

基于炎症因子、雌激素及骨稳态的多向调控研究肉桂-熟地黄防治骨质疏松的分子作用机制

平凡^{1,2}, 朱琳^{1,2}, 沈霞^{1,2*}, 韩奇峰¹, 刘莹^{1,2}, 颜永刚^{1,2}, 张岗^{1,2},
彭亮^{1,2}, 陈艳琰¹

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 西咸新区 712046; 2. 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西咸新区 712046)

摘要: 本研究整合组方配伍分析、生物信息学和代谢组学探讨肉桂-熟地黄 (Cinnamomi Cortex-Rehmanniae Radix, CR) 防治骨质疏松 (osteoporosis, OP) 的分子作用机制。建立大鼠 OP 模型, 进行 Micro-CT 指标和病理切片综合评价, 结果显示与模型组相比, CR 干预后的骨密度、骨体积分数等指标显著回调 ($P < 0.05$), 骨小梁排列成网状。UHPLC-Q-TOF/MS 研究结果主要涉及氨基酸代谢、脂类代谢及雌激素代谢途径。整合生物信息学和代谢组学分析, 最终发现: ① 肉桂酸、肉桂酸乙酯抑制 TNF、IL-1 β 、IL-13 等炎症因子, 进而防治 OP; ② CR 多个活性成分靶向作用于 ESR2、PPARG、CYP19A1、GABRA1 等靶点, 调节 cAMP 的合成、AMPK 信号通路及脂类代谢, 从而调节雌激素水平来防治 OP; ③ 油酸、花生四烯酸等作用于 AR、VDR 等靶点, 调控 HIF-1、AGE-RAGE 信号通路, 从而调控成骨、破骨细胞, 影响钙磷吸收, 维持骨稳态。本研究从炎症因子、雌激素及骨稳态多向调控的角度阐明了 CR 防治 OP 的分子机制, 为 CR 的临床应用及复方开发提供理论依据。本实验符合动物实验伦理学标准且得到陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批号: SUCMDL20210309002)。

关键词: 肉桂-熟地黄; 骨质疏松; 中药配伍; 代谢组学; 骨稳态

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)12-3644-09

Study on the molecular mechanism of Cinnamomi Cortex-Rehmanniae Radix in preventing and treating osteoporosis based on multi-directional regulation of inflammatory factors, estrogen and bone homeostasis

PING Fan^{1,2}, ZHU Lin^{1,2}, SHEN Xia^{1,2*}, HAN Qi-feng¹, LIU Ying^{1,2}, YAN Yong-gang^{1,2},
ZHANG Gang^{1,2}, PENG Liang^{1,2}, CHEN Yan-yan¹

(1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xixian New Area 712046, China; 2. Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, Xixian New Area 712046, China)

Abstract: In this study, the molecular mechanism of Cinnamomi Cortex-Rehmanniae Radix (CR) in the prevention and treatment of osteoporosis (OP) was investigated by integrating compatibility analysis of compound, bioinformatics and metabolomics. The rat OP models were established, and the Micro-CT indexes and pathological sections were comprehensively evaluated. The results showed that compared with the model group, the indexes

收稿日期: 2022-07-19; 修回日期: 2022-09-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973592, 81974525); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2022JM-538); 陕西中医药大学“秦药”品质评价及资源开发学科创新团队项目 (2019-QN01); 陕西高校青年创新团队 (2020).

*通讯作者 Tel: 86-29-38185165, E-mail: jxrain@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0879

such as bone mineral density (BMD) and bone volume/tissue volume (BV/TV) were significantly increased after CR treatment ($P < 0.05$), and the bone trabeculae were arranged into mesh. The results of UHPLC-Q-TOF/MS mainly involved amino acid metabolism, lipid metabolism and estrogen metabolism pathways. Integrating bioinformatics and metabolomics analysis, it was finally found that: ① cinnamic acid and ethylcinnamate inhibit inflammatory factors such as TNF, IL-1 β , and IL-13, thereby preventing and treating OP; ② multiple active ingredients of CR target ESR2, PPARG, and CYP19A1, GABRA1 and other targets, regulate cAMP synthesis, AMPK signaling pathway and lipid metabolism, thereby regulating estrogen levels to prevent and treat OP; ③ oleic acid, arachic acid, etc. act on AR, VDR and other targets, and regulate HIF-1 signaling pathway and AGE-RAGE signaling pathway, thereby regulating osteoblasts and osteoclasts, and affecting calcium and phosphorus absorption to maintain bone homeostasis. This study clarified the molecular mechanism of CR in preventing and treating OP from the perspective of multi-directional regulation of inflammatory factors, estrogen and bone homeostasis, and provided theoretical basis for the clinical application of CR and the development of compound. This experiment complied with the ethical standards of animal experiments and was approved by the Animal Ethics Committee of Shaanxi University of Chinese Medicine (No. SUCMDL20210309002).

