

引用:林天烨,杨旭辉,陈伯亮,何晓铭,何敏聪,李子祺,侯凯,何伟,张庆文,邓攀.茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死的网络药理学分析及动物实验[J].中医导报,2025,31(7):32-39.

茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死的网络药理学分析及动物实验*

林天烨^{1,2},杨旭辉³,陈伯亮⁴,何晓铭^{1,2},何敏聪^{1,2},李子祺^{1,2},侯凯⁴,何伟^{1,2},张庆文^{1,2},邓攀⁴

(1.广东省中医骨伤研究院,广东 广州 510405;

2.广州中医药大学第三附属医院,广东 广州 510405;

3.广州中医药大学第三临床医学院,广东 广州 510405;

4.宝鸡市中医医院,陕西 宝鸡 721000)

[摘要] 目的:基于网络药理学分析及动物实验探究茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死的作用机制。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)获得茸脂胶囊的潜在化学成分和靶点。利用GeneCards和OMIM数据库筛选与激素性股骨头坏死相关的基因,并用R软件实现药物靶点和疾病靶点的映射匹配。采用Cytoscape软件构建药物、成分、靶点和疾病间的可视化网络,通过String数据库在线平台构建蛋白质互作网络。将30只大鼠随机分为造模组20只和对照组10只。造模组大鼠构建激素性股骨头坏死模型,将造模成功大鼠随机分为模型组和中药组,每组10只。中药组采用茸脂胶囊灌胃,对照组、模型组大鼠均予等体积的蒸馏水灌胃。干预8周后,采用苏木精-伊红(HE)染色法观察大鼠股骨头空骨陷窝率。利用RT-qPCR检测股骨头组织CXC趋化因子受体2(CXCR2) mRNA、胱天蛋白酶-3(Caspase-3) mRNA、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax) mRNA表达,Western blotting检测股骨头组织CXCR2、Caspase-3、Bax蛋白表达。结果:获得茸脂胶囊有效成分163种,活性成分的作用靶标578个,茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死145个潜在靶标。排名前5位的潜在核心靶基因分别为肿瘤蛋白53(TP53)、CXCR2、 β -连环蛋白(CTNNB1)、E1A结合蛋白(EP300)、表皮生长因子受体(EGFR)。基因本体论(GO)富集分析显示生物过程(BP)主要富集于正性调节基因表达、RNA聚合酶II介导的正性转录调节、对缺氧的反应、负性调节基因表达和正性调节白细胞介素-8(IL-8)产生等,细胞组分(CC)主要富集于细胞外空间、细胞外区域、含胶原的细胞外基质等,分子功能(MF)主要富集于酶结合、相同蛋白质结合、细胞因子活性蛋白质同源二聚化活性等。京都基因与基因百科全书(KEGG)通路主要涉及磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路、FoxO信号通路、Toll样受体信号通路、白细胞介素-17(IL-17)信号通路、酒精性肝病等。模型组、中药组大鼠股骨头空骨陷窝率均高于对照组($P<0.05$);中药组大鼠股骨头空骨陷窝率低于模型组($P<0.05$)。模型组大鼠股骨头组织CXCR2 mRNA、Caspase-3 mRNA、Bax mRNA及CXCR2、Caspase-3、Bax蛋白相对表达量均高于对照组($P<0.05$);中药组大鼠股骨头组织CXCR2 mRNA、Caspase-3 mRNA、Bax mRNA及CXCR2、Caspase-3、Bax蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$)。结论:茸脂胶囊可通过多成分、多靶点途径治疗激素性股骨头坏死;CXCR2是茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死的核心靶标;茸脂胶囊可抑制激素性股骨头坏死大鼠骨髓细胞凋亡,从而达到治疗激素性股骨头坏死的作用。

[关键词] 激素性股骨头坏死;茸脂胶囊;网络药理学;CXC趋化因子受体2;分子机制;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)07-0032-08

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.07.005

Network Pharmacology Analysis and Animal Experiments of Rongzhi Capsules (茸脂胶囊) in the Treatment of Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head

LIN Tianye^{1,2}, YANG Xuhui³, CHEN Boliang⁴, HE Xiaoming^{1,2}, HE Mincong^{1,2},

LI Ziqi^{1,2}, HOU Kai⁴, HE Wei^{1,2}, ZHANG Qingwen^{1,2}, DENG Pan⁴

(1.Guangdong Institute of Traditional Chinese Medicine Orthopedics, Guangzhou Guangdong 510405, China;

*基金项目:广州市科技计划项目(2024A04J5057);广州中医药大学第三附属医院科研创新基金课题(Sy2022002);陕西省中医药管理局市级中医医院科研能力提升项目(SZY-NLTL-2024-005);广东省中医药局项目(20223012)

通信作者:邓攀,男,副主任医师,研究方向为中医药治疗骨关节疾病

2.The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510405, China; 3.The Third Clinical School of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510405, China;

