

基于异病同治及数据挖掘 探讨八珍汤治疗股骨头坏死及骨肉瘤的机制*

潘海达¹, 秦 刚^{2△}

1 永嘉县中医医院, 浙江 永嘉 325100; 2 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023

[摘要] 目的: 基于网络药理学联合分析对接法探究八珍汤治疗股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)及骨肉瘤(osteosarcoma, OS)的潜在机制。方法: 通过中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)下载活性成分和相关靶点, 通过人类基因数据库(the human gene database, GeneCards)、在线人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)下载 ONFH、OS 相关疾病靶点。使用 R 软件取交集后, 再与两病共有基因取交集。利用 STRING 数据库对交集靶点构建蛋白互作网络图, 利用 R 软件进行基因本体(gene ontology, GO)与京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析, 运行 Autodock Vina 对活性成分及关键蛋白进行对接。结果: 筛选获得八珍汤疾病相关有效成分共 159 个, 相关靶点 1965 个, ONFH、OS 共有靶点 615 个, 药物与两种疾病交集获得药物疾病靶点 124 个。GO 富集分析获得 BP 相关条目 2082 个, CC 相关条目 42 个, MF 相关条目 122 个。KEGG 功能富集分析发现糖尿病并发症中的高级糖基化终末产物-受体(advanced glycation end products-receptor, AGE-RAGE)、脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、乙型肝炎(hepatitis B)、前列腺癌(prostate cancer)、胰腺癌(pancreatic cancer)等 161 条信号通路, 分子对接初步验证了八珍汤主要活性成分能与关键靶点发生相互作用。结论: Akt1 作为关键基因, 通过调节局部血管微循环、骨代谢达到治疗 ONFH、OS 的目的, 为后续研究八珍汤治疗 ONFH、OS 的临床应用具有指导意义, 并从现代医学的角度诠释中医中药异病同治的原理。

[关键词] 股骨头坏死; 骨肉瘤; 网络药理学; 八珍汤; 异病同治

[中图分类号] R274.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2025)01-0088-07

Potential Mechanism of Treating Osteonecrosis of the Femoral Head and Osteosarcoma with Bazhen Tang Based on Data Mining and Same Treatment for Different Diseases

PAN Haida¹, QIN Gang^{2△}

1 Yongjia County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yongjia 325100, China;

2 The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China

Abstract Objective: To probe into the potential mechanism of Bazhen Tang in the treatment of osteonecrosis of the femoral head (ONFH) and osteosarcoma (OS) based on network pharmacology co-analysis docking method. Methods: The active ingredients and the relevant targets were downloaded from TCMSP, and the ONFH and OS related targets were downloaded from GeneCards and OMIM. R software was used for the intersection of both, and the intersection with the genes shared by the two diseases. STRING database was utilized to build protein-protein interactions (PPI), R software was applied to conduct GO and KEGG enrichment analysis, the docking of active ingredients and key protein was performed using Autodock Vina. Results: The study has yielded 159 active ingredients related to Bazhen Tang and disease, 1965 related targets, 615 shared targets between ONFH and OS, and 124 medicine-disease targets obtained from the intersection of medicine and two diseases. 2082 BP-related items, 42 cell component (CC) related items and 122 molecular function (MF) related items were obtained from GO enrichment analysis. All 161 signaling pathways including AGE-RAGE in diabetic complications, hepatitis B, prostate cancer, pancreatic cancer and others were gained through KEGG functional enrichment analysis, molecular docking primarily revealed that the main active ingredients of Bazhen Tang could interact with key targets. Conclusion: Akt1 as the key gene could treat ONFH and OS by regulating local vascular microcirculation and bone metabolism, it has the significance of guidance for clinical application of the subsequent study on the treatment of ONFH and OS with Bazhen Tang, and expounds the principle of same treatment for different diseases in TCM from the angle of modern medicine.

