

· 基础研究 ·

基于网络药理学与分子对接探讨木瓜治疗
膝骨关节炎的分子机制[△]

时孝晴, 梅伟, 茆军, 张农山, 邢润麟, 殷松江, 王培民*

南京中医药大学附属医院/江苏省中医院, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 基于网络药理学探索木瓜治疗膝骨性关节炎的分子作用机制。方法: 基于口服生物利用度(OR)及药物相似性(DL), 通过中药系统药理学数据库(TCMSP)筛选木瓜的主要活性成分。运用 GeneCards、OMIM 数据库建立膝骨性关节炎靶标数据库。通过 Cytoscape 3.7.1 软件构建“活性成分-作用靶标-疾病”可视化交互网络; 运用 STRING 数据库构建蛋白互作网络, 分析相关蛋白互作关系; 对核心靶点进行京都基因与基因百科全书(KEGG)通路及基因本体(GO)生物过程富集分析。通过 Discovery Studio 软件对药物活性成分与疾病靶点进行分子对接验证。结果: 筛选得到木瓜活性成分 3 个, 涉及 44 个作用靶点。网络分析结果表明, 靶点主要涉及调节细胞代谢、凋亡等生物学过程, 通过调节细胞凋亡、肿瘤坏死因子(TNF)、p53、核转录因子- κ B(NF- κ B)、糖基化终末产物(AGE)及其受体(RAGE)等信号通路来发挥治疗膝骨关节炎的作用。分子对接结果表明, 木瓜活性成分与膝骨性关节炎的血管内皮生长因子 A(VEGFA)、白细胞介素-6(IL-6)、雌激素受体 1(ESR1)等靶点对接吻合度较好。结论: 木瓜治疗膝骨性关节炎具有多系统、多成分、多靶点的特点; 其可能的作用机制包括控制炎症, 调控关节软骨代谢、生长和修复, 促进细胞增殖、分化, 抑制细胞凋亡和抵抗氧化应激等以达到控制疾病发生发展的目的; 木瓜中槲皮素、白桦脂酸、表儿茶酸等活性成分可能是其治疗膝骨性关节炎的物质基础。

[关键词] 木瓜; 膝骨关节炎; 网络药理学; 机制预测; 分子对接

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)09-1502-09

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190909001

Molecular Mechanism of Chaenomelis Fructus in Treatment of Knee Osteoarthritis

Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

SHI Xiao-qing, MEI Wei, MAO Jun, ZHANG Nong-shan, XING Run-lin, YIN Song-jiang, WANG Pei-min*

Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province

Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore the molecular mechanism of Chaenomelis Fructus in the treatment of knee osteoarthritis based on network pharmacology. **Methods:** Based on oral bioavailability and drug similarity, the main active ingredients of Chaenomelis Fructus were screened by TCMSP. GeneCard and OMIM database were used to establish the target database of knee osteoarthritis. Cytoscape 3.7.1 software was used to construct a visual interactive network map of "active ingredient-action target-disease". STRING database was used to construct protein interaction network and analyze the interaction relationship between related proteins; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway and Gene ontology (GO) bioaccumulation analysis were carried out for core targets. In addition, the drug active ingredients were docked with disease targets by Discovery Studio software. **Results:** Three active ingredients of Chaenomelis Fructus were screened, involving 44 targets. The results of network analysis revealed that these targets exerted their therapeutic effects on knee osteoarthritis by regulating cell apoptosis, TNF, p53, NF-kappa B, AGE-RAGE and other signaling pathways which mainly involved in the cell metabolism, apoptosis and other biological processes. Molecular docking results showed that the docking degree of papaya active ingredients with targets of KOA such as VEGFA, IL6, ESR1 was good. **Conclusion:** Chaenomelis Fructus had the characteristics of multi-system, multi-component and multi-target in the

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目(81774334); 江苏省中医药领军人才(SLJ0207); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX19_0354)

* [通信作者] 王培民, 教授, 研究方向: 创伤和骨关节疾病; E-mail: drwpm@163.com

treatment of knee osteoarthritis. Possible mechanisms include controlling inflammation, regulating the metabolism, growth and repairment of articular cartilage, promoting cell proliferation and differentiation, inhibiting cell apoptosis and resisting oxidative stress which could control the occurrence and development of disease. Mairin, ent-epicatechin, and quercetin in *Chaenomeles Fructus* may be the material basis for the treatment of knee osteoarthritis.

[**Keywords**] *Chaenomeles Fructus*; knee osteoarthritis; network pharmacology; mechanism prediction; molecular docking

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种中老年常见、多发疾病。伴随全球人口老龄化的不断发展, KOA的发病率逐年递增, 逐渐成为全球范围内的公共健康挑战^[1]。多数 KOA 患者临床表现为关节酸痛不适, 当疾病进一步进展时, 患者膝部常疼痛难忍, 严重影响其生活质量, 甚至最终导致残疾。木瓜为蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实, 性味酸、温, 归肝、脾二经, 主要用于湿痹拘挛、腰膝关节酸重疼痛、吐泻转筋、脚气水肿等。《日用本草》记载: “木瓜治脚气上攻, 腿膝疼痛, 止渴消肿”。《食疗本草》亦记载: “煮木瓜令烂, 研作浆粥样, 用裹痛处, 冷即易, 一宿三、五度, 热裹便差。煮木瓜时, 入一半酒同煮之, 治脚膝筋急痛”。《本事方》中记载: “木瓜煎可治筋急项强, 不可转侧”。在临床运用木瓜时, 虽不将木瓜作君药使用, 但以木瓜为臣、为佐, 常起到良效。正如《本草新编》曰: “木瓜, 但可臣、佐、使, 而不可以为君, 乃入肝益筋之品, 养血卫脚之味, 最宜与参、术同施, 归、熟(地)并用”。木瓜治疗 KOA 疗效确切, 但其具体作用机制尚不清楚。

