

# 基于网络药理学及分子对接技术探讨黄芪甲苷治疗骨质疏松的作用机制研究

范志梁<sup>1</sup>, 刘贵珍<sup>1</sup>, 陈雨佳<sup>2</sup>, 顾春松<sup>3</sup>, 李倩<sup>4</sup>, 姜特<sup>1</sup>, 李文<sup>4</sup>, 李来来<sup>4</sup>, 陈云志<sup>4</sup>, 柴艺汇<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳

<sup>2</sup>安顺市中医院皮肤科, 贵州 安顺

<sup>3</sup>贵州中医院大学第二临床医学院, 贵州 贵阳

<sup>4</sup>贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年7月10日; 录用日期: 2023年7月24日; 发布日期: 2023年8月17日

## 摘要

目的: 采用网络药理学及分子对接方法探讨黄芪甲苷治疗骨质疏松的作用机制。方法: 通过文献研究及Swiss数据库筛选得到黄芪甲苷活性成分并分析相关作用蛋白靶点, 借助OMIM、GeneCards、DRUG BANK、DisGeNet等数据库分析骨质疏松基因靶点, 并取交集; 借助STRING数据库及Cytoscape软件构建PPI网络关系并得到黄芪甲苷干预骨质疏松关键靶点; 借助metascape数据库进行生物富集分析; 使用autodock软件进行核心化合物-蛋白分子对接。结果: 得到黄芪甲苷涉及268个蛋白靶点, 其中与骨质疏松相关核心靶点为ALB、IGF1、SRC、ESR1等; 在分子对接实验中, Affinity平均值为 $-6.49 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 最小值为 $-13.46 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 证明黄芪甲苷与核心蛋白有较大结合能; KEGG富集分析结果显示关键通路为AGE-RAGE signaling pathway、FoxO signaling pathway、PI3K-Akt signaling pathway等。结论: 黄芪甲苷干预骨质疏松依靠多通路、多靶点协调作用, 其主要通过ALB、IGF1、SRC、ESR1等蛋白作用与AGE-RAGE signaling pathway、FoxO signaling pathway、PI3K-Akt signaling pathway等通路发挥治疗骨质疏松作用。

## 关键词

网络药理学, 分子对接, 骨质疏松, 黄芪甲苷

# Mechanism of Astragaloside Intervention in Osteoporosis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

\*通讯作者。

文章引用: 范志梁, 刘贵珍, 陈雨佳, 顾春松, 李倩, 姜特, 李文, 李来来, 陈云志, 柴艺汇. 基于网络药理学及分子对接技术探讨黄芪甲苷治疗骨质疏松的作用机制研究[J]. 药物化学, 2023, 11(3): 204-211.

DOI: 10.12677/hjmce.2023.113025

Zhiliang Fan<sup>1</sup>, Guizhen Liu<sup>1</sup>, Yujia Chen<sup>2</sup>, Chunsong Gu<sup>3</sup>, Qian Li<sup>4</sup>, Te Jiang<sup>1</sup>, Wen Li<sup>4</sup>, Lailai Li<sup>4</sup>, Yunzhi Chen<sup>4</sup>, Yihui Chai<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

<sup>2</sup>Department of Dermatology, Anshun Hospital of Traditional Chinese Medicine, Anshun Guizhou

<sup>3</sup>The Second Clinical School of Medicine, Guizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine University, Guiyang Guizhou

<sup>4</sup>School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Jul. 10<sup>th</sup>, 2023; accepted: Jul. 24<sup>th</sup>, 2023; published: Aug. 17<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

