论 著

骨蚀方治疗股骨头坏死的药理学机制

魏　涛，邓凯文，曾　勇，周红典，李　渔，徐祖健
西南医科大学附属中医医院 骨关节科（泸州 646000）

【摘 要】**目的** 探讨骨蚀方治疗股骨头坏死（osteonecrosis of the femoral head,ONFH）的潜在药理学机制。**方法** 首先使用TCMSP数据库检索出骨蚀方的活性成分，并根据生物利用度和类药性对检索结果进行筛选，再利用Genecard和OMIM数据库检索出ONFH的疾病靶点，接着使用R语言制作韦恩图得出骨蚀方治疗ONFH的潜在靶标，并用Cytoscape软件构建化合物-靶点-疾病网络，然后运用STRING数据库构建蛋白互作网络图，最后利用R语言进行GO生物功能与KEGG信号通路富集分析。**结果** 骨蚀方中有96个有效活性成分，与ONFH的交集基因121个，信号通路有58个，主要有IL-17、TNF以及P13K-Akt等信号通路参与调控。通过网络图筛选出骨蚀方的关键作用成分为谷甾醇、豆甾醇、槲皮素和β-谷甾醇，关键靶点为IL-6 、AKT1、VEGFA、MAPK3和JUN。**结论** 骨蚀方可通过多个基因和信号通路发挥抗炎、调节成骨/破骨细胞比值等作用，进而达到治疗ONFH的效果，体现了骨蚀方多成分、多靶点等特点，也为骨蚀方的临床运用提供了理论依据。

【关键词】网络药理学；骨蚀方；股骨头坏死；作用机理
【中图分类号】R274　　文献标志码 A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.014

Pharmacological mechanism of Gushi Fang in the treatment of osteonecrosis of femoral head

WE Tao ,DENG Kaiwen,ZENG Yong ,ZHOU Hongdian,LI Yu,XU Zujian
Department of Osteoarthrology,the Affiliated T.C.M Hospital of Southwest Medical University,Luzhou 646000 ,China

【**Abstract**】**Objective** To explore the potential pharmacological mechanism of Gushi Fang in the treatment of osteonecrosis of the femoral head（ONFH）. **Methods** Firstly，TCMSP database was used to retrieve the active ingredients of Gushi Fang，and the search results were screened according to the bioavailability and drug-like properties. Then，the Genecard and OMIM databases were used to retrieve the disease targets of ONFH.Venn map was drawn for potential targets of Gushi Fang in the treatment of ONFH via R language. The compound-target-disease network was drawn by Cytoscape software. The STRING database was used to make a protein interaction network diagram. Finally，GO biological function and KEGG signal pathway enrichment analysis were performed by R language. **Results** There were 96 active ingredients，121 cross genes with ONFH，and 58 signal pathways in Gushi Fang. IL-17，TNF，and P13K-Akt signal pathways were mainly involved in regulation. According to the network diagram，the key components of Gushi Fang were sitosterol，stigmasterol，quercetin and β-sitosterol，and the key targets were IL-6，AKT1，VEGFA，MAPK3 and JUN. **Conclusion** Gushi Fang played an anti-inflammatory role and regulated the osteoclast/osteoclast ratio through multiple genes and signaling pathways，thus achieving the therapeutic effect of ONFH，which reflected the characteristics of multi-components and multi-targets of Gushi Fang，and also provided a theoretical basis for clinical application of Gushi Fang.

【**Key words**】Network pharmacology; Gushi Fang; Osteonecrosis of the femoral head; Mechanism

股骨头坏死（osteonecrosis of the femoral head，ONFH）是股骨头血液供应受损导致股骨头内细胞死亡，从而引起病人出现关节疼痛及活动受限等临床表现，是骨科中常见的多发性及难治性疾病[1-4]。据流行病学资料显示，在美国和日本，每年分别有2万和1.2至2.4万例新诊ONFH病人，而在中国年龄大于15岁的人群中，累计约有812万例ONFH病人，其中男性发病率（1.02%）明显高于女性（0.51%），且在全世界范围内发病率呈现出逐年递增趋势[5-6]。目前，对于ONFH病因的认识可分为创伤性和非创伤性两大类，前者主要包括股骨头/颈骨折和髋臼骨折等，后者的病因更为复杂，主要有长期吸烟和过量酗酒、不规范使用糖皮质激素、肥胖、糖尿病和自身免疫性疾病等[5,7-9]。此外，ONFH对病人生活、心理和经济造成的影响更是难以估量[10-13]。故积极探索治疗此病的新方式已成为目前研究的热点方向。

