

祛痰逐瘀治疗股骨头坏死的网络药理学分析

凡一诺¹, 陈明海¹, 李伟峰¹, 陈立新¹, 魏秋实², 何伟², 陈镇秋² (¹广州中医药大学第一临床医学院, 广东省广州市 510405; ²广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2875

ORCID: 0000-0002-0976-9735(凡一诺)

文章快速阅读:

文章特点—

- (1)祛痰逐瘀方对股骨头坏死的治疗作用体现了中药多成分-多靶点-多通路的特点;
- (2)提示其作用机制可能是通过多成分、多靶点、多通路实现;
- (3)构建了祛痰逐瘀方活性成分-股骨头坏死-靶点网络;
- (4)收集有效成分、疾病靶点; 构建 PPI 网络; 进行基因 GO 和 KEGG 分析。

文题释义:

祛痰逐瘀法: 是中医根据辨证论治理论对有痰瘀互结证的疾病提出的治疗方法。股骨头坏死属于中医“骨蚀病”范畴, 中医认为早期的骨蚀病多表现为痰瘀互结证, 因此提倡早期治疗股骨头坏死采用痰瘀同治法, 常用桃红四物汤和二陈汤加减。

网络药理学: 网络药理学是围绕生物信息学、系统生物学等学科的技术和知识, 并在网络数据库检索基础上, 进行生物信息网络的构建和分析, 可构建药物的“成分-靶标-通路-疾病”网络, 深入探究药物与疾病的关系, 阐明药物的作用机制。

摘要

背景: 中医认为早期的骨蚀病多为痰瘀互结型, 故早期治疗股骨头坏死多采用痰瘀同治法。网络药理学可构建药物的“成分-靶标-通路-疾病”网络, 深入探究药物与疾病的关系, 从而多层次地阐明药物的作用机制。

目的: 构建祛痰逐瘀方活性成分-股骨头坏死-靶点网络, 探讨祛痰逐瘀方治疗股骨头坏死的关键靶点和作用机制。

方法: 桃红四物汤合二陈汤是治疗早期股骨头坏死的有效方剂, 截取其中代表药物: 半夏、陈皮、茯苓、桃仁和红花, 命名为祛痰逐瘀方。在中药计算系统药理学分析平台(TCMSP)检索并筛选祛痰逐瘀方的主要有效成分和作用靶点; 通过人类基因数据库和人类孟德尔遗传数据库(OMIM)检索股骨头坏死的相关疾病靶点; 制作韦恩图获取祛痰逐瘀方与股骨头坏死共同靶点, 利用 Cytoscape 软件构建中药-成分-疾病-靶点调控网络, 然后通过 STRING 数据平台建立 PPI 网络, 最后利用 Bioconductor 平台和 R 语言进行基因本体(GO)富集分析和基因相互作用(KEGG)通路分析。

结果与结论: ①祛痰逐瘀方中发挥治疗股骨头坏死的成分主要是 sitosterol、naringenin 等 78 个活性成分, 发挥治疗作用的靶点可能包括 NCOA2、PTGS1 等 61 个关键靶点; ②影响治疗股骨头坏死生物学过程主要为近端启动子序列特异性 DNA 结合、DNA 结合转录活性调控等, 发挥治疗的关键作用通路包括白细胞介素 17 信号通路、细胞凋亡等; ③祛痰逐瘀方对股骨头坏死的治疗作用体现了中药多成分-多靶点-多通路的特点, 提示其作用机制可能是通过多成分、多靶点、多通路实现。

关键词:

祛痰逐瘀方; 股骨头坏死; 作用机制; 网络药理学

中图分类号: R446; R496; R318

基金资助:

国家自然科学基金面上项目(81573996), 项目负责人: 陈镇秋; 国家自然科学基金面上项目(81873327),

项目负责人: 何伟; 广东省自然科学基金(2017A030313698), 项目负责人: 魏秋实

Mechanism of Qutan Zhuyu Decoction for osteonecrosis of the femoral head based on network pharmacology

Fan YINUO¹, Chen Minghai¹, Li Weifeng¹, Chen Lixin¹, Wei Qiushi², He Wei², Chen Zhenqiu² (¹First Clinical School of Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; ²First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Traditional Chinese medicine believes that the early bone erosions mostly belong to phlegm and blood stasis, so early treatment of osteonecrosis of the femoral head (ONFH) is often similar to the treatment of phlegm and blood stasis. Based on network pharmacology we can build a “component-target-pathway-disease” network of drugs to explore the relationship between drugs and diseases, thereby clarifying

凡一诺, 男, 1997 年生, 河南省周口市人, 汉族, 广州中医药大学在读硕士生, 主要从事骨关节研究。

通讯作者: 陈镇秋, 博士, 教授, 硕士生导师, 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405

文献标识码: B

投稿日期: 2020-01-04

送审日期: 2020-01-05

采用日期: 2020-02-26

在线日期: 2020-05-21



Fan YINUO, Master candidate, First Clinical School of Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Corresponding author: Chen Zhenqiu, MD, Professor, Master's supervisor, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

the mechanism of drugs

OBJECTIVE: To construct the component-target-pathway-disease network of *Qutan Zhuyu* Decoction and to explore the key targets and mechanism of *Qutan Zhuyu* Decoction in the treatment of ONFH.

