

参苓白术散治疗膝骨关节炎作用机制的网络药理学和分子对接技术分析

<https://doi.org/10.12307/2022.033>李安安¹, 姜涛², 詹敏³, 蔡宇宁², 宋敏¹, 李聪聪¹, 林文政², 张家媛¹, 刘文刚²

投稿日期: 2020-11-13

送审日期: 2020-11-17

采用日期: 2021-01-07

在线日期: 2021-06-03

中图分类号:

R453; R363; R245

文章编号:

2095-4344(2022)02-00197-08

文献标识码: B

文章快速阅读:

在 TCMSp 和 TCMID 数据库收集参苓白术散药物活性成分及药物靶点



方法:

- (1) Draw Venn Diagrams 软件绘制 Venny 图;
- (2) Cytoscape 软件构建成分-靶点网络图及交集基因 PPI 网络;
- (3) GO 和 KEGG 通路富集分析;
- (4) Pubchem、PDB 数据库及 AutoDockTools 软件行分子对接。



结论:

参苓白术散中木犀草素、山奈酚及β-谷甾醇等活性成分可通过抑制炎症、调控凋亡及降低氧化应激等作用治疗膝骨关节炎。

在 GeneCards 和 OMIM-NCBI 数据库收集膝骨关节炎疾病靶点



文题释义:

膝骨关节炎:是一种好发于中老年人的慢性骨关节退行性疾病,主要表现为疼痛、功能障碍,严重者可出现关节畸形肿胀,严重影响患者日常生活。此病属中医“膝痹病”范畴,为中医骨伤科治疗的优势病种。

网络药理学:是一种基于系统生物学理论,利用大数据进行网络分析,选取疾病靶点基因与中药复方活性成分,进行多靶点药物分子设计的新学科。通过强调对信号通路的多途径调节,可提高药物的治疗效果,降低毒副作用,从而提高新药临床试验的成功率,节省药物的研发费用。

摘要

背景:参苓白术散是健脾祛湿的代表方之一,具有良好的抗炎及免疫调节效应。近年来课题组在临床实践中发现对早、中期膝骨关节炎患者使用参苓白术散疗效颇丰,但具体的分子机制尚不明确。

目的:通过网络药理学和分子对接探究参苓白术散治疗膝骨关节炎的药理学机制。

方法:使用TCMSp和TCMID数据库搜集参苓白术散活性成分及其作用靶点,使用GeneCards和OMIM-NCBI数据库获取膝骨关节炎靶点,使用STRING与Cytoscape构建药物-活性化学成分-核心靶标网络与PPI蛋白网络互作分析,并进行GO及KEGG分析,使用AutoDockTools将重要活性成分与核心靶点进行分子对接预测。

结果与结论:①共筛选出参苓白术散活性药物化学成分109个,主要成分包含木犀草素、山奈酚和β-谷甾醇等;②其中与疾病交集靶点97个,核心靶点为PTGS2, CASP3, AKT1, MAPK1, MAPK8, TP53和EGFR等;③分子对接结果可见,山奈酚及β-谷甾醇可靶向调控CASP3, AKT1, PTGS2;④GO分析得出参苓白术散治疗膝骨关节炎的机制中主要涉及氧化应激、脂多糖、营养水平、肌肉细胞增殖及氧水平等生物过程;⑤KEGG分析结果显示,PI3K-Akt、肿瘤坏死因子、白细胞介素17和Th17细胞通路为参苓白术散治疗膝骨关节炎的主要的信号通路;⑥上述结果证实,参苓白术散中木犀草素、山奈酚及β-谷甾醇等活性成分可通过抑制炎症、调控凋亡及降低氧化应激等作用治疗膝骨关节炎。

关键词:参苓白术散;膝骨关节炎;网络药理学;分子对接;信号通路;炎症;凋亡;氧化应激

Pharmacological mechanism of *Shenling Baizhu San* in the treatment of knee osteoarthritis based on network pharmacology and molecular dockingLi Anan¹, Jiang Tao², Zhan Min³, Cai Yuning², Song Min¹, Li Congcong¹, Lin Wenzheng², Zhang Jiayuan¹, Liu Wengang²

¹Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; ²Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China; ³Nanfeng Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Li Anan, Master candidate, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Corresponding author: Liu Wengang, MD, Chief physician, Master's supervisor, Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: *Shenling Baizhu San* is one of the representative prescriptions for strengthening the spleen and removing dampness, which has good anti-inflammatory and immunomodulatory effects. In recent years, we have found positive effect of *Shenling Baizhu San* in patients with early and mid-stage knee osteoarthritis in clinical practice, but the specific molecular mechanism is still unclear.

¹广州中医药大学, 广东省广州市 510405; ²广东省第二中医院, 广东省广州市 510095; ³南方医科大学南方医院, 广东省广州市 510515

第一作者: 李安安, 男, 1996年生, 广州中医药大学在读硕士, 主要从事中医药治疗骨关节病的研究。

通讯作者: 刘文刚, 博士, 主任中医师, 硕士生导师, 广东省第二中医院, 广东省广州市 510095

<https://orcid.org/0000-0002-8887-8429> (刘文刚)

基金资助: 广东省中医药管理局科研项目(20191021); 广东省医学科学技术研究基金项目(A2020071)

引用本文: 李安安, 姜涛, 詹敏, 蔡宇宁, 宋敏, 李聪聪, 林文政, 张家媛, 刘文刚. 参苓白术散治疗膝骨关节炎作用机制的网络药理学和分子对接技术分析 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(2):197-204.



OBJECTIVE: To explore the pharmacological mechanism of *Shenling Baizhu San* in the treatment of knee osteoarthritis through network pharmacology and molecular docking.

METHODS: The TCMSP and TCMID databases were used to collect the active ingredients and their targets of *Shenling Baizhu San*. The GeneCards and OMIM-NCBI databases were used to obtain the KOA targets. STRING and Cytoscape were used to construct the drug-active chemical ingredient-core target network and the protein-protein interaction (PPI) analysis. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were carried out. AutoDockTools was used to predict molecular docking between important active ingredients and core targets.

RESULTS AND CONCLUSION: A total of 109 active pharmaceutical chemical components of *Shenling Baizhu San* were screened, and the important components included luteolin, kaempferol, β -sitosterol, etc. Among them, there were 97 intersecting targets with diseases, and the core targets were PTGS2, CASP3, AKT1, MAPK1, MAPK8, TP53, EGFR, etc. The results of molecular docking showed that kaempferol and β -sitosterol could target and regulate CASP3, AKT1, and PTGS2. GO analysis showed that the mechanism mainly involved biological processes such as oxidative stress, lipopolysaccharide, nutritional level, muscle cell proliferation, oxygen level, etc. The results of KEGG analysis showed that PI3K-Akt, tumor necrosis factor, interleukin-17 and Th17 cell pathways were the main signaling pathways. In summary, Luteolin, kaempferol, β -sitosterol, and other active ingredients in *Shenling Baizhu San* can treat knee osteoarthritis by inhibiting inflammation, regulating apoptosis, and reducing oxidative stress.