随着现代药理学、计算机学、分子生物学、生物信息学的迅速发展, 网络药理学逐渐成为一种新型疾病-药物预测模式^[2]。其在“药物-靶点-疾病”的理论框架下, 深度挖掘药物数据库、疾病数据库、基因数据库等, 并以网络图的形式进行展示, 借以阐释复杂的药物如何作用于人体。中药具有多成分、多靶点、多通道的复杂特点, 这一特征与网络药理学的整体性、系统性相一致。近年来, 通过网络药理学研究中药的作用机制取得了巨大进步, 成为探索中医药治疗疾病具体靶点与通路的有力工具。故本研究借助网络药理学, 探索木瓜的靶点、通路以及药物有效成分之间的互作关系, 为其治疗 KOA 提供机制理论支撑。

1 资料与方法

1.1 化合物成分收集与筛选

在中药系统药理学数据库和分析平台(traditional

Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)中检索木瓜的中药化学成分信息, 其筛选条件设置为药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 药物相似性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 , 获取药物活性成分^[3-4]。

1.2 木瓜及 KOA 相关作用靶点获取

以“knee osteoarthritis”作为关键词, 通过 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)与 OMIM(<https://www.omim.org/>)数据库, 检索并筛选与 KOA 相关的作用基因。通过 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/uniprot/>)将 2.1 项中所获得的药物作用靶标转化为与 GeneCard 数据库相匹配的基因名称(gene name)。最后, 将木瓜活性成分的靶点预测结果和 KOA 相关靶标的检索结果进行匹配, 并选择重叠靶点作为木瓜治疗 KOA 的核心靶点。利用 Venny 2.1(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)在线工具进行木瓜活性成分靶点和 KOA 靶点的映射并绘制韦恩图。

1.3 药物活性成分与疾病作用靶点网络构建

将木瓜的活性成分和 KOA 相关靶点筛选结果导入 Cytoscape Version 3.7.1 软件^[5], 构建木瓜活性成分与 KOA 靶点网络。其网络的节点(node)表示靶点或活性成分, 边(edge)表示其相互作用。Cytoscape 软件的核心架构是网络, 每个节点是基因、蛋白质或分子, 节点与节点之间的连接代表这些生物分子之间的相互作用。节点的度值(degree)代表网络中节点与节点相连的数目, 度值越大, 这个靶点越有可能成为化合物的关键作用靶点。

1.4 蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络构建与核心基因筛选

String 数据库(<https://string-db.org/>)收集了大量蛋白相互作用关系, 并给出了数据置信范围(低置信度: < 0.4 ; 中等置信度: $0.4 \sim 0.7$; 高等置信度: > 0.7)。在此基础上, 将木瓜的蛋白靶点导入 STRING 数据库, 物种限定 *Homo sapiens*, 置信度为 0.7, 进行 PPI 网络分析, 绘制 PPI 网络图。将该图

导入 Cytoscape version 3.7.1 软件进行拓扑属性分析。借助“Network analyzer”功能,计算参与互作靶蛋白的度值和介数(betweenness)。PPI 网络连线的粗细代表互相作用的强弱,靶点的度值反映了1个节点与其他节点的连接数目,度值越大代表此节点与其他节点的关系更紧密,在网络中地位更重要。对度值按降序进行排序,筛选出序号前20的靶点为关键靶点,借助 R project 软件绘制条形图,显示基因名与其连接节点数目。

1.5 GO 与 KEGG 富集分析

使用半编程性质的脚本性软件 R project,可实现多种生物信息分析与结果可视化。先利用 RGUI 及 org. Hs. eg. db 获取核心靶点的 entrezID,然后利用 RGUI、DOSE 及 ClusterProfiler 对核心靶点进行 GO 功能富集(molecular function, MF; biological process, BP; cellular component, CC)及 KEGG 通路进行富集。在程序语言中,将 P value Cutoff = 0.05, Q value Cutoff = 0.05,分析结果选择富集程度最高的前20条,选择气泡图的形式予以展示。最后利用 R project 软件及 pathview,通过 KEGG 数据库(KEGG, <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)下载富集排名前20名通路。通过人工查阅相关文献及反复对比筛选后,最终纳入结果。

1.6 分子对接

Discovery Studio 2016 3.0 是一个新一代分子建模和模拟环境,应用于蛋白质结构功能研究以及药物发现。采用 Discovery Studio 2016 3.0 对蛋白相互作用网络中度值靠前的3个靶点与木瓜药效成分进行分子对接验证。保存分子对接结果,并对其 LibDock score 进行分析,用以评价木瓜活性成分与靶点之间的结合活性。并用临床上广泛应用于治疗 KOA 的阳性药物塞来昔布(celecoxib)进行对照分析。

1.6.1 活性成分与 KOA 作用靶点晶体的获取 通过活性成分与疾病作用靶点网络构建,得到木瓜的类药成分与 KOA 作用靶标。上述类药成分、塞来昔布(阳性对照药物)的 mol2 结构和 KOA 相关靶点的蛋白质晶体结构,分别通过 Chemical Book 数据库(<https://www.chemicalbook.com/>)、RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载。

1.6.2 对接步骤及结果评价 将 1.6.1 得到的结果依次导入 Discovery Studio 2016 3.0 软件,进行预处理。首先对每个类药成分进行 Prepare Ligands,参数

