基于网络药理学及分子对接探究山柰酚调控 PI3K/AKT 信号通路治疗骨质疏松的潜在机制

王慧玺[1],罗峥伟[1],赵灿斌[2],孙宏章[1],陈东峰[3],李晓阳[3],管东辉[3]*

[1]山东中医药大学第一临床医学院,济南 250014;
[2]广西中医药大学第一临床医学院,南宁 530200;[3] 山东中医药大学附属医院骨科,济南 250014

摘　要:基于网络药理学及分子对接探讨山柰酚治疗骨质疏松症的治疗作用,并初步探究其潜在作用机制。通过数据挖掘形式寻找山柰酚的 2D 结构式并进行初步筛选,将符合条件的化合物进行预测靶点,同时挖掘对骨质疏松的靶点数据进行预测后取交集,制作蛋白质互作网络,进行 GO、DO、KEGG 网络分析,并筛选出核心蛋白,对所得靶点及药物中化合物进行分子对接验证。通过数据库挖掘并进行 degree 值排序后得到山柰酚靶点 99 个、骨质疏松靶点 5 937 个,得到 PPI 网络发现 AKT1、GSK3B、PIK3CG、PIK3R1 四个点位度值较大处于较核心位置。GO 富集分析发现生物过程中涉及大量对刺激的反应及磷酸化过程,其中生物过程涉及磷酸盐代谢过程的调节、对磷代谢过程的调节作用,分子功能涉及磷酸转移酶活性、转移含磷基团核受体活性;DO 显示骨与关节疾病的基因富集于第 10 位,较为靠前的位置;KEGG 结果显示,较大数量靶点富集在于癌症、肿瘤相关通路,其中包括 PI3K/AKT 信号通路相关靶点。分子对接结果表明山柰酚与 AKT1、GSK3B、PIK3R1、PIK3CG 均能形成多条氢键并存在较强结合能。以上结果表明,山柰酚具有多靶点调控的优势,可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路的相关基因及干预蛋白的表达,来发挥对骨质疏松症的治疗作用。

关键词:山柰酚;骨质疏松;网络药理学;分子对接;PI3K/AKT 信号通路

中图分类号:R274.9　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2024)Suppl-0107-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.S.014

Potential mechanism of kaempferol on the regulation of PI3K/AKT signaling pathway for the treatment of osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking

WANG Hui-xi[1],LUO Zheng-wei[1],ZHAO Can-bin[2],
SUN Hong-zhang[1],CHEN Dong-feng[3],LI Xiao-yang[3],GUAN Dong-hui[3]*

[1]*The First Clinical Medical College,Shandong University of Traditional Chinese Medicine,Jinan 250014,China*;
[2]*The First Clinical Medical College,Guangxi University of Traditional Chinese Medicine,Nanning 530200,China*;
[3]*Department of Orthopedics,Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine,Jinan 250014,China*

Abstract:In this study,the therapeutic efficacy of kaempferol in the management of osteoporosis was scrutinized through the integration of network pharmacology and molecular docking techniques,with an initial foray into elucidating its underlying mechanism. Within the context of this paper,an extensive search for the two-dimensional structural formula of kaempferol was conducted,followed by a preliminary screening of potential compounds via data mining,which were subsequentially predicted as putative targets. Concurrently,protein-protein interaction networks were meticulously constructed through the exploitation of osteoporosis-related target data for predictive analysis. An in-depth examination of GO,DO,and KEGG pathways was performed. The pivotal protein nodes were identified,and the veracity of the target compound within the pharmacological agent was substantiated through molecular docking. Through comprehensive database mining and degree-based ranking,a total of 99 kaempferol targets and 5 937 osteoporosis targets were ascertained. Within the PPI network,the central nodes AKT1,GSK3B,

收稿日期:2024-07-26　　接受日期:2024-09-03
基金项目:山东省自然科学基金(ZR2022MH147);山东省中医药科技发展项目(2020Q016)
* 通信作者 E-mail:guanyisheng0720@163.com