Key words: Shenling Baizhu San; knee osteoarthritis; network pharmacology; molecular docking; signaling pathway; inflammation; apoptosis; oxidative stress

Funding: the Research Project of Guangdong Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 20191021; Guangdong Medical Science and Technology Research Fund, No. A2020071

How to cite this article: LI AA, JIANG T, ZHAN M, CAI YN, SONG M, LI CC, LIN WZ, ZHANG JY, LIU WG. Pharmacological mechanism of *Shenling Baizhu San* in the treatment of knee osteoarthritis based on network pharmacology and molecular docking. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(2):197-204.

0 引言 Introduction

膝关节关节炎是一种好发于中老年人的慢性骨关节退行性疾病，主要临床表现为疼痛及功能障碍，严重者可出现关节畸形肿胀^[1]，其关键病理学改变为软骨退变、继发性骨赘形成、软骨下骨重塑和滑膜炎等^[2]。目前，对于晚期膝骨关节炎，人工关节置换是公认的理想治疗方法，可获得良好的近、远期疗效；而针对处于 KL1-2 级的早、中期膝骨关节炎，目前以药物治疗为主，非类固醇类抗炎药为常用的一线药物，但与之相关的消化道反应和心血管不良事件在一定程度上限制了其临床应用。

膝关节关节炎属于中医骨伤科治疗的优势病种，中医药因其疗效显著且不良反应少而逐渐凸显其治疗早、中期膝骨关节炎的潜在优势。作者所在课题组是广东省中医强省优势病种突破项目“膝痹”牵头建设单位，从事中医药防治膝骨关节炎相关的临床、科研工作 20 余年，认为岭南地区受特殊的地域、气候、饮食因素影响，一年四季以湿邪为主，正如《太平圣惠方》：“岭南土地卑湿，气候不同，夏则炎热郁蒸，冬则温暖无雪，风湿之气易伤人”，潮湿可加重膝骨关节炎患者的疼痛^[3]，同时湿邪最易伤及脾胃。不少脾虚湿阻的典型表现与早中期膝骨关节炎症状相符，如《素问·至真要大论》“诸湿肿满，皆属于脾”，早期滑膜炎、关节腔内积液导致的关节肿胀表现正与此理论相契合。而《素问·痿论》说：“脾主身之肌肉”，肌肉的萎缩也常可见于膝骨关节炎患者^[3]。

参苓白术散是健脾祛湿的代表方之一，具有良好的抗炎及免疫调节效应，临床上主要被用于治疗溃疡性结肠炎^[4-8]。近年来，课题组在临床实践中发现对早、中期膝骨关节炎患者使用参苓白术散疗效颇丰，但具体的分子机制尚不明确，且目前尚无参苓白术散治疗膝骨关节炎相关的研究，特别其对于膝关节炎软骨、滑膜等组织的病变方面。因此课题组拟围绕参苓白术散治疗膝骨关节炎开展“病-证-方”关联网研究，故在文章中利用网络药理学和分子对接的方法对参苓白术散治疗膝骨关节炎的分子机制进行探讨，为后期的研究及中药复合修复材料制作打下理论基础。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 复方化学成分收集及药物靶点预测 将参苓白术散复方中的人参、白术、茯苓、甘草、山药、桔梗、砂仁、薏苡仁、白扁豆输入 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)^[9]，收集所有化合物成分，然后根据药代动力学的原理以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性指数 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为标准筛选符合条件的化合物。药物靶点数据来源于 Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>)，应用 Uniprot (<https://www.Uniprot.org/>) 数据库使其标准化。因 TCMSP 数据库尚未收录莲子，因此莲子的化学成分及相关药物靶点查找自 TCMID (<http://www.megabionet.org/tcmid>) 数据库^[10]。

1.2 构建膝骨关节炎-靶点基因网络 基于 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 与 OMIM-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) 数据库以膝骨关节炎、Knee osteoarthritis 为关键词，种属选择“Homo sapiens”筛选疾病靶点。

1.3 复方-疾病交集基因的获取 应用 R 软件中的 Draw Venn Diagrams 工具对 1.1 与 1.2 中获取到的药物靶点与疾病靶点进行处理，获得交集基因靶点，并输出 Venny 图展示。

1.4 靶蛋白相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) 网络构建 将参苓白术散的活性化学成分，核心靶标通过 STRING 数据库与 Cytoscape 3.7.1 软件进行 PPI 蛋白网络互作分析。根据 Cytoscape 的要求构建“source-target”数据表，利用 Network Analyze 插件构建中药-有效成分-靶点调控网络，在产生的调控网络中，节点代表中药及有效成分、靶点，边代表有效成分-靶点疾病之间的相互作用。进一步利用 CytoHubba 插件的 MCC 算法计算构建各靶点的 PPI 网络。

1.5 GO 和 KEGG 通路富集分析 基于 Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>) 中的 R 包 (<https://www.r-project.org/>) clusterprofile 3.12.0 对核心靶标进行 GO 功能富集分析 (gene ontology) 和 KEGG 通路分析 (KEGG pathway analysis)。选择物种为人 (Homo sapiens)，设定阈值 $P < 0.05$ ，根据结果在 Cytoscape 3.7.1 软件进行核心靶标-关键通路网络。

1.6 分子对接 为进一步探究参苓白术散对膝骨关节炎的调控作用，将 1.1 中获取的主要化学成分与 1.4 筛选得到的核

心靶点进行分子对接验证。从 Pubchem 数据库 (<http://zinc.docking.org/>) 查询 1.1 中关键成分结构, 优化结构并保存为 mol 格式。从 PDB 数据库下载核心靶点的 3D 结构, 保存为 PDB 格式, 使用 PyMol 软件删除蛋白结构的水分子和小分子配体, 并导入 AutoDockTools 进行加氢等预处理。将活性成分和靶点蛋白均转换成 pdbqt 格式文件。最后运行 AutoDockTools 对活性成分和靶点蛋白分别进行对接, 保存最低结合能数据作为分子对接的结果。结合能越低, 表明活性成分与靶蛋白的结合力越强, 一般认为结合能 ≤ -5.0 kJ/mol 的药物分子与靶点具有较好的结合活性。

1.7 主要观察指标 通过上述方法最终能得出中药-成分-靶点网络, 直观反映参苓白术散与膝骨关节炎各潜在靶点的联系, 得出 PPI 网络反映各潜在靶点的联系及重要程度, 得出 GO 及 KEGG 分析结果反映潜在靶点的综合作用机制, 得出分子对接结果反映主要活性成分与靶点潜在结合活性。

