、环加氧酶2、基质金属蛋白酶9靶点有关，且与PI3K/Akt信号通路关系密切。分子对接结果显示，木犀草素与Akt1、SRC蛋白结合稳定。体外实验结果表明，木犀草素能显著增高BMSC内碱性磷酸酶的表达水平和活性，增加钙盐沉积和钙化结节的数量，促进BMSC的钙化；与木犀草素0 μmol/L组比较，木犀草素1、10 μmol/L组的RUVEC血管形成能力显著增强、血管长度显著增加，PI3K、Akt1的蛋白表达水平显著提高（$P<0.05$或$P<0.01$），且浓度越高效果越好。**结论** 木犀草素可能通过激活PI3K/Akt信号通路，促进PI3K、Akt1蛋白的表达来发挥增强骨折端的血管形成及骨修复的功能。

关键词 木犀草素；骨缺损；成骨修复；血管形成；网络药理学；分子对接

Study on the effects and mechanism of luteolin on osteogenic repair of bone defects

TANG Shengyao[1], HU Minhua[1], ZHOU Ruoyu[1], SUN Weipeng[1], TANG Xintao[1], LIN Haixiong[2,3], JIANG Ziwei[4]（1. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Ningxia Hui Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine&Academy of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750021, China; 3. Institute of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China; 4. Dept. One of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects and mechanism of luteolin on osteogenic repair of bone defects. **METHODS** The targets and potential pathways of luteolin in the treatment of bone defects were screened by network pharmacology method, and then the top 2 targets were selected by Hub gene screening for molecular docking verification, with binding energy as the evaluation standard. *In vitro* experiments were conducted on rat bone mesenchymal stem cells (BMSC) and rat umbilical vein endothelial cells (RUVEC). Phenotypic validation was performed using alkaline phosphatase staining, alizarin red S staining, and *in vitro* angiogenesis experiments. Western blot assay was used to detect the protein expressions of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and protein kinase 1 (Akt1), so as to validate the mechanism of luteolin on osteogenic differentiation of BMSC and angiogenesis of RUVEC *in vitro*. **RESULTS** The results of network pharmacology showed that the effects of luteolin on vascular formation and bone repair in bone defects were mainly related to Akt1, SRC, estrogen receptor 1, epidermal growth factor receptor, cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9 targets, and were closely related to PI3K-Akt signaling pathway. The results of molecular docking showed that luteolin binding to Akt1 and SRC proteins was stable. The results of *in vitro* experiments showed that luteolin could significantly improve the expressions and activities of alkaline phosphatase in BMSC, increased the number of calcium salt deposits and calcified nodules, and promoted calcification of BMSC. Compared with luteolin 0 μmol/L group, the angiogenesis ability of RUVEC was enhanced significantly in luteolin 1, 10 μmol/L groups, the length of blood vessels and the protein expressions of PI3K and Akt1 were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); the higher the concentration, the better the effect. **CONCLUSIONS** Luteolin may play a role in promoting angiogenesis and bone

Δ**基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.8197150751）；宁夏自然科学基金项目（No.2022AAC03398）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：中医药防治骨与关节损伤。E-mail：1315492593@qq.com

＃**通信作者** 主任中医师，教授，博士。研究方向：中医药防治骨与关节损伤。E-mail：ainemylyy@163.com

repair at the fracture site by activating PI3K/Akt signaling pathway and promoting the protein expressions of PI3K and Akt1.
KEYWORDS luteolin; bone defect; osteogenic repair; angiogenesis; network pharmacology; molecular docking

骨缺损又被称为节段性骨丢失，其病因复杂多样，包括高能创伤、骨肿瘤、感染等，会导致患者肢体功能缺失，严重影响患者的生活质量[1]。目前临床上对大段骨缺损尚无确切定义，一般将缺损范围达到骨周径50%以上或长度2 cm以上的骨丢失称为大段骨缺损[2]。骨缺损难以自行愈合，其修复有赖于血管生成与骨生成的协调[3]，然而目前临床上的治疗方案成本高且应用局限[4]。因此，开发具有体内血管和骨生成能力的药物/材料在骨缺损治疗方面有极大潜力。

补益肝肾中药可有效促进骨折愈合。据研究报道，补肾中药一方面可通过生长因子诱导，促进骨折端血管形成，改善血液循环[5—7]；另一方面可促进骨髓间充质干细胞（bone mesenchymal stem cells，BMSC）增殖与成骨分化[8—10]。本课题组早期研究发现，骨碎补总黄酮（total flavonoids of Rhizoma Drynariae，TFRD）具有促进牵张成骨间隙中的骨形成和重塑功能[11]，可能通过磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）-蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路促进骨缺损血管生成和成骨[12]。TFRD有效成分较复杂，在其所有单体成分中，山柰酚、柚皮苷和木犀草素的活性最好，均具有促进成骨分化的作用[13—15]。从目前的研究进展来看，柚皮苷及山柰酚促进成骨的相关研究较多，而木犀草素相对较少，因此，本研究以既往实验结果为基础[16]，通过网络药理学和分子对接寻找木犀草素适配靶点蛋白及信号通路，以大鼠BMSC及大鼠脐周静脉内皮细胞（rat umbilical vein endothelial cells，RUVEC）为研究对象，在细胞层面验证木犀草素与TFRD相似的促进成骨、成血管的功能机制，以期为骨缺损治疗挖掘潜在的药物。