天然产物研究与开发

PIK3CG, and PIK3R1 were observed to occupy prominence with elevated degree values. GO enrichment analysis revealed a preponderance of biological processes responsive to stimuli and phosphorylation events, inclusive of the regulation of phosphate metabolism, phosphorus metabolism regulation, and the phosphotransferase activity and nuclear receptor activity associated with the conveyance of phosphorous groups under molecular function. The DO analysis indicated that genes pertained to bone and joint disorders were significantly enriched within the 10th percentile, signifying notable proximity to the forefront. KEGG pathway analysis disclosed a substantial enrichment of targets within pathways associated with cancer and tumorigenesis, encompassing those pertinent to the PI3K/AKT signaling pathway. Molecular docking results demonstrated that kaempferol could form multiple hydrogen bonds with AKT1, GSK3B, PIK3R1, and PIK3CG, and had strong binding energy. The above results indicated that kaempferol possessed the advantage of multi-target regulation, and might have exerted therapeutic effects on osteoporosis by regulating the expression of related genes and interventional proteins in the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: kaempferol; osteoporosis; network pharmacology; molecular docking; PI3K/AKT signaling pathway

骨质疏松(osteoporosis)是一种以全身性骨量减少,成骨细胞和破骨细胞作用失衡为特点的代谢性骨病[1]。其临床特征为骨总量减少,骨单位遭到破坏,患者容易因轻微暴力而导致骨折。骨质疏松症由于其病程周期长、治疗效果不显著、治疗成本高的特点,加之我国正处于人口老龄化趋势的上升阶段,已经日益成为家庭及经济社会面临的严峻挑战[2],研究表明,由于未能得到充分的重视,继高血压、糖尿病之后,骨质疏松症已高居慢性病第三位[3]。研究显示,随着老年人口的快速增长,我国的医疗服务利用率不断攀升,医疗支付体系压力持续增大,针对骨质疏松症的前沿药物研发亟待解决[4]。现代医学对于该病尚无明确的系统治疗手段,主要以双膦酸盐类如阿仑膦酸钠、利塞膦酸钠,RANKL 抑制剂地舒单抗,降钙素类鲑降钙素,选择性雌激素受体调节剂雷洛昔芬类等西医药治[5],但存在其长期应用包括胃肠道不良反应、眩晕、呼吸抑制、一过性“流感样”症状、肾脏毒性及下颌骨坏死等,更有甚者纵使降低了骨折发生率,但增加了罹患子宫内膜癌、乳腺癌、心血管疾病等的风险[6],影响患者治疗结局、依从性,远期预后一般因此寻找毒副作用小,疗效好的药物治疗骨质疏松显得尤为迫切。

中医将骨质疏松归属为“骨痹”“骨痿”“骨枯”“骨蚀”“骨缩”等范畴,是指由多种因素导致的以筋骨痹阻、萎软为主要病变特征的全身性慢性退行性疾病。《灵枢·刺节真邪》曰:“虚邪之中人也,洒晰动形,起毫毛而发腠理。其入深,内搏于骨,则为骨痹。”《素问·痿论》曰:“肾者水脏也,今水不胜火,则骨枯而髓减,故足不任身,发为骨痿。”[7]传统中医药因其源远流长的学术思想及简便廉验的临床效果深入人心,其中中药因其制作简易、方便快捷、成本亲民、效果显著的特性在治疗骨质疏松方面有着独特优势。根据中医理论,骨质疏松症可分为肾虚型、脾虚型、肝肾阴虚型、痰湿阻滞型等不同的证型,其中淫羊藿、骨碎补、杜仲、葛根、女贞子、蛇床子等药物常作为主要药物配伍使用[8]。研究表明,骨碎补可以抑制破骨细胞的分化,对成骨细胞的增殖起积极作用,并能加速细胞周期;淫羊藿能够促进骨形成,抑制骨吸收,对骨重建起到平衡作用[9]。山柰酚作为骨碎补和淫羊藿的主要活性成分之一,对骨代谢有着积极的治疗作用,研究表明山柰酚可以以靶向调控多种信号通路的方式介导骨髓间充质干细胞,进而对成骨细胞与破骨细胞的分化、增殖和凋亡活动进行调控,最终达到防治骨质疏松症的目的[10]。但是其具体的分子作用机制研究国内外尚未有全面报道。

作为近些年新出现的现代生物信息学技术,网络药理学及分子对接技术对于药物靶点等探索具有巨大优势[11]。此外,研究表明,PI3K/AKT 信号通路同时介导成骨细胞与破骨细胞,对维持骨单位的稳定关系发挥了不可小觑的作用[12]。故本文章基于网络药理学及分子对接技术研究山柰酚调控 PI3K/AKT 信号通路治疗骨质疏松的潜在机制,为其中重要提取物的临床应用提供理论支持