4.Baoji Traditional Chinese Medicine Hospital, Baoji Shaanxi 721000, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of action of Rongzhi capsules in treating steroid-induced osteonecrosis of the femoral head based on network pharmacology analysis and animal experiments. Method: The potential chemical composition and target prediction of Rongzhi capsules were obtained through the traditional Chinese medicine pharmacology database and analysis platform (TCMSP) database. GeneCards and OMIM databases were used to screen genes related to steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, and R software was applied to achieve mapping and matching of drug targets and disease targets. On this basis, a visualization network of drugs, ingredients, targets, and diseases was constructed using Cytoscape software, and a protein interaction network was constructed using the String database online platform. In addition, 30 rats were randomly divided into modeling group ($n=20$) and control group ($n=10$). A rat model of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head was constructed in modeling group, and the successful model rats were randomly divided into model group and Chinese medicine group, 10 rats in each group. The Chinese medicine group was administered with Rongzhi capsules by gavage, while the control group and model group rats were given equal volumes of distilled water by gavage. Hematoxylin eosin (HE) staining method was used to observe empty bone cavity rate in rat femoral head in 8 weeks. At the same time, RT qPCR was used to detect the expression of CXCR2 chemokine receptor 2 (CXCR2) mRNA, Caspase-3 mRNA, and Bcl-2 related X protein (Bax) mRNA in the femoral head of rats. Western blotting techniques was used to detect the protein expression of CXCR2, Caspase-3 and Bax in the femoral head of rats. Result: Totally 163 effective ingredients of Rongzhi capsules were collected, and 578 potential targets for the active ingredients of Rongzhi Capsules were predicted, with 145 potential targets for the treatment of femoral head necrosis. The top 5 potential core target genes were identified as TP53, CXCR2, CTNNB1, EP300 and EGFR. Gene ontology (GO) analysis shows that its biological processes (BP) were mainly enriched in positive regulation of gene expression, RNA polymerase II mediated positive transcription regulation, response to hypoxia, negative regulation of gene expression, and positive regulation of interleukin-8 (IL-8) production. Its cellular components (CC) were mainly enriched in extracellular space, extracellular regions, collagen containing extracellular matrix, etc. Its molecular functions (MF) were mainly enriched in enzyme binding, homologous protein binding, cytokine active protein homodimerization activity, etc. The Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway mainly involved phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway, FoxO signaling pathway, toll like receptor signaling pathway, interleukin-17(IL-17) signaling pathway, alcoholic liver disease, etc. The Chinese medicine group and model group showed higher empty bone pit rate of the femoral head than control group ($P<0.05$). The Chinese medicine group showed lower empty bone pit rate of the femoral head than model group ($P<0.05$). The model group showed higher expression of CXCR2 mRNA, Caspase-3 mRNA, Bax mRNA and CXCR2, Caspase-3, Bax protein than control group ($P<0.05$). The Chinese medicine group showed lower expression of CXCR2 mRNA, Caspase-3 mRNA, Bax mRNA and CXCR2, Caspase-3, Bax protein than model group ($P<0.05$). Conclusion: The characteristics of the therapeutic effect of Rongzhi capsules on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head are multi-component and multi-target. CXCR2 is the core target of Rongzhi capsules in treating steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. Rongzhi capsules can inhibit the apoptosis of bone cells in rats with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, thereby achieving the therapeutic effect of treating steroid-induced osteonecrosis of the femoral head.

[Keywords] steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; Rongzhi capsules; network pharmacology; CXCR2 chemokine receptor 2; molecular mechanisms; rat

激素性股骨头坏死是骨科疑难疾病^[1],通常由大剂量激素使用引起。该病主要好发于中青年群体,发病率呈上升趋势^[2-3]。尤其是在当今病毒流行的环境下,糖皮质激素被广泛应用于减轻炎症和改善器官功能,这可能加剧激素性股骨头坏死的发病风险^[4-5]。晚期患者股骨头会出现严重塌陷及关节

间隙明显变小,关节功能丧失,患者常需要接受人工全髋关节置换术。关节置换会让患者面临假体感染、松动、脱位及翻修等困境^[6]。为了避免这种情况,对于青年患者而言,保留原有的股骨头显得尤为重要。因此,探索安全有效的保髋方法具有重要意义。

目前,激素性股骨头坏死药物治疗尚未达成共识,药物以双膦酸盐类、他汀类、非甾体抗炎药为主,疗效尚不明确^[7-8]。中医学认为激素性股骨头坏死患者常因肾气虚弱和经络堵塞导致的气血不畅而引发疼痛^[9]。气虚和血瘀是此病的关键病机,肾气不足是病机之本,而血瘀及痰湿的阻滞则是发病条件^[10-11]。苁脂胶囊由清代赵濂《伤科大成》中的“壮筋续骨丹”为主方加减而成,具有补益肝肾、强骨生髓及活血的作用,主要针对病情早期的虚和瘀。研究^[12]显示苁脂胶囊在改善髋关节功能、减轻疼痛方面有显著效果。然而,苁脂胶囊治疗激素性股骨头坏死机制仍不完全明确。因此,本研究通过网络药理学分析挖掘苁脂胶囊的核心作用靶点和通路,并通过动物实验进行验证。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30只10周龄的SPF级雄性SD大鼠,体质量(302.3±11.06)g,购自广州中医药大学三元里校区动物实验中心,动物生产许可证号:CXK[粤]2013-0034。动物质量合格证号:44005800014663。大鼠饲养于广州中医药大学SPF级动物房,保持温度在25℃,空气湿度为37%,光照采用12 h/12 h光暗周期。本研究方案经广州中医药大学动物实验伦理审查委员会批准(20231216003)。

1.2 药物 苁脂胶囊(组成:当归、川芎、白芍、熟地黄、杜仲、续断、血竭、自然铜、骨碎补、桂枝、鹿茸、黄芪、补骨脂、菟丝子、西洋参、木瓜、黄柏、牡丹皮、桃仁、三七)购于宝鸡市中医医院药房(陕药制字Z2017008)。

1.3 试剂 甲强龙注射液[法玛西亚普强(中国)有限公司,批号:4322913];咪喹莫特(武汉克米克生物医药技术有限公司,批号:22113106);BCA蛋白定量试剂盒(上海原鑫生物科技有限公司,批号:FD2001);蛋白上样缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司,批号:AR1112);Trizol试剂[天根生化科技(北京)有限公司,批号:DP424];兔抗鼠CXC趋化因子受体2(C-X-C motif chemokine receptor 2, CXCR2)抗体(博奥森生物有限公司,批号:ab92653);兔抗鼠胱天蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(博奥森生物有限公司,批号:ab56237);兔抗鼠Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(博奥森生物有限公司,批号:ab21629);0.3%戊巴比妥钠(上海国药集团化学试剂有限公司,批号:ab32651)。

1.4 主要仪器 H1650R型台式冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器有限公司);SPL0960型荧光PCR板(美国Thermo公司);DYY-2C型电泳仪(北京六一股份有限公司);M199型切片刀(莱卡技术股份有限公司);YD-315型切片机(浙江金华益迪公司);BMJ-A型包埋机(常州中威电子仪器股份有限公司);BA210T型显微镜(Motic公司)。

1.5 方法

1.5.1 网络药理学分析

1.5.1.1 苁脂胶囊有效活性成分及靶点的筛选 利用中药系统药理数据库与分析平台(traditional Chinese medicine pharmacology database and analysis platform,TCMSP)检索苁脂胶囊组成的中药(当归、川芎、白芍、熟地黄、杜仲、续断、血