1 材料

1.1 主要仪器

TGL-16c型冷冻离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；SCO6WE型恒温培养箱购自美国SHELLAB公司；DMi8-M型倒置显微镜购自德国Leica公司；DR-200Bs型酶标检测仪购自无锡华卫德朗仪器有限公司；PowerPac Basic型电泳仪购自美国Bio-Rad公司；Micro Publisher型成像系统购自加拿大QImaging公司；WD-9405F型脱色摇床购自北京六一仪器有限公司；FB201型扫描仪购自日本Canon公司。

1.2 主要药品与试剂

木犀草素溶液（批号DA21442，纯度≥98%）购自南京道斯夫生物科技有限公司；磷酸盐缓冲液（PBS）、DMEM低糖培养基、胎牛血清均购自美国Gibco公司；BCIP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒（批号C3206）、成骨细胞钙化结节染色试剂盒（批号C0148S）、RIPA细胞总蛋白裂解液（批号P0013B）、BCA蛋白定量试剂盒（批号P0010S）、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）试剂盒（批号P0012A）、Western blot封闭液、胰蛋白酶、茜素红S染色液均购自上海碧云天生物技术有限公司；基质胶（批号356234）购自美国Corning公司；鼠源Akt1抗体（批号AF6261）、鼠源PI3K抗体（批号AF6241）、辣根过氧化物酶标记的鼠源免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）二抗（批号S0001）均购自美国Affinity公司；聚偏二氟乙烯膜（PVDF膜，批号IPFL00010）购自德国默克公司；ECL超敏化学发光液（批号P10100）购自苏州新赛美生物科技有限公司；其余试剂为实验室常用规格，水为超纯水。

1.3 细胞

大鼠BMSC、RUVEC（批号分别为CP-R131、CP-R232）均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 木犀草素的靶点预测 通过PubChem数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）获取木犀草素的分子结构，通过SwissTargetPrediction在线平台（http://www.swisstargetprediction.ch/）预测木犀草素的潜在靶点；利用UniProtKB数据库（https://www.uniprot.org/）使靶点名称标准化，并删除重复数据。

2.1.2 骨缺损相关靶点的收集 以“traumatic bone defect”为关键词在GeneCards数据库（https://www.genecards.org/）、PharmGKB数据库（https://www.pharmgkb.org/）、NCBI数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）中搜索与骨缺损发病相关的靶点。合并去重后，将骨缺损相关靶点与木犀草素预测靶点导入Venny 2.1软件得到交集靶点并绘制Venny图，得到的交集靶点为木犀草素治疗骨缺损的潜在作用靶点。

2.1.3 核心靶点蛋白质-蛋白质相互作用分析及Hub基因的筛选 通过String数据库（https://cn.string-db.org/）对核心靶点蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）进行分析，得到PPI网络图；利用Cytoscape 3.8软件对PPI网络进行拓扑学分析，以度值（degree）、介数中心性（betweenness centrality，BC）、接近中心性（closeness centrality，CC）等参数筛选2次，获得PPI网络中的核心蛋白。

2.1.4 京都基因与基因组百科全书信号通路富集分析和基因本体功能富集分析 利用Kobas数据库（http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/）对木犀草素治疗骨缺损的潜在作用靶点进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）信号通路富

集分析和基因本体（gene ontology，GO）功能富集分析，筛选出$P<0.05$的信号通路和生物过程（biological procsee）、细胞组分（cellular component）、分子功能（molecular function）条目。对重要性排名前20位的KEGG信号通路和排名前10位的GO功能条目绘制气泡图和柱状图，并构建“成分-靶点-信号通路”可视化网络。

2.2 分子对接

通过分子对接技术分析核心靶点与木犀草素的作用关系。从PubChem数据库得到木犀草素的分子结构，将其导入Chem 3D软件进行能量最小化，得到小分子的pdb文件；在PDB数据库（https://www.rcsb.org/）中搜索核心靶点蛋白的结构，利用PyMOL软件删除水分子和小分子配体；最后利用AutoDock Tool 1.5.7软件将处理得到的木犀草素小分子和核心靶点进行分子对接，以验证结果的可靠性。以木犀草素与核心靶点的对接结合能来评价结合亲和力，若结合能＜－5 kJ/mol，说明具有结合亲和力，且结合能的数值越低，说明结合亲和力越强，结合越稳定。