中医学依据ONFH的临床表现，可将其归于“骨蚀”和“骨痹”等范畴，其中瘀阻络证和肝肾亏虚证又为临床常见的两种证型[14]。但由于骨蚀方药物所含成分复杂，其作用机制尚待进一步阐明。因此，本文基于网络药理学探讨骨蚀方治疗ONFH的潜在作用靶点及分子学机制，拟为骨蚀方的临床应用提供可靠的理论依据和科学基础。

基金项目：四川省教育厅项目（01030015）
第一作者简介：魏　涛，研究生。
通信作者：徐祖健，主任医师。E-mail:xuzujian@21cn.com
引用本文：魏涛，邓凯文，曾勇，等. 骨蚀方治疗股骨头坏死的药理学机制[J]. 西南医科大学学报，2022,45（5）：436-440.DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.014

1 资料与方法

1.1 骨蚀方活性成分及靶点收集

通过TCMSP数据库收集骨蚀方中8味中药的活性成分，首先分别以“延胡索”“续断”“牛膝”“骨碎补”“独活”“川芎”“白术”和“白芍”为关键词逐一进行检索，再以口服利用度≥30%同时成药相似性≥0.18为阈值对上述药物进行再次筛选，获得骨蚀方有效活性成分信息，然后再次使用TCMSP数据库获得活性成分所对应的靶点名称，最后使用Uniprot数据库获得靶点对应的基因，并将物种类型选择为“human”。

1.2 股骨头坏死治疗靶点收集

首先分别通过Genecard和OMIM数据库以“osteonecrosis of the femoral head”为关键词进行检索，去重检索结果后获得ONFH疾病的所有靶点，导入至Excel对结果进行整合，然后利用R语言制作韦恩图，获得骨蚀方作用靶点并与上述靶点取交集，最后得到骨蚀方治疗ONFH的潜在靶标。

1.3 构建化合物-靶点-疾病网络

首先将治疗ONFH疾病的靶点与骨蚀方治疗靶点同时导入至Excel合并，对结果重复值导入至新的Excel表格，此结果即为骨蚀方治疗ONFH的靶点，然后将上述结果导入至Cytoscape 3.7.2软件获得骨蚀方与治疗靶点的互作网络图。

1.4 蛋白互作网络(PPI)构建

首先将骨蚀方治疗ONFH的潜在靶点依次导入STRING数据库，然后导入至Cytoscape 3.7.2软件将结果以可视化形式展现出来。

1.5 GO生物功能与KEGG信号通路富集分析

将骨蚀方治疗ONFH的交集靶点利用R语言，条件设定为$P \leqslant 0.05$进行KEGG和GO富集分析，并选择前20条结果绘制柱状图。

2 结果

2.1 骨蚀方化合物-ONFH靶点-疾病网络构建

通过TCMSP数据库检索骨蚀方治疗ONFH的活性成分靶标，剔除检索出的重复结果后得到：延胡索8个，续断3个，牛膝6个，骨碎补7个，独活4个，川芎5个，白术3个，白芍4个。其中谷甾醇为白芍、川芎、延胡索的共有成分；山柰酚为白芍、骨碎补、牛膝的共有成分；豆甾醇为骨碎补、牛膝、熟地黄、延胡索的共有成分；槲皮素为牛膝、延胡索的共有成分；β-谷甾醇为独活、骨碎补、牛膝、续断共有成分。对Genecard和OMIM数据库中获得的ONFH相关基因取并集，得到ONFH相关基因739个。将骨蚀方候选靶标与ONFH候选靶标相比较，得到可能与治疗ONFH的作用靶标121个，并绘制韦恩图展示(见图1)。将骨蚀方活性成分和与ONFH相关靶标同时导入Cytoscape 3.7.2软件，构建化合物-靶点-疾病网络图，图中包括158个节点。骨蚀方治疗ONFH具有多成分和多靶标等特点(见图2)。