竭、自然铜、骨碎补、桂枝、鹿茸、黄芪、补骨脂、菟丝子、西洋参、木瓜、黄柏、牡丹皮、桃仁、三七)化学成分及其相关的药物靶点。筛选标准设定为口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18。其中血竭、补骨脂和鹿茸未能通过TCMSP检索。设定物种为人类,分别从BATM-TCM数据库、HERB数据库(<http://herb.ac.cn/>)及相关文献中获取三者的有效活性成分。使用中药名称的首字母和数字为化学成分命名(如白芍使用BS1-BS8)。将成分的SMILES格式信息通过PubChem获取,并输入Swiss Target Prediction数据库设定筛选条件为概率大于0,从而识别其潜在药物靶点。

1.5.1.2 激素性股骨头坏死靶点获取 以“steroid-induced necrosis of femoral head(激素性股骨头坏死)”为检索词,通过检索GeneCards、OMIM等在线疾病数据库,获取激素性股骨头坏死相关疾病靶点,并将所得靶点分别合并、去重,再利用Uniprot数据库匹配已验证的人类靶点基因名。

1.5.1.3 苁脂胶囊活性成分潜在作用靶点与激素性股骨头坏死的共同靶点筛选及蛋白质互作(PPI)网络 将激素性股骨头坏死的潜在靶点与苁脂胶囊药物靶点进行映射,绘制韦恩图获取两者交集。然后,将这些交集基因输入String数据库,构建展示苁脂胶囊活性成分与激素性股骨头坏死共同靶点的PPI网络。分析的物种设定为人类(Homo sapiens),置信度选择为0.9,并隐藏没有关系的靶点以简化网络结构。使用Cytoscape软件将这种相互作用导入,并通过CytoNCA插件对网络节点的拓扑结构进行分析,以识别关键靶点。

1.5.1.4 基因本体论(gene ontology,GO)富集分析和京都基因与基因百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析 利用GO.R包对获得的共同靶点进行GO富集分析,涉及分子功能(molecular function,MF)、生物过程(biological process,BP)和细胞组分(cell component,CC)。此外,采用KEGG.R包进行KEGG通路富集分析,探讨核心通路的富集程度,进而探索苁脂胶囊在治疗激素性股骨头坏死可能涉及的生物功能和信号通路机制。

1.5.2 动物实验

1.5.2.1 造模 大鼠经过1周的适应性饲养后,通过耳牌标记法对其进行标识。使用随机数字表将30只大鼠分为造模组20只和对照组10只。造模组大鼠采用咪喹莫特溶液与甲强龙联合注射法^[13]建立激素性股骨头坏死模型,大鼠接受咪喹莫特溶液皮下注射,每次剂量为30 mg/kg,间隔两周进行,总共注射两次。此外,造模组大鼠还接受臀肌注射甲强龙,每次剂量为40 mg/kg,1次/周,持续4周。对照组大鼠则分别在相同时间点接受等体积的0.9%氯化钠注射液皮下注射及臀肌注射。

1.5.2.2 分组与药物干预 将造模成功大鼠随机分为模型组和中药组,每组10只。根据《药理实验方法学》^[14],成人标准体质量(60 kg)的苁脂胶囊每日剂量为0.5 g/kg,大鼠的等效剂量为人用量的6.3倍,因此中药组的剂量设定为3.15 g/(kg·d)。蒸馏水溶解苁脂胶囊后灌胃,持续8周。对照组、模型组大鼠均给予等体积的蒸馏水灌胃,10 mL/kg,持续8周。

1.5.2.3 取材 药物灌胃结束后使用0.3%戊巴比妥钠(45 mg/kg)

麻醉大鼠,然后完整取出双侧股骨。每组随机取6只大鼠的股骨头标本在4%多聚甲醛溶液中固定48 h,接着用0.9%氯化钠注射液冲洗。随后进行后续的micro-CT扫描及病理染色。

1.5.2.4 观察指标 (1)股骨头HE染色病理切片及空骨陷窝率。采用pH=7.4的EDTA(14%)在数字超声脱钙机中对股骨头进行脱钙,每天更换溶液,1周后至完全脱钙为止。随后进行组织脱水、包埋和切片(厚度:5 μ m),切片在37 $^{\circ}$ C的恒温箱内烘干后,室温保存。然后进行脱蜡、苏木素染核、伊红染色、脱水封片等步骤。染色完成后,将玻片在通风橱中晾置以去除二甲苯气味。通过数字病理切片扫描系统对玻片进行扫描,比较骨小梁形态。每组选取5个玻片,在显微镜下(放大200倍)于骨骺线上方随机选择3个视野,计算空骨陷窝率。空骨陷窝率=空骨陷窝数/总骨陷窝数 \times 100%。

(2)股骨头组织CXCR2 mRNA、Caspase-3 mRNA、Bax mRNA表达。采用RT-qPCR检测股骨头组织CXCR2 mRNA、Caspase-3 mRNA、Bax mRNA表达。每组随机取6只大鼠的股骨头,使用骨剪将股骨头组织剪碎,然后液氮研磨。按照RNA试剂盒说明书提取组织RNA,并使用生物光度计测定RNA的浓度,然后进行逆转录和RT-qPCR检测。逆转录的步骤包括95 $^{\circ}$ C的预变性(2 min)、95 $^{\circ}$ C的变性(5 min)、60 $^{\circ}$ C的退火(30 s)、72 $^{\circ}$ C的延伸(45 s),总共进行40个循环。引物序列见表1。以GAPDH作为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因的相对表达水平。

表 1 引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增产物长度/bp
CXCR2	上游引物:CCTGCTTACTTTCCGAAGGAC	108
	下游引物:TTGCTGTATTGTTGCCCATGT	
Caspase-3	上游引物:GTGGAAGTACGATGATATGGC	116
	下游引物:CGCAAAGTGACTGGATGAACC	
Bax	上游引物:CGGCGAATTGGAGATGAAGTGG	124
	下游引物:CTAGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC	
GAPDH	上游引物:GCAAGGATACTGAGAGCAAGAG	133
	下游引物:GGATGGAATTGTGAGGGAGATG	