2.3 体外实验验证

2.3.1 细胞培养与传代 将冻存的RUVEC和BMSC在37 ℃水浴中复温后，在超净台分别转入含5 mL完全培养基的15 mL离心管中，在24 ℃以1 200 r/min离心5 min去上清液。重新添加5 mL完全培养基，混匀后移入培养皿中，在37 ℃、5% CO_2的培养箱中孵育，第2天更换培养基。待细胞生长至融合度为80%～90%时进行传代。吸除培养基，加入2 mL PBS清洗3次。去除PBS，加入2 mL 0.25%胰蛋白酶进行消化，待细胞圆缩后，加入4 mL完全培养基吹打混匀终止消化，用15 mL离心管暂存细胞悬液，然后在24 ℃以1 200 r/min离心5 min，去除上清液，加6 mL完全培养基至细胞沉淀，吹打混匀后，分别转移至2个培养皿中，补全完全培养基至5 mL。移入37 ℃、5% CO_2的培养箱培养，24 h后换液，显微镜观察，待细胞贴壁融合后换液；用不含血清的DMEM培养液培养24 h，用于后续实验。

2.3.2 细胞碱性磷酸酶活性检测 采用碱性磷酸酶染色。选取3代BMSC消化接种于24孔板中，1 d后分别给予含不同浓度木犀草素溶液（0、1、10 μmol/L）的成骨诱导液进行干预，给药剂量参考文献[15]和本课题组前期预实验结果设置。每3 d更换1次培养基，7 d后使用BCIP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒染色，首先吸出残余培养基，使用PBS清洗2次，再使用含4%多聚甲醛的细胞固定液固定细胞，室温条件下固定30 min后去除残留液体，用PBS冲洗3次，每次5 min。然后按照说明书配制染色工作液并加入24孔板中，37 ℃恒温孵育30 min，每5 min查看1次，显色达到预期深浅即终止。去除残留液体，用PBS清洗2次，终止反应。最后置于扫描仪下观察显色深度并拍照，实验共重复3次。以碱性磷酸酶染色后孔板中蓝色深度及分布范围为评价标准，颜色越深，分布范围越广，说明细胞碱性磷酸酶活性越高。

2.3.3 细胞钙化情况检测 采用茜素红S染色。选取3代BMSC消化接种于24孔板中，1 d后分别给予含不同浓度木犀草素溶液（0、1、10 μmol/L）的成骨诱导液进行干预，给药剂量参考文献[15]和本课题组前期预实验结果设置。每3 d更换1次培养基，14 d后使用成骨细胞钙化结节染色试剂盒进行染色。首先吸出残余培养基，以PBS清洗2次，再使用含4%多聚甲醛的细胞固定液固定细胞，室温条件下固定30 min后去除残留液体，用PBS冲洗3次，每次5 min。然后加入茜素红S染色液，37 ℃恒温孵育30 min，每5 min查看1次，显色达到预期深浅即终止。去除染色液，用PBS清洗2次，终止反应。最后置于扫描仪下观察显色深度并拍照，实验共重复3次。以茜素红S染色后孔板中红色深度及分布范围为评价标准，颜色越深，分布范围越广，说明钙盐沉积越多，钙化结节数量越多。

2.3.4 细胞血管分化能力检测 采用体外血管形成实验检测。实验前1 d将基质胶、1盒100 μL枪头置于冰盒中，放入4 ℃冰箱过夜，使基质胶能够在低温条件下融化。实验当天使用预冷的枪头将基质胶在冰上接种到血管生成载玻片上，每孔10 μL均匀覆盖板底，避免产生气泡，随后将血管生成载玻片的盖子盖上，置于10 cm的培养皿中，放入浸水的纸巾，制成1个湿盒，将其放入37 ℃、5% CO_2的培养箱中，孵育30 min以固化基质胶。将50 μL经不同浓度木犀草素溶液（0、1、10 μmol/L）预处理的RUVEC（5 000个细胞）加入血管生成载玻片中并在37 ℃、5% CO_2培养箱培养6 h，给药剂量参考文献[15]和本课题组前期预实验结果设置。随后在倒置显微镜下的5个随机视野中观察RUVEC的形态变化和血管形成情况，实验共重复3次。使用Image J软件中的“Analyze HUVEC Phase Contrast”函数计算平均血管长度。

2.3.5 细胞内PI3K、Akt1蛋白检测 采用Western blot法检测，以验证网络药理学方法识别到的木犀草素成骨、成血管潜在调节靶点及作用途径的可靠性。将BMSC接种到6孔板上，给予含不同浓度木犀草素溶液（0、1、10 μmol/L）的成骨诱导液干预7 d，给药剂量参考文献[15]和本课题组前期预实验结果设置。用PBS冲洗贴壁细胞3次，弃废液，然后加入适当体积的细胞总蛋白裂解液裂解；同时，用细胞刮刀刮下细胞和试剂，转到1.5 mL EP管中。冰上静置30 min，每隔5 min震荡混匀1次。在4 ℃以12 000 r/min离心30 min，收集上清液，即为总蛋白溶液。使用BCA蛋白定量试剂盒测定其蛋白浓度，随后将蛋白在6%浓度的电泳凝胶上电泳分离，

并通过电印迹转移至PVDF膜上。将PVDF膜在室温下于封闭液中封闭45 min，然后在4 ℃与Akt1抗体、PI3K抗体（稀释度均为1∶1 000）一起孵育过夜。洗涤3次后，将目标蛋白条带与二抗（稀释度为1∶5 000）在室温下孵育1 h。加入显影液后进行目的蛋白显影，实验共重复3次。使用Image J软件对条带进行灰度值分析，以PI3K、Akt1与内参蛋白（β-actin）条带灰度值的比值表示目的蛋白表达水平。