Keywords osteonecrosis of the femoral head; osteosarcoma; network pharmacology; Bazhen Tang; same treatment for different diseases

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)是指各种原因造成股骨头局部血流动力学改变导致的一种常见髋关节疾病,因其病程缠绵、难以修复,故又有“不死的癌症”之称。其病因尚未明确。我国ONFH年增长15 000~20 000例,男性多于女性,发病人群多集中于中老年人^[1]。骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是来源于间充质的肿瘤,是最常见的骨科恶性肿瘤^[2], OS发病人群主要为青少年,其次为老年人^[3]。随着病情的进展,骨质破坏随之加重,高达15%~20%的患者在诊断时出现了不同程度的骨折^[4]。八珍汤首录于《医方考》卷3,现将八珍汤作为ONFH、OS的后期用药^[5],适用于久病肌肉瘦削和脉弱气微者,对于中医中药治疗上述疾病具有指导意义,但是针对两病采用异病同治背后的机理尚不明确。中医药以“辨证论治”为指导思想,从整体出发,对于现代医学所不及之处,起到了很好的补充。网络药理学融合多学科的技术和内容,揭示中药复方治疗疾病多成分、多靶点、协同作用的网络关系,是合理、低成本开发药物的必要条件^[6]。本研究基于网络药理学,对八珍汤治疗ONFH及OS的作用靶点和信号通路进行预测,并进行分子对接,为进一步基础研究奠定基础。

1 研究方法

1.1 八珍汤有效成分和靶点筛选 使用中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)(<http://tcmispw.com/tcmisp.php>)分别对人参、白术、白茯苓、当归、川芎、白芍、熟地黄、甘草以口服利用度(oral bioavailability, OB)≥30%及药物相似性(drug likeness, DL)≥0.18为筛选条件,采用Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)下载人类相关信息进行注释。

1.2 ONFH及OS疾病靶点取共同靶点检索 通过人类基因数据库(the human gene database, GeneCards, <https://www.genecards.org>)及在线人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM, <http://www.omim.org/>)以“osteonecrosis of the femoral head”“osteosarcoma”为关键词检索,获得较为完善的基因数据,找出两种疾病的共有基因并绘图。

1.3 八珍汤与两种疾病相关基因交集 通过R软件找出八珍汤与两种疾病共有基因的交集基因,并绘制韦恩图。

1.4 “成分-靶点-通路”网络 采用Cytoscape 3.8.0软件,构建成分-靶点-通路网络。在圆形

网络中,节点包括成分、靶点、通路。连线代表药物成分-靶点-通路之间的相互作用。

1.5 关键基因的蛋白-蛋白互作(protein-protein interactions, PPI)网络构建 将共同靶点,导入STRING数据库(<https://string-db.org/cgi/input.pl>),以score≥0.90为筛选条件,并隐藏无关节点,其余参数不作变更,绘制PPI网络图,并导出string_interactions.tsv文件。

1.6 核心基因筛选 将“1.5”项获得的string_interactions.tsv导入Cytoscape 3.8.0软件,使用CytoNCA插件进行筛选,选取Betweenness、Closeness、Degree、Eigenvector、Local Average Connectivity-based method、Network、Sub-graph、Information、Select All Centralities等六项,选择without weight为筛选条件,进行两次筛选,得到核心基因,同时进行拓扑分析获得关键基因。

1.7 ID转化及富集分析 运用R 4.04,插件org.Hs.eg.db(Bioconductor-org.Hs.eg.db)进行ID转化后,运用插件colorspace(Bioconductor-Search)、stringi(Bioconductor-Search)、ggplot2(Bioconductor-Search)及clusterProfiler(Bioconductor-clusterProfiler)、DOSE(Bioconductor-DOSE)、enrichplot(Bioconductor-enrichplot)、pathview(Bioconductor-pathview)进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。

1.8 成分-靶点分子对接 利用Cytoscape中插件Network Analyzer对网络进行拓扑分析,同时分别从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载SDF格式的化合物结构并利用Chem 3D软件将SDF格式转化为mol2格式文件,从RCSB数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载蛋白AR(PDB ID:2OZ7)、PTGS2(PDB ID:5F19)、PPARG(PDB ID:6T9C)的PDB格式结构,使用Pymol软件去除溶剂分子与配体,使用AutoDock Tools 1.5.6软件加氢,计算电荷、分配原子类型等,保存为pdbqt格式。最后运行Autodock vina 1.1.2进行分子对接,采用Discovery Studio 2020可视化分析对接构象。

2 结果

2.1 八珍汤活性成分及潜在靶点 检索TCMSP数据库,通过ADME筛选(DL≥0.18、OB≥30%),八珍汤8味中药中得到有效成分159个,获取每个成分的潜在靶点,结合Uniprot矫正并去除重,得到潜在靶点1965个。见表1。