Key words: Cinnamomi Cortex-Rehmanniae Radix; osteoporosis; Chinese medicine compatibility; metabolomics; bone homeostasis

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是最常见的骨骼系统疾病, 多见于 50 岁以后绝经的妇女, 已经成为中老年人最常见的疾病之一。OP 是一种以骨量低、骨组织微结构破坏, 脆性增加, 易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。OP 的发病机制复杂多样, 其主要机制是由破骨细胞介导的骨吸收过度或成骨细胞介导的骨形成不足而导致骨重建过程的失衡。而骨骼的长期制动、雌激素水平下降及慢性炎症等均与 OP 发生的重要因素^[2,3]。目前治疗 OP 主要有两种方法, 其一是化药治疗, 常用的为双膦酸盐类药物, 但其对患者胃肠道有一定的刺激作用。另一种是传统中药治疗, 中医上根据临床症状将 OP 归为“骨痿、骨痹、骨枯”等范畴, 主要使用滋补肝肾、补肾健脾、活血化痰等为主要功效的中药材来治疗 OP^[4,5]。补肾壮骨类中药可以增加骨骼密度, 缓解疼痛症状, 且具备不良反应小、安全有效、可长期服用等优点。

肉桂具有补火助阳、引火归元、散寒止痛、温通经脉的功效, 为温补肾阳之常用药物, 又是多个经典补肾名方中的常用药。研究发现肉桂可通过抑制 NF- κ B 配体诱导活化 T 细胞核因子和激活 c-fos 表达从而治疗 OP, 并且肉桂所含肉桂醛具有抑制破骨细胞形成的作用^[6], 给肉桂治疗 OP 提供一定的理论基础。熟地黄具有滋阴补血、益精填髓的功效。同时, 研究表明熟地黄中所含的豆甾醇及地黄苷等成分对生物体内炎症因子的调节及破骨细胞生成都有影响^[7-10]。然而, 有关肉桂-熟地黄 (Cinnamomi Cortex-Rehmanniae Radix, CR) 协同治疗 OP 的分子作用机制方面研究较少, 故通过组方配伍分析寻找与肉桂配伍规律高的中药组成药对, 进一步研究其对 OP 的作用机制。

网络药理学已经广泛应用于中药作用机制的研

究^[11], 本课题组前期主要围绕桃核承气汤双向调节治疗脑卒中、清热解毒药防治冠状病毒进行网络药理学研究^[12,13]。代谢组学是系统生物学的重要组成部分^[14], 通过现代检测手段如各种色谱等进行代谢物的定性定量分析, 并通过一系列数据分析得到代谢物产物影响通路, 从而解析生物体内动态变化的代谢物综合信息来了解其可能受影响的部位和代谢作用机制^[15]。网络药理学结合代谢组学研究, 其多视角、整体交互的特点与中医药整体观念、证候的复杂体系不谋而合。因此, 本研究从中医“肾主骨”理论出发, 运用数据挖掘对肉桂进行配伍组方用药分析, 结合网络药理学和代谢组学对肉桂及其配伍中药防治 OP 的分子机制进行探究, 为临床用药和新药开发提供一定的数据支持。

材料与方法

基于组方分析研究肉桂治疗 OP 的配伍规律 利用古今医案云平台 (V2.3.5) 收集整理现代医案库、名医医案录和共享医案录, 检索信息中医疾病输入“骨痹、骨枯、骨痿”, 西医疾病输入“骨质疏松”。纳入标准为: ① 符合 OP 症状, 筛选出关于肾精亏虚型 OP 的相关医案; ② 主要治疗方法为中药方剂治疗, 排除其他西医和针灸等治疗方法; ③ 医案要完整, 包括姓名、性别、中医疾病、中医证候, 方剂组成等。根据筛选的结果, 将编号、方剂组成、中医证候等信息录入古今医案云平台。对数据进行标准化, 最后导入分析池, 对用药数据进行频次统计、关联分析、中医证候分析。

活性成分及其相关靶点的数据库构建 依据口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ^[13], 在 TCMSP、TCMIP、

BATMAN-TCM、CNKI 数据库中分别检索“肉桂”和“熟地黄”得到活性成分和靶点, 接下来再利用 Swiss Target Prediction、TCMIP 最新在线数据库进行相关靶点的补充。在 Genecards、OMIM、Drug bank、TTD 数据库中以“osteoporosis”为关键词进行搜索。将 CR 对应靶点和 OP 靶点导入 Venny 2.0 中取交集, 即构建了 CR 防治 OP 的靶点库。

多算法虚拟筛选和通路富集 将交集靶点导入 STRING 平台, 设置选项中设置“high confidence > 0.700”, 得到的蛋白-蛋白相互作用网络 (protein-protein interaction networks, PPI) 使用 Cytoscape 3.7.2 软件中的 MCODE 相关算法和 CytoHubba 相关算法进行分析, 筛选重要靶点。并使用 Cytoscape 3.7.2 构建“CR 活性成分-靶点-疾病”网络。将重要靶点导入 Metascape 数据库, 在京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库进行通路分析。

实验动物 56 天未生育的雌性 Wistar 大鼠 50 只, 购于成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (川) 2020-030, 饲养于陕西省中医药管理局中药药效机制与物质基础重点实验室。本实验符合动物实验伦理学标准且得到陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批号: SUCMDL20210309002)。