(3)股骨头组织CXCR2、Caspase-3、Bax蛋白表达。采用Western blotting检测股骨头组织CXCR2、Caspase-3、Bax蛋白表达。每组随机选取6只大鼠的股骨头标本,在液氮中研磨成粉。取等量的骨粉末,按照100 mg:1 mL的比例加入RIPA蛋白裂解液,充分震荡均匀。将样品在冰上裂解30 min,然后在4 $^{\circ}$ C下以12 000 r/min(离心半径为10 cm)离心20 min。吸取上清液,并添加四分之一体积的蛋白上样缓冲液。将混合物置于100 $^{\circ}$ C水浴锅中加热5 min,使蛋白变性。分装后储存于-80 $^{\circ}$ C备用。使用BCA法检测骨组织提取后的蛋白浓度。根据制胶说明书记配制下层12%分离胶和上层5%浓缩胶,然后进行蛋白样本的上样。在室温下,以110 kV电压进行电泳,持续90 min。电泳结束后,将蛋白转移到膜上(冰上、200 mA、2 h)。随后,在室温下用5%牛奶进行封闭处理,持续1 h。孵育一抗的过程中使用适当稀释的抗体[CXCR2(1:1 000)、Caspase-3(1:1 000)、Bax(1:5 000)]在4 $^{\circ}$ C下进行过夜孵育。在室温下洗膜3次,5 min/次。孵育二抗过程中使用山羊抗兔IgG抗体(1:500)和山

羊抗鼠IgG抗体(1:500),在室温下孵育2 h。再次洗膜3次,5 min/次。最后,将膜浸泡于ECL显影液中,并放置于成像系统中显影。通过Image J软件测定内参(GAPDH)和目的蛋白条带的灰度值,计算目的蛋白的相对表达量,即目的蛋白灰度值与内参灰度值的比值。

1.5.3 统计学方法 采用SPSS 26.0进行统计学分析,计量资料通过Shapiro-Wilk进行正态性检验,符合正态分布数据采用“均数 \pm 标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,符合正态分布多组数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),在各组间符合正态性检验的前提下,检验方差齐性,若方差齐采用LSD检验,若方差不齐采用塔姆黑尼检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 网络药理分析结果

2.1.1 茸脂胶囊活性成分及潜在作用靶点筛选 获得茸脂胶囊的有效活性成分163种,其药物之间共有的成分有52种,结合Swiss Target Prediction预测、合并、去重后得到药物靶点1 411个。(见表2)

表 2 部分活性化合物及对应靶点信息 (OB 值排名前 25 位)

编号	化学成分	化学成分命名	靶点	来源中药
MOL001918	芍药苷元	BS1	GABRA1	白芍
MOL001924	芍药苷	BS3	TNF	白芍
MOL001494	亚麻油酸乙酯	CX1	PTGS1	川芎
MOL002140	川芎嗪	CX2	RXRA	川芎
MOL002058	环木脂素	DZ1	KCNH2	杜仲
MOL001040	(2R)-7-羟基-2-(4-羟基苯基)苯并四氢吡喃-4-酮	GSB1	PTGS1	骨碎补
MOL001978	金鱼草素	GSB2	CCNA2	骨碎补
MOL001454	小檗碱	HB1	NOS2	黄柏
MOL002641	异黄柏甙	HB3	PTGS2	黄柏
MOL000239	华良姜素	HQ2	CAMTA2	黄芪
MOL000211	丁香香薷	HQ1	PGR	黄芪、牡丹皮
MOL000359	谷甾醇	MDP2	PGR	牡丹皮、熟地黄
MOL000211	Mairin	MG1	PGR	木瓜
MOL002883	油酸乙酯	MG2	NCOA2	木瓜
MOL000449	豆甾醇	SDH2	GABRA1	熟地黄
MOL001323	谷甾醇 α 1	TR1	NR3C2	桃仁
MOL001328	2,3-二脱氢GA70	TR2	PTGS1	桃仁
MOL001558	芝麻素	TSZ1	HADHB	菟丝子
MOL000358	β -谷甾醇	XY54	CASP8	西洋参、桂枝、续断
MOL001352	龙胆根素	XD	PGR	续断
MOL1	齐墩果酸	XJ1	COX8A	血竭
MOL2	脱氢枞酸	XJ2	PLAT	血竭
MOL8	补骨脂乙素	BCZ2	CYP19A1	补骨脂
MOL35	17- β -雌二醇	LR1	EPX	鹿茸
MOL36	葡萄糖胺	LR2	ADAM8	鹿茸

2.1.2 激素性股骨头坏死基因获取和分析 检索GeneCards得到与“激素性股骨头坏死”相关靶点578个,检索OMIM数据库得到相关靶点260个,PharmGkb数据库得到相关靶点130个,检索TTD数据库得到相关靶点2个。(见图1)将所有靶点合并、去重后,共获得激素性股骨头坏死的相关靶点864个。

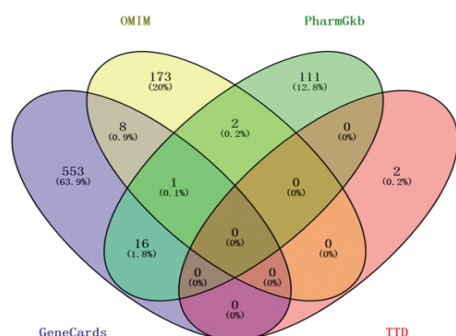


图1 激素性股骨头坏死相关靶点筛选韦恩图

2.1.3 茸脂胶囊-激素性股骨头坏死交集靶点分析及PPI网络构建 利用R4.3.1软件,分析1 411个药物活性成分靶点和864个激素性股骨头坏死相关疾病靶点。茸脂胶囊与激素性股骨头坏死共有靶点145个。(见图2) 将交集靶基因导入String在线分析网站(<https://string-db.org/>),设置隐藏未连接的靶点,设定最低互作评分中的“highest confidence>0.9”,并导出蛋白-蛋白互作结果数据。(见图3) 共获得144个节点,303条边。进一步通过Cytoscape 3.7.2软件得到茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死的潜在靶基因的PPI网络。(见图4) 运用其中的CytoNCA插件筛选Hub基因,使用Degree算法,得出排名前5位潜在核心靶基因分别为肿瘤蛋白53(tumor protein 53,TP53)、CXCR2、 β -连环蛋白(β -catenin,CTNNB1)、E1A结合蛋白(E1A binding protein,EP300)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)。(见图5)