为默认值,保存为分子对接配体。其次通过 Prepare Protein,参数取默认值,得到预处理蛋白质结构,抽离靶点原配体,保存为分子对接受体。受体活性位点选择原配体抽离位置,在 LibDock 模块设定 Docking Preferences 为 High Quality,对接匹配方法(Conformation Method)为 BEST,Parallel Processing 为 True,其他参数取默认值。对接结果以打分函数 LibDock score 给出,LibDock score 越高,预测成分与靶点结合的活性越高。

2 结果

2.1 木瓜活性成分的筛选

检索 TCMSP 数据库,筛选条件为 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18,共检索到木瓜中包含4个活性成分,对4个活性成分进行手工检索相关靶点,最终纳入3个有效活性成分,包括槲皮素、白桦脂酸、表儿茶酸,见表1。

表1 TCMSP 中木瓜的活性成分

MOL	化合物	OB/%	DL
MOL000211	白桦脂酸(mairin)	55.38	0.78
MOL000073	表儿茶酸(ent-epicatechin)	48.96	0.24
MOL000098	槲皮素(quercetin)	46.43	0.28

2.2 木瓜活性成分靶点库与 KOA 作用靶点集的构建

检索 TCMSP 数据库中成分靶点,其收录的木瓜中成分作用靶点共162个。使用 Uniprot 数据库收集作用靶点的基因名(gene name),删除无效与重复的靶点,最后得到78个活性成分作用靶标。通过 GeneCards、OMIM 数据库检索整合得到1543个 KOA 相关基因靶点。将78个活性药物靶点与1543个 KOA 相关靶点基因进行映射,得到44个共同靶点基因,韦恩图见图1,具体药物活性成分靶标见表2。

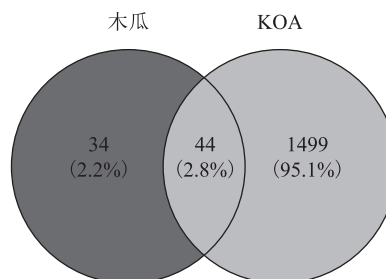


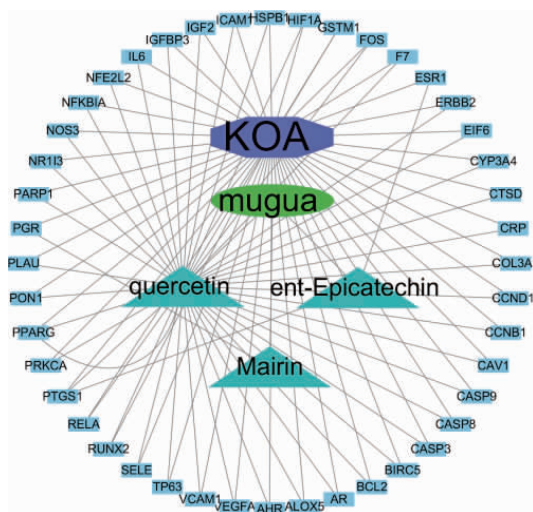
图1 KOA 靶点与木瓜成分靶点韦恩图

表 2 木瓜治疗 KOA 潜在靶标信息

编号	基因	编号	基因	编号	基因
1	PGR	16	CASP3	31	CCNB1
2	PTGS1	17	TP63	32	ALOX5
3	ESR1	18	NFKBIA	33	NFE2L2
4	AR	19	CASP8	34	PARP1
5	PPARG	20	PRKCA	35	AHR
6	F7	21	HIF1A	36	COL3A1
7	RELA	22	ERBB2	37	NR1I3
8	VEGFA	23	CYP3A4	38	CRP
9	CCND1	24	CAV1	39	RUNX2
10	BCL2	25	ICAM1	40	CTSD
11	FOS	26	SELE	41	IGFBP3
12	EIF6	27	VCAM1	42	IGF2
13	CASP9	28	BIRC5	43	PON1
14	PLAU	29	NOS3	44	GSTM1
15	IL6	30	HSPB1		

2.3 构建“药物-成分-疾病-靶点”网络

将 3 种药物活性成分和 44 个疾病相关作用靶点筛选结果进行映射, 去除无对应靶点的化学成分, 并删除重复的靶点。将数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建药物靶点-疾病靶点交集网络, 见图 2。由图 2 可得, 此网络共包括节点 50 个, 边 93 个。木瓜的 1 种活性成分可对应 1 个或多个疾病靶标, 多种药物活性成分可对应相同的疾病靶标, 提示木瓜治疗 KOA 具有多成分、多靶标的特点。



注: 绿色椭圆形代表中药名称; 紫色八边形代表疾病名称; 青色三角形代表药物有效成分; 蓝色四边形代表疾病作用靶点。

图 2 中药化合物-靶点网络

2.4 PPI 网络分析

将木瓜可能治疗 KOA 的 44 个关键靶标导入

STRING 数据库, 获取其相互作用关系并保存 PPI 网络图与 TSV 格式文件, 见图 3。PPI 网络中共包含节点 44 个, 边 122 条。充分体现了中药治疗疾病作用机制的复杂性。在 PPI 网络中, 度值较高即处于较为核心位置的靶点包括 VEGFA、IL6、ESR1、CASP3 等。利用 R 软件绘制条形图, 展示了 PPI 网络中度值中心性较高的前 20 位的靶点, 见图 4。