**Objective:** To investigate the mechanism of astragaloside in the treatment of osteoporosis by network pharmacology and molecular docking. **Methods:** The active ingredients of astragaloside were obtained through literature review and Swiss database screening, and the related protein targets were analyzed. The osteoporosis gene targets were analyzed by OMIM, GeneCards, DRUG BANK, DisGeNet and other databases, and the intersection was selected. The PPI network relationship was constructed by using STRING database and Cytoscape software, and the key targets of astragaloside intervention in osteoporosis were obtained. Bioenrichment analysis was carried out with metascap database. Autodock software was used for core compound-protein molecular docking. **Results:** Astragaloside involved 268 protein targets, among which the core targets related to osteoporosis were ALB, IGF1, SRC, ESR1, etc. In the molecular docking experiment, the average value of Affinity was  $-6.49 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , and the minimum value was  $-13.46 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , indicating that astragaloside had greater binding energy with core protein. KEGG enrichment analysis showed that the key pathways were AGE-RAGE signaling pathway, FoxO signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, etc. **Conclusion:** The intervention of astragaloside in osteoporosis depends on multi-pathway and multi-target coordination. It mainly plays a role in the treatment of osteoporosis through the interaction of ALB, IGF1, SRC, ESR1 and other proteins with AGE-RAGE signaling pathway, FoxO signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway and other pathways.

## Keywords

Network Pharmacology, Molecular Docking, Osteoporosis, Astragaloside IV

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨强度降低为特征的疾病, 主要与骨组织丢失和骨微结构破坏有关[1]。OP 患者的骨量减少、骨微结构破坏、骨脆性增加, 极易发生骨折, 严重影响患者的健康和生活质量[2]。随着医疗水平的发展, 国内外对 OP 的研究不断深入, 在 OP 的治疗组方中, 黄芪作为基础药物存在, 为治疗 OP 之要药[3]。黄芪(*Astragali radix*)为我国常用中药之一, 黄芪甲苷(astragaloside, AST)是黄芪的主要活性成分之一, 现代研究表明其可通过调节 FoxO3a 信号通路, 升高去势大鼠骨保护素及降钙素水平, 提高骨密度, 缓解去势大鼠的骨质疏松症状[4]且体外实验证实其可促进骨髓间干细胞分化,

促进骨细胞活力。本文利用网络药理学研究方法，筛选黄芪甲苷干预骨质疏松的化学活性物质及作用靶点、机制，为后期该药物临床应用提供科学理论依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 黄芪甲苷化学成分及靶点筛选

借助 chemdraw 软件绘制化合物结构并导入 Swiss TargetPrediction 数据库及 PharmMapper 数据库得到结果去重即为该化合物核心作用靶点，并结合相关文献研究，最终获得黄芪甲苷核心基因靶点。

### 2.2. 骨质疏松相关靶点筛选

在 GeneCards、DRUG BANK、OMIM 等数据库获取骨质疏松核心基因靶点信息。在这些数据库中，DRUG BANK 数据库主要以临床实验为依据，GeneCards、OMIM 数据库更注重文献收集，因此选用多个数据库进行骨质疏松基因靶点获取有益于得到更加系统的靶点数据。

### 2.3. 黄芪甲苷成分 - 骨质疏松靶点

借助 STRING 分析平台，建立并分析 PPI 网络拓扑关系，借助 CytoScape 3.7.2 软件进一步优化结果，获得黄芪甲苷干预骨质疏松关键基因靶点信息。

### 2.4. GO 功能富集及 KEGG 通路富集

借助 Metascape 平台进行核心基因靶点的生物信息数据富集分析，其中包括 GO BP (生物过程)、GO MF (分子功能)、GO CC (细胞成分)及 KEGG 通路。将筛选结果构建富集条形分析图及通路气泡图。

### 2.5. 分子对接计算验证

通过对 2.3.项结果分析得到该网络中度值排名最高的 6 个靶点蛋白，并结合 RCSB 平台下载该蛋白 pdb 格式，借助 Openbabel 软件将黄芪甲苷由 sdf 转化为 pdb 格式。借助 pymol 及 Autodock 软件对蛋白及化合物进行预处理及分子对接，以结合能(Affinity)作为判断二者结合活性的参考。