药物与试剂 熟地黄购于运城市神农中药材有限公司 (批号: 20210501), 肉桂购于陕西泓森中药饮片有限公司 (批号: 20210184), 经陕西中医药大学颜永刚教授鉴定肉桂、地黄均为正品, 且符合 2020 年版中国药典标准。按照右归丸中肉桂: 熟地黄的配伍比例 1:4 制备其水煎液。阿仑膦酸钠片购于石药集团欧意药业有限公司 (批号: 007200603); 青霉素钠购于哈药集团股份有限公司 (批号: 20100610-1); 色谱级甲醇、乙腈 (德国 Merck 公司), 甲酸、2-氯苯丙氨酸 (美国 Thermo Fisher 公司) 均为分析纯。实验用水通过使用 Milli-Q 水净化系统 (美国 Millipore 公司) 进行净化。

仪器 QTOF/MS-6545 质谱仪、1290InfinityLC 超高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 涡旋混合器 MIX-200 (上海净信实业发展有限公司); 离心机 5427R (德国 Eppendorf 公司); Micro-CT SKYSCAN 1276 (美国 Bruker 公司); 电子调温电热套 98-I-B (天津市泰斯特仪器有限公司)。

分组和给药 将 50 只大鼠随机分组为: 空白组、模型组、假手术组、CR 组以及阳性组, 每组 10 只。给予大鼠灌胃给药, CR 组给予肉桂 ($0.63 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) - 熟地黄 ($2.52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 浓缩水煎液, 阳性组给予阿仑膦酸钠片 $1.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 空白组、假手术组、模型组给予等体积量蒸馏水, 灌胃时间持续 90 天。

造模 除空白组外, 各组大鼠腹部注射 10% 水合氯醛 ($0.003 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$) 进行麻醉, 然后手术背部入路摘取双侧卵巢, 即建立 OP 模型, 假手术切除双侧卵巢处等体积脂肪^[16]。术后注射 0.3 mL 20 万单位青霉素钠进行术后消炎 3 天, 恢复一周后, 进行药物干预。

取材及样品处理 末次灌胃后禁食 12 h, 动物麻醉后, 进行腹主动脉取血, 每只取 5 mL 新鲜血液, 并将其进行 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心处理, 取上清液, 置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。取出腰椎 L_4 于冰袋上去除多余组织和肌肉, 处理干净之后放入含有组织固定液的样品管中。

Micro-CT 检测 将去除肌肉和筋膜的腰椎 L_4 置于 Micro-CT 中进行扫描, 设置源电压为 75 kV, 源电流为 200 μA , 对其进行骨密度及多元参数的检测和计算, 并对其进行三维重建。

苏木精-伊红 (HE) 染色 于 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛溶液中取出腰椎 L_4 并清洗, 10% EDTA 脱钙 15 天。梯度乙醇脱水后浸蜡, 包埋, 制 $5 \mu\text{m}$ 厚度切片, 摊片后 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干, 多功能染色机染色, 倒置光学显微镜 10 倍观察, 机载系统拍照。

UHPLC-Q-TOF/MS 代谢组学研究

样本制备 取血清样本 50 μL 和 20% 乙腈甲醇内标提取液 300 μL 加入到对应的已编号的 2 mL 微量离心管中。涡旋 3 min, 在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min; 取 200 μL 上清液, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 然后以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 离心 3 min。取 180 μL 等分的上清液到对应进样瓶内衬管中, 用于上机分析。

色谱条件 色谱柱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$), 美国 Waters 公司; 流动相 A: 超纯水 (0.1% 甲酸); 流动相 B: 乙腈 (0.1% 甲酸); 梯度程序为: 0~11 min, 5%~90% B; 11~12 min, 90% B; 12~12.1 min, 90%~5% B; 12.1~14 min, 5% B。柱温: $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 流速: $0.40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: 2 μL 。所有样品均由 LC-MS 系统按照机器指令采集。

质谱条件 采用双喷射电喷雾离子源, 正负离子模式质谱参数: 离子源电压: 正离子模式 2 500 V, 负离子模式 1 500 V; 雾化器电压: 40 V; 碎裂压力: 135 V; 辅气流速: $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 离子源温度和鞘气温度均为 $325 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 鞘气流速: $11 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

数据分析 原始数据经过 ProteoWizard 转换为 mzML 格式, 采用 XCMS 程序进行峰提取对齐, 保留时间校正。采用“SVR”方法对峰面积进行校正, 并对各组样本中缺失率 > 50% 的峰进行过滤。校正筛选后的峰, 通过检索实验室自建数据库、整合公共库、AI 预测库及 metDNA 方法得到代谢物鉴定信息。使用 IBM SPSS Statistics 21.0 统计软件进行数据统计分析, 组间

数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两组样本分析采用独立样本 *t* 检验, 分析数据以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 肉桂组方配伍分析