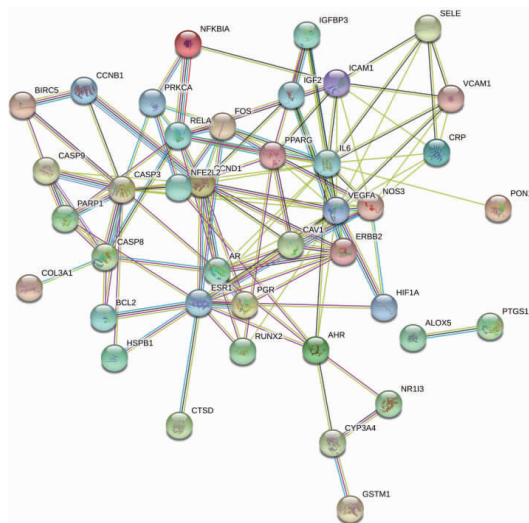


图 3 木瓜治疗 KOA 潜在作用靶点间的 PPI 网络

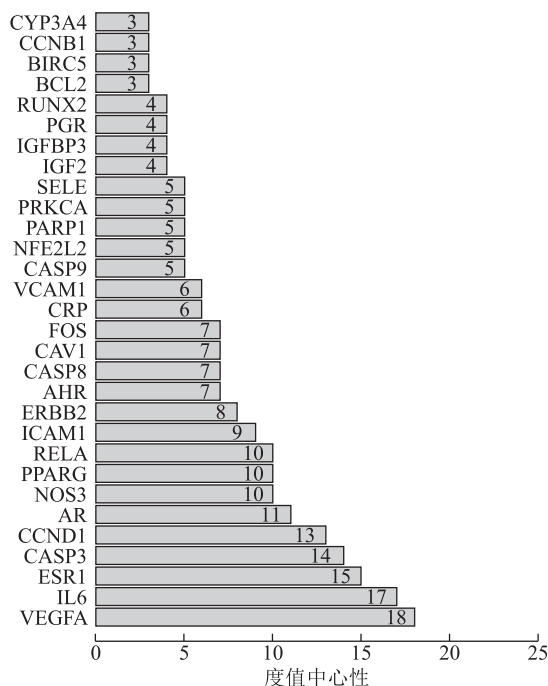


图 4 PPI 网络中排名前 20 的关键靶点

2.5 GO 和 KEGG 通路富集分析

分析 44 个核心靶点主要富集的分子功能、生物过程、细胞成分。结果显示, 木瓜治疗 KOA 的核心

靶点共在 65 个 GO term 上富集。其中所涉及的生物学功能与过程主要包括 RNA 聚合酶 II 转录调节区序列特异性 DNA 结合转录因子活性参与转录的正调节、蛋白质异二聚化活性、RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区序列特异性 DNA 结合、核心启动子近端区序列特异性 DNA 结合、染色质结合、配体激活的序列特异性 DNA 结合 RNA 聚合酶 II 转录因子活性等,与细胞增殖、细胞凋亡及调控细胞代谢等生物学过程密切相关。以 $P < 0.05$ 为阈值筛选排名前 20 的

GO 分析结果,见图 5。对木瓜治疗 KOA 的 44 个核心靶点进行 KEGG 富集分析,分析结果显示,共富集在 83 条通路上,其中与 KOA 通路相关的主要包括细胞凋亡、PI3K-Akt、肿瘤坏死因子(TNF)、核转录因子- κ B(NF- κ B)以及 p53 信号通路等。这些经典信号通路对 KOA 的发生、发展起到重要作用。以 $P < 0.05$ 为阈值筛选排名前 20 的 KEGG 分析结果,见图 6。GO 和 KEGG 分析提示木瓜可以通过以上多条通路作用于 KOA。