2.4 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料满足正态分布以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 木犀草素、骨缺损相关靶点及潜在作用靶点 通过PubChem数据库共筛选得到木犀草素的潜在靶点103个。通过Genecards、PharmGKB、NCBI数据库搜索并汇总、去重后，共得到骨缺损相关靶点14 161个。利用Venny 2.1软件，得到骨缺损与木犀草素交集的靶点97个，即为木犀草素治疗骨缺损的潜在作用靶点。

3.1.2 PPI分析及Hub基因筛选结果 将上述97个交集靶点导入String数据库和Cytoscape 3.8软件，得到PPI网络图；隐藏游离节点，对PPI网络进行拓扑学分析，结果显示，该网络中包含92个节点和996条边，网络中节点越大、颜色越深，节点的degree值越大，代表其在PPI网络中的作用越重要。利用网络拓扑学参数进行Hub基因筛选，第1次以degree值大于2倍中位数，BC值、CC值大于中位数为条件筛选，第2次以degree值、BC值、CC值大于中位数为条件筛选（图1），最终得到12个Hub基因，排名前6位依次为Akt1、SRC、雌激素受体1（estrogen receptor 1，ESR1）、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）、环加氧酶2（cyclooxygenase 2，PTGS2）、基质金属蛋白酶9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）。

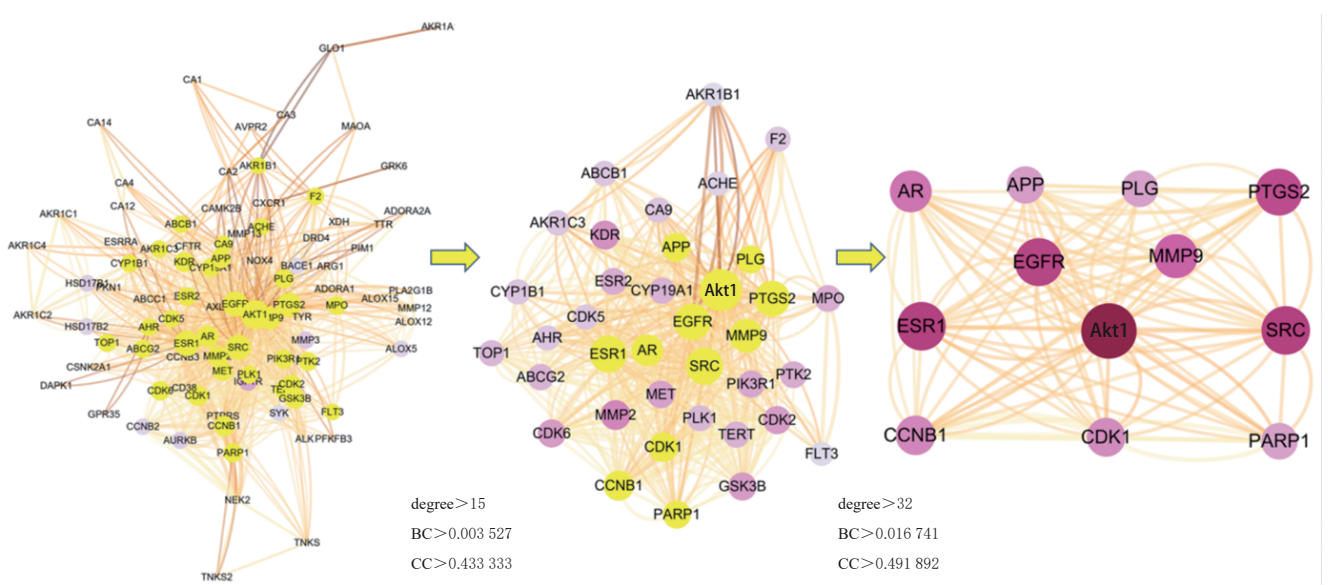
3.1.3 KEGG信号通路富集分析结果 通过KEGG富集得到197条信号通路，选取重要性排名前20位的信号通路绘制气泡图（图2）。结果显示，潜在靶点主要富集在肿瘤中的通路（pathways in cancer）、氮代谢（nitrogen metabolism）和PI3K/Akt信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）等相关通路中。

3.1.4 GO功能富集分析结果 GO功能富集分析共得到1 670条GO条目，选取重要性排名前10位的条目进行可视化分析（图3）。结果显示，其生物过程涉及蛋白质磷酸化（protein phosphorylation）、凋亡过程的负反馈调节（negative regulation of apoptotic process）、对外源刺激的反应（response to xenobiotic stimulus）等；细胞组成涉及胞质溶胶（cytosol）、细胞质（cytoplasm）、细胞核（nucleus）等；分子功能主要集中于蛋白激酶活性（protein kinase activity）、碳酸盐脱水酶活性（carbonate dehydratase activity）、三磷酸腺苷结合（ATP binding）等。