通过对符合条件的 63 条医案结果进行中医证候分析, 在不同证候型 OP 中筛选出治疗肾精亏虚型 OP 的医案, 最终纳入医案的共 32 条, 占比 58.18%。将 32 个处方的中药进行排序, 总共 153 个中药, 总频次 525, 其中使用频次最高的中药为熟地黄, 占比 58.97%。设置支持度为 0.1, 置信度为 0.5, 筛选出与肉桂关联中药的频次, 结果可见与肉桂配伍频次最高的为熟地黄 (表 1), 且置信度为 1, 证明了肉桂和熟地黄配伍的合理性, 故以 CR 为药对探究其治疗 OP 的作用机制。

2 CR 防治 OP 的功效物质筛选及分子机制分析

通过数据挖掘和虚拟筛选, 共得到 CR 有效成分 19 个、CR 靶点 1 016 个、OP 靶点共 1 724 个。CR 与 OP 交集靶点共 192 个, 占比 8.1%。

将交集靶点构建 PPI 网络, 网络中包含 192 个节点、907 条边。利用 MCODE 相关算法和 CytoHubba 相关算法筛选出了 69 个重要靶点 (图 1A)。将交集靶点和 CR 化学成分通过 Cytoscape 3.9.2 构建“活性成分-靶点-OP”网络, 共有 213 个节点 (图 1B)。根据 degree 值排名, 得到 CR 治疗 OP 的关键成分有油酸、花生四烯酸、豆甾醇、 β -谷甾醇、肉桂酸、肉桂酸乙酯、肉桂醇、肉桂醛等。核心靶点有 PPARG、CYP19A1、GABRA1、ESR2、AR、VDR、CA2、TNF、IL-1 β 、IL-13 等。

将 CR 治疗 OP 的 69 个重要靶点进行 KEGG 富集分析, 筛选出与治疗 OP 密切的通路信号, 包括雌激素、IL-17、Th17、AGE-RAGE、MAPK、破骨细胞分化、PI3K-Akt、NF- κ B 等信号通路 (图 1C)。由此得出 CR 治疗 OP 与调节雌激素、炎症相关通路、破骨细胞分化相关。

3 CR 对 OP 大鼠腰椎骨小梁结构参数及形态的影响

通过 Micro-CT 检测大鼠腰椎的各项指标。结果显示, 与空白组相比, 模型组腰椎骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨体积分数 (bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁数量 (trabecular number, Tb.N) 及骨小

梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th) 均显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 经过药物干预的 CR 组和阳性组, BMD、BV/TV、Tb.N 均发生显著的回调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、Tb.Th 也一定程度升高 (图 2A~D)。如图 2E 所示, 与空白组相比, 模型组大鼠的骨小梁间隙 (trabecular separation, Tb.sp) 明显升高 ($P < 0.01$), 而 CR 组和阳性组给予药物干预, Tb.sp 又显著降低 ($P < 0.05$)。其中 BMD 是影响 OP 的重要因素, 也是导致骨折等 OP 并发症的主要原因; BV/TV 表示骨组织体积与组织体积比值, 可直接反映骨量变化情况; Tb.N 是给定长度内骨组织与非骨组织的交点数量, 发生 OP 时 Tb.N 的值减小; Tb.Th 是骨小梁的平均厚度, 发生 OP 时, Tb.Th 值减小; Tb.sp 是骨小梁之间的髓腔平均宽度, Tb.sp 增加, 提示骨吸收增加, 可能发生 OP^[17]。通过三维 CT 影像 (图 3) 也可以看出, 与空白组及假手术组比较, 模型组腰椎 L₄ 部分骨小梁稀疏; 而与模型组相比, CR 组和阳性组腰椎 L₄ 的骨小梁数量及密度均显著增多。通过以上多指标评价及三维 CT 影像可以认为大鼠 OP 造模成功, 且 CR 可以改善 OP 大鼠所造成的骨小梁减少。

在大鼠的腰椎组织 HE 染色切片中可以看到 (图 4), 与空白组相比, 假手术组的骨小梁数量及厚度未见明显减少, 排列整齐, 骨小梁连续性好; 模型组的骨小梁变细, 数目减少稀疏, 连接性降低, 出现大片无骨小梁骨髓区; 在进行 CR 及阿仑膦酸钠片给药干预之后, 与模型组相比, 骨小梁的数量显著增多, 连接性较好, 进一步表明 CR 的治疗效果。

4 CR 对 OP 大鼠血清代谢物的影响及代谢通路分析

首先采用无监督模式识别的主成分分析 (principal component analysis, PCA) 对空白组、模型组、CR 组血清样本差异进行直观显示。结果表明, QC 样本在 PCA 图中均呈现中心聚集, 表明在分析过程中样本具有良好的重复性和仪器稳定性, 正负离子模式下三组均有明显区分, 见图 5A、B。紧接着在两组间两两进行有监督模式识别的正交偏最小二乘法判别 (OPLS-DA) 分析, 结果均未出现过拟合, 显示正负离子模式下空白组能与模型组明显区分, 见图 5C、D; CR 干预治疗前后能够明显区分, 见图 5E、F。

根据 $VIP \geq 1$, $P < 0.05$, fold change ≥ 1.2 和 fold

Table 1 Frequency of compatibility of traditional Chinese medicine with Cinnamomi Cortex