1 材料与方法

1.1 数据库与软件

数据库:SwissTargetPrediction(http://swisstarget-prediction.ch/)、OmicShare Tools(https://www.omicshare.com/tools/)、GeneCards(https://www.genecards.org)、化源网(https://www.chemsrc.com/casindex/)、UniProt(https://www.uniprot.org/)、PubChem(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)、

天然产物研究与开发

Draw Venn diagrams (https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/)、String(https://cn.string-db.org)、PharmMapper (https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html)、g: Profile (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/convert)。

软件:Pymol(4.6.0)、Cytoscape (3.9.0)、OpenBabel(3.1.1)、Prism10(10.2.3)、Auto Dock(4.2.6)。

1.2　方法

1.2.1　山柰酚及骨质疏松靶点获取

山柰酚:由化源网、PubChem 获取 SDF 分子结构式,使用 SwissTargetPrediction、PharmMapper 预测基因,获取 CSV 格式文件并取两组数据交集,删除其中重复值。

骨质疏松:由 GeneCards 输入"osteoporosis"获得相关基因 CSV 文件。

1.2.2　交集基因及 PPI 网络图的构建

把"1.2.1"的获取文件导入获取 OmicShare Tools 交集靶点信息,导入 String 数据库,下载 TSV 格式文件,导入 Cytospace 3.9.1 进行拓扑计算及图片渲染,根据拓扑计算名单筛选 degree 值 >20 的核心靶点,再次构建核心 PPI 网络图

1.2.3　GO 及 DO 富集分析

把"1.2.1"的获取交集靶点基因通过 g:Profile 将 ID 名称转换为 ESGNID,然后获取交集靶点基因,导入 OMICshare 生物云平台工具,选择动态 GO 分析及 DO 分析得出结果

1.2.4　分子对接处理

在 KEGG 中分析结果 PI3C/AKT 通路中相关靶点并由 UniProt 数据库获取相关靶点的三级结构式,通过 PubChem 获得山柰酚的 pdb 结构格式文件,通过 Pymol、Autodock1.5.7 进行分子对接可视化处理

2　结果

2.1　PPI 网络构建

由 SwissTargetPrediction 获得 102 个预测基因,由 PubChem 获得 293 个预测基因,通过合并数据一共获得山柰酚靶点 358 个,骨质疏松靶点 5 936 个。其中交集基因共 203 个,构建 PPI 网络后发现 1 个 GPR36 靶点未参与网络构建,在 Cytoscape3.9.1 中拓扑计算后,选择 degree 值 >20 的靶点 99 个,构建核心 PPI 网络,结果见图 1A、1B。

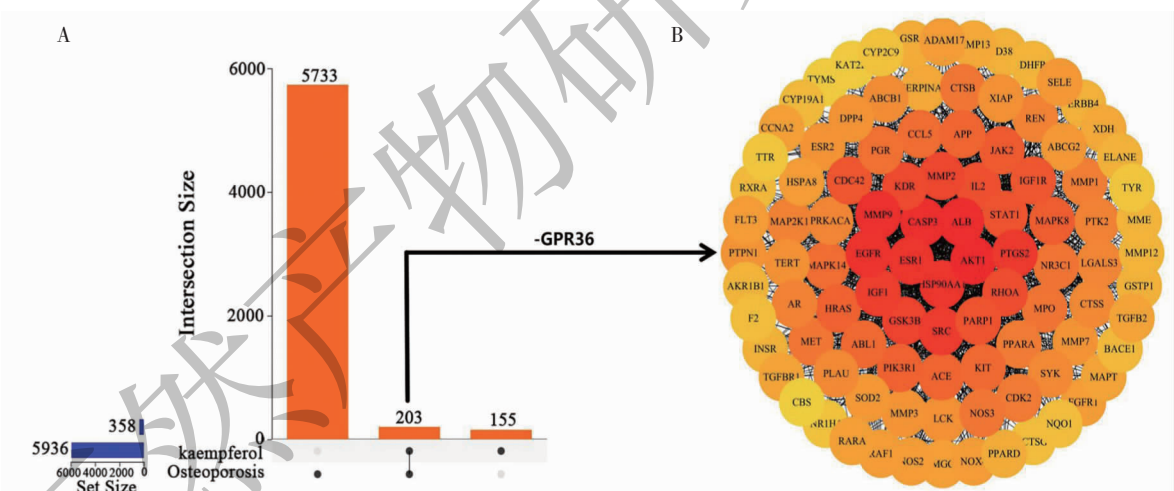

图 1　预测基因靶点取交集后按 degree 值排序构建核心 PPI 网络

Fig. 1　Construction of the core PPI network by sorting the intersection of predicted gene targets based on degree value