2 结果 Results

2.1 参苓白术散活性化学成分 文章共收集参苓白术散药物化学成分 109 个, 预测靶点 182 个, 参苓白术散各中药有效成分见表 1。

表 1 | 参苓白术散中部分活性化合物基本信息

Table 1 | Basic information of active compounds of Shenling Baizhu San

Mol ID	成分名	生物利 类药性 来源 用度 (%) 指数	Mol ID	成分名	生物利 类药性 来源 用度 (%) 指数
MOL000273	16alpha-Hydroxydehydrotrametenolicacid(16 α -羟基脱氢跨烯酸)	30.93 0.81 茯苓	MOL004903	Liquiritin(甘草苷)	65.69 0.74
MOL000275	Trametenolicacid(梯烯酸)	38.71 0.80	MOL004904	Licopyranocoumarin(香豆素)	80.36 0.65
MOL000276	7,9(11)-dihydropachymicacid(7,9(11)-脱氢巴戊酸)	35.11 0.81	MOL004907	Glyzaglabrin(糖基甘油)	61.07 0.35
MOL000279	Cerevisisterol(塞维妥醇)	37.96 0.77	MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	62.90 0.53
MOL000280	Dehydrotumulosicacid(脱氢瘤酸)	31.07 0.82	MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	71.12 0.18
MOL000282	Stellasterol(甾醇)	43.51 0.72	MOL004959	1-methoxyphaseollidin(1-甲氧基菜豆蛋白)	69.98 0.64
MOL000283	Ergosterolperoxide(麦角固醇过氧化物)	40.36 0.81	MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin	83.71 0.27
MOL000285	Polyporenicacid(聚孔酸 C)	38.26 0.82	MOL000500	Vestitol(糖醇)	74.66 0.21
MOL000287	Eburicoicacid(花生酸)	38.70 0.81	MOL005000	Gancaoning(甘草素 G)	60.44 0.39
MOL000289	Pachymicacid(茯苓酸)	33.63 0.81	MOL005007	Glyasperinm(甘油 M)	72.67 0.59
MOL000290	Poricoicacid(多孔酸甲)	30.61 0.76	MOL005017	Phaseol(菜豆酚)	78.77 0.58
MOL000291	Poricoicacid(多孔酸乙)	30.52 0.75	MOL001559	Piperlonguminine(吡隆宁)	30.71 0.18 山药
MOL000292	Poricoicacid(多孔酸丙)	38.15 0.75	MOL001736	(-)-Taxifolin((-)-紫杉酚)	60.51 0.27
MOL000296	Hederagenin	36.91 0.75	MOL000310	Denudatinb(芦丁乙)	61.47 0.38
MOL000300	Dehydroeburicoicacid(脱氢表皮酸)	44.17 0.83	MOL000322	Kadsurenone(海风藤酮)	54.72 0.38
MOL002879	Diop	43.59 0.39 人参	MOL005429	Hancinol(甘露醇)	64.01 0.37
MOL003648	Inermin	65.83 0.54	MOL005430	Hancinonec(汉生酮 C)	59.05 0.39
MOL000422	Kaempferol(山奈酚)	41.88 0.24	MOL005435	24-Methylcholest-5-enyl-3beta-O-glucopyranoside_qt	37.58 0.72
MOL004492	Chrysanthemaxanthin(菊黄素)	38.72 0.58	MOL005438	Campesterol(菜油甾醇)	37.58 0.71
MOL005308	Aposiopolamine(鬼白胺)	66.65 0.22	MOL005440	Isofucosterol(异氟固醇)	43.78 0.76
MOL005314	Celabenzine(西拉本嗪)	101.88 0.49	MOL005458	Dioscoresidec_qt(薯根甙 C)	36.38 0.87
MOL005317	Deoxyharringtonine	39.27 0.81	MOL000546	Diosgenin(薯根皂素)	80.88 0.81
MOL005318	Dianthramine(地那敏)	40.45 0.20	MOL005461	Doradexanthin(多拉黄质)	38.16 0.54
MOL005320	Arachidonate(花生四烯酸)	45.57 0.20	MOL005463	Methylcimicifugoside_qt(甲基香茅苷-Qt)	31.69 0.24
MOL005321	Frutinonea(果丁酮 A)	65.90 0.34	MOL005465	Aids180907	45.33 0.77
MOL005344	Ginsenosiderh2(人参皂苷 Rh2)	36.32 0.56	MOL002773	Beta-carotene(β -胡萝卜素)	37.18 0.58 白扁豆
MOL005348	Ginsenoside-Rh4_qt(人参皂苷 Rh4-qt)	31.11 0.78	MOL001689	Acacetin(金合欢素)	34.97 0.24 桔梗
MOL005356	Girinimbin	61.22 0.31	MOL004355	Spinasterol(菠菜甾醇)	42.98 0.76
MOL005357	Gomisinb(戈米菌素 B)	31.99 0.83	MOL004580	Cis-Dihydroquercetin(顺二氢槲皮素)	66.44 0.27
MOL005360	Malkangunin	57.71 0.63	MOL005996	2-O-methyl-3-O- β -D-glucopyranosylplatycogenata	45.15 0.25
MOL005376	Panaxadiol(人参二醇)	33.09 0.79	MOL000006	Luteolin(木犀草素)	36.16 0.25
MOL005384	Suchilactone(内酯)	57.52 0.56	MOL006026	Dimethyl-2-O-methyl-3-O-a-D-glucopyranosylplatycogenata	39.21 0.25
MOL005399	Alexandrin_qt	36.91 0.75	MOL006070	Robinin	39.84 0.71
MOL005401	Ginsenosiderg5_qt(人参 Rg5-qt)	39.56 0.79	MOL001755	24-Ethylcholest-4-en-3-one	36.08 0.76 砂仁
MOL000787	Fumarine(富马林)	59.26 0.83	MOL001771	Poriferast-5-en-3beta-ol	36.91 0.75
MOL000020	12-seneciyl-2E,8E,10E-atractylentriol	62.40 0.22	MOL001973	Sitosterylacetate(谷甾醇乙酸酯)	40.39 0.85
MOL000021	14-acetyl-12-seneciyl-2E,8E,10E-atractylentriol	60.31 0.31	MOL003975	Icosa-11,14,17-trienoicacidmethylester	44.81 0.23
MOL000022	14-acetyl-12-seneciyl-2E,8Z,10E-atractylentriol	63.37 0.3	MOL007180	Vitamin-e(维生素-E)	32.29 0.70
MOL000028	A-Amyrin(α -香树脂)	39.51 0.76	MOL007514	Methylcosa-11,14-dienoate	39.67 0.23
MOL000033	(24S)-24-Propylcholesta-5-ene-3beta-ol	36.23 0.78	MOL007535	Salpha-Stigmastane-3,6-dione	33.12 0.79
MOL000049	β -acetoxylatractylone(β -乙酰氧基苍术酮)	54.07 0.22	MOL007536	Stigmasta-5,22-dien-3-beta-ylacetate	46.44 0.86
MOL000072	8 β -ethoxyatractylenolide(8β -乙氧基白术内酯)	35.95 0.21	MOL001323	Sitosterolalphi1(谷固醇 α 1)	43.28 0.78 薏苡仁
MOL001484	Inermine	75.18 0.54 甘草	MOL001494	Mandenol(甘露醇)	42.00 0.19
MOL002311	Glycyrol(甘油)	90.78 0.67	MOL002372	(E,e,e,e)-squalene((e, e, e, e)-角鲨烯)	33.55 0.42
MOL000392	Formononetin	69.67 0.21	MOL002882	[(2R)-2,3-dihydroxypropyl](Z)-octadec-9-enoate	34.13 0.30
MOL004808	Glyasperinb(甘油 B)	65.22 0.44	MOL000359	Sitosterol(谷甾醇)	36.91 0.75
MOL004810	Glyasperinff(甘油 F)	75.84 0.54	MOL008118	Coixenolide(烯内酯)	32.40 0.43
MOL004824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	60.25 0.63	MOL008121	2-monoolein(2-油酸单甘油酯)	34.23 0.29
MOL004829	Glepidotinb(缓激肽 B)	64.46 0.34	MOL000449	Stigmasterol(甾醇)	43.83 0.76 人参、山药、砂仁、薏苡仁
MOL004835	Glypallicalcone(甘草酮)	61.60 0.19	MOL009172	Pronuciferine(前核苷)	32.75 0.37 莲子
MOL004841	Licochalconeb	76.76 0.19	MOL007213	Nuciferine(核苷)	34.43 0.40
MOL004855	Licoricone(甘草酸)	63.58 0.47	MOL000953	Clr(clr)	37.87 0.68 山药、薏苡仁
MOL004863	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	66.37 0.41	MOL000358	Beta-sitosterol(β -谷甾醇)	36.91 0.75 砂仁、人参
MOL004891	Shinpterocarpin	80.30 0.73			