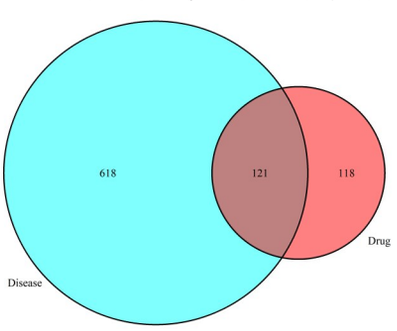


图1 骨蚀方与ONFH靶点韦恩图

Figure 1 Venn diagram of Gushi Fang and targets of ONFH

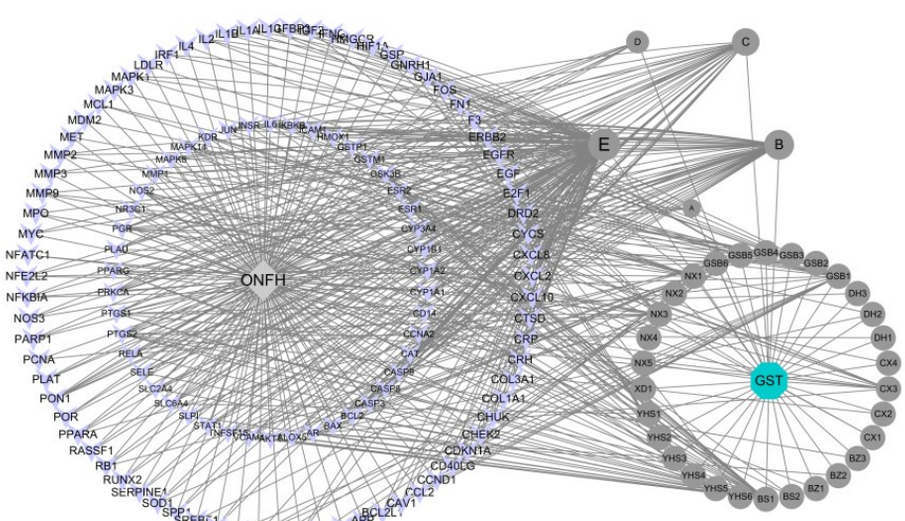


图2 骨蚀方治疗ONFH的“药物-靶点-疾病”网络图

Figure 2 "Drug-Target-Disease" network diagram of ONFH treated with Gushi Fang

注：ONFH：股骨头坏死；GST：骨蚀方；YHS：延胡索；XD：续断；NX：牛膝；GSB：骨碎补；DH：独活；CX：川芎；BZ：白术；BS：白芍；A：谷甾醇；B：山柰酚；C：β-谷甾醇；D：豆甾醇；E：槲皮素

2.2 靶蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图

将骨蚀方治疗ONFH作用靶点导入STRING蛋白互作网络数据库,再将得到的靶蛋白互作图导入Cytoscape 3.7.2软件。结果共计158节点,515条边(见图3)。连接度位于前30的靶点作为骨蚀方治疗ONFH的核心靶点,其中排名前4的包括白介素6(Interleukin 6,IL-6)、*AKT1*、*VEGFA*、*MAPK3*和*JUN*。提示这4个靶标基因是骨蚀方治疗ONFH的重要基因(见图4)。

