

· 学术探讨 ·

基于分子网络模型的中药调控骨重建的评价方法

刘艳秋¹ 于静华² 战丽彬³

摘要 中医药在防治骨质疏松方面具有明显优势和特色。许多抗骨质疏松中药能够对骨质疏松的关键病理环节——骨重建发挥多方面的整合调节。研究揭示中药调控骨重建的多成分、多靶点、整合作用机制,有待探索新的研究模式和方法。本文从骨重建的骨形成途径、骨吸收途径以及它们之间的相互作用角度,分析骨重建的发生发展过程,探讨体外构建骨重建的生物网络、疾病网络模型,进而构建成分—靶点网络模型,为中药调控骨重建研究提供新思路。通过建立中药成分—靶点对接的方法,阐明中药调控骨重建的多靶点作用机制,为抗骨质疏松中药的多靶点整合机理研究提供方法借鉴。

关键词 骨质疏松;骨重建;生物网络;中药;多靶点

Evaluation Methods for Chinese Herbal Drugs Regulating Bone Remodeling Based on Molecular Network Model LIU Yan-qiu¹, YU Jing-hua², and ZHAN Li-bin³ 1 Institute of Integrative Medicine, Dalian Medical University, Dalian (116044); 2 Institute of Virology and AIDS Research, First Hospital of Jilin University, Changchun (130000); 3 Second Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Liaoning (116023)

ABSTRACT Chinese medicine (CM) has played obvious advantages and characteristics in prevention and treatment of osteoporosis (OP). Many anti-OP Chinese herbal drugs (CHDs) possess various regulated activities on bone remodeling. However, the novel methods are needed for elucidation of multi-target mechanism of CHDs. The occurrence and development of bone remodeling were analyzed from bone formation pathways, bone resorption pathways, as well as their interaction. Biological network and disease-related network model of *in-vitro* bone remodeling were explored, and further compound-target network model established, thus providing new thinking ways for CHDs regulating bone remodeling. By establishing CHDs components-target docking, multi-target mechanisms of CHDs for regulating bone remodeling was clarified. In this way authors hoped to provide reference for multi-target mechanisms of anti-OP CHDs.

KEYWORDS osteoporosis; bone remodeling; biological network; Chinese herbal drugs; multi-target

中药的特色和优势在于多成分、多靶点、整合调节,这使中药在治疗疑难杂症方面表现出西药所无法比拟的优势。同时,中药这一复杂性也为其作用机制研究带来严峻挑战。近年来,西药研究模式已经从寻求单靶点药物向多靶点的组合药物研究转变。

如何通过现代科学研究手段和方法诠释中药的作用特色,建立适合中药多靶点整合作用研究的技术方法体系,对推动中药现代研究,揭示中药的作用机制以及开发研制创新中药都具有积极意义。本文以骨质疏松的关键病理环节——骨重建为出发点,探讨治疗骨质疏松中药调控骨重建的分子网络机制,期望对调控骨重建的中药多成分、多靶点、整合调节作用研究提供思路和方法。

1 骨重建的分子调控网络

骨重建是由破骨和成骨细胞介导的、发生于骨表面的,由破骨细胞启动、激活、骨吸收开始和与之相耦联的成骨细胞激活、骨形成、矿化结束的动态过程。骨重建的骨形成和骨吸收耦联现象于 1964 年即被

基金项目:国家自然科学基金面上项目 (No. 81473545)

作者单位:1.大连医科大学 中西医结合研究院(学院)(大连 116044);2.吉林大学第一医院艾滋病与病毒研究所(长春 130000);3.大连医科大学附属第二医院(大连 116023)

通讯作者:刘艳秋, Tel: 0411-86110193, E-mail: yqliu@dmu.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20171129.293