2.2 疾病靶点的获取 在 GeneCards 与 OMIM-NCBI 数据库中以“Knee osteoarthritis”为关键词进行检索, 将 2 个数据库中所获得的疾病靶点汇总并删除重复, 共获得 1 967 个, 将其作为候选靶标来源。

2.3 获取交集基因及网络构建

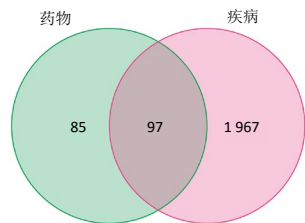
2.3.1 获取复方-疾病交集基因 将 1.1 与 1.2 中获得的复方药物靶点与疾病靶点数据导入到 R 软件, 应用 Draw Venn Diagrams 工具获取交集基因, 绘制韦恩图, 共获得 97 个交集靶点基因, 见图 1。

2.3.2 构建成分-靶点网络图 运用 Cytoscape 3.7.1 软件中 Network Analyze 插件构建复方化学成分-靶点作用网络, 见图 2。网络共有 167 个节点, 440 条边。左边代表核心靶标, 其中颜色越深表明 degree 值越高。右边代表活性化学成分, 不同颜色代表来自不同药物。右边颜色从上至下, 浅蓝色代表人参, 草黄色代表茯苓, 橘黄色代表白术, 红色代表白扁豆, 浅紫色代表薏苡仁, 深紫色代表山药, 浅绿色代表桔梗, 淡黄色代表莲子, 深蓝色代表砂仁, 墨绿色代表甘草。每条边代表化合物与靶点的关系。从图 2 可知, 一个化学成分常与多个交集基因靶点对应, 且一个交集基因与靶点也同时对应多个化学成分, 化学成分又从属于不同的中药, 这说明参苓白术散治疗膝骨关节炎是通过多成分、多靶点、多通路起

效的, 其中木犀草素 (luteolin)、山奈酚 (kaempferol) 和 β - 谷甾醇 (beta-sitosterol) 含有较高 Degree 值, 为主要活性成分。

2.4 交集基因 PPI 网络构建与分析 应用 STRING 数据库对交集基因初步构建蛋白作用网络, 见图 3。网络图包括 97 个节点, 3 058 条边。节点代表蛋白, 边代表蛋白与蛋白之间的作用关系。网络连接程度越高说明蛋白间关系越密切。为进一步筛选核心蛋白, 将 STRING 数据库获得的 interaction.tsv 文件导入到 Cytoscape 中的, 通过 CytoHubba 插件对网络进行分析, 筛选条件按 MCC 排列, 颜色越深、越靠近中心表明 RANK 更前, 关键性越高。其中 PTGS2, CASP3, AKT1, MAPK1, MAPK8, TP53, BCL2L1, EGFR, VEGFA, JUN 在网络中连接程度较高, 说明这些靶蛋白是网络中的关键靶点。

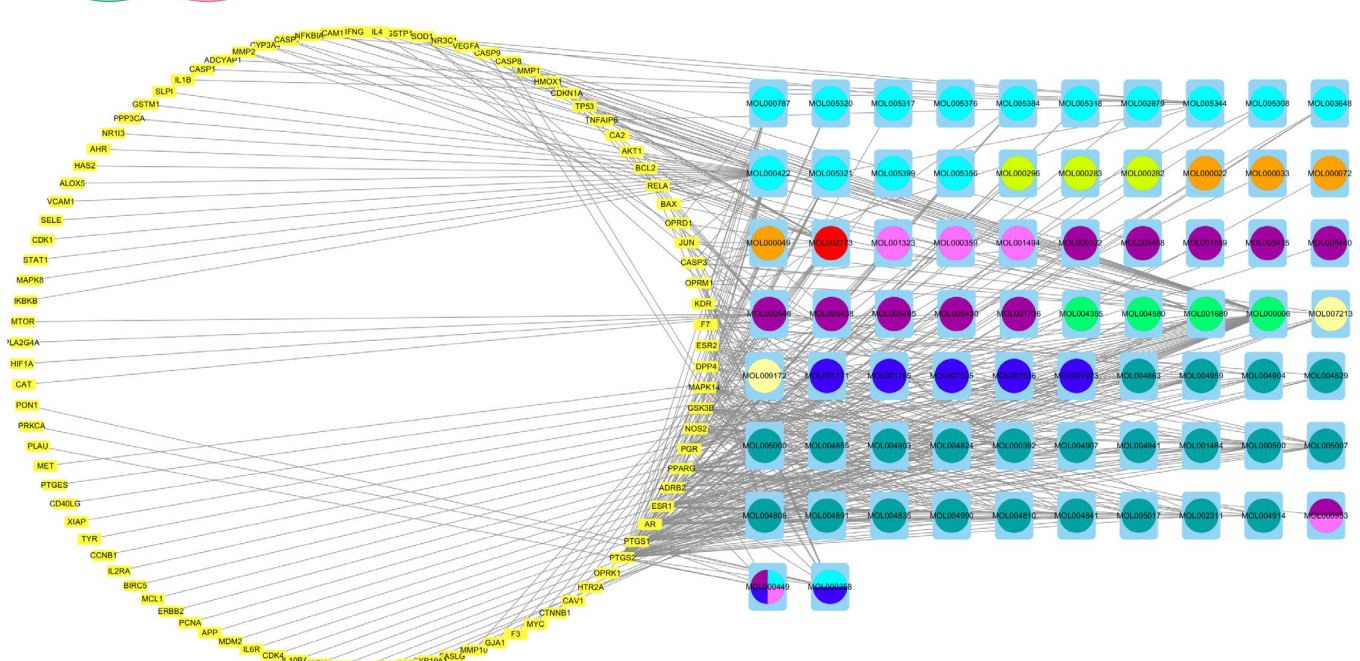
2.5 交集基因的 GO 和 KEGG 通路富集分析 基于 Bioconductor 中的 R 包对核心靶标进行基因本体论 (GO) 功能富集分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。富集条件为 P valueCutoff=0.05 且 Q valueCutoff=0.05, 其他项目默认原始设置, 并根据每个项目的 P 值、 Q 值及富集在其上的基因数目绘制气泡图, 横坐标表示靶点数。GO 富集中交集基因主要参与了氧化应激、脂多糖、营养水平、肌肉细胞增殖和氧水平等生物过程, 见图 4。KEGG 通路主要涉及 PI3K-Akt、肿瘤坏死因子、白细胞介素 17 和 Th17 细胞通路, 见图 5。