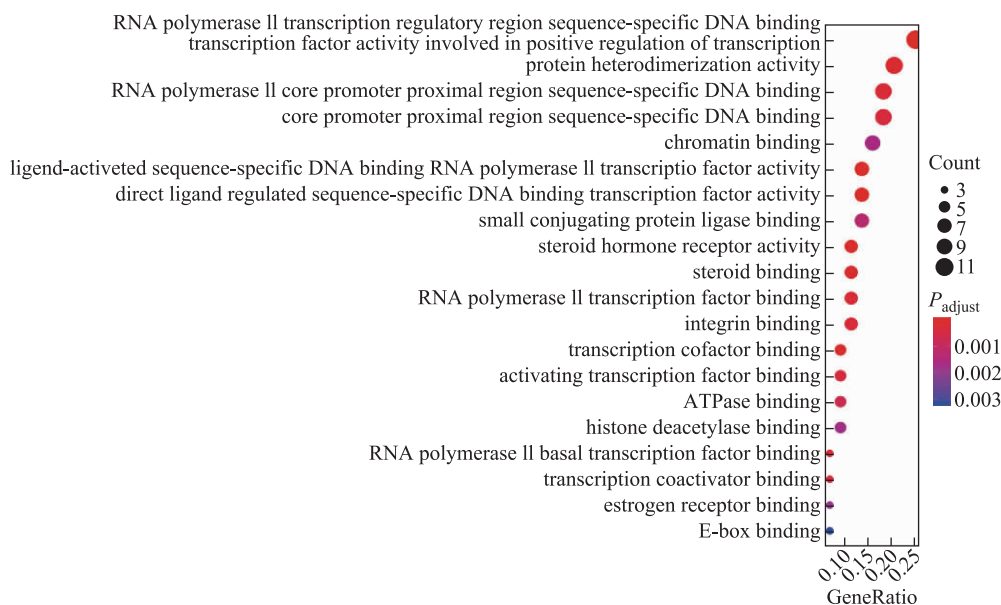


图 5 木瓜活性成分潜在治疗 KOA 靶点的 GO 功能分析

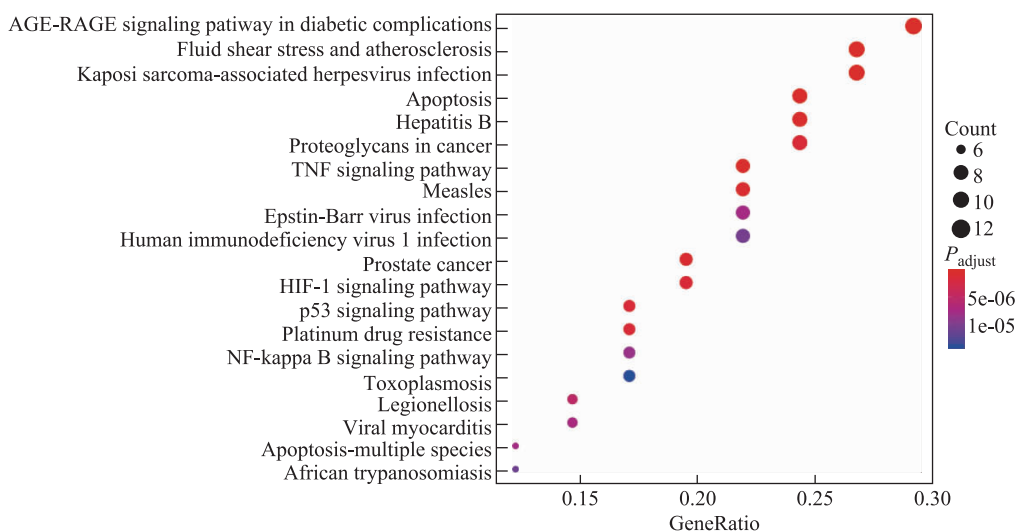


图 6 木瓜活性成分潜在治疗 KOA 靶点的 KEGG 富集分析

2.6 靶点通路分析

利用 KEGG Mapper 工具获取木瓜治疗 KOA 的通路图(见图 7)。木瓜与 KOA 相关靶点标记为红色。细胞凋亡通路图显示,木瓜治疗 KOA 涉及 12 个效应靶点。

2.7 分子对接分析

Discovery Studio 分子对接验证网络药理学。LibDock score 代表分子对接吻合度,分数越高代表配体与受体蛋白结合性越好。分子对接结果表明,木瓜活性成