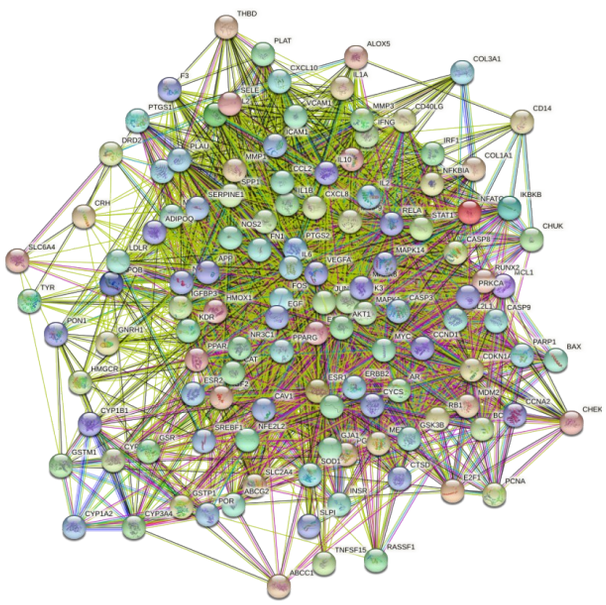


图3 骨蚀方治疗ONFH的PPI网络

Figure 3 PPI network of ONFH treated with Gushi Fang

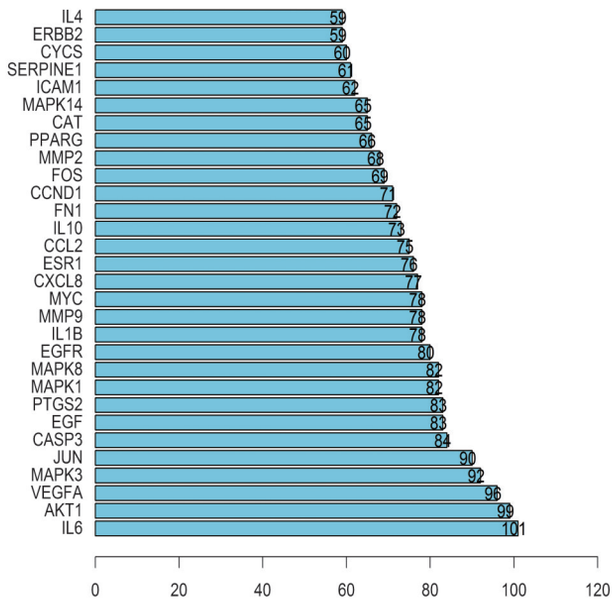


图4 骨蚀方治疗ONFH的核心靶点

Figure 4 Core targets of ONFH treated with Gushi Fang

2.3 GO生物功能与KEGG信号通路富集分析

GO功能富集出生物过程总计140条,结果取排名前20(见图5)。KEGG信号通路富集出相关通路总计157条,结果取排名前20(见图6)。分析结果表明,骨蚀方治疗ONFH的靶点主要涉及细胞因子受体结合(cytokine receptor binding)、细胞因子活性(cytokine activity)、信号转导受体激活(signaling receptor activator activity)、IL-17信号通路(Interleukin-17 signaling pathway)、TNF信号通路(TNF signaling pathway)以及P13K-Akt信号通路(P13K-Akt signaling pathway)等。

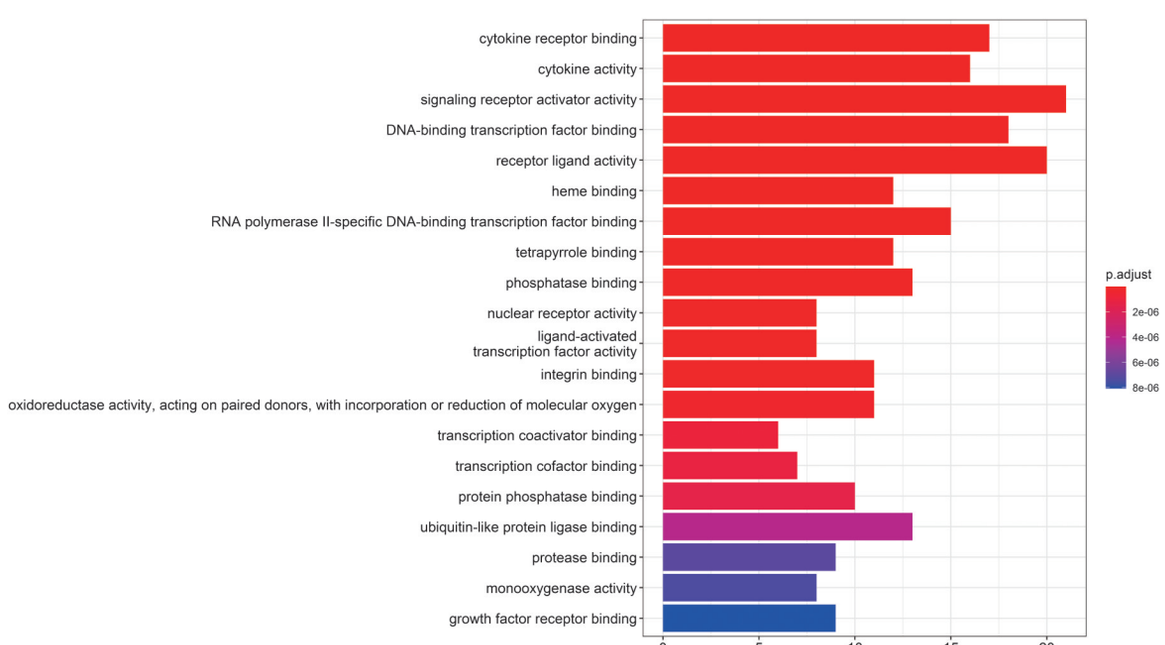


图5 骨蚀方治疗ONFH靶点基因GO功能富集图

Figure 5 GO function enrichment map of the target genes of ONFH treated with Gushi Fang