2.2　GO、DO 富集结果分析

将 99 个核心靶点进行 GO 富集分析,分析结果得到生物过程(biological process,BP)、细胞组分(cell component,CC)、分子功能(molecular function,MF)数据条目表单。各类比条目取前 20 个制作 GO 富集图,共涉及磷酸盐代谢过程的调节、对磷代谢过程的调节作用、对细胞群增殖的调节作用、磷酸转移酶活性、醇基为受体激酶活性、转移酶活性、转移含磷基团、核受体活性等。DO 富集分析发现:骨与关节疾病富集在第 10 位,有 60 个基因参与骨与关节疾病过程,如图 2 所示。

2.3　KEGG 信号通路富集分析结果

KEGG 结果见显示得到癌症通路、PI3K-AKT 信号通路、MAPK 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、松弛素信号通路、VEGF 信号通路、化学致癌作用-受体激活等多条信号通路,取前

天然产物研究与开发

20 个通路制作 KEGG 分析(见图 3),其中包括 PI3K/AKT 信号通路相关靶点。4 个靶点富集在 PI3K/AKT 信号通路中,分别是 AKT1、GSK3B、PIK3CG、PIK3R1。

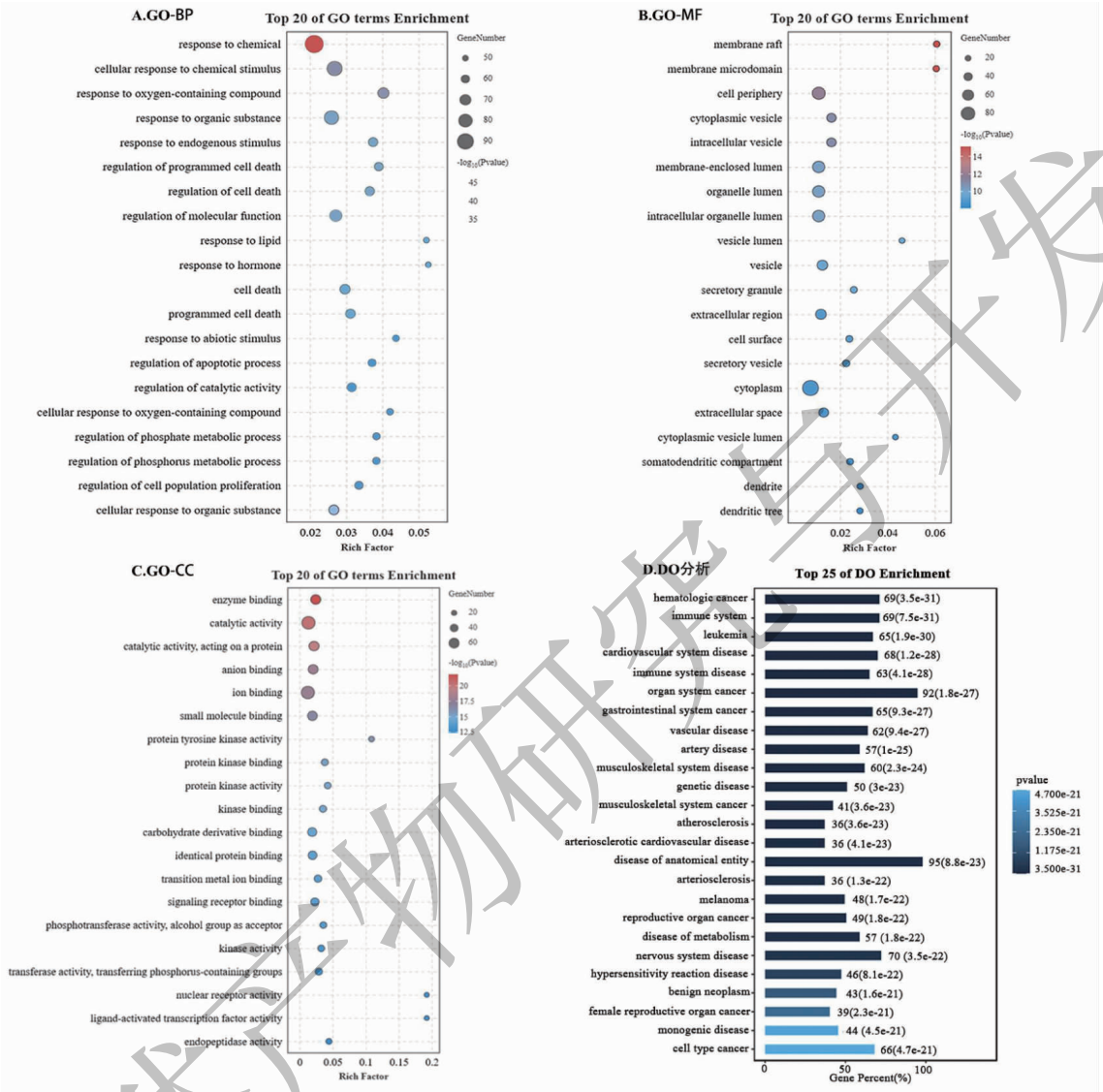

图 2 GO 富集分析和 DO 疾病富集分析结果