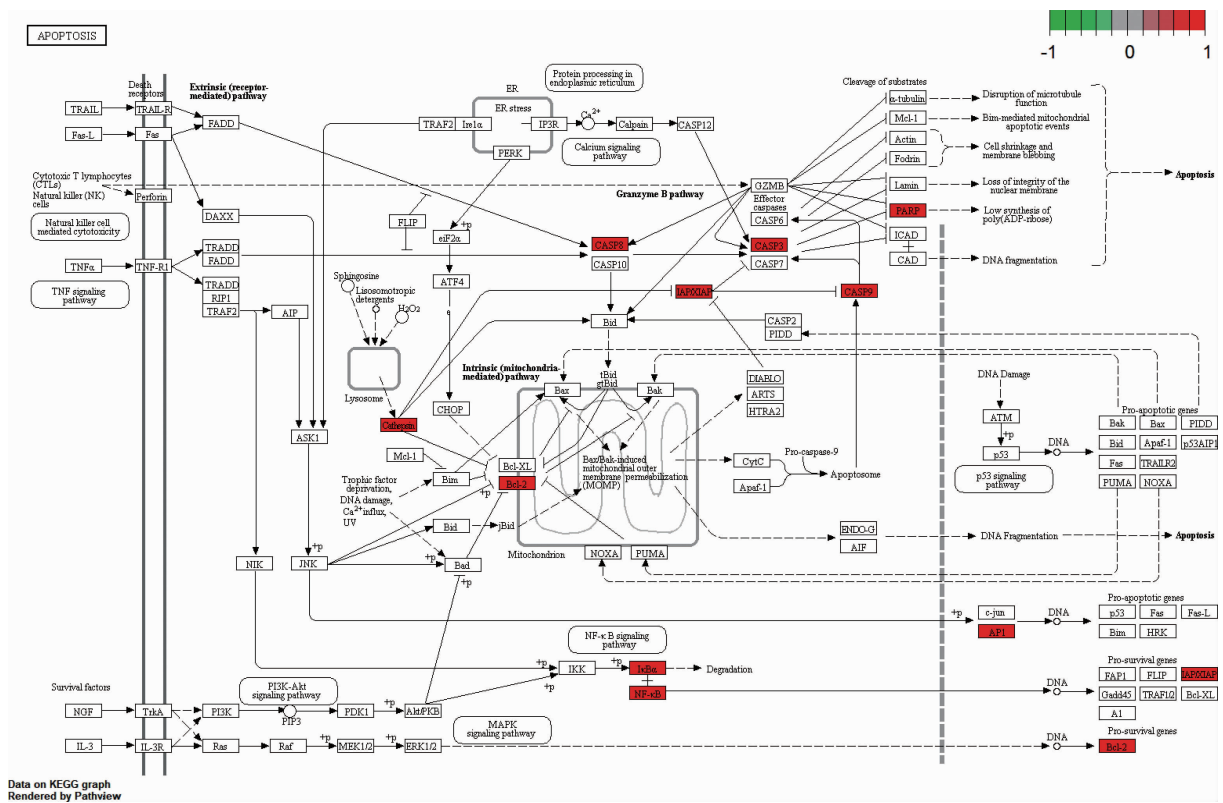


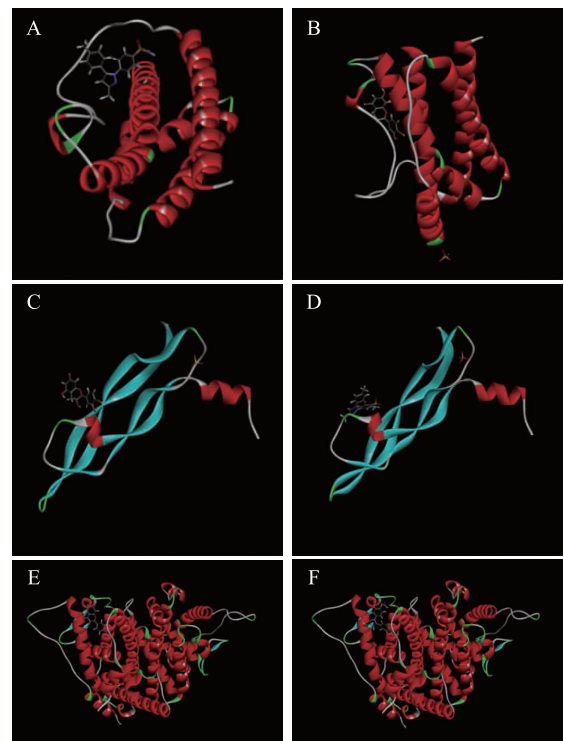
图 7 木瓜在细胞凋亡通路中的作用靶点

分与 KOA 部分关键靶点蛋白分子对接吻合度较好。木瓜活性成分与塞来昔布相比，分子对接吻合度无明显差异。与此同时，也间接验证了木瓜对于 KOA 的 VEGFA、IL6、ESR1 等靶点具有调节作用。分子对接结果与网络药理学筛选结果一致，用分子对接的方式验证了网络药理学的可靠性。木瓜成分配体与 KOA 靶蛋白受体的对接结果见表 3，对接过程见图 8。

表 3 配体受体蛋白分子对接的结果

KOA 靶标	药物有效成分	LibDock score
VEGFA	表儿茶酸	105.040 0
	槲皮素	100.305 0
	白桦脂酸	96.781 9
	塞来昔布	96.623 9
ESR1	表儿茶酸	73.508 9
	槲皮素	78.426 0
	白桦脂酸	-
	塞来昔布	77.766 5
IL6	表儿茶酸	113.614 0
	槲皮素	95.561 2
	白桦脂酸	-
	塞来昔布	66.377 3

注：- 表示没有得到 LibDock score。



注：A. IL6 与塞来昔布对接过程；B. IL6 与表儿茶酸对接过程；C. VEGFA 与表儿茶酸对接过程；D. VEGFA 与塞来昔布对接过程；E. ESR1 与槲皮素对接过程；F. ESR1 与塞来昔布对接过程。

图 8 木瓜活性成分、塞来昔布和 KOA 相关靶点的部分对接过程

3 讨论

KOA 是一种慢性关节退变性疾病,其主要表现在于关节软骨退化、关节边缘和软骨下骨的反应性增生^[6]。流行病学调查发现,60 岁以上人群当中,全球 KOA 患病率达 10% 以上,而中国农村人群中其患病率超过 16%,给患者、家庭及社会带来了较为沉重的经济压力^[7]。现在临床常用于治疗 KOA 的药物,如非甾体抗炎药(NSAID),存在消化系统、心血管系统等不良反应。与此同时,葡萄糖胺和软骨素等软骨保护剂与安慰剂组相比,亦没有显著的临床益处^[8]。中医中药的简、便、廉、效及其较小的不良反应等优势逐渐凸显。

祖国传统医学认为 KOA 属于“痹症”范畴。木瓜具有舒筋活络、和胃化湿的功效,可用于治疗湿痹拘挛、腰膝关节酸重疼痛。木瓜治疗 KOA 疗效显著,但更为确切的治疗靶点、通路不清,缺乏相关分子层面的研究。KOA-木瓜靶点基因网络揭示,引起 KOA 的靶点众多,且靶点之间存在着复杂的作用关系,并非单一靶点起作用。中药治疗 KOA 具有多成分、多靶点的特点,采用网络药理学分析有利于从分子水平阐明其作用机制。

通过检索数据库并设置筛选条件,最终得到 3 个有效活性成分,包括槲皮素、白桦脂酸与表儿茶酸。现代研究发现,槲皮素具有抑制膝关节中软骨细胞凋亡、减弱氧化应激反应、抑制软骨细胞外基质降解的作用^[9-12]。表儿茶酸对成骨细胞具有双向调节作用,在中低浓度时可促进成骨细胞增殖,高浓度时对其产生抑制作用^[13]。白桦脂酸呈剂量依赖性的抑制了白细胞介素-1 β (IL-1 β)诱导的基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、MMP-3、MMP-13、前列腺素 E₂(PGE₂)和一氧化氮(NO)生成,其可能是通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)来抑制 IL-1 β 诱导的 KOA^[14]。

此项研究通过木瓜靶点与 KOA 靶点构建网络,基于节点的度值,对包括 VEGFA、IL6、ESR1、CASP3、CCND1 等排名前 20 的关键靶点进行了排序。KEGG 通路富集与靶点通路分析显示,KOA 发生机制与相关靶点及其所分布的通路有密切关联。这与目前对上述中药活性成分及其关键靶点的研究结果和其与 KOA 间关系的相关研究基本一致。