图注: 图中左侧绿色圆圈呈现了复方药物靶点数量; 右侧红色圆圈呈现了疾病靶点数量; 中间交集处为交集靶点数量

图 1 | 参苓白术散-膝骨关节炎交集基因韦恩图

Figure 1 | Venn map of intersection targets between Shenling Baizhu San and knee osteoarthritis



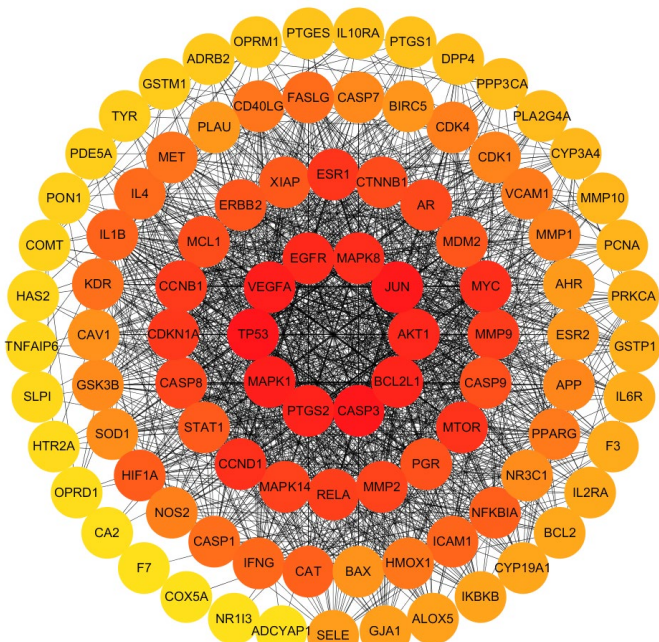
图注: 图中左边半圆形为核心靶标网络图, 其中颜色越深表明 degree 值越高; 右边方阵图为活性化学成分, 浅蓝色代表人参, 草黄色代表茯苓, 橘黄色代表白术, 红色代表白扁豆, 浅紫色代表薏苡仁, 深紫色代表山药, 浅绿色代表桔梗, 淡黄色代表莲子, 深蓝色代表砂仁, 墨绿色代表甘草。PTGS2 为环氧合酶 2, PTGS1 为环氧合酶 1, NOS2 为一氧化氮合酶 2, MAPK14 为丝裂原活化蛋白激酶 14

图 2 | 参苓白术散-成分-靶点网络

Figure 2 | Drug-ingredients-target network of knee osteoarthritis

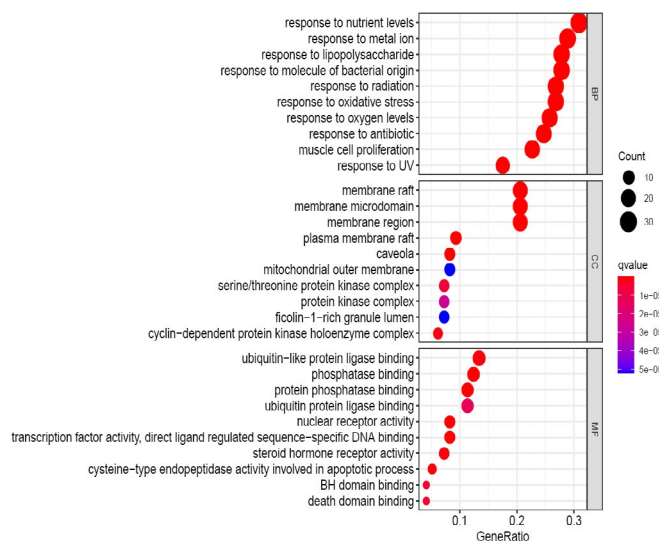
2.6 分子对接验证结果 将 2.4 中筛选得到部分核心靶点 (CASP3, AKT1, PTGS2) 与 2.3.2 中筛选得到的部分核心成分 (木犀草素、山奈酚和 β- 谷甾醇) 进行分子对接。一般认为结合能 ≤ -5.0 kJ/mol 的药物分子与靶点具有较好的结合

活性, 筛选为山奈酚与 CASP3 和 AKT1, β- 谷甾醇与 CASP3 和 PTGS2 结合均有较好的结合活性, 见图 6。以上结果间接证明, 参苓白术散活性主要成分可对核心靶点发挥调控作用。



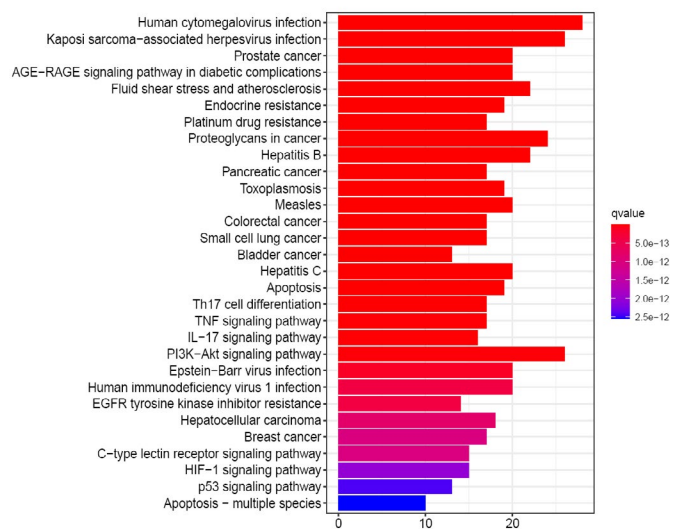
图注: 图中节点颜色越深、越靠近中心表明关键性越高。PTGS2 为环氧合酶 2, CASP3 为半胱氨酸蛋白酶 3, AKT1 为蛋白激酶 B, MAPK1 为丝裂原活化蛋白激酶 1, MAPK8 为丝裂原活化蛋白激酶 8, EGFR 为表皮生长因子受体

图 3 | 参苓白术散 - 膝关节炎蛋白质相互作用网络
Figure 3 | Protein-protein interaction network of potential targets of Shenling Baizhu San and knee osteoarthritis