Fig. 2 Results of GO enrichment analysis and DO disease enrichment analysis

2.4 分子对接

使用 Pymol、Autodock 软件进行对接前处理及对接并将结果可视化(见图 4)。结果显示,山柰酚与 AKT1、GSK3B、PIK3CG、PIK3R1 等小分子存在较强结合能,易于结合。其中山柰酚-AKT1 信号通路可见 3 条氢键于 His-967、Asp-837 位点形成,对接能为-6.83 kcal/mol ;山柰酚-PIK3CG 信号通路,可见 3 条氢键于 His-967、Asp-837 位点形成,对接能为-5.44 kcal/mol;山柰酚-GSK3B 信号通路,可见 2 条氢键于 Lys-94、Ser-119 位点形成,对接能为-7.92 kcal/mol;山柰酚-PIK3R1 信号通路,可见 6 条氢键于 Glu-666、Ser-709、Val-667、Lys-668、His-669 位点形成,对接能为-8.36 kcal/mol。

3 讨论与结论

随着我国人口老龄化的加剧,骨质疏松发生率日益升高,对高龄群体生命财产安全带来沉重负担。中医将骨质疏松归属为“骨痹”“骨痿”“骨枯”“骨蚀”“骨缩”等范畴,《灵枢·刺节真邪》曰:“虚邪之中人也,洒晰动形,起毫毛而发腠理。其入深,内搏于骨,则为骨痹。”《素问·痿论》曰:“肾者水脏也,今水不胜火,则骨枯而髓减,故足不任身,发为骨痿。”中药因其源远流长,简便廉验深入人心,在骨