3.1.5 分子对接验证结果 本研究以木犀草素为研究载体，以重要性排名前2位的靶点（Akt1、SRC）进行分子对接。结果表明，木犀草素与Akt1、SRC的结合能分别为−34.2、−20.8 kJ/mol，均小于−5 kJ/mol，表明均具有较强的结合力，相互作用关系见图4。其中，木犀草素与Akt1的氨基酸残基LYS179、ALA230、ASN279形成氢键相互作用，与SRC的氨基酸残基GLU339、GLU157、LYS321、TYR326形成氢键相互作用。

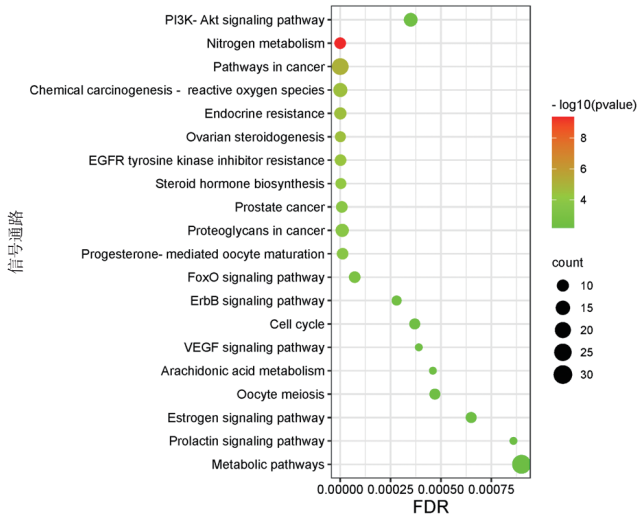
3.2 体外实验验证结果

3.2.1 木犀草素对BMSC成骨分化的影响 碱性磷酸酶染色结果显示，木犀草素0 μmol/L组蓝色几乎不可见，木犀草素1 μmol/L组则相对明显，木犀草素10



A. PPI网络图　　B. 第1次筛选　　C. 第2次筛选

图1 Hub基因筛选过程



注：图中气泡大小、颜色与富集基因数目和通路显著性有关，气泡越大表示富集基因数目越多，颜色越深表示通路越显著

图2　排名前20位的KEGG信号通路气泡图

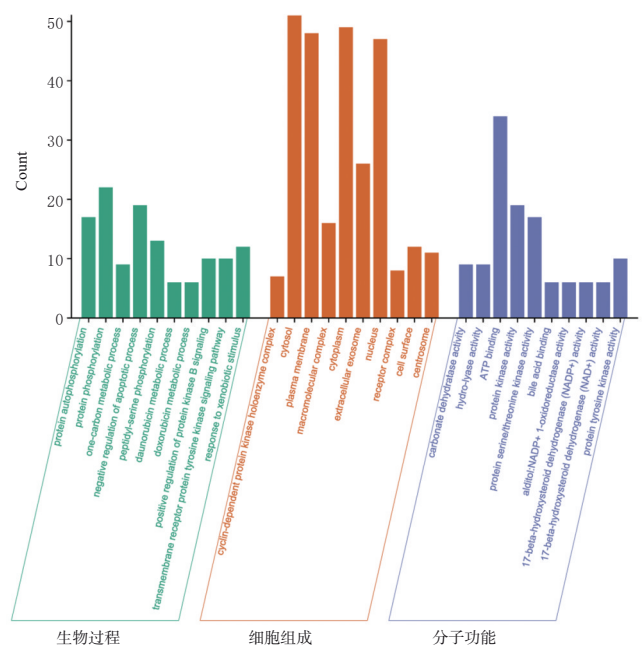
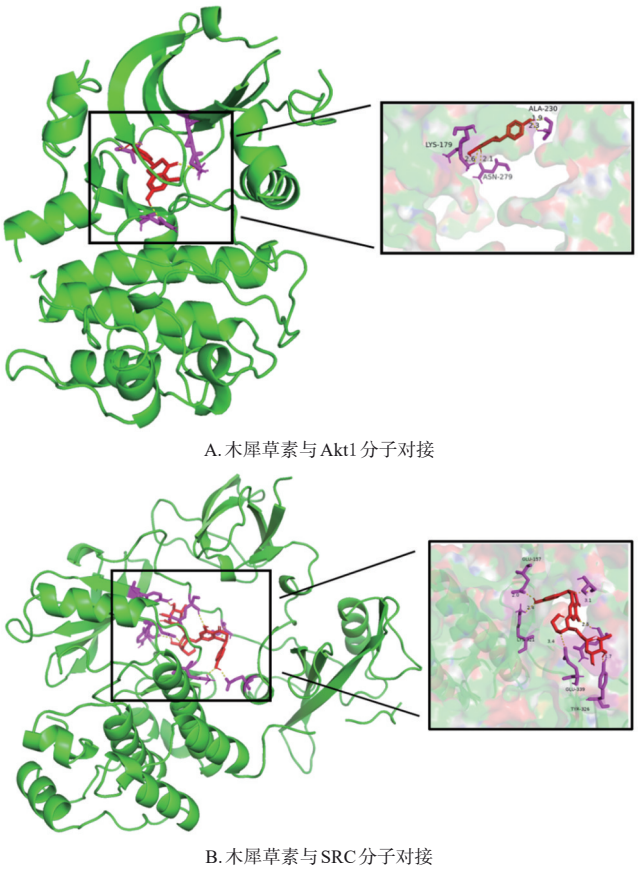