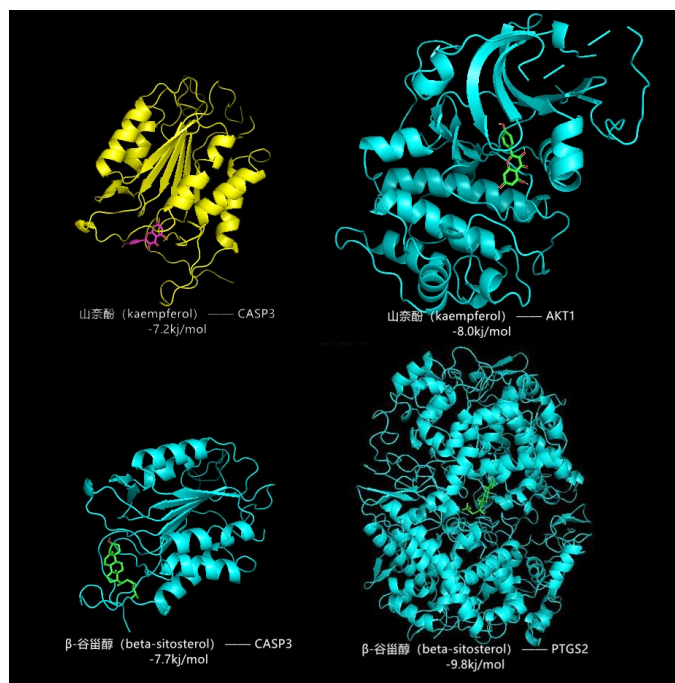
图注: 点越大表明相关靶点数量越多; 颜色越红代表富集程度越高; GO 分析结果主要富集于生物过程通路 (BP): 氧化应激 (response to oxidative stress)、脂多糖 (response to lipopolysaccharide)、营养水平 (response to nutrient levels)、肌肉细胞增殖 (muscle cell proliferation)、氧水平 (response to oxygen levels) 等生物过程

图 4 | 参苓白术散 - 膝关节炎潜在靶点的生物功能分析
Figure 4 | Biological functions analysis of potential targets of Shenling Baizhu San and knee osteoarthritis



图注: 图中柱越长明相关靶点数量越多; 颜色越红代表富集程度越高; KEGG 通路分析结果主要富集于 PI3K-Akt、肿瘤坏死因子、白细胞介素 17 和 Th17 细胞通路

图 5 | 参苓白术散 - 膝关节炎潜在靶点的 KEGG 通路分析
Figure 5 | KEGG pathway analysis of potential targets of Shenling Baizhu San and knee osteoarthritis



图注: 图中较大分子为靶点蛋白, 较小分子为活性成分
图 6 | 参苓白术散活性成分 - 膝关节炎核心靶点的对接分析
Figure 6 | Docking analysis of active pharmaceutical ingredients of Shenling Baizhu San and core genes of knee osteoarthritis

3 讨论 Discussion

膝骨关节炎属中医“膝痹病”范畴，也是中医骨伤科治疗的优势病种，为本虚标实之证，在内为脏腑亏虚，在外为风寒湿等外邪侵袭合而为痹。而岭南地区，外邪致病以湿邪为主，对此，清代岭南名家何梦瑶指出：“岭南地卑土薄……人中多湿”；其次，饮食好于生冷饮食且贪尝肥甘厚味，经年累月，加之素体外湿受浸、内伤饮食，进而脾胃运化失衡呈湿困脾胃等状况^[11]，故岭南人群致病，多以湿邪为首^[11]，因此课题组认为脾虚湿阻为本地膝痹病常见证型。参苓白术散作为健脾祛湿第一方，主要被用于治疗溃疡性结肠炎，而有趣的是，近年来课题组在临床实践中发现某些合并膝骨关节炎的溃疡性结肠炎患者在接受参苓白术散治疗后，其膝骨关节炎相关的症状亦得到明显缓解，这一现象引发了课题组的注意，因此逐渐在临床诊疗中应用参苓白术散治疗脾虚湿阻型早、中期膝骨关节炎患者，疗效良好，但具体机制尚不明确。进一步通过查阅文献发现尚无参苓白术散治疗膝骨关节炎相关的研究报道，课题组遂于文章中利用网络药理学和分子对接技术对参苓白术散治疗膝骨关节炎进行靶点预测，为后续临床、基础研究及新药开发提供新的思路。

参苓白术散由人参、茯苓、炒白术、炒白扁豆、薏苡仁、山药、莲子、桔梗、砂仁和炒甘草组成，以健脾祛湿为法。君药以人参、茯苓和炒白术 3 药共同组成，人参补脾胃之气，扶正祛邪；茯苓与白术益气健脾渗湿。臣药以山药、莲子、炒白扁豆和薏苡仁 4 药共同组成，其中莲子、山药健脾益胃，健脾之功，止泻厚肠；白扁豆、薏苡仁起化湿健脾砂仁行气醒脾，祛湿和胃；因肺与大肠相表里，选用入肺经之桔梗，使肺气开宣，水道通调而止泻，同时载药上行，使诸药可上行肺脏培土生金以补益肺气；使药炒甘草，味甘入脾，健脾和中，调和药性。上述 10 味药共同配合，奏以补升降运之功，益气健脾，渗湿止泻，可谓是健脾渗湿第一方。从中医学的角度来讲，免疫与卫气存在紧密的关联，卫气来源于脾胃所化生水谷精微中的剽悍滑利部分，故参苓白术散能够影响人体的免疫功能从而调控膝骨关节炎慢性炎症的发展。

文章通过对参苓白术散进行网络药理学分析可知其活性成分有 109 个，其中木犀草素、山奈酚、 β -谷甾醇可能是参苓白术散治疗膝骨关节炎的关键成分。木犀草素具有抗炎、抗氧化活性、保护软骨和抗肿瘤等作用。有研究发现在骨关节炎小鼠中，木犀草素显著抑制核转录因子 κ B 和 MAPK 通路^[12-13]，降低了白细胞介素 1 β 诱导的一氧化氮、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子 α 、基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 8 和基质金属蛋白酶 9 的产生与磷酸化，同时降低了环氧合酶 2，诱导性一氧化氮合酶、基质金属蛋白酶 1，基质金属蛋白酶 3 和基质金属蛋白酶 13 的表达水平，逆转了由白细胞介素 1 β 诱导的 II 型胶原蛋白的降解。还有研究发现其

能下调一氧化氮，肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 的表达，减轻炎症反应，保护软骨细胞^[14]。山奈酚具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤等功能。LI 等^[15]发现山奈酚可调节巨噬细胞 M1/M2 型极化，M1 细胞具有促炎及加速软骨破坏的功能，加速膝骨关节炎病程的进展^[16]。LEE 等^[17]发现山奈酚可抑制白细胞介素 1 β 从而抑制 RANKL 和 MAOKs 等对软骨的破坏。XIAO 等^[18]发现山奈酚可有效抑制 ROS 途径，从而降低炎症水平。 β -谷甾醇也被证明具有抗炎、免疫调节及镇痛等效果^[19]，但目前尚无 β -谷甾醇与膝骨关节炎相关的基础研究，值得在后续深入探索。结合分子对接结果可见，山奈酚、 β -谷甾醇可靶向调控 CASP3, AKT1, PTGS2 等减缓膝骨关节炎病程的发展，可见参苓白术散活性成分多具有抑制炎症、抗氧化、保护软骨基质等功能。