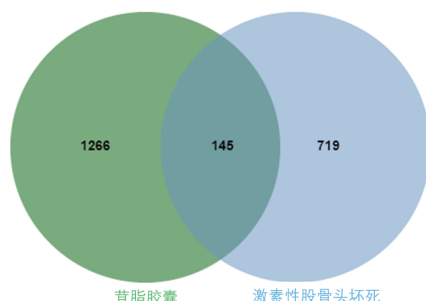


图2 茸脂胶囊-活性成分-激素性股骨头坏死共同靶点韦恩图

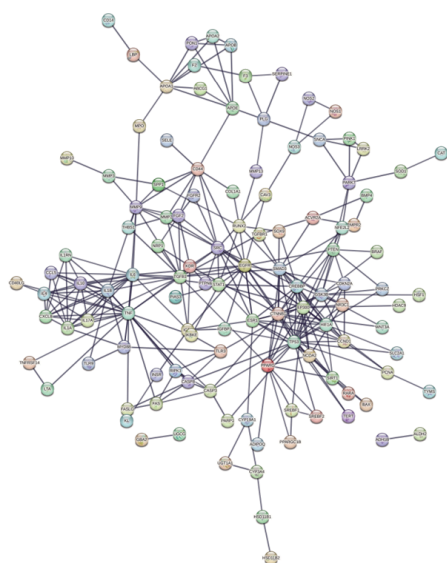


图3 茸脂胶囊-活性成分-激素性股骨头坏死靶点 PPI 网络图

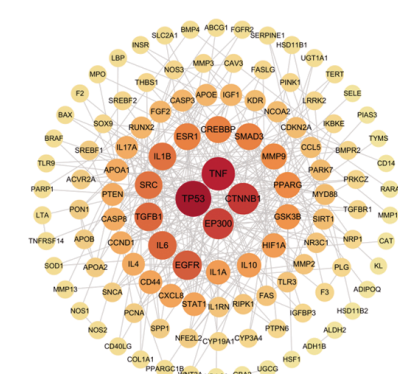


图4 核心蛋白的PPI网络

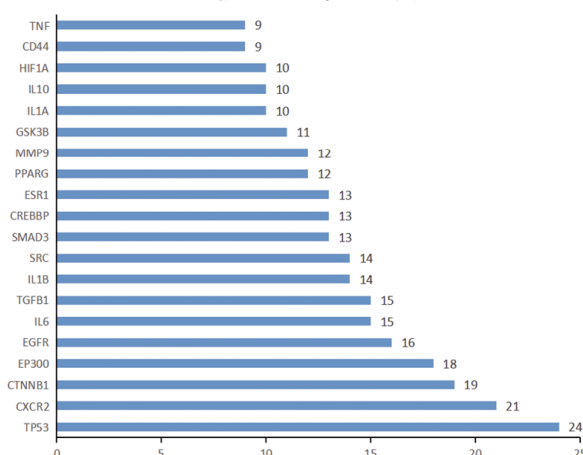


图5 基于 Degree 值的前 20 个核心蛋白的柱状图

2.1.4 疾病-药物-成分-靶点互作网络构建 借助Cytoscape软件构建激素性股骨头坏死-茸脂胶囊-活性成分-靶点互作网络。网络中的红色菱形代表茸脂胶囊组成药物,绿色圆形代表活性成分,蓝色矩形代表靶点基因。(见图6)

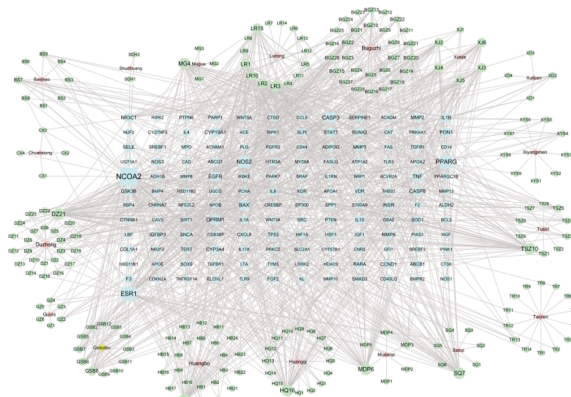


图6 激素性股骨头坏死-茸脂胶囊-活性成分-靶点互作网络

2.1.5 GO和KEGG富集分析结果 GO分析显示BP主要富集于正性调节基因表达、RNA聚合酶II介导的正性转录调节、对缺氧的反应、负性调节基因表达和正性调节白细胞介素-8(interleukin-8,IL-8)产生;CC主要富集于细胞外空间、细胞外区域、含胶原的细胞外基质;MF主要富集于酶结合、相同蛋白质结合、细胞因子活性蛋白质同源二聚化活性。(见图7)茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死核心基因的KEGG通路主要涉及磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路、FoxO信号通路、Toll样受体信号通路、白细胞介素-17(interleukin-17,IL-17)

信号通路、酒精性肝病等。(见图8)