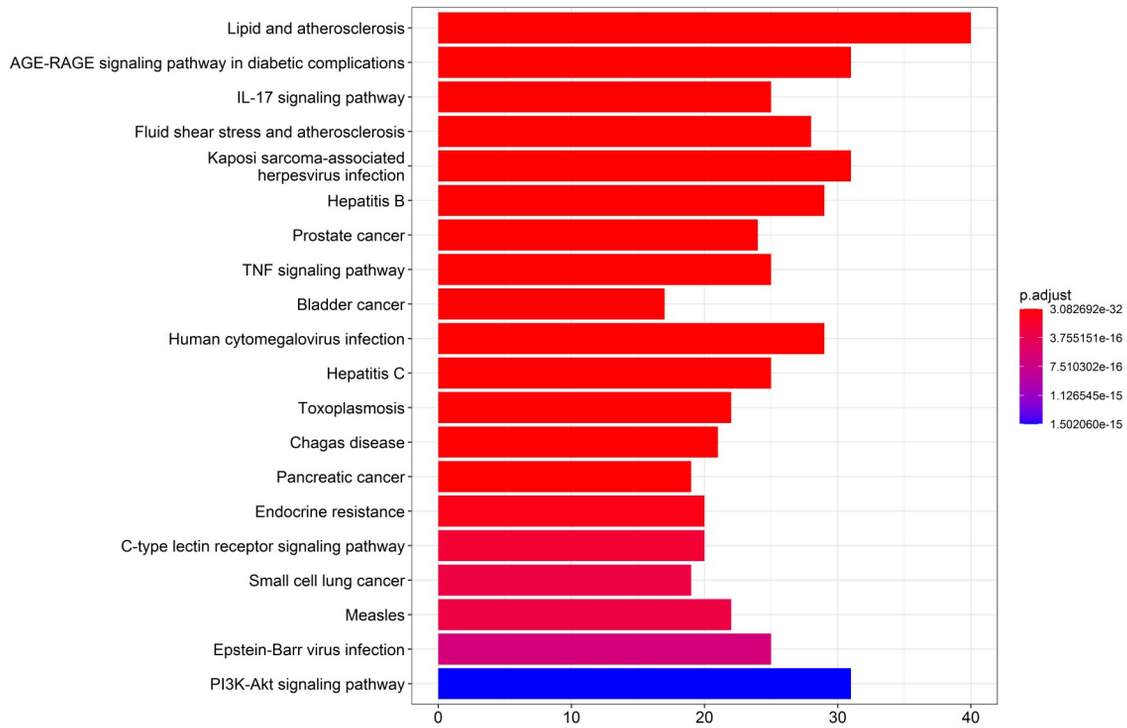


图6 骨蚀方治疗ONFH靶点基因KEGG功能富集图

Figure 6 KEGG functional enrichment map of target genes of ONFH treated with Gushi Fang

3 讨论

目前对ONFH的治疗方式主要包括手术治疗和保守治疗两类，手术治疗方式的选择又是多种多样，各有优劣，其中髓芯减压术和钽棒植入术虽然对疾病分期较早的病人疗效显著，但对于分期较晚者常常难以达到缓解临床症状的目的；而髋关节置换术虽然是治愈病人的有效方法，但作为异体结构，存在后期再次换髋和翻修的可能，加之手术风险和较高的手术费用使病人对手术治疗的接受度相对较低[15]。另外，保守治疗又分为药物治疗和物理治疗，前者主要有应用双膦酸盐抑制骨吸收，促进新骨生成，但对于此药的最佳使用浓度尚存争议；抗凝药物和血管扩张剂的应用能有效改善病灶处血液供应，预防塌陷等特点，但对于有出血风险的病人而言又限制了此类药物的使用；体外冲击波疗法和脉冲电磁疗法为治疗ONFH常用的物理方式，主要通过促进病灶处血管生成、刺激成骨起到增加骨量等作用，而高压氧治疗可增加氧含量，改善微循环，并诱导新生血管形成，但目前相关报道较少，疗效有待大样本临床研究验证[16-17]。