图3　排名前10位的GO功能富集分析柱状图

μmol/L组显色最深，这表明木犀草素能显著增高BMSC内碱性磷酸酶的表达水平和活性，见图5A。茜素红S染色结果显示，木犀草素0 μmol/L组红色较浅、范围较小，木犀草素1 μmol/L组显色相对明显，木犀草素10 μmol/L组显色最深、范围最广，这表明木犀草素能显著增加BMSC内的钙盐沉积和钙化结节数量，促进BMSC的钙化，见图5B。

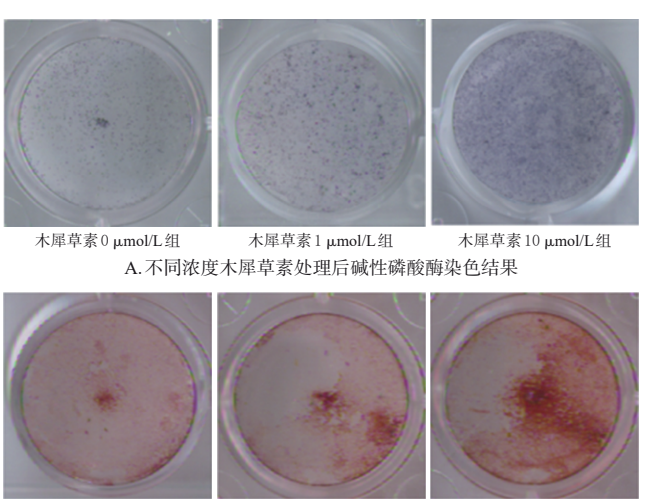
3.2.2　木犀草素对RUVEC体外血管形成的影响　体外血管形成实验结果表明，与木犀草素0 μmol/L组比较，木犀草素1、10 μmol/L组细胞血管形成能力显著增强，血管长度显著增加（$P<0.05$或$P<0.01$），联结长度更长，网状结构更多，且10 μmol/L组效果更显著，见图6。



A. 木犀草素与Akt1分子对接

B. 木犀草素与SRC分子对接

图4　木犀草素与核心靶点基因编码蛋白的分子对接图

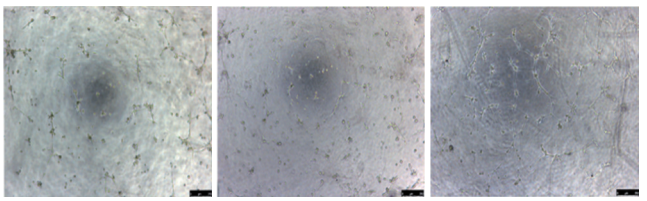


A. 不同浓度木犀草素处理后碱性磷酸酶染色结果

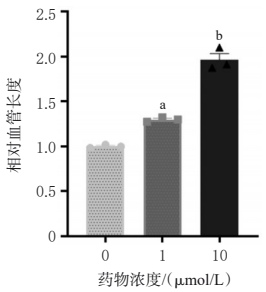
B. 不同浓度木犀草素处理后茜素红S染色结果

图5　木犀草素对BMSC成骨分化的影响

3.2.3　木犀草素对BMSC内PI3K、Akt1蛋白表达的影响　与木犀草素0 μmol/L组比较，木犀草素1、10 μmol/L组细胞PI3K、Akt1蛋白表达水平显著提高（$P<0.05$或$P<0.01$），且木犀草素浓度越高，PI3K、Akt1蛋白表达水平提高越显著，见图7。由此进一步表明，木犀草素能够激活PI3K/Akt信号通路，促进PI3K、Akt1蛋白的表达，从而增强成骨分化。



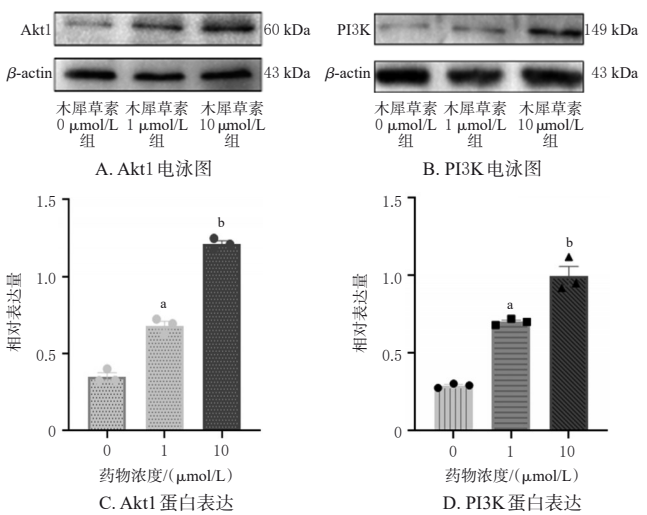
A. 不同浓度木犀草素处理后体外血管形成程度比较（比例尺＝100 μm，n＝3）