表1 八珍汤活性成分

药物	化合物编号	化合物名称	口服利用度(%)	类药性
熟地黄	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
人参	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
人参	MOL000358	beta-sitotero l	36.91	0.75
人参	MOL003648	Inermin	65.83	0.54
人参	MOL000422	kaempfero l	41.88	0.24
人参	MOL004492	Chrysanthemaxanthin	38.72	0.58
人参	MOL005308	Aposiopolamine	66.65	0.22
人参	MOL005314	Celabenzine	101.88	0.49
人参	MOL005317	Deoxyhanringtonine	39.27	0.81

2.2 ONFH与OS共同潜在靶点 在GeneCards、OMIM、PharmGkb平台中,分别以“Osteonecrosis of the Femoral Head”“osteosarcoma”为关键词,取交集得到615个与ONFH、OS共有的潜在靶点。利用R软件绘图。见图1。

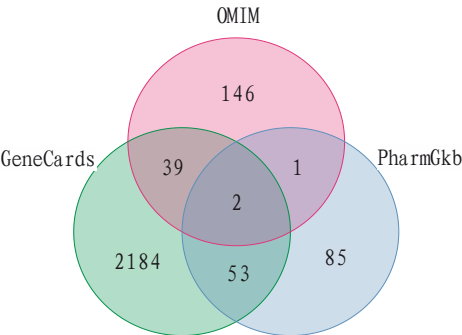


图1 ONFH与OS共同潜在靶点

2.3 八珍汤与两种疾病相关基因取交集 将筛选所得共同潜在靶点与八珍汤作用靶点取交集,发现124个共同基因,即八珍汤治疗OS、ONFH的潜在靶点基因。见图2。

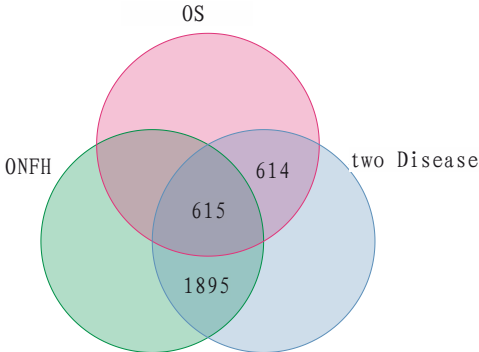


图2 八珍汤与两种疾病相关基因韦恩图

2.4 “成分-靶点-通路”网络 为进一步阐述八珍汤多成分、多靶点治疗ONFH、OS的协同作用机制,进行药物成分-靶点-通路网络构建,构建网络包括208个节点和879条边。见图3。

2.5 靶点基因PPI网络构建 采用Cytoscape 3.8.0软件,构建成分-靶点-通路网络。在圆形

网络中,节点包括成分、靶点、通路。连线代表药物成分-靶点-通路之间的相互作用。以Score≥0.990为筛选条件,并隐藏无关节点,其余参数不作变更,绘制蛋白网络互作图。将124个共同靶点导入STRING数据库,得到PPI网络图。见图4。

2.6 核心基因筛选及拓扑分析获得关键基因 运用Cytoscape自带插件CytoCNA筛选关键基因子集(见图4),其中v-jun禽肉瘤病毒17癌基因同源物(v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog JUN)、信号转导子和转录激活子3(signal transducer and activator of transcription,STAT3)、有丝分裂原激活蛋白激酶8(mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(serine/threonine protein kinase 1,Akt1)等为其关键核心子集。见表2。拓扑分析获得相关性最高的五个靶点基因是重组肿瘤蛋白53(recombinant tumor protein 53 TP53)、Akt1、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)、MAPK8。见表3。

2.7 ID转化及富集分析 利用Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>)数据库R语言,P值设定为0.05,进行GO功能富集分析及KEGG通路富集分析。利用Bioconductor(<http://www.bioconductor.org/>)数据库R语言,P值设定为0.05,进行GO功能富集分析及KEGG通路富集分析。GO富集显示包括细胞对化学压力的反应(cellular response to chemical stress)、对氧化应激的反应(response to oxidative stress)、对脂多糖的反应(response to lipopolysaccharide)等生物过程(Biological Process,BP)相关条目2082个。转录调节复合物(transcription regulator complex)、膜筏(membrane raft)、膜微区(membrane microdomain)等细胞成分(cell component,CC)相关条目42个。蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性(protein serine/threonine kinase activity)、DNA结合转录激活物活