Frost 等人发现并定义^[1],但骨重建的调控机制却知之甚少。近些年来,一些研究集中于成骨和破骨细胞相互调控机制的研究。目前与骨重建失衡紧密相关的主要涉及 3 条途径^[2,3]:(1)Wnt 途径是调控骨形成的关键靶点通路,Wnt 蛋白以旁分泌形式作用于邻近细胞、包含 20 种家族成员的分泌性糖蛋白。当 Wnt 与其七次跨膜蛋白受体 Frizzled 结合,同时结合辅助受体低密度脂蛋白受体 LRP5/6,促进胞内的 dishevelled 蛋白(Dsh)活化,活化的 Dsh 使 GSK-3 β 磷酸化,磷酸化的 GSK-3 β 从 β -catenin、轴蛋白(Axin)及结直肠瘤性息肉病基因蛋白(APC)复合物中解离,使 β -catenin 移位至细胞核内,激活 Wnt 靶基因的转录,如 Axin2、DKK1、NKD1 等,促进骨形成。(2)OPG/RANKL/RANK 途径是影响破骨细胞形成的关键途径,阻断 RANKL 已经成为抑制骨吸收的重要靶点,其他的潜在靶点有阻断 RANKL/RANK 相互作用、阻断 RANK 下游信号的 TRAF2-JNK 和 TRAF6-NF κ B。(3)雌激素受体(estrogen receptor, ER)途径是较早研究调控骨重建的经典途径,虽然 ER α/β 调控骨重建的行为机制目前还没有完全阐释清楚,但各种雌激素受体选择性调节剂已经作为抑制骨吸收、治疗骨质疏松的药物^[4]。以上任何单一途径均不能有效调控骨重建的骨形成与骨吸收的耦联平衡。Wnt 途径与 OPG/RANKL/RANK、ER α/β 途径在介导骨形成和骨吸收耦联过程中在胞内分子(如 NF- κ B),胞外分子间(如促耦联因子 RANKL、FSH),抑制耦联因子(如 calcitonin、estrogen、Sema3A 等),存在交叉对话及相互作用^[4,5],它们形成生物信号网络是维持骨重建平衡的重要因素。可见,维持骨重建的稳定并非由骨形成或骨吸收各自独立的功能决定,而是由调节骨形成和骨吸收功效的相关分子共同参与的。因此,针对单一途径或单一过程,如促进骨形成或抑制骨吸收的药物调控都有可能对与之相耦联的另一过程引起负面影响。

由此可见,骨重建的发生机制主要是由骨形成与骨吸收介导的分子网络调控。因此,考虑信号途径间的互串关系及蛋白间的相互作用将更加符合骨重建的发生发展过程。本项目组已体外构建成骨细胞前体——骨髓间充质干细胞、破骨前体及卵泡颗粒细胞的共培养模型^[6],在此多细胞培养模型基础上,不仅可同时评价骨形成与骨吸收调控分子等多种相互关联的分子表达水平,而且适合对中药多靶成分以及多靶点整合调节机理的研究,有利于发现既能促进骨形成又能抑制骨吸收、具有双向功能调控作用的中药。

2 基于靶点相关网络探讨中药调控骨重建的作用机制

在建立骨重建生物调控网络基础上,构建中药的成分—靶点网络,将为研究中药调控骨重建的多靶点整合作用特色提供一条新途径,这与当前的网络药理学研究思路相契合^[7]。这一研究思路主要涉及到生物网络、疾病网络、成分靶点相关网络的构建技术,利用生物信息学、分子生物学、组学等手段,分析疾病网络的动态变化过程,找到疾病网络的关键节点及靶标。利用分子对接等计算手段,计算预测成分靶点,构建成成分—靶点网络,为找到调控网络的有效成分组合提供数据支持。依据调控骨重建信号途径及信号分子的相互作用关系,我们利用 cytoscape 软件构建了骨重建生物信号网络,如图 1,一些关键因子如 β -catenin(Catnb)、ER α 、RANK、TRAF2 等处于网络关键节点,其连接数目较多,多为信号途径中的关键转录因子,表明它们是调节骨重建的关键蛋白分子。一些已经开发或正在研发的药物也是以这些关键节点为靶点,如处于临床研究的 RANK 抗体^[8]。然而,作用于单一靶点的药物往往不能有效调控复杂的疾病网络恢复平衡,如上市药物双磷酸盐通过抑制 FPPS,阻止 GTPases 碳末端醛基化,破坏破骨细胞增殖、凋亡、膜的延伸。然而,长期服用双磷酸盐会导致骨形成障碍,造成骨坏死。因此,开发兼具骨吸收抑制剂的同时促进骨形成的多靶点药物将会比当前药物在提高骨强度和骨质量方面更具有优势。如缺失氯离子通道 CLC-7 小鼠没有功能性破骨细胞,但不影响骨形成功能^[2]。事实上,很多中药如补肾中药在减少骨吸收的同时,能