根据 PPI 网络分析结果，可以发现 PTGS2, CASP3, AKT1, MAPK1, MAPK8, TP53 和 EGFR 等为关键靶点基因。PTGS2 亦称为环氧合酶 2，此基因作为炎症过程中的重要靶点，可将花生四烯酸转化为 PGH2 进而导致炎症^[20]，选择性环氧合酶 2 抑制剂塞来昔布等已被广泛用于临床膝骨关节炎治疗中并取得广泛疗效^[21-22]。CASP3 半胱氨酸蛋白酶 3 是调控凋亡的重要基因^[23]，ZHAROVA 等^[24]发现 CASP3 与滑膜炎的水肿及其他表现呈密切相关；有研究认为其可用于判断膝骨关节炎的预后及病情^[25]；同时研究表明山奈酚可有效抑制 CASP3 从而降低炎症^[26]。AKT1 蛋白激酶 B 是 PI3K/Akt 通路的关键调控因子，控制细胞生长和存活，文中 KEGG 分析得出 PI3K/Akt 通路亦是参苓白术散治疗膝骨关节炎的重要通路之一，研究表明 AKT1 表达的上调有利于软骨细胞的存活并促进软骨修复^[27]。MAPK1, MAPK8 是 MAPK 家族成员，来自体内、外模型的研究表明软骨的降解与 MAPK 的高表达相关^[28-29]。EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一，此信号通路对细胞的分化、增殖等细胞学过程起到重要的调节作用，研究指出 EGFR 信号与膝骨关节炎病理有关，迄今为止，大多数研究一致认为 EGFR 对关节软骨发挥双重作用：一方面，它通过刺激软骨细胞增殖和存活而发挥合成代谢作用；另一方面，EGFR 信号还通过抑制 Sox9 的表达而产生分解代谢作用，而 Sox9 是软骨形成主转录因子，从而抑制软骨基质蛋白（如 II 型胶原和聚集蛋白聚糖）的合成^[30]。可见参苓白术散可对部分经典的炎症、细胞凋亡和软骨代谢方面对膝骨关节炎靶点蛋白进行干预，从而影响膝骨关节炎病程的发展。

文章根据 GO 富集分析结果得出，参苓白术散治疗膝骨关节炎主要涉及与生物过程有关，主要涉及氧化应激、脂多糖、营养水平、肌肉细胞增殖及氧水平等生物过程。氧化应激是活性氧过量产生和超氧化物歧化酶水平降低的结果^[31]，年龄的增长和长期机械负荷不均都会增强软骨细胞的氧化应激水平^[32]。其中脂多糖已被证实存在于膝骨关节炎患者血液和滑膜中^[33]，能加速炎症的发生和促进凋亡^[33-34]，

同时脂多糖诱导动物膝骨关节炎模型已被广泛应用于实验。营养水平、肌肉细胞增殖及氧水平过程无疑与膝骨关节炎患者症状密切相关，其中营养水平与参苓白术散健脾功能相吻合，提升细胞营养代谢水平无疑能增强肌肉细胞增殖过程，改善患者肌肉萎缩，肌肉细胞增殖与氧水平过程更是与乏力的表现密切相关，这都体现了脾在体合肉、主四肢的生理功能。

KEGG 通路富集分析结果显示参苓白术散治疗膝骨关节炎主要涉及 PI3K-Akt、Zharova、白细胞介素 17 和 Th17 细胞通路。PI3K/Akt 是调节自噬的经典信号通路，对于关节软骨细胞的稳态平衡起重要作用^[35-36]，研究表明此通路在膝骨关节炎患者中被抑制^[37]；另一方面 PI3K/Akt 调控的核转录因子 κ B 通路也与炎症的发生密切相关^[38]。肿瘤坏死因子与膝骨关节炎的炎性表现密切相关^[39]，同时也与核转录因子 κ B 通路具有密切联系^[40]，抑制肿瘤坏死因子通路能有效延缓膝骨关节炎病程并提升患者的生活水平^[41]。Zharova17 为 TH17 细胞分泌的炎性物质，其与膝骨关节炎的病程严重程度密切相关^[42]，同时也可以调节肿瘤坏死因子通路的水平^[43]。以上 4 条通路都是经典的炎症通路，可见参苓白术散可通过调节炎症来干预膝骨关节炎病程。

综上所述，参苓白术散治疗膝骨关节炎从多成分、多靶点、多通路对疾病发展进行调控，其活性成分可能通过抑制炎症、调控凋亡、降低氧化应激等作用发挥疗效。文章为参苓白术散的临床应用提供了一定的理论基础，亦为后续的研究提供一定的方向，但存在一定局限性：首先，该研究结果为虚拟预测结果，还需开展后续实验进一步验证；其次，中药复方成分复杂，活性成分间相互作用、体内药物代谢动力学、对各靶点的调控强度等影响并不能完全纳入计算中，因此确切的机制仍需要进一步的深入研究。因此，课题组后期的研究可以从以下几方面入手：①围绕参苓白术散复方开展“病-证-方”关联网络研究，基于课题组的临床实践构建岭南地区“膝痹-脾虚湿阻证-参苓白术散”研究模型，开展临床以及基础研究，以期为岭南地区膝痹病的临床治疗提供新的思路；②对参苓白术散的核心成分如木犀草素、山奈酚和 β -谷甾醇等，展开针对性的基础研究，如拆方验证、含药学清复方活性成分提取、血清药理学和动物细胞模型验证等。木犀草素及山奈酚对软骨细胞行为学如增殖、分化的调控已有研究报道，课题组可选择不同的切入点如巨噬细胞极化、外泌体、细胞焦亡和 m6A 调控等进行研究或者针对软骨外组织如滑膜/脂肪垫展开研究；同时，目前尚无 β -谷甾醇与膝骨关节炎相关的基础研究，课题组未来可初步探讨其对软骨细胞的生物学调控，以期为新药的开发寻求新的思路。

作者贡献：第一、二作者和通讯作者设计此文章。所有数据均由第一作者进行收集分析。其他作者共同参与研究讨论。第一作者成文。通

讯作者审核。

经费支持：该文章接受了“广东省中医药管理局科研项目(20191021)”及“广东省医学科学技术研究基金项目(A2020071)”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，没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道，不存在利益冲突。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过广州中医药大学生物统计学专家审核。