## 3. 结果

### 3.1. 黄芪甲苷主要化学成分基因靶点预测

通过文献研究并借助 Swiss TargetPrediction 及 PharmMapper 平台进行预测并去除所有重复基因后共计得到 268 个预测靶点。

### 3.2. 黄芪甲苷与骨质疏松相关基因靶点获取

利用 Genecards 平台共收集到骨质疏松相关靶点 5260 个，选取 Score  $\geq$  0.98 的结果结合 TTD、DRUGBANK、OMIM 数据库进行补充，共获得 1449 个核心疾病靶点。将黄芪甲苷核心靶点与骨质疏松核心靶点取交集，VENN 分析得到 78 个核心作用靶点，见图 1。

### 3.3. PPI 网络构建

将“3.2.”项所得 80 个交集靶点导入 String11.5 平台做 PPI 网络分析，见图 2。该网络共 77 个节点数，566 条边，根据度值推测 ALB、IGF1、SRC、ESR1 等为核心靶点。

### 3.4. GO 功能富集和 KEGG 通路富集

利用 Metascape 平台对交集基因进行生物信息富集分析，GO 分析结果包括 GO BP 982 条，GO CC 41

条, GO MF 95 条; KEGG 富集分析得到 139 条信号通路; 取 GO 及 KEGG 分析结果排名前 20 建立生物信息富集分析图, 见图 3。

### 3.5. 黄芪甲苷分子对接筛选

将黄芪甲苷与 ALB、IGF1、SRC、ESR1、MMP9、MAPK1 6 个核心蛋白进行分子对接, 从而得到 6 组化合物 - 蛋白对接结果。其中 Affinity 平均值为 $-6.49 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 最小值为 $-13.46 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  证明黄芪甲苷与核心蛋白有较大结合能。本文对接结果为进一步进行黄芪甲苷相关实验提供理论支撑, 对接结果见图 4。