天然产物研究与开发

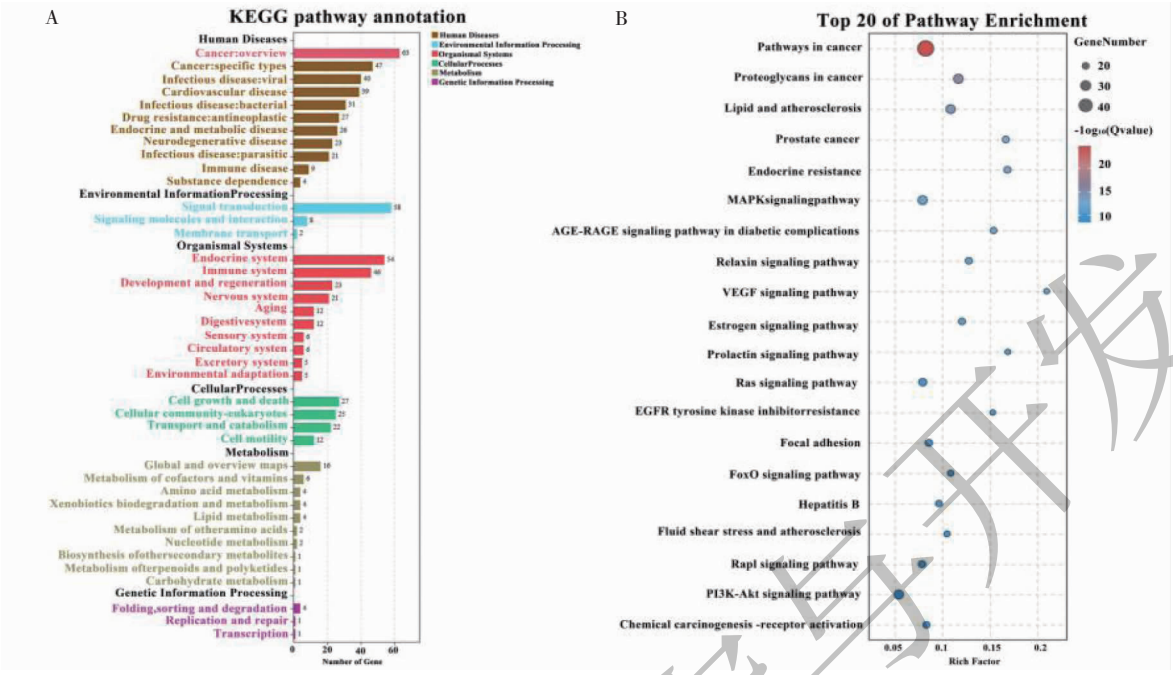

图 3　KEGG 信号通路富集分析结果

Fig. 3　Results of KEGG signaling pathway enrichment analysis

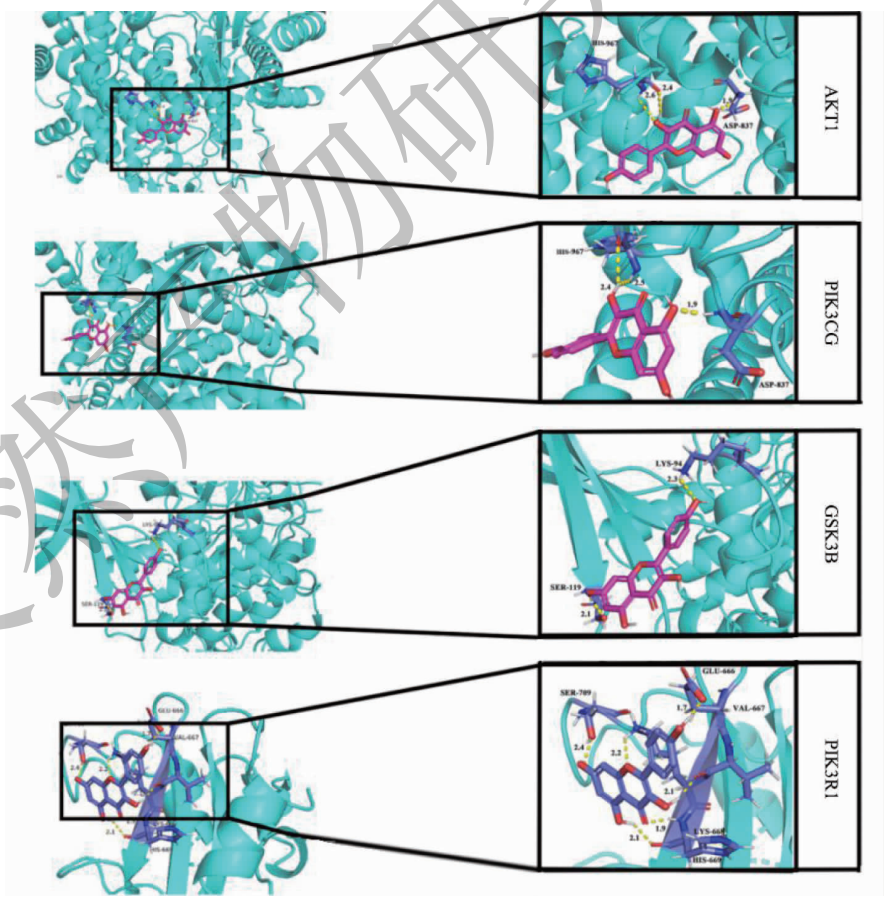

图 4　山柰酚与 AKT1、GSK3B、PIK3CG、PIK3R1 对接的可视化结果

Fig. 4　Visualization of docking results between kaempferol and AKT1, GSK3B, PIK3CG, and PIK3R1