性(DNA-binding transcription activator activity)、RNA聚合酶ii特异性(RNA polymerase II-specific)、DNA结合转录激活物活性(DNA-binding transcription activator activity)等分子功能(molecular function,MF)相关条目122个。KEGG功能富集分析发现糖尿病并发症

中的高级糖基化终末产物-受体(advanced glycation end products-receptor,AGE-RAGE)、脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、乙型肝炎(hepatitis B)、前列腺癌(prostate cancer)、胰腺癌(pancreatic cancer)等161条信号通路等161条信号通路。见图5—7。

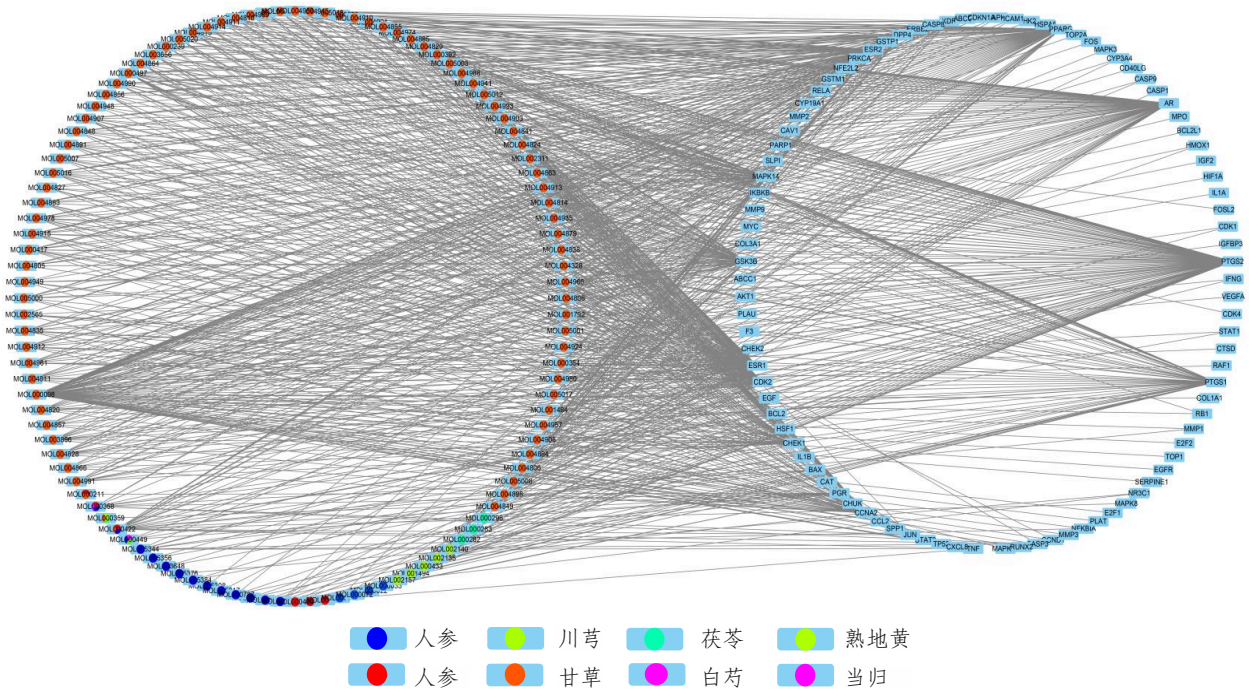


图3 “成分-靶点-通路”网络图

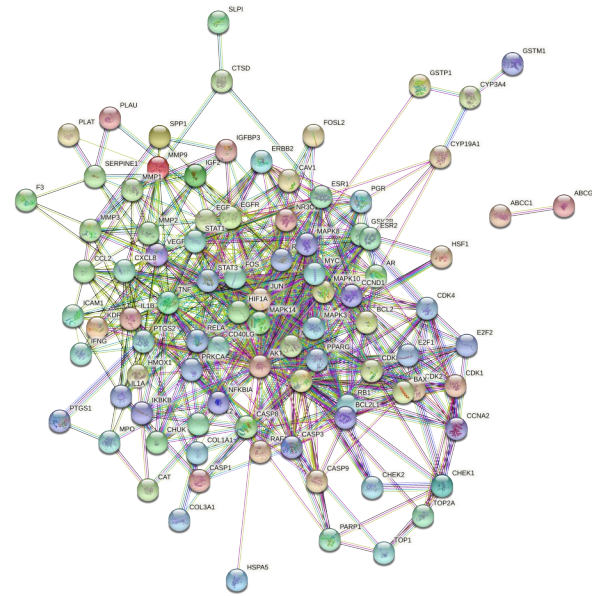


图4 靶点基因 PPI 交互图

表2 CytoCNA筛选关键靶点子集

基因	Degree 值	基因	Degree 值
MYC	13	MAPK1	13
JUN	13	TP53	12
FOS	13	AKT1	11

表3 拓扑分析筛选关键靶点

基因	Degree 值
TP53	44