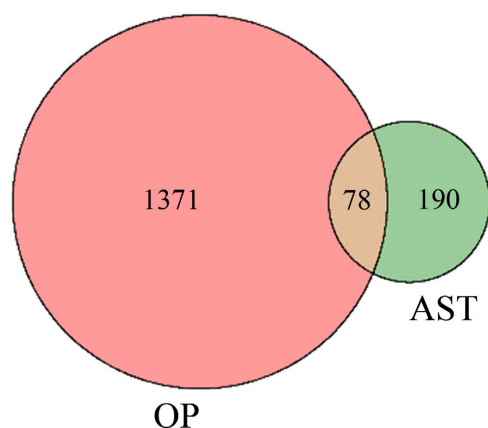


Figure 1. Drug-disease target VENN diagram

图 1. 药物 - 疾病靶点 VENN 图

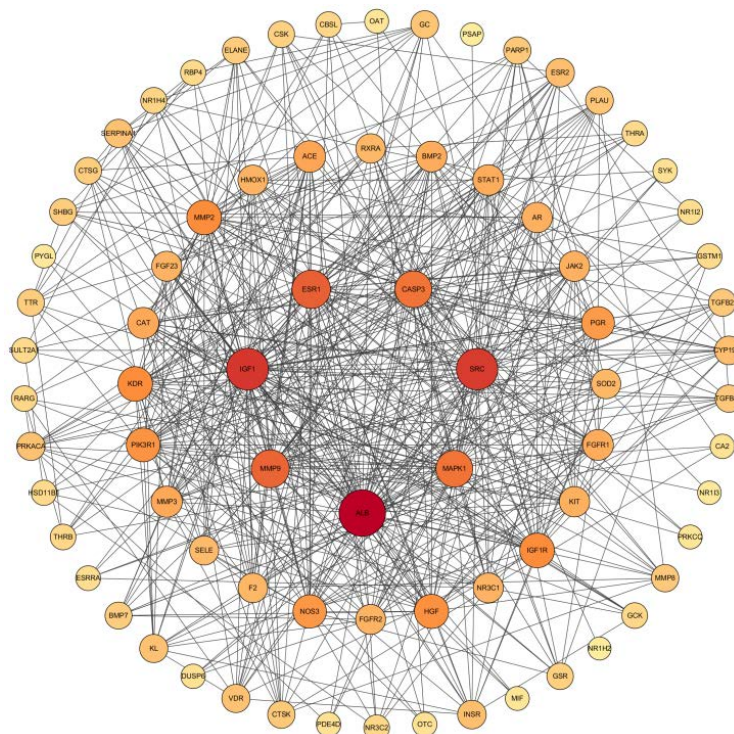
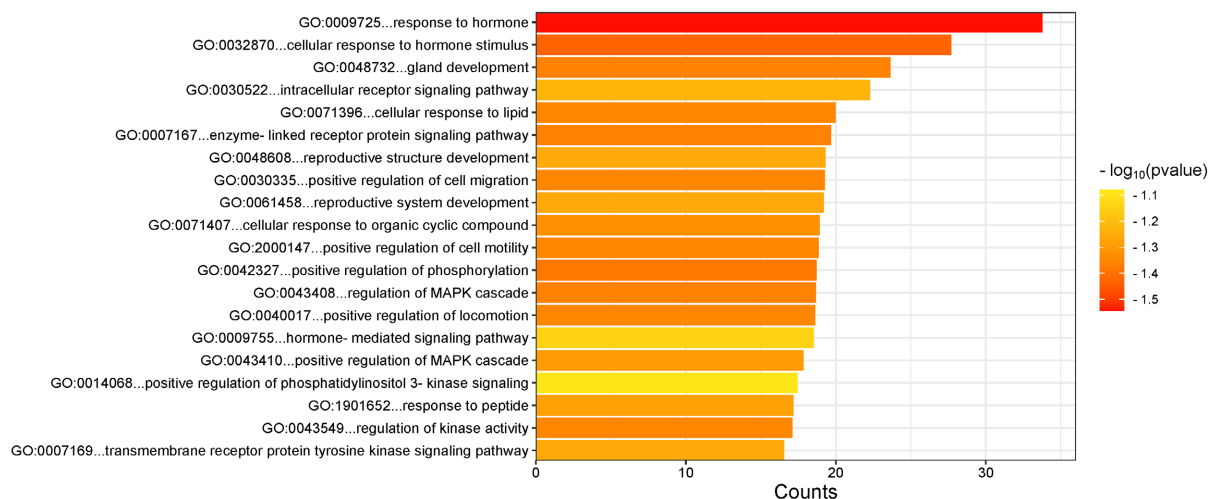
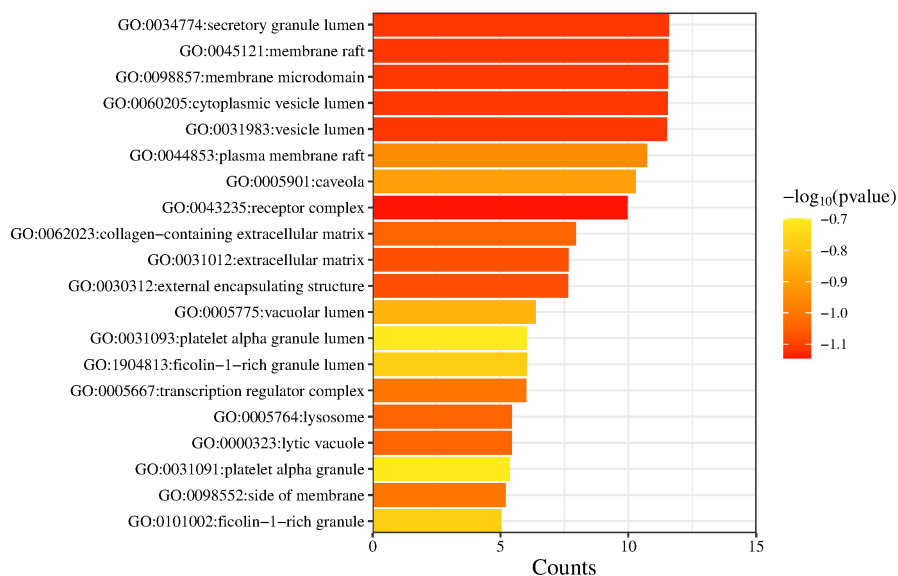