METHODS: *Taohong Siwu* Decoction and *Erchen* Decoction are effective prescriptions for the treatment of early ONFH. The representative drugs include Pinellia tangerine peel, medlar, peach kernel and safflower, named as *Qutan Zhuyu* Decoction. The main active components and targets of *Qutan Zhuyu* Decoction was searched and screened in the Chinese Medicine Computing System Pharmacology Analysis Platform (TCMSP), and a search for ONFH targets in the Human Gene Database (GeneCards) and the Human Mendelian Genetic Database (OMIM) was performed. The common targets of *Qutan Zhuyu* Decoction and ONFH were got by Venn diagrams. Cytoscape3.6.1 was used to construct a Chinese medicine-ingredient-disease-target regulation network, then establish a protein-protein interaction network through the STRING data platform, and finally use the Bioconductor platform and R language for gene ontology enrichment analysis and gene interaction (KEGG) pathway analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: The main components of *Qutan Zhuyu* Decoction for the treatment of ONFH were 78 active components such as sitosterol and naringenin. The targets for therapeutic effects might include 61 key targets such as NCOA2 and PTGS1. The biological processes affecting the treatment of ONFH mainly included proximal promoters, sequence-specific DNA binding, and regulation of DNA-binding transcriptional activity. Key pathways for therapeutic use included interleukin-17 signaling pathway and apoptosis. Overall, the therapeutic effect of *Qutan Zhuyu* Decoction on ONFH reflects the characteristics of multi-component-multi-target-multi-channel of traditional Chinese medicine, suggesting that its mechanism may be achieved by multi-components, multi-targets and multi-channels.

Key words: Qutan Zhuyu Decoction; osteonecrosis of the femoral heads; mechanism; network pharmacology

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81573996 (to CZQ) and 81873327 (to HW); the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2017A030313698 (to WQS)

0 引言 Introduction

股骨头坏死是一种由于股骨近端血供中断而引起的骨坏死，是一种潜在的破坏性疾病^[1]，实质上是由于微血管循环受损导致的骨细胞死亡^[2-3]。股骨头坏死发病率逐渐上升，每年，在中国报道的新病例有100 000-200 000^[4]。股骨头坏死的临床表现主要是疼痛以及髋关节活动范围受限，若未经治疗，有70%-80%的患者发展为继发性髋关节炎^[5]，因此针对股骨头坏死病程发展的控制尤其重要。股骨头坏死的治疗取决于其发展至不同的阶段^[6]。值得注意的是，许多非手术治疗，例如西药治疗、生物物理治疗、脉冲电磁治疗和高压氧治疗在早期可以改善疼痛和功能结局^[7]。然而，大多数现代医学保守疗法在防止其发作和延缓其发展方面缺乏广泛应用的证据^[6-7]。股骨头坏死早期的钻孔减压等手术治疗可能有效缓解症状，但这种方法在预防股骨头塌陷方面没有比保守治疗更大的价值^[8-10]。目前，中药在亚洲得到广泛应用，且已证实可为股骨头坏死患者提供止痛和改善的生活质量的作用^[11-12]。

股骨头坏死属于中医“骨蚀病”范畴。中医认为早期的骨蚀病多为痰瘀互结型^[13]，故早期治疗股骨头坏死多采用痰瘀同治法。二陈汤和桃红四物汤分别是治疗骨蚀病痰湿蕴结和气滞血瘀的主方^[14]。二陈汤自创立以来，其化痰作用受到后世医家的认可^[15]。桃红四物汤来源于清·吴谦等所著的《医宗金鉴》，为中医传统活血化瘀经典方剂之一^[16]，有研究发现桃红四物汤对股骨头的微结构具有改善作用^[17]。二陈汤与桃红四物汤合方已被证实对痰瘀互结型的骨坏死有良好的修复作用^[18]，然而现有研究多是名家经验、动物实验、临床观察等，并未阐述合方的具体药理作用机制，故文章选取合方中半夏、陈皮、茯苓、桃仁、红花5味代表药物做深入研究。

网络药理学是围绕生物信息学、系统生物学等学科的技术和知识，并在网络数据库检索基础上，进行生物信息网络的构建和分析。网络药理学可构建药物的“成分-靶标-

通路-疾病”网络，深入探究药物与疾病的关系，从而多层次地阐明药物的作用机制^[19]。网络药理学的构建思维比传统药理学更适用于解释组方中药间的复杂关系^[20]。此次研究于二陈汤合桃红四物汤中选取5味代表药物，组成祛痰逐瘀方，并将其和股骨头坏死作为研究对象，构建祛痰逐瘀方活性成分-股骨头坏死-靶点网络，探讨其作用机制，为进一步的研究提供思路和理论依据。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 设计 构建中药-成分-疾病-靶点调控网络，进行GO富集分析和KEGG通路分析。