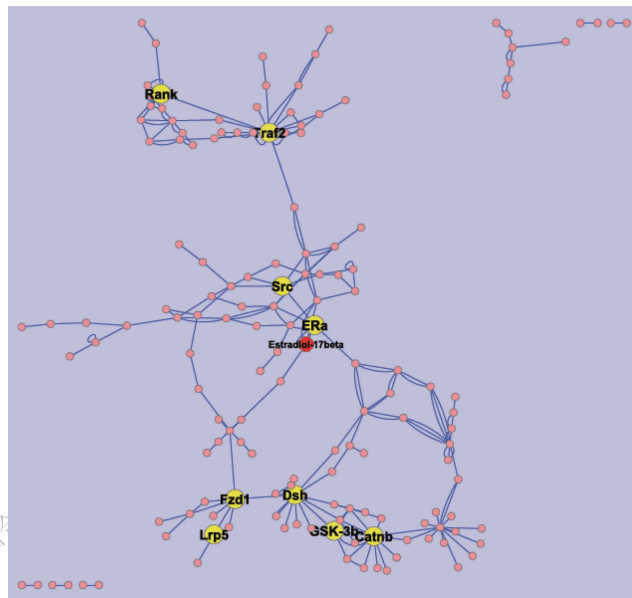


图 1 骨重建的靶点相关网络

够持续改善骨量^[9]。因此,从调节骨重建的信号网络中发现中药的多靶点成分是很有可能的。

目前,依据化学结构及化学结构相似性钩取靶点有较多方法及网络靶点数据库可供使用,如 Drug-Bank (<http://www.drugbank.ca/>)、PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>)等^[10]。来源于数据库内的生物大分子,与特定的小分子化合物进行匹配,根据蛋白与小分子化合物分子构象,进行分子动力学模拟和计算,依据对接能量,获得小分子化合物的对接靶点。目前,反向分子对接软件取得了快速发展,如 idTarget (<http://idtarget.Rcas.sinica.edu.tw/>)、TarFisDock (<http://www.dddc.ac.cn/tarfisdock/>)等。不同的对接软件由于对接原理不同,获得的靶点也有所差异,进一步通过发展多种实验技术手段验证靶点的准确性对于获取真正药物靶点具有重要意义。

中药的作用特色在于多成分、多靶点、整合调节,这决定中药作用靶点并非单个成分靶点的简单相加,沿用单一化学小分子的靶点钩取方法并不完全适合于中药作用靶点的发现。中药调控骨重建的靶点有可能分布于生物网络或疾病网络的一些特定位置,在时间和空间上协同调节网络恢复平衡,达到防治疾病的效果。中药成分与西药靶点的区别在于中药的诸多有效成分不一定作用于网络的关键节点,虽然有较多网络连接或连接集中度较高的节点调控网络作用明显,但产生副反应的可能性也增大。通过作用多个关键及次要网络节点调控网络平衡可能是中药的作用机制之一。另外,除了靶点在网络中的位置重要性外,中药成分与靶点的结合力对中药作用也有很大影响。西药往往靶点专一,特异性高,结合能力强,中药成分与靶点的低亲和力是保证中药多靶点的作用机制之一。

3 展望

国际上,许多药物公司及专家寄希望于发现及开发多靶点的抗骨质疏松药物^[11]。相比单靶点西药,从中药中发现调控骨重建平衡的药物有非常广阔的前景。近年来,多种补肾中药如淫羊藿、骨碎补、何首乌、菟丝子等,以及中药复方如仙灵骨葆、二至丸等,在防治骨相关疾病包括骨质疏松方面已经显示出一定优势,进一步揭示中药防治骨质疏松的作用机制是当前中药研究人员面临的机遇与挑战。我们通过构建骨重建的生物调控网络,一方面能够解析中药成分对网络节点及其对整个网络的动态改变,揭示中药对骨重建的调控作用。另一方面,通过中药成分与靶点的对接

计算,分析并优化网络靶点及成分组合物,有利于抗骨质疏松的创新中药研制。因此,建立并发展适合于中药多成分、多靶点整合调节特色的新的分子网络模型,将为基于化学分子网络——靶点网络的创新中药研制提供启示和方法学借鉴。在利用网络药理学思路基础上,发展适合于中药复杂体系的调控网络研究模式和方法将为中药研究拓展新的发展方向,并成为推动中医药继承与创新发展的新动力。

参 考 文 献

- [1] Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's Law: the remodeling problem [J]. *Anat Rec*, 1990, 226 (4): 414-422.
- [2] Deal C. Potential new drug targets for osteoporosis [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2009, 5 (3): 20-27.
- [3] Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, et al. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 105 (52): 20764-20769.
- [4] Ohissson C. Bone metabolism in 2012: Novel osteoporosis targets [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9 (2): 72-74.
- [5] Cao X. Targeting osteoclast-osteoblast communication [J]. *Nat Med*, 2011, 17 (11): 1344-1346.
- [6] Liu YQ, Han XF, Liu TG, et al. A cell-based model of bone remodeling for identifying activity of icaritin in the treatment of osteoporosis [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37 (1): 219-226.
- [7] 王建华, 张永祥, 周文霞. 中药药理与临床研究进展 [M]. 第7册. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 265-290.
- [8] Baron R. Osteoporosis in 2011: Osteoporosis therapy—dawn of the post-bisphosphonate era [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 8 (2): 76-78.
- [9] 沈霖, 杜靖远, 杨艳萍, 等. 补肾法防治原发性骨质疏松症的细胞、分子作用机理研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2006, 14 (1): 1-4.
- [10] 范胜军, 李学军. 反向分子对接—药物靶点发现和确认的新途径 [J]. *生理科学进展*, 2012, 43 (5): 367-370.
- [11] Zaudi M, Iqbal J. Translational medicine: double protection for weakened bones [J]. *Nature*, 2012, 485 (7396): 47-48.

(收稿: 2015-04-20 在线: 2018-01-09)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