Figure 2. AST-OP target PPI network

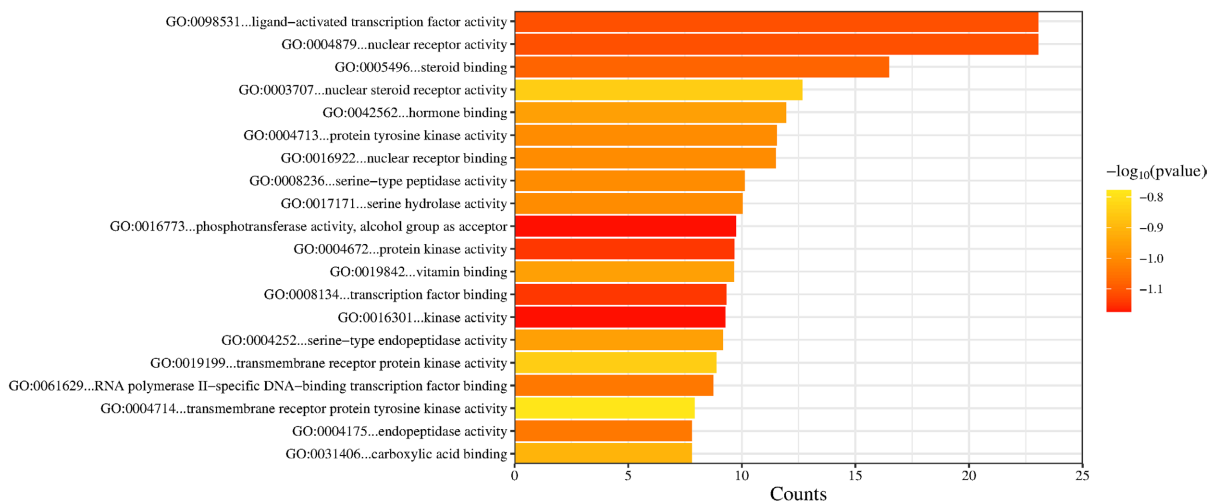
图 2. 黄芪甲苷 - 骨质疏松靶点 PPI 网络



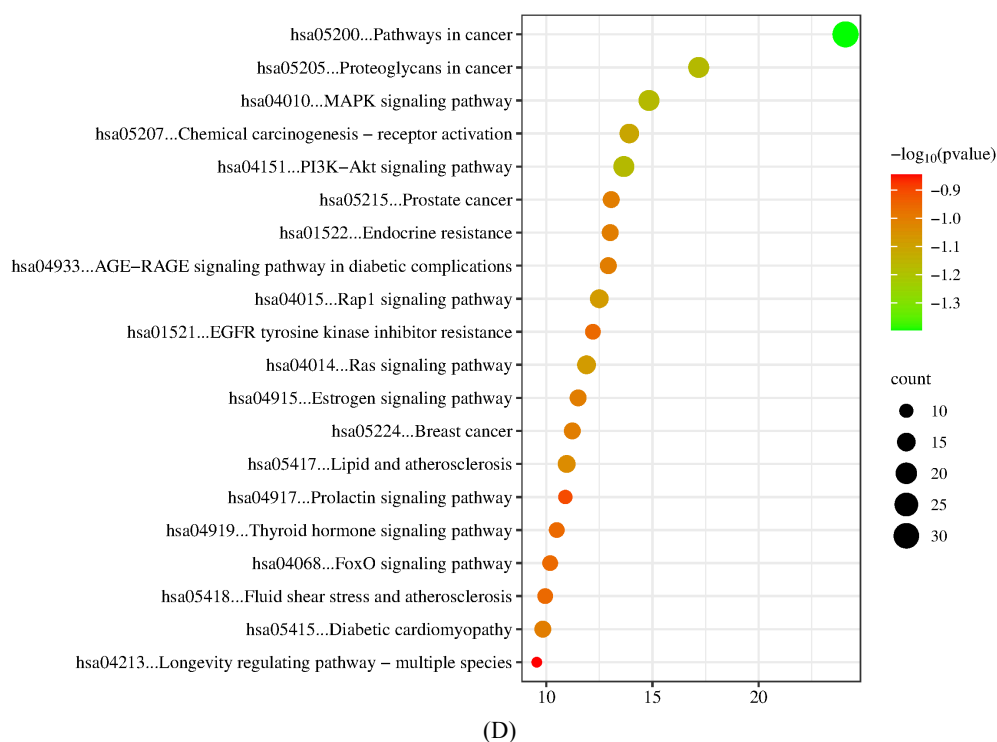
(A)