天然产物研究与开发

质疏松治疗中发挥了巨大贡献并不断被后人研究，其中骨质疏松常用药骨碎补可以抑制破骨细胞的分化，对成骨细胞的增殖起积极作用，并能加速细胞周期；淫羊藿能够促进骨形成，抑制骨吸收，对骨重建起到平衡作用。山柰酚作为骨碎补和淫羊藿的主要活性成分之一，对骨代谢有着积极的治疗作用[13]，山柰酚是一种四羟基黄酮，在抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多方面发挥着药理学活性。大量研究表明，山柰酚可以通过诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭，通过靶向调控多种信号通路的方式介导骨髓间充质干细胞，进而对成骨细胞与破骨细胞的分化、增殖和凋亡活动进行调控，最终达到防治骨质疏松症的目的[14,15]。这与前人研究有着高度一致性。

PI3K/AKT 信号通路对骨代谢有着重要的调控作用，研究表明，通过调控 PI3K/AKT 信号通路，可以调节成骨与破骨之间的平衡，对骨代谢产生影响[16]。本研究 KEGG 富集分析显示，槲皮素有四个靶点参与了 PI3K/AKT 信号通路调控，分别是：PIK3R1、PIK3CG、AKT1、GSK3B，研究表明 PI3K 的磷酸化对 PI3K/AKT 信号通路的激活有着重要作用[17]，p-PI3K 加速 AKT 磷酸化过程，从而对下游靶点产生调控作用[18,19]。AKT1 作为 AKT 蛋白家族对骨代谢有着重要的影响，研究表明抑制 AKT1 磷酸化，可抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活，从而对成骨过程产生抑制作用[20,21]。研究表明，AKT 磷酸化后可激活 PI3K/AKT 信号通路，并磷酸化 GSK3β，进一步调控 Wnt/β-catenin 通路，从而对骨代谢过程产生影响[22]。GSK3β 磷酸化后失活，Wnt/β-catenin 中的降解复合体解体，使 β-catenin 在胞质中的积累并促进其入核，促进下游基因转录[23,24]。这与 GO 结果显示，大量基因涉及细胞增殖及凋亡过程，且 DO 显示大量基因涉及骨与关节疾病这与前人研究高度一致。

但是在实践操作中，网络药理学分析结果中经常可以看到某些化合物被标注为多种疾病的有效成分，这种非特异性和非指导性的结果降低了分析的可信度。现有成分、靶点、疾病等数据的质量以及预测靶点算法的准确性直接影响到最终的研究结果。且研究结果需要进行实验验证以确保其可靠性。在未经验证的情况下，这些结果的价值受到限制。同时中药复方网络药理学得到的靶点主要是基于单味中药成分的预测靶点叠加得到，但这种方法得到的靶点准确率较低。并且在临床实践中不同的中药炮制和煎煮方法会影响药物的疗效，使得实验或临床使用的中药补剂成分更加复杂。

综上所述，山柰酚具有多靶点调控的优势，可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路的相关基因及蛋白的表达，来对骨质疏松产生一定的治疗作用。

参考文献

1 Li AQ, Zhang R, Ma JH, et al. Research progress on the application of zebrafish model in the prevention and treatment of osteoporosis with traditional Chinese medicine[J/OL]. J Shaanxi Univ Traditional Chinese Medicine(陕西中医药大学学报): 1-7[2024-10-22]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1501.R.20240524.1846.007.html.

2 Li JB. Osteoporosis prevention and treatment[N]. Gansu Keji Bao(甘肃科技报), 2024-03-28(8).

3 Chen TT, Peng T. Research progress of traditional chinese medicine in the treatment of osteoporosis[J]. J Pract Tradit Chin Intern Med(实用中医内科杂志), 2024, 38: 141-143.

4 Ying J, Song JY, Gao CS. Population aging, medical and health expenditure and employment: analysis of the mechanism based on health human capital and technology level[J]. Northwest Popul J(西北人口), 2024, 45: 79-91.

5 Li C. Clinical efficacy of dapagliflonzin combined with denosumab in the treatment of osteoporosis[J]. Chin J Urban Rural Enterp Hyg(中国城乡企业卫生), 2024, 39: 27-30..