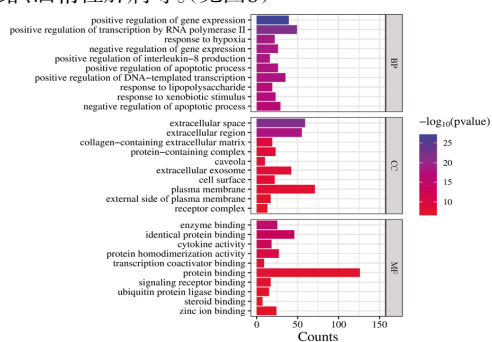


图7 GO 富集分析柱状图

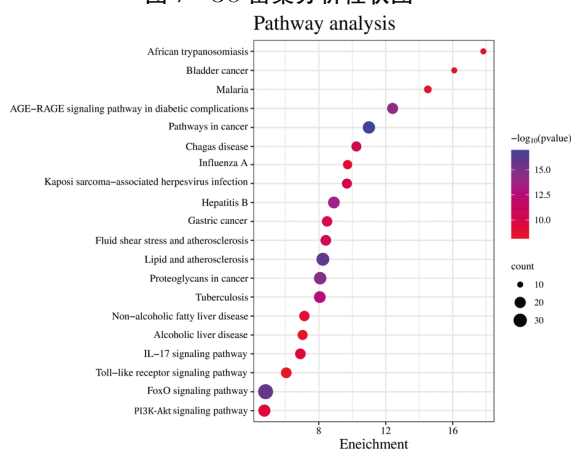


图8 KEGG 富集分析气泡图

2.2 动物实验结果

2.2.1 各组大鼠股骨头空骨陷窝率比较 HE染色显示,大鼠左侧股骨头关节软骨染成粉红色,细胞核呈现蓝色,骨小梁显示为鲜红色。对照组大鼠股骨头标本显示出光滑的关节面,软骨厚度均匀,骨小梁排列规则,且只有少量骨细胞核出现固缩。与对照组比较,模型组大鼠股骨头中软骨关节面粗糙,骨小梁排列紊乱,骨髓腔中出现大量脂肪细胞;骨细胞核固缩现象更加显著,出现大量空骨陷窝。与模型组比较,中药组大鼠股骨头关节面较光滑,骨小梁排列整齐,骨髓腔中见少量脂肪细胞、少量骨细胞核出现固缩。(见图9)模型组、中药组大鼠股骨头空骨陷窝率均高于对照组($P<0.05$);中药组大鼠股骨头空骨陷窝率低于模型组($P<0.05$)。(见表3)

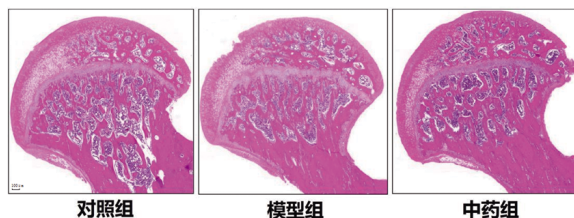


图9 各组大鼠股骨头 HE 染色 ($\times 20$)

表3 各组大鼠股骨头空骨陷窝率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	空骨陷窝率/%
对照组	6		1.874 \pm 0.974
模型组	6		63.653 \pm 5.097 ^a
中药组	6	3.15 g/(kg·d)	10.431 \pm 1.764 ^{ab}
F			107.842
P			0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2.2 各组大鼠股骨头组织CXCR2 mRNA、Caspase-3 mRNA及Bax mRNA相对表达量比较 模型组大鼠股骨头组织CXCR2 mRNA相对表达量高于对照组($P<0.05$);模型组、中药组大鼠股骨头组织Caspase-3 mRNA、Bax mRNA相对表达量均高于对照组($P<0.05$);中药组大鼠股骨头组织CXCR2mRNA、Caspase-3mRNA及Bax mRNA相对表达量均低于模型组($P<0.05$)。(见表4)

表4 各组大鼠股骨头组织 CXCR2 mRNA、Caspase-3 mRNA 及 Bax mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	CXCR2 mRNA	Caspase-3 mRNA	Bax mRNA
对照组	6		0.653 \pm 0.065	0.452 \pm 0.016	0.675 \pm 0.021
模型组	6		0.875 \pm 0.028 ^a	0.842 \pm 0.084 ^a	0.986 \pm 0.097 ^a
中药组	6	3.15 g/(kg·d)	0.621 \pm 0.064 ^{ab}	0.675 \pm 0.086 ^{ab}	0.842 \pm 0.076 ^{ab}
F			103.070	54.371	47.818
P			0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2.3 各组大鼠股骨头组织CXCR2、Caspase-3及Bax蛋白相对表达量比较 模型组、中药组大鼠股骨头组织CXCR2、Caspase-3及Bax蛋白相对表达量均高于对照组($P<0.05$);中药组大鼠股骨头组织CXCR2、Caspase-3及Bax蛋白相对表达量低于模型组($P<0.05$)。(见图10、表5)

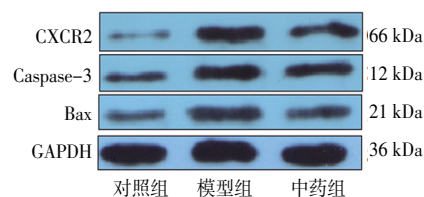


图10 各组大鼠股骨头组织 CXCR2、Caspase-3 及 Bax 蛋白表达 Western blotting 图

表5 各组大鼠股骨头组织 CXCR2、Caspase-3 及 Bax 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	CXCR2	Caspase-3	Bax
对照组	6		0.442 \pm 0.053	0.563 \pm 0.062	0.462 \pm 0.023
模型组	6		0.817 \pm 0.042 ^a	0.939 \pm 0.084 ^a	0.973 \pm 0.162 ^a
中药组	6	3.15 g/(kg·d)	0.629 \pm 0.035 ^{ab}	0.774 \pm 0.037 ^{ab}	0.749 \pm 0.184 ^{ab}
F			83.673	36.740	73.511
P			0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

网络药理学分析发现CXCR2是萆脂胶囊治疗激素性股骨头坏死的核心靶标。因此,本研究进一步设计动物实验,探讨CXCR2在萆脂胶囊治疗激素性股骨头坏死中的作用。结果发现萆脂胶囊可以显著改善激素性股骨头坏死大鼠股骨头空骨陷窝率。激素性股骨头坏死大鼠股骨头CXCR2基因高表达。萆脂胶囊可以降低CXCR2基因表达,并抑制激素性股骨头坏死大鼠骨细胞凋亡,从而达到治疗激素性股骨头坏死的目的。

网络药理学分析发现萆脂胶囊具有163种有效成分,并确定了578个相关靶点。这些成分对应于治疗激素性股骨头坏死的145个潜在靶标。本研究利用Degree算法筛选出关键潜