VEGFA 是血管内皮生长因子(VEGF)家族的成员,其表达水平降低可以增强软骨形成和预防骨关

节炎的疾病进展^[15]。其原因可能由 apelin 介导的滑膜 VEGF 参与了 KOA 的疼痛通路^[16]。同时研究表明,抑制 VEGF 不仅可以增强软骨细胞分化,还可以保护软骨细胞免受 TNF- α 诱导的软骨细胞中细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)的磷酸化^[17]。IL-6 是一种强烈激活免疫系统并增强炎症反应的细胞因子,其参与各种炎症疾病的发病过程。对 IL-6 进行抑制,一方面减少了碘乙酸单钠诱导的骨关节炎(OA)大鼠实验模型的疼痛行为,另一方面,通过阻断 IL-6 或信号传导及转录激活蛋白-3(STAT-3),可以减轻内侧半月板失稳造成的 OA 大鼠的疼痛症状^[18]。ESR1 属于配体调控转录因子的核受体(NR)超家族,可表达于成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞以及骨细胞,软骨细胞中 E2 靶向活化 ESR1,通过抑制 ERK 磷酸化激活,进而抑制 ERK 信号通路,促进自噬流的形成,激活自噬,减少凋亡,进而引起软骨细胞的增殖^[19-20]。Meta 分析及基因相关性研究同样显示,ESR1 基因与 KOA 具有相关性^[21-22]。CASP3 是细胞凋亡过程中的关键酶。Takada 等^[23]发现,OA 的病理进展与细胞凋亡与内质网应激反应有关,CASP3 活化与软骨退变、软骨细胞凋亡具有相关性。在 KOA 人群中 CCND1 的表达下调,且随着 KOA 严重程度的增加,其下调越多。当 CCND1 过表达时,其可以逆转 FOXD2-AS1 抑制对软骨细胞活力的影响^[24-25]。

根据 GO 注释结果可知,木瓜主要通过影响关节软骨代谢、生长和修复,细胞增殖、分化、凋亡和抵抗氧化应激、炎症等通路而发挥治疗 KOA 的作用。通过 KEGG 富集分析,其结果主要富集在细胞凋亡、TNF、NF- κ B、p53、AGE-RAGE 等信号通路。

细胞凋亡是细胞的一种程序化死亡。现代研究发现,调控 KOA 软骨细胞凋亡的信号通路复杂多样,如 PI3k/Akt 信号通路、MAPK 信号通路、MAPK/JNK 信号通路、MAPK/ERK1/2 信号通路、TLR4 信号通路等^[26-28]。p53 是一种转录调节因子,在细胞凋亡的启动中发挥重要作用,当发生物理损伤、缺氧、代谢异常时可引起 p53 的过度表达,过度表达的 p53 能够刺激 Bax 基因表达增加,使 Bax 和 Bcl-2 的比例失调,从而促进细胞凋亡^[29]。在凋亡信号转导的级联反应中,过度表达的 p53 作用于线粒体,使其膜电位以及通透性改变,释放细胞色素 C,从而激活 Caspase-3,亦引起细胞凋亡的发生^[30]。TNF- α 是促炎细胞因子的一种,其在炎症过

程中发挥重要作用^[31]。TNF- α 诱导产生 MMP, 包括 MMP-1、MMP-3、MMP-13 及 ADAMTS-5 等^[32]。同时 TNF- α 能够激活 NF- κ B 信号通路, 使得 TNF- α 的促炎功能进一步加强^[33]。Özler 等^[34]发现, 在晚期 KOA 患者的血清与膝关节滑液中的 TNF- α 升高与疾病等级呈正相关。随着疾病严重程度的进展, 滑液 MMP-13 和血清 TNF- α 水平明显增加, 但 TNF- α 水平是一种全身性升高, MMP-13 水平则在局部升高。在关节炎组织中, NF- κ B 信号传导途径可以被促炎细胞因子、机械应激和细胞外基质降解产物激活, 这种活化可以调节许多细胞因子、炎症介质、转录因子和几种基质降解酶的表达^[35]。在 KOA 的病理进展中, 其被 KOA 软骨细胞活化。NF- κ B 信号通路不仅与促炎、应激等相关, 而且该通路的激活可促进软骨细胞分化为肥大样状态^[36]。持续的 NF- κ B 活化可诱导 ELF3、HIF2、RUNX2 等转录因子, 进而引发 MMP-13 和 ADAMTS 蛋白酶的产生, 其促进关节软骨细胞从前肥大状态转变为终末分化肥大状态^[36]。

综上所述, 本研究采用网络药理学方法和技术, 筛选出木瓜中 3 种药物活性成分和 81 个潜在治疗靶点。共有 1543 个 KOA 疾病相关靶标, 其中 44 个是木瓜-KOA 的共同靶标。通过对 GO 生物过程和 KEGG 信号通路的富集分析, 初步预测木瓜可能通过槲皮素、白桦脂酸、表儿茶酸等有效活性成分调控 VEGFA、IL6、ESR1、CASP3、CCND1 等靶点, 调节细胞凋亡、TNF、p53、NF- κ B、AGE-RAGE 等信号通路, 最终抑制炎症反应, 调节免疫功能, 干预细胞凋亡过程, 从而治疗 KOA。网络药理学的分析结果一方面说明了引起 KOA 因素多且复杂, 另一方面也直观的表明了木瓜多成分、多途径、多靶点治疗 KOA 的特点, 研究结果有助于对 KOA 发病机制的理解, 并在预防和治疗 KOA 方面拓展了新的治疗策略。但由于数据库、相应的分析算法和各种平台的软件功能的局限性, 其结果可作为开展实验研究的线索, 但具体机制有待实验研究进一步验证。