AKT1	38
JUN	38
MAPK1	35
TNF	35
MAPK8	34

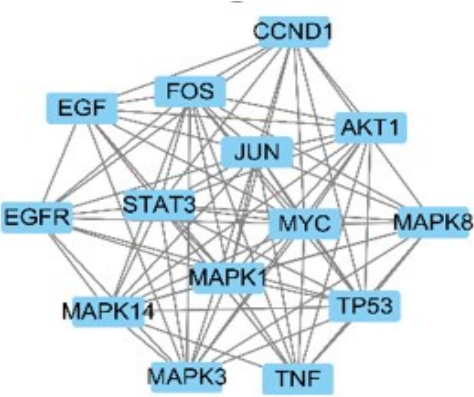


图5 靶点基因关键子集

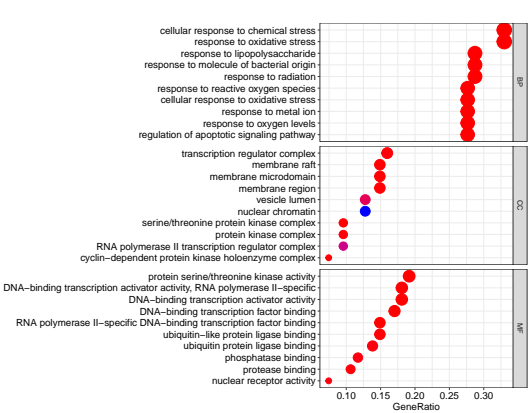


图6 GO功能富集分析

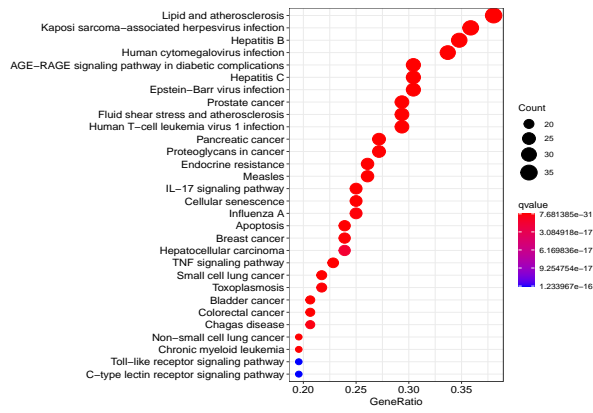


图7 KEGG功能富集分析

2.8 分子对接 Cytoscape 中插件 Network Analyzer 中节点度值(degree)前7的化合物见表4,其中dgree值越大的有效成分提示它可能越重要。分别与以网络拓扑分析及CytoCNA关键成分排名前6的靶点,进行分子对接。一般认为结合能越低。分子对接结果,表中对接分数均 ≤ -5.0 kcal/mol,表明关键成分与靶点结合性能好,能在一定程度上验证成分-靶点之间的结合能力。进行分子对接绘图,见图8。因AKT1 整体结合能较好,故将其可视化。见表5。

表4 筛选关键化合物

化合物	Degree 值
MOL000098-quercetin	72
MOL000354-isorhamnetin	24
MOL000392-formononetin	19
MOL000422-kaempferol	14
MOL000497-licochalcone-a	13
MOL002135-Myricanone	13
MOL004328-naringenin	13