中医在治疗ONFH方面具有独特优势，对早期病人的治疗效果甚至优于手术治疗[18-19]。骨蚀方作为治疗ONFH的特色方剂，通过长期观察发现骨蚀方在改善病人疼痛和提高关节活动度等方面疗效确切。本方重用续断和牛膝为君药，补肾强骨的同时兼顾活血通经，考虑本病病程较长，久病入络，故配伍延胡索为臣药，止痛行气之余兼活血之功，同时佐以骨碎补、独活和川芎加强诸药补肾活血之力，最后施以少量白术和白芍健脾柔肝，以上药物合用共奏补肾强骨、活血止痛之效，故“骨蚀”自愈也。此外，结合本网络药理学结果，我们推测骨蚀方通过调节IL-17、TNF以及P13K-Akt信号通路发挥治疗ONFH的作用。IL-17和TNF作为重要的促炎性因子，相比健康人群，在ONFH病人血清中含量较高，故以IL-17和TNF为治疗靶标成为目前治疗ONFH的新思路[20-23]。亦有研究证实，通过激活P13K-Akt信号通路能促进股骨破骨细胞的重吸收，对改善股骨的骨显微参数具有积极作用[24-26]。同时，P13K-Akt信号通路在既往研究中表明，在心肌缺血再灌注中可以通过恢复细胞抗凋亡、促进肌浆网对Ca^{2+}再摄取途径保护心肌[27]；也有研究表明P13K-Akt信号通路可通过调控股骨血管信号通路活性，促进病灶血管修复，也可通过诱导成骨细胞增殖、抑制破骨细胞活性，从而调节二者比值，参与到治疗ONFH疾病的过程[28-31]。

4 结论与后续验证

通过网络药理学结果得知，骨蚀方治疗ONFH的药理学机制可能通过谷甾醇、豆甾醇、槲皮素和β-谷甾醇等成分，作用于IL-6 、AKT1、VEGFA、MAPK3和JUN等靶点和IL-17、TNF以及P13K-Akt等信号通路，发挥抗炎、调节成骨/破骨细胞比值等而发挥治疗作用。后续，我们将结合本研究结果开展一系列实验验

证骨蚀方治疗ONFH的具体作用机制。

（利益冲突：无）

参 考 文 献

[1] ZHAO DW, HU YC. Chinese experts′ consensus on the diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults[J]. Orthop Surg, 2012, 4(3): 125-130.

[2] KURODA Y, OKUZU Y, KAWAI T, *et al*. Difference in therapeutic strategies for joint-preserving surgery for non-traumatic osteonecrosis of the femoral head between the United States and Japan: a review of the literature[J]. Orthop Surg, 2021, 13(3): 742-748.

[3] CUI QJ, JO WL, KOO KH, *et al*. ARCO consensus on the pathogenesis of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head [J]. J Korean Med Sci, 2021, 36(10): e65.

[4] GUGGENBUHL P, ROBIN F, CADIOU S, *et al*. Etiology of avascular osteonecrosis of the femoral head[J]. Morphologie, 2021, 105(349): 80-84.

[5] Microsurgery Department of the Orthopedics Branch of the Chinese Medical Doctor Association, Group from the Osteonecrosis and Bone Defect Branch of the Chinese Association of Reparative and Reconstructive Surgery, Microsurgery and Reconstructive Surgery Group of the Orthopedics Branch of the Chinese Medical Association. Chinese guideline for the diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults[J]. Orthop Surg, 2017, 9(1): 3-12.

[6] ZHAO DW, ZHANG F, WANG BJ, *et al*. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version)[J]. J Orthop Translat, 2020, 21: 100-110.

[7] WU XJ, WANG YL, SUN W, *et al*. Potential roles of extracellular vesicles in osteonecrosis of femoral head: a systematic review [J]. Gene, 2021, 772: 145379.

[8] ONGGO JR, NAMBIAR M, ONGGO JD, *et al*. Outcome of tantalum rod insertion in the treatment of osteonecrosis of the femoral head with minimum follow-up of 1 year: a meta-analysis and systematic review[J]. J Hip Preserv Surg, 2020, 7(2): 329-339.

[9] LI Z, HUANG C, YANG B, *et al*. Emerging roles of long non-coding RNAs in osteonecrosis of the femoral head[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(9): 5984-5991.

[10] SEVERYNS M, GAYET LE. Aseptic osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell anemia[J]. Morphologie, 2021, 105(349): 94-101.

[11] ANDRONIC O, WEISS O, SHOMAN H, *et al*. What are the outcomes of core decompression without augmentation in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head?[J]. Int Orthop, 2021, 45(3): 605-613.