Compatibility of traditional Chinese medicine	Support	Confidence	Lift	Co-occurrence
Cinnamomi Cortex-Rehmanniae Radix	0.18	1	1.7	7
Cinnamomi Cortex-Corni Fructus	0.13	0.71	1.85	5
Cinnamomi Cortex-Poria	0.1	0.57	1.48	4
Cinnamomi Cortex-Astragali Radix	0.1	0.57	1.11	4

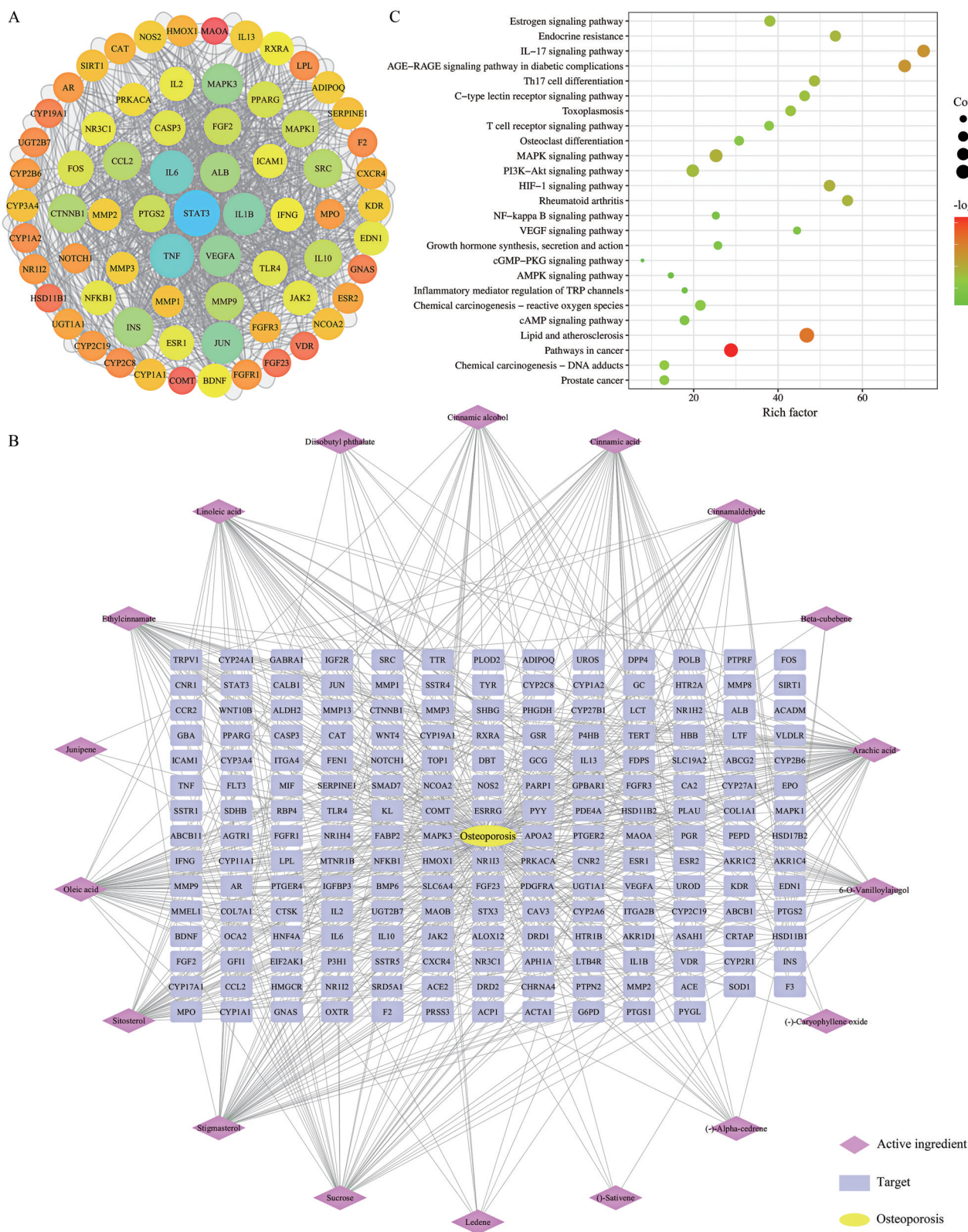


Figure 1 Virtual screening of key targets and functional substances of Cinnamomi Cortex-Rehmanniae Radix (CR) in the prevention and treatment of osteoporosis (OP). A: Protein-protein interaction (PPI) network of CR for OP treatment; B: Active ingredients-targets-OP network; C: Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis of key targets of CR in the prevention and treatment of OP. PPARG: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; CYP19A1: Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1; GABRA1: Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1; AR: Androgen receptor; ESR2: Estrogen receptor 2; VDR: Vitamin D3 receptor; CA2: Carbonic anhydrase 2; TNF: Tumor necrosis factor; IL-1 β : Interleukin-1 beta; IL-13: Interleukin-13