(B)

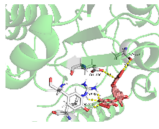
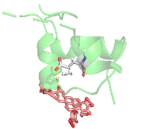
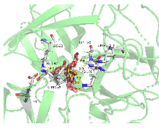
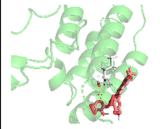
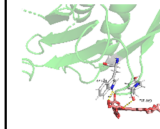
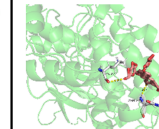


(C)



**Figure 3.** Enrichment analysis of potential targets of major components of *AST* (Note: (A) GO-BP analysis; (B) GO-CC analysis; (C) GO-MF analysis; (D) KEGG analysis)

**图 3.** 黄芪甲苷主要成分潜在靶点的富集分析(注: (A) GO-BP 分析; (B) GO-CC 分析; (C) GO-MF 分析; (D) KEGG 分析)

名称	ALB-AST	IGF1-AST	SRC-AST	ESR1-AST	MMP9-AST	MAPK1-AST
分子对接						
结合能 ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	-5.64	-1.34	-13.46	-6.16	-4.29	-8.03

**Figure 4.** Molecular docking pattern of some core compounds of *AST*

**图 4.** 黄芪甲苷部分核心化合物分子对接模式

## 4. 讨论

骨质疏松症是一种表现为骨强度降低的疾病, 其与骨组织缺失、骨微结构损坏有主要关联性[5]。OP 患者一般表现为骨量降低、骨微结构破坏、骨脆性升高, 使得 OP 患者极易发生骨折, 这不仅危害影响患者身体健康, 还严重影响患者生活质量水平[6]。随着医疗水平不断提高, 国内外对 OP 的研究不断深入, 在 OP 的防治组方中黄芪作为基础药物存在, 在治疗骨质疏松中药频次排名中为第五[7], 已然成为了治疗骨质疏松的研究热点。

中医学中并无骨质疏松症概念, 但在诸多文献中均可发现该病的身影, 最早记载于《素问·痿论》, 另在《灵枢·刺节真邪》与《脾胃论·脾胃盛衰论》中也有记载, 多将该病归属于“骨痿”“骨痹”等

范畴[8][9]。大部分学者与临床医家认为骨质疏松症发生的基本病机是肾精亏虚[10]。肾为先天之本，具有贮存、封藏精气的作用，精气能生化髓，髓强则骨强，故骨为肾所主，肾精的盛衰直接调节骨的生长发育，骨髓不生化，会造成骨含量下降，继而出现骨质疏松症[11]。因此骨质疏松症以补肝肾强筋骨为主要治则，研究表明，黄芪具有能改善骨形成从而发挥防治骨质疏松症的功效[12]。

黄芪(*Astragali radix*)原称黄耆，始载于《神农本草经》[13]。黄芪性微温味甘，归脾、肺经，具有补气升阳，固表止汗，利水消肿，生津养血等功效，还具有补肾气的作用，现已收录于《中国药典》之中[14]。黄芪甲苷是黄芪主要活性成分之一，具有调节免疫系统、抗衰老等功效，其可通过抑制氧化应激反应而发挥防治骨质疏松的作用[15]。