1.2 时间及地点 实验于2019年11月至12月在广州中医药大学完成。

1.3 祛痰逐瘀方活性成分与作用靶点的筛选 研究采用中药系统药理学分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>)检索陈皮、半夏、桃仁、红花、茯苓五味中药的全部化学成分，TCMSP数据库以化合物口服生物利用度(OB)>30%和类药性(DL)>0.18作为化合物的筛选条件，筛选出所有化合物，得到的化合物具有较高的活性成分。同时通过TCMSP数据库平台获取中药活性化合物的作用靶点。

1.4 方法

1.4.1 股骨头坏死疾病靶点的确定 通过在线《人类孟德尔遗传》数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)以及GeneCards(<https://www.genecards.org/>)检索与股骨头坏死相关靶点。

1.4.2 活性成分靶点和疾病靶点韦恩图的绘制 利用R语言绘制将中药活性成分相关的靶点和疾病靶点进行匹配映射，并绘制韦恩图(venn)获得祛痰逐瘀方-股骨头坏死的共同作用靶点。

1.4.3 活性成分靶点-疾病靶点网络图的构建 利用韦恩图取交集，获得祛痰逐瘀方-股骨头坏死的共同靶点，并进行中药活性成分靶点-疾病靶点的网络药理学可视化分析，

利用Cytoscape 3.6.1软件构建“疾病-作用靶点及中药活性成分-作用靶点”网络图, 疾病、中药活性成分和作用靶点以“节点”表示, 几个“节点”之间的相互联系用“边”表示。通过可视化分析可以筛选出联系最强的靶点基因和活性分子, 这些作用于数量较多的基因靶点的活性分子将会是研究的重点。

1.4.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将祛痰逐瘀方-股骨头坏死共同作用靶点导入STRING (<https://string-db.org/>)数据库中, 以置信度分数score>0.9为条件进行筛选, 并隐藏网络中无联系的节点, 利用该平台绘制PPI网络图。

1.4.5 基因本体(GO)富集分析和基因相互作用(KEGG)通路分析 利用Bioconductor平台 (<https://www.bioconductor.org/>)和R语言对获得的基因进行GO富集分析和KEGG通路分析。通过相关脚本利用R语言导出GO富集分析表格和KEGG富集分析表格, 并分别绘制GO富集分析和KEGG富集分析的barplot柱状图。

2 结果 Results

2.1 祛痰逐瘀方活性成分的筛选 通过TCMSP平台数据库检索的陈皮化学成分63个, 半夏化学成分116个, 桃仁化学成分66个, 红花化学成分189个, 茯苓化学成分34个, 通过OB>30%和DL>0.18进一步筛选得到陈皮的潜在活性成分5个, 半夏潜在活性成分13个, 桃仁潜在活性成分23个, 红花潜在活性成分22个, 茯苓潜在活性成分15个。部分活性成分见表1。

表1 中药活性成分 ID/中英文名称/OB/DL/来源
Table 1 ID/Chinese and English name/OB/DL/source of active ingredients of Chinese herbs

MOL ID	化合物名称(英文名称)	OB	DL	来源
MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	36.91	0.75	陈皮
MOL004328	柚皮素(naringenin)	59.29	0.21	陈皮
MOL005815	米橘素(Citromitin)	86.9	0.51	陈皮
MOL005828	川陈皮素(nobiletin)	61.67	0.52	陈皮
MOL001755	散沫花甾醇(24-Ethylcholest-4-en-3-one)	36.08	0.76	半夏
MOL002670	卡维丁碱(Cavidine)	35.64	0.81	半夏
MOL002714	黄芩素(baicalein)	33.52	0.21	半夏
MOL002776	黄芩苷(Baicalin)	40.12	0.75	半夏
MOL001323	柠檬二烯醇(Sitosterol alpha1)	43.28	0.78	桃仁
MOL001348	赤霉素(gibberellin 17)	94.64	0.49	桃仁
MOL001368	3-O-对香豆酰基奎宁酸 (3-O-p-coumaroylquinic acid)	37.63	0.29	桃仁
MOL000296	常春藤皂苷元(hederagenin)	36.91	0.75	桃仁
MOL002680	毛茛黄素(Flavoxanthin)	60.41	0.56	红花
MOL002695	木酚素(lignan)	43.32	0.65	红花
MOL002698	羽扇豆醇棕榈酸酯(lupeol-palmitate)	33.98	0.32	红花
MOL002706	八氢番茄红素(Phytoene)	39.56	0.5	红花
MOL000283	麦角甾醇过氧化物(Ergosterol peroxide)	40.36	0.81	茯苓
MOL000289	茯苓酸(pachymic acid)	33.63	0.81	茯苓
MOL000300	去氢齿孔酸(dehydroeburicoic acid)	44.17	0.83	茯苓
MOL000279	酒酵母甾醇(Cerevisterol)	37.96	0.77	茯苓