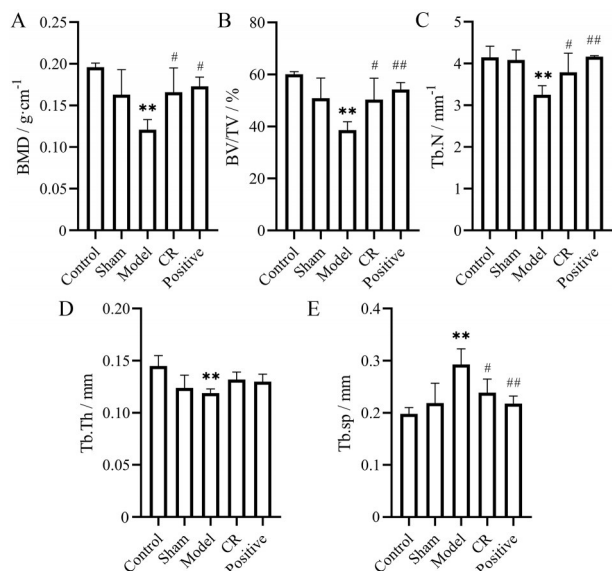


Figure 2 Monitoring results of lumbar tissue indexes in rats. A: Bone mineral density (BMD); B: Bone volume/tissue volume (BV/TV); C: Trabecular number (Tb.N); D: Trabecular thickness (Tb.Th); E: Trabecular separation (Tb.sp). $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs model group

change ≤ 0.83 进行筛选, 认为其差异显著, 筛选出 CR 调节 OP 的差异代谢物。在正负离子模式下, 分别鉴定空白组、模型组和 CR 组的差异代谢物。与空白组相比, 模型组有 162 个代谢物发生变化; 与模型组相比, CR 组有 219 个代谢物发生变化。共有 74 个交集差异代谢物, 其中有 63 个差异代谢物在空白组和模型组、模型组和 CR 组发生相反趋势的变化。其中 4-叔丁基苯甲酸、喹啉、5-羟甲基尿嘧啶、PE-NMe2 [18:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)]、2-苯甲酰胺基乙酸甲酯、羟基乙酸、牛磺胆酸、氢化肉桂酸等 40 个代谢物下调转为上调。丙烯酰胺、肌酸、7-甲基黄嘌呤、油酸酰胺、六甘醇、L-乳酸、L-异亮氨酸、尿酸等 23 个代谢物有明显趋势从上调转为下调。结果表明, CR 主要通过调节 4-叔丁基

苯甲酸、氢化肉桂酸、7-甲基黄嘌呤、油酸酰胺、牛磺胆酸、牛磺鹅去氧胆酸等代谢物进而治疗 OP。

针对上述差异代谢物, 对其进行代谢途径富集分析。差异代谢物显著富集于氨基酸的合成代谢、脂类代谢及雌激素的生成、HIF-1 信号通路的调节等。其中氨基酸途径的合成代谢包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及苯丙氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢等。脂类代谢途径包括胆汁酸的合成。雌激素的生成包括 cAMP 的合成以及 AMPK 信号通路的调节作用等。

讨论

中医学认为“肾生骨髓, 在体为骨”, 骨的发育生长均依赖于肾精的滋养^[18]。根据文献记载及临床症状, 将 OP 在中医的病候证型分为四类: 肾精亏虚、肝血虚证、瘀血阻络、脾胃气虚。通过组方配伍分析肾精亏虚证引起的 OP, 分析其处方组成, 寻找与温肾补阳药肉桂最佳的配伍中药, 发现与肉桂配伍频次、关联度最高的是熟地黄。熟地黄为中药中的补血养阴之佳品, 而肉桂为药食同源的补火助阳佳品, 两者结合, 阴阳双补, 故选用肉桂与熟地黄组成药对进行研究。

首先, 通过虚拟筛选 CR 治疗 OP 的活性成分作用靶点及分子通路分析, 发现油酸、花生四烯酸、豆甾醇、 β -谷甾醇、肉桂酸、肉桂酸乙酯、肉桂醇靶向作用于 ESR2、PPARG、CYP19A1、GABRA1、AR、VDR 等靶点。ESR2 为雌激素受体, 是介导对骨量的遗传影响和骨质疏松症风险的候选基因^[19]。PPARG 参与调控雌激素合成关键酶的基因转录, 其可以调节胎盘雌激素合成关键酶、基质金属蛋白酶 mRNA 表达进而影响雌激素的生成^[20]。CYP19A1 对雌性小鼠卵泡的发育有重要作用, 其主要原因是影响雌激素生成^[21]。GABRA1 也参与调控雌激素合成相关通路。AR 在骨髓间质干细胞 (MSCs)、成骨、破骨细胞及骨细胞中均有明显表达,