参考文献

- [1] JOHNSON V L, HUNTER D J. The epidemiology of osteoarthritis[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2014, 28 (1): 5-15.
- [2] HOPKINS A. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.
- [3] WAN Y X, XU L Y, LIU Z, et al. Utilising network pharmacology to explore the underlying mechanism of Wumei Pill in treating pancreatic neoplasms [J]. BMC Compl Alter Med, 2019, 19(1): 158.
- [4] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [5] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res, 2003, 13 (11): 2498-2504.
- [6] CUCCHIARINI M, DE GIROLAMO L, FILARDO G, et al. Basic science of osteoarthritis [J]. J Exp Orthop, 2016, 3: 22.
- [7] LIU Y, ZHANG H F, LIANG N X, et al. Prevalence and associated factors of knee osteoarthritis in a rural Chinese adult population: An epidemiological survey [J]. BMC Public Health, 2016, 16: 94.
- [8] SAWITZKE A D, SHI H, FINCO M F, et al. Clinical efficacy and safety of glucosamine, chondroitin sulphate, their combination, celecoxib or placebo taken to treat osteoarthritis of the knee: 2-year results from GAIT [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(8): 1459-1464.
- [9] FENG K, CHEN Z X, LIU P C, et al. Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18192-18205.
- [10] WEI B, ZHANG Y, TANG L X, et al. Protective effects of quercetin against inflammation and oxidative stress in a rabbit model of knee osteoarthritis [J]. Drug Dev Res, 2019, 80(3): 360-367.
- [11] QIU L N, LUO Y J, CHEN X J. Quercetin attenuates mitochondrial dysfunction and biogenesis via upregulated AMPK/SIRT1 signaling pathway in OA rats [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 1585-1591.
- [12] LI Y, WANG J L, SONG X P, et al. Effects of baicalin on IL-1 β -induced inflammation and apoptosis in rat articular chondrocytes [J]. Oncotarget, 2017, 8: 90781-90795.
- [13] 谢睿峰. 不同浓度表儿茶素没食子酸酯对体外培养成骨细胞的影响[D]. 太原: 山西医科大学, 2018.
- [14] WANG J B, CHEN A M, WU Q, et al. Betulinic acid inhibits IL-1 β -induced inflammation by activating PPAR- γ in human osteoarthritis chondrocytes [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29: 687-692.
- [15] ZUPAN J, VRTAČNIK P, CÖR A, et al. VEGF-A is

- associated with early degenerative changes in cartilage and subchondral bone [J]. *Growth Factors*, 2018, 36 (516): 263-273.
- [16] TAKANO S, UCHIDA K, INOUE G, et al. Vascular endothelial growth factor expression and their action in the synovial membranes of patients with painful knee osteoarthritis[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2018, 19:204.
- [17] ZHANG X F, CRAWFORD R, XIAO Y. Inhibition of vascular endothelial growth factor with shRNA in chondrocytes ameliorates osteoarthritis [J]. *J Mol Med*, 2016, 94:787-798.
- [18] LATOURTE A, CHERIFI C, MAILLET J, et al. Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76: 748-755.
- [19] KHALID A B, KRUM S A. Estrogen receptors alpha and beta in bone[J]. *Bone*, 2016, 87:130-135.
- [20] 刘敏, 谢巍伟, 郑维, 等. 雌二醇与 ESR1 靶向结合通过 ERK 信号通路调控软骨细胞的增殖[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(2):134-143.
- [21] AHRAR H, AGHILI K, SOBHAN M R, et al. Association of rs2234693 and rs9340799 polymorphisms of estrogen Receptor-1 gene with radiographic defined knee osteoarthritis: A meta-analysis[J]. *J Orthop*, 2019, 16:234-240.
- [22] DAI X Y, WANG C, DAI J, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in estrogen receptor alpha gene with susceptibility to knee osteoarthritis: A case-control study in a Chinese Han population[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:151457.
- [23] TAKADA K, HIROSE J, SENBA K, et al. Enhanced apoptotic and reduced protective response in chondrocytes following endoplasmic reticulum stress in osteoarthritic cartilage[J]. *Int J Exp Pathol*, 2011, 92:232-242.
- [24] ZHU X B, YANG S W, LIN W J, et al. Roles of cell cycle regulators cyclin D1, CDK4, and p53 in knee osteoarthritis[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(9):529-534.
- [25] CAO L, WANG Y, WANG Q G, et al. LncRNA FOXD2-AS1 regulates chondrocyte proliferation in osteoarthritis by acting as a sponge of miR-206 to modulate CCND1 expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 1220-1226.
- [26] 翁文玉, 郝烨华, 张瑜生, 等. 线粒体途径相关信号通路对成骨细胞凋亡的作用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(12):1665-1670.
- [27] 王华敏, 宓轶群, 刚嘉鸿. 信号通路在膝骨关节炎实验研究中的进展[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(2): 267-272.
- [28] KALAITZOGLOU E, LOPES E B P, FU Y, et al. TLR4 promotes and DAP12 limits obesity-induced osteoarthritis in aged female mice[J]. *JBM Plus*, 2019, 3:e10079.
- [29] SHIN S, LEE E M, CHA H J, et al. MicroRNAs that respond to histone deacetylase inhibitor SAHA and p53 in HCT116 human colon carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(6):1343-1352.
- [30] KIM S J, JU J W, OH C D, et al. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (2): 1332-1339.
- [31] CROFT M, BENEDICT C A, WARE C F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12:147-168.
- [32] BUCKLAND J. Osteoarthritis: Positive feedback between ADAMTS-7 and TNF in OA [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(10):566.
- [33] HAYDEN M S, GHOSH S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26:253-266.
- [34] ÖZLER K, AKTAŞ E, ATAY Ç, et al. Serum and knee synovial fluid matrix metalloproteinase-13 and tumor necrosis factor- α levels in patients with late stage osteoarthritis [J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2016, 50 (6): 670-673.
- [35] LEPETSOS P, PAPAVALASSIOU K A, PAPAVALASSIOU A G. Redox and NF- κ B signaling in osteoarthritis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 132:90-100.
- [36] MARCU K B, OTERO M, OLIVOTTO E, et al. NF- κ B signaling: Multiple angles to target OA [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11:599-613.

(收稿日期: 2019-09-09 编辑: 田苗)