2.2 祛痰逐瘀方治疗股骨头坏死潜在靶点的预测 通过TCMSP平台数据库检索得到OB>30%和DL>0.18的中药活性成分, 并利用TCMSP平台获得这些活性成分对应的靶点基因, 去除无效和重复的靶点后, 共得到祛痰逐瘀方中活性成分靶点基因共124个。以Femur Head Necrosis为检索词, 利用Genecard数据库平台, 以筛选出股骨头坏死疾病的潜在作用靶点共1357个; 利用OMIM数据库平台得到股骨头坏死疾病的潜在作用靶点共101个。利用R语言绘制韦恩图(图1), 得到疾病和中药活性成分的共同基因靶点61个, 如NCOA2, PTGS1, ESR1, RELA, BCL2, CASP3, LDLR, PPARG, APOB, SREBF1等。提示祛痰逐瘀方主要作用于这些潜在靶点发挥治疗股骨头坏死的作用。

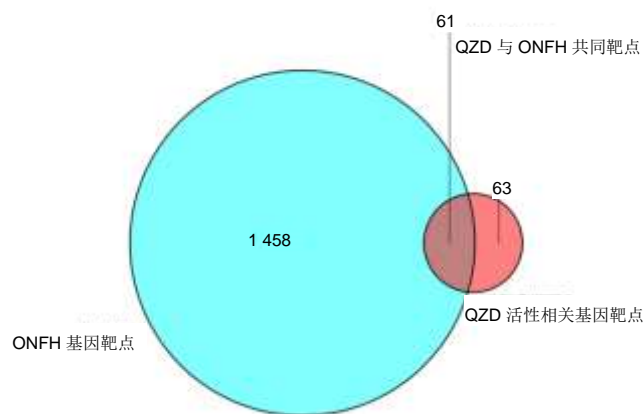
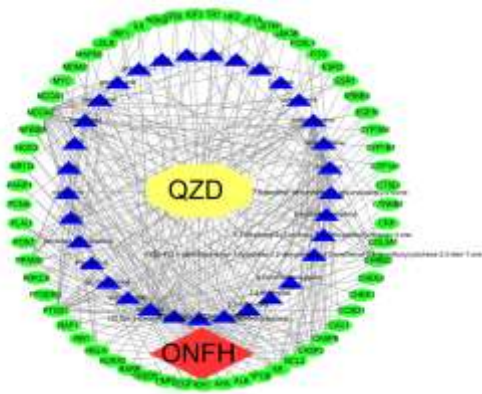


图1 祛痰逐瘀方(QZD)和股骨头坏死(ONFH)的匹配基因
Figure 1 The matching genes of Qutan Zhuyu Decoction and osteonecrosis of the femoral head

2.3 活性成分靶点-疾病靶点网络图的构建 祛痰逐瘀方治疗股骨头坏死相关的中药活性成分共34个, 前10个为sitosterol, naringenin, 5, 7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one, Citromitin, nobiletin, Cavidine, baicalein, beta-sitosterol, Stigmasterol, gondoic acid。将中药活性成分和二者的共同基因靶点导入Cytoscape软件进行可视化分析(图2)。其中八边形代表祛痰逐瘀方, 菱形代表疾病, 三角形代表中药活性成分, 椭圆代表基因靶点。结果显示祛痰逐瘀方-股骨头坏死中连接度为靠前的活性分子为quercetin, baicalein, kaempferol, luteolin, nobiletin, beta-sitosterol, beta-carotene, naringenin, coniferin(最少者对应6个基因靶点, 最高者对应42个基因靶点)。祛痰逐瘀方作用于股骨头坏死的相关靶点基因共61个, 其中连接度较多的关键靶点基因为NCOA2, CHRM3, PTGS1, CASP3, BCL2, AR, PPARG, CASP8。以上成分以及基因靶点是祛痰逐瘀方治疗股骨头坏死的重要活性成分和关键基因靶点, 在祛痰逐瘀方治疗股骨头坏死中具有重要意义。

2.4 关键靶点基因PPI网络的构建 将祛痰逐瘀方-股骨头坏死的61个共同基因靶点导入String数据库平台, 选择物种为人类, 获取蛋白质相互作用关系, 利用String数据库