本实验采取网络药理学和分子对接的研究方法，构建 PPI 网络拓扑图，通过软件分析该网络相关网络要素，探讨了黄芪甲苷治疗骨质疏松主要作用靶点。

#### 4.1. 靶点分析

网络拓扑分析结果显示，黄芪甲苷对应 268 个蛋白靶点，其中与骨质疏松相关的共同靶点 78 个。通过构建 PPI 网络发现，ALB、IGF1、SRC、ESR1、MMP9、MAPK1 等的度值较大，可能是黄芪甲苷最关键的治疗骨质疏松靶点。ALB 是机体营养状态的重要评估指标，当机体营养不足时易产生骨质疏松症[16]。IGF1 是骨细胞生长发展、维持骨骼正常的关键因子，其可参与骨相关细胞生成从而调节骨骼生长[17]。SRC 是可受多种因子激活并参与细胞生长分化中的非受体蛋白酪氨酸激酶，其可参与破骨细胞活化并抑制成骨细胞生成从而导致骨质疏松的发生[18]。ESR1 是雌激素受体对破骨细胞有较强的抑制作用，而破骨细胞数量显著增加会引起骨吸收增加加速骨质疏松的发生。有研究表明黄芪注射液对雌激素受体具有激活作用，其治疗 OP 的机制可能与激活雌激素受体有关[19]。

#### 4.2. 生物富集分析

KEGG 信号通路分析发现黄芪甲苷主要是通过 Pathways in cancer、Proteoglycans in cancer、MAPK signaling pathway、AGE-RAGE signaling pathway、Chemical carcinogenesis-receptor activation、PI3K-Akt signaling pathway、Estrogen signaling pathway、FoxO signaling pathway 等通路抵抗骨质疏松。

AGE-RAGE signaling pathway 有调控胶原交联的作用，其可影响与还原糖反应降低骨骼硬度，此外 AGEs 有抑制间充质干细胞增殖作用并促进细胞凋亡，表明 AGEs 影响骨组织生成，在骨质疏松中有重要作用[20]。PI3K-Akt signaling pathway 有调控成骨细胞(OB)和破骨细胞(OC)凋亡和增殖的重要作用，而 OB 与 OC 的动态平衡破坏是骨质疏松的重要发病机制[21]。有研究表明，PI3K-Akt signaling pathway 的激活对线粒体吞噬有保护作用，后者可显著抑制 OB 凋亡的同时抑制 OC 分化，从而发挥治疗骨质疏松的作用。FoxO signaling pathway 在多数组织中均有表达，其可调控细胞衰老，氧化应激等进程，研究表明，激活的 FoxO1 可调控抗氧化酶活性，减少氧化应激引起的骨骼损伤，此外 FOXO1 还可调节线粒体活性，进而达到平衡 OB/OC 比例，减少骨流失的同时促进骨形成[22]。

### 5. 总结

本实验采用网络药理学和分子对接方法，借助数据库分析预测黄芪甲苷干预骨质疏松蛋白靶点及相互作用关系，初步阐明黄芪甲苷干预骨质疏松的多靶点、多通路作用机制。本实验结果提示黄芪甲苷可能通过 ALB、IGF1、SRC、ESR1 等蛋白靶点，参与 AGE-RAGE、FoxO、PI3K-Akt 等信号通路发挥干预骨质疏松的作用，为进一步探明黄芪治疗骨质疏松的物质基础及作用机制提供理论价值。但本实验仍有一定的局限性，团队计划后续开展体内和体外实验，进一步验证实验预测结果，为中医药防治骨质疏松提供新思路。

## 基金项目

2023 年度贵州省卫生健康委科学技术基金项目, 项目编号: gzwkj2023-524; 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题专项, 项目编号: QZYY-2021-022。