[12] YUE JA, GAO H, GUO XZ, *et al*. Fibula allograft propping as an effective treatment for early-stage osteonecrosis of the femoral head: a systematic review[J]. J Orthop Surg Res, 2020, 15(1): 206.

[13] MONT MA, SALEM HS, PIUZZI NS, *et al*. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: where do we stand today? A 5-Year update[J]. J Bone Joint Surg Am, 2020, 102(12): 1084-1099.

[14] 杨琪，杜炯，孙继高，等. 股骨头坏死中医证型分析[J]. 中医正骨，2020，32(1)：14-17.

[15] 王骏，葛乔枫，武壮壮，等. 股骨头坏死手术治疗最新进展：如何达到保髋治疗的目的[J]. 中国组织工程研究，2018，22(31)：5056-5061.

[16] 曾祥洪，梁博伟. 股骨头坏死保髋治疗的新策略[J]. 中国组织工程研究，2021，25(3)：431-437.

[17] GUO PP, GAO FQ, WANG YH, *et al*. The use of anticoagulants for prevention and treatment of osteonecrosis of the femoral head: a systematic review[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(16): e6646.

[18] 任维龙，许波，李刚. 中医药治疗早期股骨头缺血性坏死疗效的Meta分析[J]. 中华中医药学刊，2016，34(10)：2454-2458.

[19] ZHANG QW, YANG F, CHEN YL, *et al*. Chinese herbal medicine formulas as adjuvant therapy for osteonecrosis of the femoral head: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(36): e12196.

[20] ZOU DB, ZHANG KN, YANG Y, *et al*. Th17 and IL-17 exhibit higher levels in osteonecrosis of the femoral head and have a positive correlation with severity of pain[J]. Endokrynol Pol, 2018, 69(3): 283-290.

[21] YUAN L, LI W, TIAN ZB, *et al*. Predictive role of cytokines IL-10, IL-12 and TNF-α gene polymorphisms for the development of osteonecrosis of the femoral head in the Chinese Han population[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017, 63(9): 144-149.

[22] WEI BF, FENG Z, WEI W, *et al*. Associations of TNF-α -238 A/G and IL-10 -1082 G/A genetic polymorphisms with the risk of NONFH in the Chinese population[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(12): 4872-4880.

[23] PENG WX, DONG WT, ZHANG F, *et al*. Effects of transplantation of FGF-2-transfected MSCs and XACB on TNF-α expression with avascular necrosis of the femoral head in rabbits[J]. Biosci Rep, 2019, 39(4): BSR20180765.

[24] 曾昭池，汤勇，张先慧，等. 外源性Apelin-13通过调控 VEGF/PI3K/Akt信号通路促进大鼠股骨骨折愈合[J]. 安徽医科大学学报，2021，56(1)：48-53.

[25] WANG XY, GONG LJ, HUANG JM, *et al*. Pinocembrin alleviates glucocorticoid-induced apoptosis by activating autophagy via suppressing the PI3K/Akt/mTOR pathway in osteocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 880: 173212.

[26] KUANG MJ, HUANG Y, ZHAO XG, *et al*. Exosomes derived from Wharton′s jelly of human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce osteocyte apoptosis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats via the miR-21-PTEN-AKT signalling pathway[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(9): 1861-1871.

[27] 彭萱，张英. 氢吗啡酮后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤及对PI3K/Akt/eNOs信号通路影响研究[J]. 西南医科大学学报，2017，40(6)：558-561.

[28] 宋世雷，陈跃平，章晓云. PI3K/AKT信号通路调控股骨头坏死的相关机制[J]. 中国组织工程研究，2020，24(3)：408-415.

[29] LV WX, YU MX, YANG QY, *et al*. Total flavonoids of Rhizoma drynariae ameliorate steroid-induced avascular necrosis of the femoral head via the PI3K/AKT pathway[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 345.

[30] SHEN ZH, HU XQ, HU MJ, *et al*. Activation of AKT signaling via small molecule natural compound prevents against osteoblast apoptosis and osteonecrosis of the femoral head[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(11): 7211-7222.

[31] ZHAN JD, YAN ZJ, ZHAO MY, *et al*. Allicin inhibits osteoblast apoptosis and steroid-induced necrosis of femoral head progression by activating the PI3K/AKT pathway[J]. Food Funct, 2020, 11(9): 7830-7841.

（2021-04-27 收稿，2022-06-21 修回）