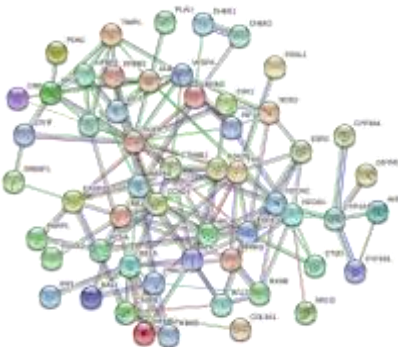


图注：图中八边形代表祛痰逐瘀方(QZD)，菱形代表疾病，三角形代表中药活性成分，椭圆代表基因靶点。ONFH：股骨头坏死

图 2 活性成分靶点-疾病靶点网络图

Figure 2 Active ingredient target-disease target network

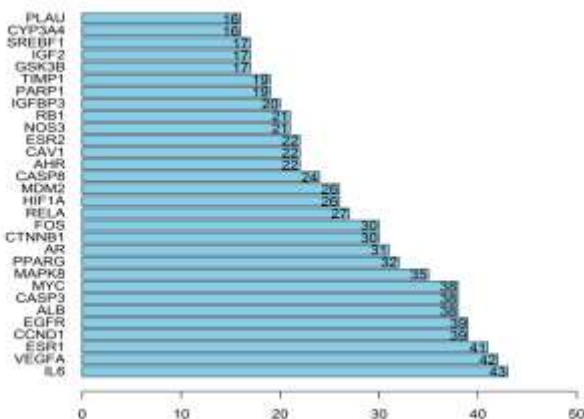
平台平台构建蛋白关系网络(图3)。排除1个游离的基因靶点，并选择置信度分数score>0.9后，构建出的网络图共有55个节点，146个边(节点为基因靶点，边为二者的相互关系)。其中的节点可代表相互作用关系、预测关系、同源性、共表达、构造关系等。根据Count值筛选出排名前30的关键靶点蛋白(图4)。



图注：构建出的网络图共有 55 个节点，146 个边(节点为基因靶点，边为二者的相互关系)

图 3 蛋白质相互作用网络图

Figure 3 Protein-protein interaction network

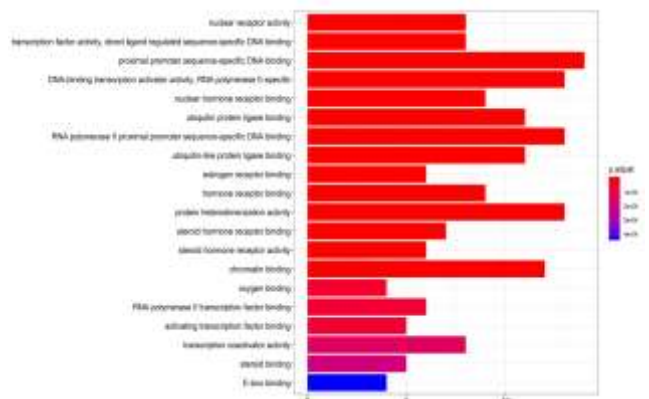


图注：根据 Count 值筛选出排名前 30 的关键靶点蛋白

图 4 祛痰逐瘀方治疗股骨头坏死的关键基因靶点

Figure 4 Key gene targets of Qutan Zhuyu Decoction for the treatment of osteonecrosis of the femoral head

2.5 GO富集分析和KEGG通路分析 GO富集分析得到84个GO条目，列举生物学功能排名较靠前的20个条目(图5)，主要为近端启动子序列特异性DNA结合(共14个靶点：NCOA2, ESR1, RELA, PPARG, SREBF1, AR, ESR2, HIF1A, FOSL1, AHRMYC, RB1, RUNX2, IRF1)、DNA结合转录活性调控(共13个靶点：ESR1, RELA, SREBF1, AR, RXRB, FOS, HIF1A, FOSL, MYC, NR1I3, PARP1, RUNX2, IRF1)、RNA聚合酶II近端启动子序列特异性DNA结合(共13个靶点：NCOA2, ESR1, RELA, PPARG, SREBF1, AR, ESR2, HIF1A, FOSL1, AHR, MYC, IRF1, RUNX2)、蛋白质异二聚化(共13个靶点：RELA, BCL2, PPARG, VEGFA, FOS, HIF1A, AHR, CAV1, CTNNB1, IKBKB, EGFR, RAF1, ERBB3)、染色质结合(共12个靶点：NCOA2, ESR1, RELA, PPARG, SREBF1, NCOA1, AR, FOS, CTNNB1, EGFR, PCNA, RUNX2)、泛素蛋白连接酶结合(共11个靶点RELA, BCL2, GSK3, HIF1A, CASP8, NFKBIA, MDM2, CHEK2, ERBB3)等多个生物学功能。表明祛痰逐瘀方可以通过参与多种生物学过程来发挥治疗股骨头坏死的作用。