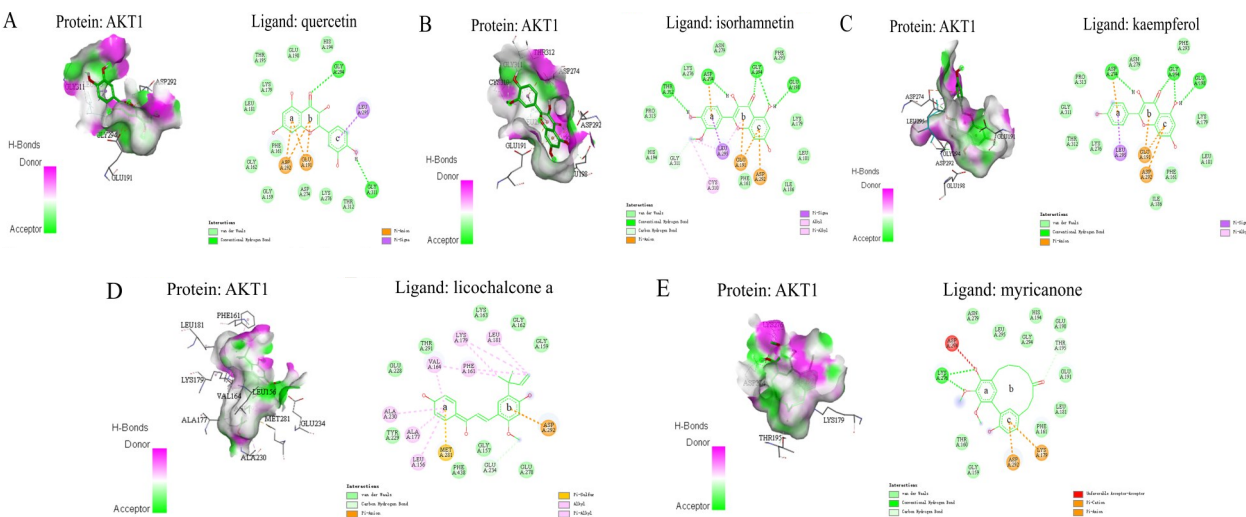


图8 潜在有效成分与关键靶点蛋白的分子对接结果

表5 核心组件成果与核心目标对接

蛋白	PDB ID	化合物	结合能(kcal/mol)
Akt1	4GV1	MOL000098-quercetin	-8.4
		MOL000354-isorhamnetin	-8.1
		MOL000392-formononetin	-8
		MOL000422-kaempferol	-8.1
		MOL000497-licochalcone-a	-8.5
		MOL002135-Myricanone	-8.8
		MOL004328-naringenin	-8

3 讨论

中医学中没有 ONFH 和 OS 相对应的概念,根据其临床表现属于“骨蚀”“骨瘤”“石痛”等范畴。同时,中医学对于 ONFH、OS 的病因病机主要归纳为:气滞血瘀,肾精亏虚,正虚邪侵^[7]。两病绵延日久气血亏耗,因气虚不能生血而致血虚,亦可因血虚而致气虚,故临床证候多表现为气血两虚证。因此,本研究基于网络药理学探究八珍汤治疗 ONFH、OS 的机制。

从有效化合物来看,八珍汤所含有的槲皮素(quercetin),可以通过减少细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)和抑制Caspase-3途径,表现出抗凋亡作用,并且通过氢键和疏水相互作用稳定关节软骨的细胞外基质,从而缓解局部症状。至于 OS,槲皮素已被证实对其具有细胞循环阻滞,调控肿瘤细胞分化,参与肿瘤细胞转移、种植及入侵等作用^[8]。柚皮素则有抗凋亡、清除自由基、抗癌、保护血管等作用^[9]。同时柚皮素可以阻断核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白通路,从而抑制滑膜细胞凋亡,进而介导关节炎的进展,保护髋关节。其也可以通过介导周期蛋白1(Cyclin D1),阻断G₁/S期,从而阻止OS生长;同时柚苷还可以通过抑制基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2,MMP2)的表达,抑制OS的转移^[10]。