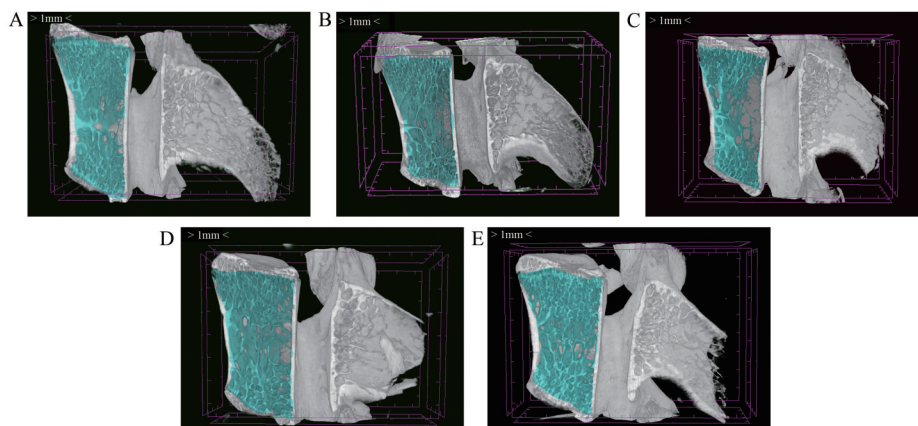


Figure 3 CT 3D imagery of rat lumbar tissue. A: Control group; B: Sham group; C: Model group; D: CR group; E: Positive group

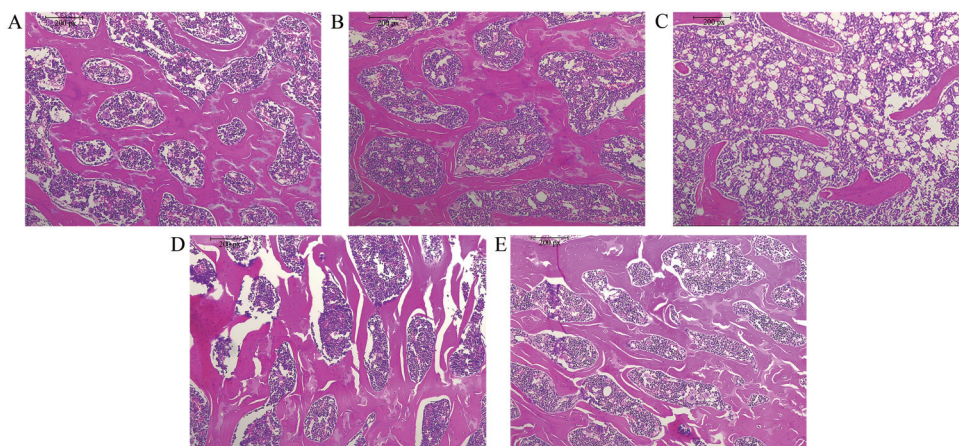


Figure 4 Micrograph of rat lumbar tissue section (10×). A: Control group; B: Sham group; C: Model group; D: CR group; E: Positive group

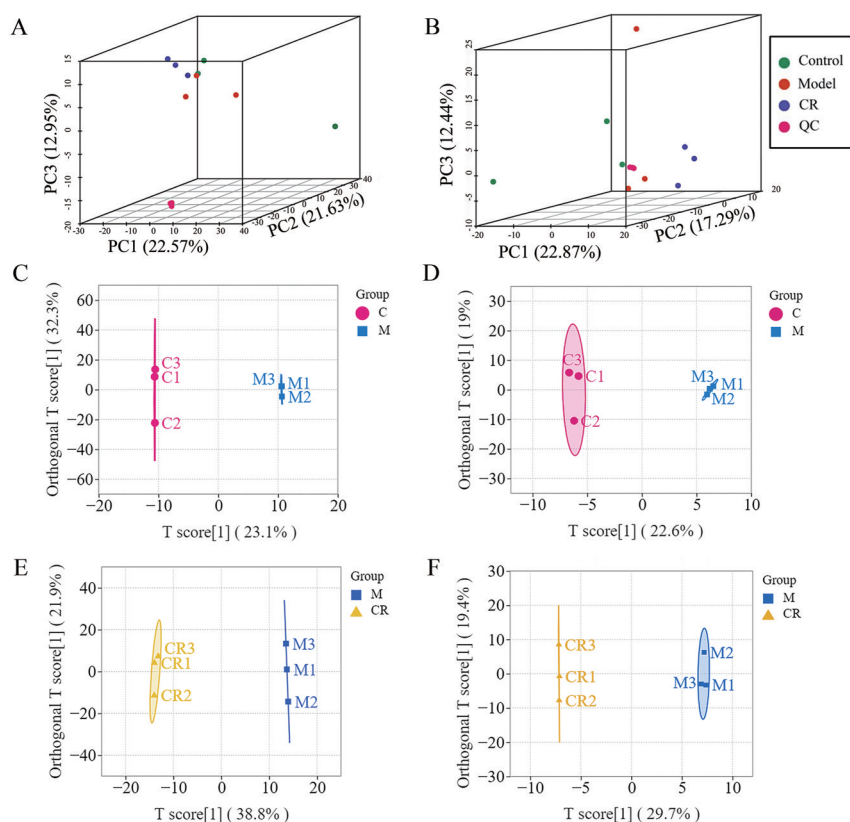


Figure 5 Multivariate statistical analysis of serum metabolomics. A: PCA diagram in positive ion mode; B: PCA diagram in negative ion mode; C: OPLS-DA diagram in positive ion mode of control vs model group; D: OPLS-DA diagram in negative ion mode of control vs model group; E: OPLS-DA diagram in positive ion mode of model vs CR group; F: OPLS-DA diagram in negative ion mode of model vs CR group