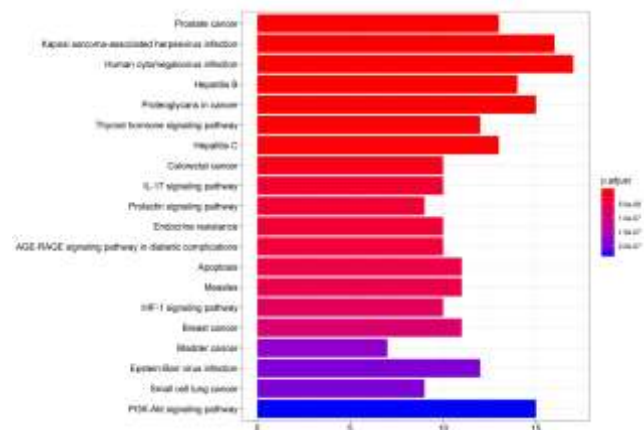
图注：GO 富集分析得到 84 个 GO 条目，列举生物学功能排名较靠前的 20 个条目

图 5 关键基因靶点 GO 生物过程富集分析柱状图

Figure 5 Histogram of GO enrichment analysis of key gene targets in terms of biological process

KEGG通路富集分析得到120条信号通路(P < 0.05)，列举排名较靠前的20个条目(图6)，主要为甲状腺激素信号通路、白细胞介素17(IL-17)信号通路、内分泌抵抗、AGE-RAGE信号通路、细胞凋亡、缺氧诱导因子1(HIF-1)信号通路、PI3K-Akt信号通路等，除柱状图、点状图列出的通路外，还有血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、p53信号通路、Th17细胞分化、TNF信号通路、细胞衰老、MAPK信号通路、Wnt信号通路、mTOR信号通路等值得关注。PI3K-Akt信号通路是KEGG通路富集分析中与股骨头坏死相关的分值最高、靶点最多的通路，以祛痰逐瘀方参与PI3K-Akt信号通路为例(图7)，标记靶点代表祛痰逐瘀方中活性成分的关键基因靶点在PI3K-Akt信号通路中所参与的

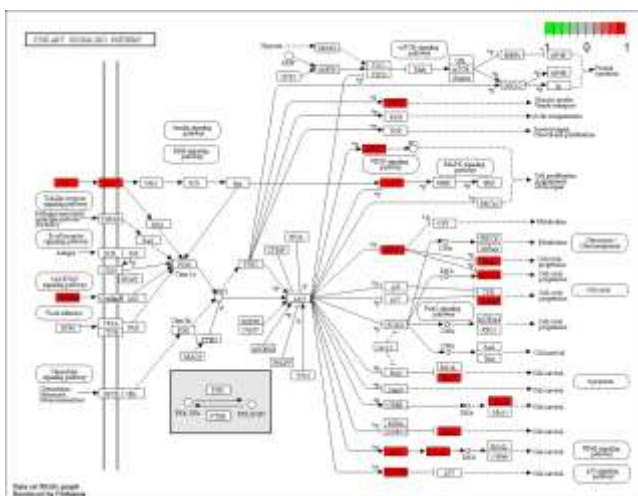
过程, 这些基因靶点在PI3K-Akt信号通路中起着关键作用。这些表明祛痰逐瘀方可以通过参与多种通路协调发挥治疗股骨头坏死的作用, 提示这些关键通路可以作为研究祛痰逐瘀方治疗股骨头坏死的方向。



图注: KEGG 通路富集分析得到 120 条信号通路($P < 0.05$), 列举排名较靠前的 20 个条目

图 6 关键基因靶点 KEGG 代谢通路富集分析柱状图

Figure 6 Histogram of KEGG pathway enrichment analysis of key gene targets



图注: 祛痰逐瘀方中活性成分的关键基因靶点在 PI3K-Akt 信号通路中所参与的过程

图 7 KEGG 富集分析中关键靶点参与 PI3K-Akt 信号通路图

Figure 7 KEGG pathway enrichment analysis of key targets involved in PI3K-Akt signaling pathway

3 讨论 Discussion

3.1 组方分析 股骨头坏死属于中医“骨蚀病”范畴。骨蚀病在不同阶段表现为不同的证候特点, 此次研究基于早期股骨头坏死痰瘀互结的分型, 选取祛痰逐瘀方的半夏、陈皮、茯苓、桃仁、红花5味药进行研究, 半夏和陈皮具有燥湿化痰之功, 茯苓利水渗湿, 桃仁、红花活血祛瘀, 五者配伍气顺痰消, 气行血行, 痰瘀则散。元代朱丹溪的《丹溪心法》中提到“痰瘀互结”, 清代唐宗海在《血证论》中指出“血积既久亦能化为痰水”“血与气本不相离”“水即

气也”, 表明痰瘀同源, 即痰瘀同治具有临床指导价值。

3.2 活性成分分析 此次研究共收集到治疗股骨头坏死的活性成分78个, 其中与股骨头坏死有共同作用靶点的活性成分共34个(部分见表1), 如槲皮素、黄芩苷等。研究表明, 黄芩苷可以调控Wnt信号通路^[21], 进而调节骨髓间充质干细胞的成骨分化及增殖。另外, 也有研究证明黄芩苷可以通过抑制RANKL的表达, 对成骨进行调节^[22-23]。此外, 研究发现, 槲皮素可以通过调节VEGF信号通路和AMPK信号通路, 进而影响股骨头坏死的进程^[24-25]。表明这些活性成分可以通过作用于相关靶点及信号通路来调节股骨头坏死的进程。