在靶基因前五名,分别是TP53、CXCR2、CTNNB1、EP300和EGFR。GO富集分析发现BP主要富集于正性调控基因表达、RNA聚合酶II介导的正性转录调节、缺氧应答、负性调控基因表达以及IL-8的正性调控。CC主要集中于细胞外空间、细胞外区域和含胶原的细胞外基质。MF主要涉及酶结合、蛋白质同源结合、细胞因子活性和蛋白质同源二聚化活性。KEGG通路富集分析发现茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死主要涉及PI3K/Akt信号通路、FoxO信号通路、Toll样受体信号通路、IL-17信号通路、酒精性肝病等。

股骨头坏死特征性改变为骨小梁中弥漫性地出现空骨陷窝或核固缩态的骨细胞,周围骨髓伴有坏死^[15]。激素性股骨头坏死的致病机制包括激素诱导的成骨细胞凋亡、骨微血管内皮细胞凋亡等^[16]。糖皮质激素引发的氧化应激和线粒体损伤导致成骨细胞凋亡以及成骨分化障碍,与激素性股骨头坏死的发生密切相关^[17]。细胞自噬与凋亡作为程序性细胞死亡的两个关键因素,在激素性股骨头坏死的研究中也占据了重要地位^[18-19]。骨细胞的自噬和凋亡过程与激素性股骨头坏死之间存在一定关联^[20-21]。细胞凋亡的启动依赖于两类胱天蛋白酶(Caspases)的激活。当细胞损伤被检测到时,起始Caspases(如Caspases-2、Caspases-8、Caspases-9和Caspases-10)从未激活的原酶形式被激活,进一步激活效应Caspases(如Caspases-3、Caspases-6和Caspases-7)^[22]。效应Caspases的激活会引发一系列反应,如内切酶激活、核蛋白和细胞骨架破坏、蛋白质交联、吞噬细胞配体表达及凋亡小体形成。PI3K/Akt信号通路可能是茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死的关键,与细胞的分化、凋亡和自噬高度相关。调控这一通路可以实现对激素性股骨头坏死的精准调控。其作用机制包括促进成骨细胞分化、抑制凋亡、修复内皮细胞及调控自噬。WANG D等^[23]研究显示,PI3K/Akt介导的凋亡在补血通络丸治疗股骨头坏死中发挥了关键作用。该药能够上调破骨细胞中Caspase-3和Bax的表达,降低Bcl-2、p-Akt和p-PI3K的表达水平。茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死可能通过抑制骨细胞凋亡来发挥作用,其成分包括骨碎补、三七和桃仁。研究发现骨碎补的活性成分提取物总黄酮能够通过激活PI3K/Akt通路,促进成骨细胞增殖,并降低细胞凋亡及细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平^[24]。三七总皂苷可以提高激素环境下MC3T3-E1细胞的成骨能力,改善激素性股骨头坏死大鼠模型的病理变化,其机制可能涉及调控PI3K/AKT/Bcl-2通路,促进自噬及减少凋亡^[25]。桃仁中的主要活性成分扁桃苷能降低激素性股骨头坏死大鼠的血液黏度,改善股骨头的病理损伤,抑制凋亡,其作用机制可能为调节PI3K/Akt/Bcl-2/Bax通路^[26]。

CXCR2是一个重要的促炎趋化因子受体,主要分布在中性粒细胞、浆细胞、单核细胞、巨噬细胞和内皮细胞中^[27]。它与多种肿瘤的发生和进展密切相关,如其活化会促进脑肿瘤和乳腺癌的生长及转移^[28]。CXCR2可通过调节细胞周期相关蛋白如CDK4、CDK6,加快细胞周期,同时CXCR2还能通过影响凋亡相关蛋白Bcl-2,降低程序性细胞死亡的发生^[29]。Bcl-2是一种抗凋亡基因,其信号通路是线粒体介导的细胞死亡过程中的关键调节路径。该途径可通过BH结构域与线粒体膜上的

Bcl-2蛋白结合,调节其抗凋亡功能^[30]。CXCLs/CXCR1/2轴可调节成骨细胞的功能,特别是骨吸收和成骨。研究^[31]表明,骨质疏松症患者的腰椎松质骨及其骨髓中CXCL2的水平显著高于健康个体,并且CXCL2可以减少小鼠骨质流失。体外实验证明CXCL2过表达会抑制MC3T3-E1成骨细胞系的增殖和分化。本研究发现茸脂胶囊能降低激素性股骨头坏死大鼠的空骨陷窝率,并促进病变修复。模型组大鼠股骨头骨组织CXCR2 mRNA、Caspase-3 mRNA、Bax mRNA及CXCR2、Caspase-3、Bax蛋白相对表达量均高于对照组($P<0.05$);中药组大鼠股骨头骨组织CXCR2 mRNA、Caspase-3 mRNA、Bax mRNA及CXCR2、Caspase-3、Bax蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$)。在细胞凋亡信号作用下,Bax活化后在线粒体中形成二聚体,增加膜通透性,从而促进凋亡。Caspase-3作为关键蛋白酶,在该过程中扮演重要角色。降低其活性能够有效抑制细胞死亡^[32]。激素主要通过增加Bax和降低Bcl-2的表达来诱导成骨细胞凋亡^[33]。本研究结果表明,茸脂胶囊可抑制激素性股骨头坏死大鼠股骨头组织Bax和Caspase-3表达,从而减少细胞凋亡。

综上所述,茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死具有多成分、多靶点的特点。CXCR2是茸脂胶囊治疗激素性股骨头坏死的核心靶标。茸脂胶囊可以降低CXCR2基因表达,并抑制激素性股骨头坏死大鼠骨细胞凋亡,从而达到治疗激素性股骨头坏死的作用。本研究不足之处:(1)动物实验未利用CXCR2基因敲除或过表达小鼠,因此无法直接研究茸脂胶囊对动物体内CXCR2的具体调控作用。(2)本研究未设计阳性对照组。目前激素性股骨头坏死动物实验的研究领域尚缺乏公认的阳性对照药物,导致本研究难以设置合适的阳性对照组。(3)本研究未考察量效关系,有待后续研究进一步优化。