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] GLYN-JONES S, PALMER AJ, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis. Lancet. 2015;386(9991):376-387.
- [2] HÜGLE T, GEURTS J. What drives osteoarthritis?-synovial versus subchondral bone pathology. Rheumatology. 2017; 56(9):1461-1471.
- [3] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南(2018 年版)[J]. 中华骨科杂志, 2018,38(12):705-715.
- [4] MA Q, OUYANG Y, MENG F, et al. A review of pharmacological and clinical studies on the application of Shenling Baizhu San in treatment of ulcerative colitis. J Ethnopharmacol. 2019;244:112105.
- [5] 高玲玲, 单颖. 参苓白术散对感染鼠伤寒沙门菌小鼠的免疫调节作用[J]. 现代预防医学, 2019,46(8):1450-1455.
- [6] 周波, 戴飞跃. 参苓白术散对胃癌 IV 期患者外周血 CD4+CD25+ Tregs 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2015,35(5):50-52.
- [7] LV WJ, LIU C, LI YF, et al. Systems Pharmacology and Microbiome Dissection of Shen Ling Bai Zhu San Reveal Multiscale Treatment Strategy for IBD. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:8194804.
- [8] 潘玉甄. 参苓白术散加减联合非布司他治疗非急性期痛风性关节炎脾虚湿阻证的临床观察[D]. 福州: 福建中医药大学, 2020.
- [9] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines. J Cheminform. 2014;6:13.
- [10] XUE R, FANG Z, ZHANG M, et al. TCMID: Traditional Chinese Medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis. Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):D1089-D1895.
- [11] 曾令烽, 杨伟毅, 梁桂洪, 等. 岭南中医湿证与慢性病防治创新模式探讨[J]. 中华中医药杂志, 2019,34(6):2345-2349.
- [12] FEI J, LIANG B, JIANG C, et al. Luteolin inhibits IL-1 β -induced inflammation in rat chondrocytes and attenuates osteoarthritis progression in a rat model. Biomed Pharmacother. 2019;109: 1586-1592.

- [13] LEE SA, PARK BR, MOON SM, et al. Chondroprotective effect of cynaroside in IL-1 β -Induced primary rat chondrocytes and organ explants via NF- κ B and MAPK signaling inhibition. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:9358080.
- [14] XUE J, YE J, XIA Z, et al. Effect of luteolin on apoptosis, MAPK and JNK signaling pathways in guinea pig chondrocyte with osteoarthritis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2019;65(6):91-95.
- [15] LI Y, ZHENG D, SHEN D, et al. Protective effects of two safflower derived compounds, kaempferol and hydroxysafflor yellow a, on hyperglycaemic stress-induced podocyte apoptosis via modulating of macrophage M1/M2 polarization. *J Immunol Res*. 2020;2020:2462039.
- [16] XIE J, HUANG Z, YU X, et al. Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019;46:36-44.
- [17] LEE WS, LEE EG, SUNG MS, et al. Kaempferol inhibits IL-1 β -stimulated, RANKL-mediated osteoclastogenesis via downregulation of MAPKs, c-Fos, and NFATc1. *Inflammation*. 2014;37(4):1221-1230.
- [18] XIAO HB, LU XY, LIU ZK, et al. Kaempferol inhibits the production of ROS to modulate OPN- α v β 3 integrin pathway in HUVECs. *J Physiol Biochem*. 2016;72(2):303-313.
- [19] BABU S, JAYARAMAN S. An update on β -sitosterol: a potential herbal nutraceutical for diabetic management. *Biomed Pharmacother*. 2020;131:110702.
- [20] KURUMBAIL RG, KIEFER JR, MARNETT LJ. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol*. 2001;11(6):752-760.
- [21] SHARMA V, BHATIA P, ALAM O, et al. Recent advancement in the discovery and development of COX-2 inhibitors: insight into biological activities and SAR studies (2008-2019). *Bioorg Chem*. 2019;89:103007.
- [22] PULJAK L, MARIN A, VRDOLJAK D, et al. Celecoxib for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;5(5):Cd009865.
- [23] THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-1316.
- [24] ZHAROVA TA, KOGAN EA, MAKAROV VI, et al. Correlation of synovial caspase-3 concentration and the photodynamic effectiveness in osteoarthritis treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;30:101669.
- [25] YASSIN AM, ABUBAKR HO, ABDELGALIL AI, et al. COL2A1 and Caspase-3 as promising biomarkers for osteoarthritis prognosis in an equus asinus model. *Biomolecules*. 2020;10(3):354.
- [26] ABDULLAH A, RAVANAN P. Kaempferol mitigates endoplasmic reticulum stress induced cell death by targeting caspase 3/7. *Sci Rep*. 2018;8(1):2189.
- [27] ZHAO X, WANG T, CAI B, et al. MicroRNA-495 enhances chondrocyte apoptosis, senescence and promotes the progression of osteoarthritis by targeting AKT1. *Am J Transl Res*. 2019;11(4):2232-2244.
- [28] DONG YH, WANG P, YANG YG, et al. PRMT5 inhibition attenuates cartilage degradation by reducing MAPK and NF- κ B signaling. *Arthritis Res Ther*. 2020;22(1):201.
- [29] CHU X, YU T, HUANG X, et al. Tomatidine suppresses inflammation in primary articular chondrocytes and attenuates cartilage degradation in osteoarthritic rats. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(13):12799-12811.
- [30] QIN L, BEIER F. EGFR signaling: friend or foe for cartilage? *JBMR Plus*. 2019;3(2):e10177.
- [31] BOLDUC JA, COLLINS JA, LOESER RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2019;132:73-82.
- [32] KOIKE M, NOJIRI H, OZAWAY, et al. Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. *Sci Rep*. 2015;5:11722.
- [33] HUANG ZY, STABLER T, PEI FX, et al. Both systemic and local lipopolysaccharide (LPS) burden are associated with knee OA severity and inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(10):1769-1775.
- [34] JIN J, YU X, HU Z, et al. Isofraxidin targets the TLR4/MD-2 axis to prevent osteoarthritis development. *Food Funct*. 2018;9(11):5641-5652.
- [35] ZHONG JT, YU J, WANG HJ, et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on the autophagy, apoptosis, and chemotherapy resistance of human breast cancer cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Tumour Biol*. 2017;39(5):1010428317697562.
- [36] DIBBLE CC, CANTLEY LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol*. 2015;25(9):545-555.
- [37] ROSA SC, RUFINO AT, JUDAS F, et al. Expression and function of the insulin receptor in normal and osteoarthritic human chondrocytes: modulation of anabolic gene expression, glucose transport and GLUT-1 content by insulin. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(6):719-727.
- [38] CHOI MC, JO J, PARK J, et al. NF- κ B signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction. *Cells*. 2019;8(7):734.
- [39] CHISARI E, YAGHMOUR KM, KHAN WS. The effects of TNF- α inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(5):708-718.
- [40] WEHLING N, PALMER GD, PILAPIL C, et al. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor α inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF- κ B-dependent pathways. *Arthritis Rheum*. 2009;60(3):801-812.
- [41] OSSENDORFF R, GRAD S, STODDART MJ, et al. Autologous Chondrocyte Implantation in Osteoarthritic Surroundings: TNF α and Its Inhibition by Adalimumab in a Knee-Specific Bioreactor. *Am J Sports Med*. 2018;46(2):431-440.
- [42] 冯方, 刘英, 彭毅, 等. 膝关节炎患者关节滑液中 IL-17 水平与疾病严重程度的相关性 [J]. *西部医学*, 2020,32(6):845-848.
- [43] 王迷娜, 刘璐, 赵洛鹏, 等. 膝关节炎炎症因子及信号通路的研究进展 [J]. *中国骨伤*, 2020,33(4):388-392.

(责任编辑: WJ, ZN, SX)