3.3 关键靶点及通路分析 此次研究共收集到可能和治疗股骨头坏死相关的作用靶点共61个, GO富集分析也得出祛痰逐瘀方作用于股骨头坏死的相关靶点中, PPARG、RUNX2等发挥了重要作用。相关研究显示PPARG的异常调节导致促脂肪形成和抗成骨作用的发生^[26], 增加股骨头坏死的风险。SONG等^[27]也发现RUNX2与股骨头坏死的发生有密切关系。KEGG富集通路显示, 白细胞介素17信号通路、Th17细胞分化、细胞凋亡、PI3K-Akt信号通路、p53信号通路、血管内皮生长因子信号通路、Wnt信号通路、mTOR信号通路、TNF信号通路、细胞衰老、MAPK信号通路等在股骨头坏死的发生发展中发挥重要作用。ZOU等^[28]通过研究发现白细胞介素17和Th17细胞在股骨头坏死中有较高的表达, 且与疼痛关系密切, 表明白细胞介素17信号通路和Th17细胞分化与股骨头坏死密切相关。VEGF在血管生成中很重要, 并且能够通过促进血管内皮细胞的分裂和生长来诱导血管生成^[29-31], 并促进骨组织重塑和新的骨形成^[32], 同样, AMPK信号通路也是股骨头坏死发生发展的重要通路^[33]。此外, 也有研究已经证明Wnt信号通路参与了股骨头坏死的发病机制^[34], 其可以促进成骨细胞的分化和增殖^[35]。PI3K-Akt信号通路也已被证实可对血管修复再生、成骨细胞分化增殖凋亡与破骨细胞分化相关因素进行有效调控^[36]。

从以上的结果可以看出祛痰逐瘀方借助槲皮素、黄芩苷等活性成分, 作用于分子靶点以及相关的信号通路(如Wnt、血管内皮生长因子等信号通路)来协同发挥对股骨头坏死的治疗作用, 其可涉及血管生成、成骨分化等多个生物过程。因此, 可以得出结论, 祛痰逐瘀方可能通过多个活性成分、靶点、生物过程以及多个信号通路来协同发挥对股骨头坏死的治疗作用, 但其主要通过哪些具体的通路尚未可知, 通过该文推测可能的通路, 这将是下一步实验设计的重点。因此该文虽然只是在分子层面上对祛痰逐瘀方治疗股骨头坏死的作用机制做了初步探讨, 但为进一步研究其作用机制提供了新的思路和依据, 为以后的动物实验提供了基础研究。