6 Zhang Y, You RX, Zhang C. Expert consensus on rational use of anti-osteoporosis agents (2023)[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2024, 44: 985-1006.

7 Sun SX, Feng QJ, Zhao LJ, et al. Progress of research on the role of Chinese medicine in bone reconstruction[J]. Clin J Tradit Chin Med(中医药临床杂志), 2023, 35: 394-398.

8 Wang XP, Ren WL, Cheng MH, et al. Overview of the etiology and management of osteoporosis in the elderly[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med(天津中医药大学学报), 2024, 43: 356-362.

9 Ren KX. Research progress of Chinese medicine in the treatment of osteoporosis[J]. Inner Mongolia Tradit Chin Med(内蒙古中医药), 2024, 43: 161-163.

10 Yang QP, Chen F, Cui W, et al. Signaling pathways related to kaempferol active monomers in the treatment of osteoporosis[J]. Chin J Tissue Eng Res(中国组织工程研究), 2024, 28: 4242-4249.

11 Liao YN, Zhao Kl, Guo HW. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2024, 55: 4204-4213.

天然产物研究与开发

12 Yang YQ, Li L, Zhao N, et al. Advances in the relationship between PI3K/AKT signalling pathway and osteoporosis[J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志),2022,42:6144-6148.

13 Wu P, Yang X, Gao S, et al. Mechanism of Herba Cistanches-Epimedium Herb-Fortune's Drynaria Rhizome in the treatment of osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking[J]. J Med Inform(医学信息),2024,37:1-6.

14 Zhang JL. To explore the mechanism of kaempferol and formononetin against non-small cell lung cancer based on network [D]. Jinan Shandong University of Chinese Medicine(山东中医药大学)2023.

15 Wang L, Liao ZW, Zhao LL, et al. Research progress of anticancer mechanism of kaempferol[J]. Chin J Bioproc Eng(生物加工过程),2024,22:325-330.

16 Kong LJ, Lu H, Wang X, et al. Protective effect and mechanism of quercetin on cardiac and renal functions in rats with cardiorenal syndrome[J]. China Pharm (中国药房),2024,35:1612-1617.

17 Li NY, Liu GH, Zhang Y, et al. Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate induces apoptosis in mouse spermatogonia through the Rap1/PI3K/AKT pathway[J]. Mod Prev Med(现代预防医学),2024,51:2242-2247.

18 Qi PK, Hou DC, lv YF, et al. Mechanism study on apoptosis of osteoclasts induced by Guilu Erxian Jiao[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2024,42:86-90.

19 Chen X, Zheng XM, Shu YX, et al. Observation of neuroinflammatory response and PI3K/AKT signaling pathway-related protein expression in brain tissues of ICH rats after intraperitoneal injection of kaempferol[J]. Shandong Med J(山东医药),2024,64:19-24

20 Lu Y, Long HX. Effect and mechanism of combined treatment with Zhibai Dihuang Pills on idiopathic precocious puberty based on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, sex ho roles, and bone metabolism[J]. Clin Misdiagn Misther(临床误诊误治),2024,37:82-88.

21 Wang HY, Sun QG, Huang W, et al. Decoction for nourishing yin and invigorating kidney improves bone metabolism of diabetic rats complicated with ovariectomized osteoporosis through PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志),2024,33:911-916.

22 Shang LZ, Mao MD, Xu EP, et al. Effect of Chaihu Jia Longgu Mulitang on signaling pathway of PI3K/Akt/GSK3β/β-catenin in hippocampus tissue of rats with depression[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2020,26:12-19.

23 Zhang S, Gao ZH, Wang QH, et al. The mechanism of quercetin improving dox-induced myocardial injury in mice based on PI3K/AKT/GSK-3β/β-catenin pathway [J/OL]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技):1-11[2024-10-22]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023120038.

24 Wei A, Fan B, Zhao Y, et al. Overexpression of ST6Gal-I contributes to the progression of prostate cancer via PI3K/Akt/GSK-3β/β-catenin signaling pathway[C]//Proceedings of the 6th Pan-Bohai Rim Society for Biochemistry and Molecular Biology Symposium(第六届泛环渤海生物化学与分子生物学会学术交流会论文集),2016:26.

天然产物研究与开发