B. 不同浓度木犀草素处理后血管长度比较

a：与木犀草素0 μmol/L组比较，P＜0.05；b：与木犀草素0 μmol/L组比较，P＜0.01

图6　木犀草素对RUVEC体外血管形成的影响



A. Akt1电泳图　B. PI3K电泳图　C. Akt1蛋白表达　D. PI3K蛋白表达

a：与木犀草素0 μmol/L组比较，P＜0.05；b：与木犀草素0 μmol/L组比较，P＜0.01

图7　木犀草素对BMSC内PI3K、Akt1蛋白表达的影响

4　讨论

骨修复是一个依赖血管维持的过程，血管不仅为骨缺损部位提供营养物质、矿物质、生长因子，同时也是修复细胞进入骨缺损区的通道，是骨结构重新构建的基础[17]。更为重要的是，调控骨再生相关的细胞和信号分子同样受其影响，因此骨缺损修复极其依赖成血管-成骨耦联这一过程[18]。本研究在本课题组前期研究的基础上[6－7]，通过网络药理学和分子对接筛选出了木犀草素的主要作用靶点，随后用细胞实验验证了筛选的结果及木犀草素对骨缺损血管的生成及骨修复作用。

本次网络药理学研究结果显示，木犀草素和骨缺损的共同作用靶点主要分布在PI3K/Akt信号通路中，而PI3K/Akt信号通路已被证明可促进成骨细胞形成[19]，如TFRD可通过PI3K/Akt途径促进大鼠牙髓干细胞的成骨分化[20]。通过Hub基因筛选，Akt1、SRC、ESR1被发现为重要性排前3位的靶点。以往研究显示，Akt1和EGFR可以促进骨髓细胞的增殖和分化，并抑制细胞凋亡[21－22]。而SRC蛋白的磷酸化则被证实可以通过ESR1依赖的非经典信号通路激活，从而促进成骨[23]。分子对接结果显示，Akt1、SRC与木犀草素的结合能均不高于－5.0 kJ/mol，提示木犀草素可能通过作用于Akt1、SRC发挥治疗作用。木犀草素与靶点的结合模式包括与赖氨酸（LYS）、丙氨酸（ALA）、天冬酰胺（ASN）、谷氨酸（GLU）、酪氨酸（TYR）的残基结合等，提示木犀草素可通过与核心靶点多位点结合发挥作用，这与中医的“多靶点、多通路”治疗疾病理论相呼应。

本研究通过实验验证发现，木犀草素对RUVEC的体外血管形成有促进作用。研究报道，内皮细胞增殖启动后会增加对细胞凋亡的抵抗力，使得蛋白水解平衡变化，促进细胞骨架重组、迁移及分化，最终促进新血管腔形成[24－25]。本研究结果显示，不同浓度的木犀草素对RUVEC的体外血管形成均具有明显的促进作用。与木犀草素0 μmol/L组比较，木犀草素1 μmol/L组与10 μmol/L组的RUVEC血管形成能力增强、联结长度更长、网状结构更多。这可认为木犀草素启动了血管生成信号，为血管长入提供了分子基础。本研究结果还显示，木犀草素能够显著增加血管长度。以上结果提示，在体外条件下木犀草素可有效促进血管生成。

本研究结果显示，木犀草素可通过PI3K/Akt信号通路促进BMSC成骨分化。碱性磷酸酶染色与茜素红S染色结果均显示，不同浓度木犀草素能够促进BMSC成骨分化，促进钙化结节形成。作为主要分布在细胞膜上，并在干细胞的成骨过程中前驱表达的钙结合转运蛋白，碱性磷酸酶是成骨细胞形成的重要标志[26]。本研究结果表明，与木犀草素0 μmol/L组比较，干预BMSC 7 d后，1 μmol/L与10 μmol/L木犀草素可明显促进碱性磷酸酶表达。钙化结节作为成骨分化的直接证明，本研究结果显示，BMSC在木犀草素的诱导下14 d即可出现钙盐沉积，且浓度越高钙盐沉积越多，说明成骨分化显著。PI3K/Akt是维持机体细胞正常生理活动的关键信号通路，其中Akt1作为PI3K的下游蛋白，可调节细胞增殖、生长和存活；激活PI3K/Akt信号通路后可通过抑制炎症细胞因子表达、减少细胞凋亡等，促进成骨细胞分化[20]。Western blot检测结果也显示，1 μmol/L与10 μmol/L木犀草素可促进PI3K、Akt1蛋白表达，且浓度越高效果越明显。以上结果均提示，PI3K、Akt1可能是木犀草素促进骨形成的靶点。

综上所述，木犀草素可能通过激活PI3K/Akt信号通路，促进PI3K、Akt1蛋白的表达来发挥增强骨折端的血

管形成及骨修复功能，这为木犀草素靶向治疗骨缺损和其他难以愈合的骨疾病提供了参考。但本研究也存在不足之处，未针对血管生成因子及对应通路进行深入探讨，尚待后续实验深入研究。

参考文献

[1] ALMUBARAK S，NETHERCOTT H，FREEBERG M，et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration[J]. Bone，2016，83：197-209.