作者贡献: 第一作者负责收集、整理数据以及论文撰写, 第二、三、

四作者协助收集和整理数据,第五、六作者及通讯作者校正论文。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金面上项目(81573996, 81873327)”“广东省自然科学基金(2017A030313698)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] CHUGHTAI M, PIUZZI NS, KHLOPAS A, et al. An evidence-based guide to the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *Bone Joint J*.2017;99-B(10):1267-1279.
- [2] COHEN-ROSENBLUM A, CUI QJ. Osteonecrosis of the Femoral Head. *Orthop Clin North Am*. 2019;50(2):139-149.
- [3] GAUTIER E, GANZ K, KRUGEL N, et al. Anatomy of the medial femoral circumflex artery and its surgical implications. *J Bone Joint Surg*.2000;82-B:679-683.
- [4] LIU F, WANG W, YANG L, et al. An epidemiological study of etiology and clinical characteristics in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head. *J Res Med Sci*. 2017;22:15.
- [5] TRIPATHY SK, GOYAL T, SEN RK. Management of femoral head osteonecrosis: Current concepts. *Indian J Orthop*.2015;49(1):28-45.
- [6] MOYA-ANGELER J, GIANAKOS A, VILLA J, et al. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head. *World World J Orthop*. 2015;6(8):590-601.
- [7] CHUGHTAI M, PIUZZI N, KHLOPAS A, et al. An evidence-based guide to the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *Bone Joint J*. 2017;99-B(10):1267-1279.
- [8] MONT M, CHERIAN J, SIERRA R, et al. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: Where do we stand today? A ten-year update. *J Bone Joint Surg Am*. 2015;97(19):1604-1627.
- [9] KOO K, KIM R, KO G, et al. Preventing collapse in early osteonecrosis of the femoral head. A randomised clinical trial of core decompression. *J Bone Joint Surg Br*. 1995;77(6):870-874.
- [10] WRIGHT J, EINHORN T, HECKMAN J. Grades of recommendation. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(9):1909-1910.
- [11] WANG W, YU J, TAO X. Systemic lupus erythematosus complicated with femoral head ischemic necrosis treated by Chinese medicine therapy for activating blood and dredging collaterals method. *Chin J Integr Med*. 2011;17(2):105-110.
- [12] LI C, SHEN L, YANG Y, et al. Effects of Modified Qing'e Pill on the expression of adiponectin, bone morphogenetic protein 2 and coagulation-related factors in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head. *Chin J Integr Med*. 2017;23(3):183-189.
- [13] 李泰贤,陈志伟,薛志鹏,等.中老年股骨头坏死患者中医证候特点[J]. *中华中医药杂志*,2019,34(4):1414-1418.
- [14] 何伟.中西医结合骨伤科学[M].广州:广东高等教育出版社,2007:464.
- [15] 包永生,谢文英,王俊月.二陈汤研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019,25(23):9-18.
- [16] 张东龙.桃红四物汤临床应用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014,16(11):217-219.
- [17] 陈晓波,陈雷雷,洪郭驹,等.桃红四物汤对激素性股骨头坏死兔股骨头微结构的影响及其机制[J]. *山东医药*,2017,57(32):5-9.
- [18] 陈镇秋,何伟,魏秋实.“痰瘀同治”对酒精性股骨头坏死患者血液流变学及血脂水平的影响[J]. *中华中医药杂志*,2012,27(1):246-248.
- [19] 吴俊颖,张璐,谢敏子,等.基于网络药理学研究温胆汤治疗冠心病的作用机制[J]. *中国药房*,2018,29(23):3227-3232.
- [20] 赵炳聪,李亚鸿,解红霞.网络药理学在中药复方作用机制研究中的应用[J]. *中国中医药信息杂志*,2020,27(3):133-136.
- [21] 李晨睿,孟志远,牛银波,等.黄芩苷通过Wnt/ β -catenin信号通路对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的促进作用[J]. *中国药理学通报*, 2015,31(7):919-924.
- [22] 刘彬,舒欣,葛怡坤,等.野黄芩苷对大鼠成骨细胞OPG、RANKL表达的影响[J]. *临床口腔医学杂志*, 2017,33(1):7-10.
- [23] 宋红梅,魏迎辰,吴斌,等.温阳补肾方对兔激素性股骨头坏死组织RANKL/RANK/OPG通路的影响[J]. *中华中医药杂志*,2016,31(1):302-305.
- [24] 韦艳,陆艳玲,王荣荣,等.槲皮素对缺氧人肝癌细胞HepG2增殖及HIF-1 α 、VEGF的影响[J]. *武警医学*, 2018,29(2):134-137.
- [25] 肖洁,尹松梅,谢双锋,等.槲皮素调控AMPK活性诱导HL-60细胞自噬与凋亡[J]. *中山大学学报(医学科学版)*,2018,39(4):501-509.
- [26] WYLES CC, PARADISE CR, HOUDEK MT, et al. CORR[®] ORS Richard A. Brand Award: Disruption in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPARG) Increases Osteonecrosis Risk Through Genetic Variance and Pharmacologic Modulation. *Clin Orthop Relat Res*.2019;477(8):1800-1812.
- [27] SONG Y, DU Z, REN M, et al. Association of gene variants of transcription factors PPAR γ , RUNX2, Osterix genes and COL2A1, IGFBP3 genes with the development of osteonecrosis of the femoral head in Chinese population. *Bone*.2017;101:104-112.
- [28] ZOU D, ZHANG K, 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. *Endokrynol Pol*.2018;69(3):283-290.
- [29] 马剑雄,何伟伟,赵杰,等.股骨头坏死发病机制研究的最新进展[J]. *中国组织工程研究*,2017,21(27):4397-4402.
- [30] WHITE AP, VACCARO AR, HALL JA, et al. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop*. 2007;31:735-741.
- [31] CAO QS, ZHANG T, ZHANG J. Correlation analysis of STAT3 and VEGF expression and eosinophil infiltration in nasal polyps. *Eur Arch Otorhinolaryngol*.2015;272:1955-1960.
- [32] DAILIANA ZH, STEFANO N, KHALDI L, et al. Vascular endothelial growth factor for the treatment of femoral head osteonecrosis: An experimental study in canines. *World J Orthop*. 2018;9(9):120-129.
- [33] 王钰钢,范启明,汤亭亭.AMPK信号通路对骨代谢的调节作用[J]. *中国骨质疏松杂志*,2014,20(3):322-326.
- [34] ZHANG C, ZOU YL, MA J, et al. Apoptosis associated with Wnt/ β -catenin pathway leads to steroid-induced avascular necrosis of femoral head. *BMC Musculoskelet Disord*.2015;16:132.
- [35] 刘艳玲,李方兵,赵曦.Wnt信号通路在成骨细胞中的作用:成骨还是破骨? [J]. *中国组织工程研究*,2014,18(33):5366-5371.
- [36] 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.