参考文献

- [1] 朱瑞征,李文龙,薛志鹏,等.基于德尔菲法及共识会议法的《股骨头坏死中医疗效评价标准(2019年版)》临床疗效评价方法研究[J].中医药导报,2022,28(6):57-61.
- [2] MA M X, TAN Z, LI W Y, et al. Osteoimmunology and osteonecrosis of the femoral head[J]. Bone Joint Res, 2022, 11(1):26-28.
- [3] LI Z L, SHAO W K, LV X, et al. Advances in experimental models of osteonecrosis of the femoral head[J]. J Orthop Translat, 2023, 39:88-99.
- [4] IM G I. Regenerative medicine for osteonecrosis of the femoral head: Present and future[J]. Bone Joint Res, 2023, 12(1):5-8.
- [5] ZHANG J, CAO J Z, LIU Y F, et al. Advances in the pathogenesis of steroid-associated osteonecrosis of the femoral head[J]. Biomolecules, 2024, 14(6):667.
- [6] BIAN Y X, HU T T, LV Z H, et al. Bone tissue engineering for treating osteonecrosis of the femoral head[J]. Exploration (Beijing), 2023, 3(2):20210105.
- [7] TSUBOSAKA M, MARUYAMA M, LUI E, et al. Preclinical

- models for studying corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2024, 112(1): e35360.
- [8] 柴威涛, 郭成龙, 张晓刚, 等. 股骨头坏死的中西医研究进展[J]. *中医研究*, 2023, 36(12): 92-96.
- [9] 中国中医药研究促进会中医骨伤临床循证医学分会, 何伟, 王智勇. 非创伤性股骨头坏死中西医结合诊疗专家共识[J]. *中医正骨*, 2024, 36(9): 1-11.
- [10] 郭强, 李国庆. 中西医治疗股骨头坏死的研究进展[J]. *临床医学研究与实践*, 2024, 9(5): 185-189.
- [11] 吴智恒, 吴睿哲, 荣尚, 等. 基于BMP/Smads/Runx2信号通路探讨桃红四物汤对创伤性股骨头坏死模型大鼠成骨分化表达和病理形态学的影响[J]. *中医药导报*, 2022, 28(9): 7-13.
- [12] 侯凯, 李军, 张钦. 茸脂生骨胶囊联合阿法骨化醇治疗早期股骨头缺血性坏死的临床效果[J]. *临床医学研究与实践*, 2019, 4(16): 131-133.
- [13] 林天烨, 吴智明, 张文胜, 等. 复方生脉成骨胶囊修复激素性股骨头坏死的作用机制[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(2): 200-207.
- [14] 魏伟, 吴希美, 李元建. *药理实验方法学*[M]. 4版. 人民卫生出版社, 2010.
- [15] XIEXH, WANGXL, YANGHL, et al. Steroid-associated osteonecrosis: Epidemiology, pathophysiology, animal model, prevention, and potential treatments(an overview). *J Orthop Translat*, 2015, 3(2): 58-70.
- [16] 张杰, 曹建泽, 刘永飞, 等. 激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J]. *中国矫形外科杂志*, 2024, 32(7): 620-624, 630.
- [17] 胡兆林, 常峰. 激素性股骨头坏死发病机制及相关信号通路研究进展[J]. *医学综述*, 2022, 28(3): 466-470.
- [18] GAO Y, YOU Y H, ZHANG P F, et al. Cortistatin prevents glucocorticoid-associated osteonecrosis of the femoral head via the GHSR1a/Akt pathway[J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 132.
- [19] 胡康一, 曹林忠, 尚征亚, 等. 细胞焦亡在激素性股骨头坏死发病机制中的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2023, 12(11): 61-65, 70.
- [20] MIGLIORINI F, MAFFULLI N, BARONCINI A, et al. Prognostic factors in the management of osteonecrosis of the femoral head: A systematic review[J]. *Surgeon*, 2023, 21(2): 85-98.
- [21] 成衍男, 潘振宇. 激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J]. *临床外科杂志*, 2023, 31(4): 301-304.
- [22] 芮仞, 姜悦, 张先姚, 等. 细胞凋亡在激素性股骨头坏死发病机制中的研究进展[J]. *山西中医学院学报*, 2019, 20(1): 65-69.
- [23] WANG D, LIU Y C, TANG D D, et al. Induction of PI3K/Akt-mediated apoptosis in osteoclasts is a key approach for Buxuetongluo pills to treat osteonecrosis of the femoral head[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 729909.
- [24] 武瑞骐, 崔伟, 杨启培, 等. 激素性股骨头坏死的中医药治疗机制[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(17): 2763-2771.
- [25] 田照, 曾平, 刘金富, 等. 三七总皂苷介导PI3K/AKT/Bcl-2信号通路调节MC3T3-E1自噬和凋亡治疗激素性股骨头坏死[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(6): 1361-1365.
- [26] 曾晓会, 卓俊城, 杨帆, 等. 羟基红花黄色素A联合扁桃苷对激素性股骨头坏死大鼠的作用研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(11): 1284-1290.
- [27] WANG A, REN M, WANG J C. The pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: A systematic review of the literature[J]. *Gene*, 2018, 671: 103-109.
- [28] 孙亮, 刘万林, 娜日松, 等. 3-甲基腺嘌呤调控自噬基因Beclin1可降低模型兔激素性股骨头缺血坏死的发生与发展[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(15): 2391-2396.
- [29] 王文选, 赵振群, 刘万林, 等. Beclin 1和MAP1-LC3在家兔激素性股骨头缺血坏死中表达的实验研究[J]. *实用骨科杂志*, 2017, 23(9): 811-815.
- [30] 赵振群, 张志峰, 刘万林, 等. 激素性股骨头坏死过程中低氧诱导因子1 α 与骨细胞凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(51): 8201-8207.
- [31] YANG Y, ZHOU X Y, LI Y J, et al. CXCL2 attenuates osteoblast differentiation by inhibiting the ERK1/2 signaling pathway[J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(16): jcs230490.
- [32] 农兵, 张法灿, 梁增文, 等. 胃溃疡愈合与Caspase3的表达及细胞凋亡的关系研究[J]. *广西医科大学学报*, 2006, 23(3): 365-367.

(收稿日期:2025-01-20 编辑:蒋凯彪)