[2] 王海波，杨新明，张瑛，等. 大段骨缺损修复的组织工程学研究进展[J]. 中华生物医学工程杂志，2013，19(1)：73-76.

[3] MA Y H，GU S J，YIN Q D，et al. Application of multiple wrapped cancellous bone graft methods for treatment of segmental bone defects[J]. BMC Musculoskelet Disord，2019，20(1)：346.

[4] HAUGEN H J，LYNGSTADAAS S P，ROSSI F，et al. Bone grafts：which is the ideal biomaterial[J]. J Clin Periodontol，2019，46(Suppl 21)：92-102.

[5] 曾展鹏，周驰，李康活，等. 补肾接骨中药对骨折修复的成骨作用及机制[J]. 中国组织工程研究，2015，19(15)：2442-2448.

[6] 尹朝献，刘安平，曹日隆. 中药促进骨折愈合机制的实验研究进展[J]. 中医药临床杂志，2007，19(6)：640-642.

[7] 李宝锋. 基于肾主骨生髓理论的补肾生髓法促进骨折愈合的文献与临床研究[D]. 济南：山东中医药大学，2013.

[8] 王庆丰，王孝辉，张彩丽，等. 骨碎补总黄酮促进大鼠诱导膜中VEGF、BMP-2表达的实验研究[J]. 药物评价研究，2018，41(7)：1220-1223.

[9] 尹文哲，徐展望，王利，等. 骨碎补总黄酮对模拟失重下共育骨细胞中ALP活性及BMP-2和OPG基因表达影响[J]. 中药材，2012，35(3)：452-455.

[10] 沈智，曾景奇，李益亮，等. 骨碎补总黄酮对悬尾实验性骨质疏松模型大鼠骨密度及BMP-2 mRNA的影响[J]. 中医药导报，2019，25(21)：33-36.

[11] 申震，姜自伟，李定，等. 基于牵张成骨技术比较两种补肾法在成血管-成骨耦联机制中的作用差异[J]. 中华中医药杂志，2019，34(5)：2150-2155.

[12] LIN H X，WANG X T，LI Z G，et al. Total flavonoids of Rhizoma Drynariae promote angiogenesis and osteogenesis in bone defects[J]. Phytother Res，2022，36(9)：3584-3600.

[13] HU W H，WANG H Y，XIA Y T，et al. Kaempferol，a major flavonoid in *Ginkgo folium*，potentiates angiogenic functions in cultured endothelial cells by binding to vascular endothelial growth factor[J]. Front Pharmacol，2020，11：526.

[14] ZHAO Z H，MA X L，MA J X，et al. Naringin enhances endothelial progenitor cell（EPC）proliferation and tube formation capacity through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Chem Biol Interact，2018，286：45-51.

[15] QUAN H，DAI X P，LIU M Y，et al. Luteolin supports osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells[J]. BMC Oral Health，2019，19(1)：229.

[16] LIN H X，WANG X T，WANG L G，et al. Identified the synergistic mechanism of Drynariae Rhizoma for treating fracture based on network pharmacology[J]. Evid Based Complement Alternat Med，2019，2019：7342635.

[17] GURTNER G C，WERNER S，BARRANDON Y，et al. Wound repair and regeneration[J]. Nature，2008，453(7193)：314-321.

[18] BRANDI M L，COLLIN-OSDOBY P. Vascular biology and the skeleton[J]. J Bone Miner Res，2006，21(2)：183-192.

[19] LIU J，ZHAO X D，PEI D D，et al. The promotion function of berberine for osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via ERK-FOS pathway mediated by EGFR[J]. Sci Rep，2018，8(1)：2848.

[20] YANG C，LIU X H，ZHAO K，et al. miRNA-21 promotes osteogenesis via the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1α pathway and enhances bone regeneration in critical size defects[J]. Stem Cell Res Ther，2019，10(1)：65.

[21] HU K. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration[J]. Bone，2016，91：30-38.

[22] XIAO Y P，ZENG J，JIAO L N，et al. Review for treatment effect and signaling pathway regulation of kidney-tonifying traditional Chinese medicine on osteoporosis[J]. China J Chin Mater Med，2018，43(1)：21-30.

[23] LEE C H，HUANG Y L，LIAO J F，et al. Ugonin K-stimulated osteogenesis involves estrogen receptor-dependent activation of non-classical Src signaling pathway and classical pathway[J]. Eur J Pharmacol，2012，676(1/2/3)：26-33.

[24] MUÑOZ-CHÁPULI R，QUESADA A R，ÁNGEL MEDINA M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells[J]. Cell Mol Life Sci，2004，61(17)：2224-2243.

[25] DAVIS G E，SENGER D R. Endothelial extracellular matrix：biosynthesis，remodeling，and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization[J]. Circ Res，2005，97(11)：1093-1107.

[26] ZHANG Y C，SUN Y，LIU J L，et al. MicroRNA-346-5p regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inhibiting transmembrane protein 9[J]. Biomed Res Int，2020，2020：8822232.

（收稿日期：2022-10-27　修回日期：2022-11-26）

（编辑：舒安琴）