## 参考文献

- [1] 中华中医药学会. 骨质疏松性骨折中医诊疗指南[J]. 中医正骨, 2023, 35(1): 1-9.
- [2] 王峰. 骨质疏松性椎体压缩骨折的临床相关研究和意义[D]: [博士学位论文]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [3] 段小云, 仲瑞雪, 吴传红, 季欧. 基于数据挖掘和网络药理学探讨中医药治疗骨质疏松症的用药规律及机制[J]. 中国医院用药评价与分析, 2023, 23(2): 162-168.
- [4] 成鹏, 白银亮, 胡彩莉, 连佛彦, 周海宇. 黄芪甲苷通过调控 FoxO3a/Wnt2/ $\beta$ -catenin 通路抑制去卵巢大鼠骨质疏松的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 161-166.
- [5] 姜涛, 邵敏, 黄永青, 等. 骨质疏松症的诊疗进展[J]. 当代医学, 2018, 24(30): 182-186.
- [6] 张清文, 卫俊杰. 糖尿病性骨质疏松症发病机制的研究进展[J]. 现代临床医学, 2022, 48(5): 378-380.
- [7] 唐中尧, 李华, 徐祖健. 中药治疗骨质疏松症的用药规律研究[J]. 中医正骨, 2019, 31(1): 20-22+25.
- [8] 宋家彬, 赵丽, 刘文红. 基于辨证理念的骨质疏松症中医治疗进展[J]. 内蒙古中医药, 2020, 39(10): 166-168.
- [9] 王璇, 徐天成. 以太阳经为例浅谈《伤寒论》六经与《黄帝内经》六经的异同[J]. 国际中医中药杂志, 2016, 38(3): 197-199.
- [10] 邓荣, 唐本夫, 钟欣欣. 基于网络药理学研究黄芪抗骨质疏松作用机制[J]. 中医药临床杂志, 2020, 32(5): 890-896.
- [11] 王新祥, 张允岭, 黄启福. 对骨质疏松症中医主要病机和现代病因学的认识与探讨[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(12): 1119-1123.
- [12] 范志梁, 田兴中, 顾春松, 牛建均, 刘春艳, 王焕珍, 国业东, 李文, 陈云志, 柴艺汇. 黄芪调节维生素 D 介导 OPG/RANKL/RANK 信号通路对维甲酸诱导骨质疏松 C57BL/6J 小鼠股骨的影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(4): 831-834.
- [13] 魏·吴普, 述. 神农本草经[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2016: 31.
- [14] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 315-316.
- [15] 黄海涛, 梁单, 金昱. 黄芪甲苷拮抗过氧化氢引起的小鼠成骨细胞凋亡作用[J]. 延边大学医学学报, 2012, 35(2): 86-91.
- [16] 丁伟逸, 张霆, 林越, 严寅杰. 基于网络药理学探讨益气化痰补肾方治疗骨延迟愈合的作用机制[J]. 实用中西医结合临床, 2022, 22(8): 7-13+24.
- [17] Tanaka, S., Amling, M., Neff, L., Peyman, A., Uhlmann, E., Levy, J.B. and Baron, R. (1996) c-Cbl Is Downstream of c-Src in a Signalling Pathway Necessary for Bone Resorption. *Nature*, **383**, 528-531. <https://doi.org/10.1038/383528a0>
- [18] Peng, X.D., Xu, P.Z., Chen, M.L., et al. (2003) Dwarfism, Impaired Skin Development, Skeletal Muscle Atrophy, Delayed Bone Development, and Impeded Adipogenesis in Mice Lacking Akt1 and Akt2. *Genes & Development*, **17**, 1352-1365. <https://doi.org/10.1101/gad.1089403>
- [19] 王海彬, 王军舰, 黄辉, 刘琳, 刘少军, 徐传毅, 何伟, 樊粤光, 黄志伟. 黄芪注射液对雌激素受体的激活作用研究[J]. 时珍国医国药, 2006(11): 2113-2115.
- [20] Asadipooya, K. and Uy, E.M. (2019) Advanced Glycation End Products (AGEs), Receptor for AGEs, Diabetes, and Bone: Review of the Literature. *Journal of the Endocrine Society*, **3**, 1799-1818. <https://doi.org/10.1210/js.2019-00160>
- [21] Xi, J.C., Zang, H.Y., Guo, L.X., Xue, H.B., Liu, X.D., Bai, Y.B. and Ma, Y.Z. (2015) The PI3K/AKT Cell Signaling Pathway Is Involved in Regulation of Osteoporosis. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, **35**, 640-645. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1041647>
- [22] 杨亚军, 崔燎. FoxO/Wnt 通路在氧化应激介导的骨质疏松中的调控机制[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(1): 27-30.