筛选所得关键基因与细胞凋亡分子对接。Akt1 相较其他关键基因,与上述基因关联性更高。已有实验证明,Akt1 参与血管生成和血管稳定^[11]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)作为细胞分泌的主要血管生成因子,其生理作用需要通过激活Akt1而实现,同时Akt1下游靶点内皮型一氧化氮合酶,也被证实调节缺血及后续血管生成方面发挥积极作用^[12]。ONFH、OS 的病理过程涉及包含成骨细胞与破骨细胞参与的骨代谢紊乱^[13]。Akt1 作为骨代谢信号的“调解员”,其通过下游多种靶点致使蛋白磷酸化,从而表现出抗凋亡、调控骨代谢的作用。其作用原理可能并不是通过影响骨细胞增殖,而是通过增强线粒体对凋亡的易感性,从而抑制骨细胞生存^[14]。不仅如此,Akt1 还在破骨细胞的生理过程中起到了关键性的作用^[15]。ONFH 早在 ARCO I 期时 MRI 下就表现出“双线征”,其本质是破骨细胞在内的骨代谢失衡的过程,Akt1 作为治疗 ONFH 的潜在靶点,其激活并表达后,可以有效抑制软骨细胞中的磷酸盐积累,从而抑制软骨钙化,抑制骨赘形成即股骨头“蘑菇样”改变。其

中Akt1还可以通过磷酸化,增加蛋白聚糖的合成,从而促进了人关节软骨细胞修复及其活性。所以,Akt1通过介导骨代谢,尤其是破骨细胞活性,减少对正常骨质的破坏,即预防 ARCO III~IV 期股骨头塌陷及形态学改变,减少周围骨赘形成^[16]。

破骨细胞参与了 OS 的发生、发展全程。在早期破骨细胞能促进 OS 生长,并抑制其转移,特别是 OS 致命性的肺部转移,但随着 OS 进展,肿瘤细胞所分泌的B细胞因子2会抑制破骨细胞的生长。由此可见,Akt1 作为治疗 ONFH 的关键基因,其可通过减少正常骨质破坏,促进关节软骨修复,进而缓解疼痛等症状。对于 OS 早期抑制破骨细胞活性,从而阻止 OS 的发展及迁移种植,到了 OS 晚期,Akt1 介导破骨细胞活性的增强可能会抑制 OS 的进展。

综上所述,本研究基于异病同治探讨八珍汤治疗 ONFH、OS 的机制,其机理主要与介导血管生成,调整骨代谢有关,为后续临床研究提出了新的观点,同时其多途径、多靶点、多成分体现了中医的整体观。本研究仅从分子角度对其作用机制进行阐述,其具体过程需要进一步探讨和验证。此外,就不同批次间,药物及其加工过程对于疗效的影响尚未纳入讨论,后续需要研究并加以完善。

参考文献

- [1] 林煊烨,杜斌,刘铎,等. 中医药治疗股骨头坏死的研究进展[J]. 西部中医药,2024,37(2):122-125.
- [2] MOORE D D, LUU H H. Osteosarcoma [J]. Cancer Treat Res,2014,162:65-92.
- [3] CAI L, LV J, ZHANG Y, et al. The lncRNA HNF1A-AS1 is a negative prognostic factor and promotes tumorigenesis in osteosarcoma [J]. J Cell Mol Med,2017,21(11):2654-2662.
- [4] BIAZZO A, DE PAOLIS M. Multidisciplinary approach to osteosarcoma [J]. Acta Orthop Belg,2016,82(4):690-698.
- [5] 赵宇舒,刘双萍,李志成. 八珍汤对力竭小鼠的抗疲劳作用机制研究[J]. 中兽医医药杂志,2020,39(3):71-74.
- [6] 龙善甫. 辨证论治骨肿瘤一例[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),1990(4):531-532.
- [7] 黄桂成,王拥军. 中医骨伤科学[M]. 4版. 北京:中国中医药出版社,2016:700-705.
- [8] LAN H, HONG W, FAN P, et al. Quercetin inhibits cell migration and invasion in human osteosarcoma cells [J]. Cell Physiol Biochem,2017,43(2):553-567.
- [9] 彭侃,鲁超,胡守业,等. 柚皮苷对骨关节炎软骨破坏的保护作用研究[J]. 现代生物医学进展,2020,20(13):2418-2424.
- [10] 李岩,张德巍,杨大业. 柚皮苷对骨肉瘤细胞生物学功能的影响[J]. 现代肿瘤医学,2019,27(16):2836-2839.
- [11] 石威,张俊忠,解鹏超,等. 基于网络药理学和分子对接探