主要通过促进MSCs向成骨细胞分化,促进成骨细胞骨化、矿化以及抑制破骨细胞分化等方式进行,调控机制与Wnt/ β -catenin、MAPK等通路有关^[10]。VDR为核激素受体,主要与机体内活性维生素D结合,发挥维持钙磷平衡、调节成骨及破骨细胞分化等多种生物学作用^[22]。肉桂酸乙酯、肉桂酸通过作用于IL-13、IL-1 β 、TNF等炎症因子发挥抗炎作用从而防治OP。此外,

TNF- α 还通过激活NF- κ B促进RANKL诱导的破骨细胞,从而影响骨形成^[23]。Du等^[24]研究发现肉桂醛抑制破骨细胞生成,可以明显提高OP大鼠BMD,对骨小梁宽度、厚度、表面积也有提高。综上,花生四烯酸、豆甾醇、 β -谷甾醇、肉桂酸乙酯、肉桂醇、肉桂醛是CR治疗OP的活性成分,主要靶向作用于PPARG、CYP19A1、GABRA1、AR、ESR2、VDR、CA2、TNF、IL-1 β 、IL-13等,

影响炎症反应、雌激素调节及骨稳态平衡从而防治OP。

通过大鼠去势手术建造OP模型,利用UHPLC-QTOF/MS技术和多元统计分析方法分别比较了对照组与模型组、模型组与CR组大鼠血清中的代谢物,发现CR影响大鼠OP的63个差异代谢物和86条差异代谢通路,主要包括:①影响氨基酸代谢途径;②影响脂类代谢;③影响雌性激素的合成、释放。通过差异代谢物的结果发现,与空白组比较,模型组L-异亮氨酸、L-高丝氨酸、L-脯氨酸等代谢物显著上调;与模型组相比,在CR组中显著下调,可以认为CR干预影响了氨基酸代谢途径进而防治OP。研究^[25-27]发现氨基酸的失调可诱发OP、肥胖、脂肪肝等疾病。脂类代谢包括初级胆汁酸合成、类固醇生物合成、花生四烯酸代谢、神经鞘磷脂的合成等。胆汁酸可以影响肠道对维生素D的吸收,并且对成骨细胞有破坏作用,影响钙、磷吸收、新骨形成及旧骨溶解,致低骨密度及骨流失,引起OP^[28]。与模型组相比,CR组的牛磺胆酸、牛磺鹅去氧胆酸等相关代谢物从含量下调恢复至上调值水平。除此之外,由于去势手术可以使大鼠的雌激素减少,而雌激素又可以减少胆汁酸的排出^[29],又可以影响雌激素的合成等。综上,CR主要通过氨基酸代谢途径、脂质代谢途径以及雌激素代谢途径等影响OP。

将生物信息学预测的主要调节通路与UHPLC-QTOF/MS代谢通路联合分析,共同富集到4条通路,分别是HIF-1信号通路、cAMP信号通路、AGE-RAGE信号通路、AMPK信号通路。HIF-1通路与促进成骨细胞功能密切相关,激活HIF-1通路可以促进脊髓损伤的修复、骨折的愈合速度和增加BMD^[30,31]。cAMP信号通路的表达影响生物体内的雌激素水平^[32],同时其参与甲状旁腺激素(PTH)对成骨的调节的中间环节作用^[33],对OP的治疗起主要作用。AGE-RAGE信号通路在特定环境中也参加促进成骨细胞分化的过程^[34]。AMPK信号通路参与胰岛素抵抗的病理进展,调节性激素水平^[35],进而影响OP。综上,CR通过HIF-1信号通路、cAMP信号通路、AGE-RAGE信号通路、AMPK信号通路调节生物体内雌性激素水平,促进成骨细胞分化,从而防治OP。

综上,CR防治OP的分子作用机制主要包括:①肉桂酸、肉桂酸乙酯通过抑制TNF、IL-1 β 、IL-13等炎症相关因子,发挥抗炎作用从而防治OP;②油酸、花生四烯酸、豆甾醇、 β -谷甾醇、肉桂酸、肉桂酸乙酯、肉桂醇靶向作用于ESR2、PPARG、CYP19A1、GABRA1等靶点,调节cAMP的合成、AMPK信号通路及脂类代谢,从而调节雌激素水平来防治OP;③油酸、花生四烯酸、 β -谷甾醇、豆甾醇、肉桂酸、肉桂酸乙酯作用于AR、

VDR等靶点,调控HIF-1、AGE-RAGE信号通路,影响胆汁酸代谢,从而调控成骨细胞和破骨细胞,影响钙磷吸收,维持骨稳态。此项研究阐明了CR防治OP的分子作用机制,为临床科学、安全用药奠定理论基础。

作者贡献:平凡参与实验设计、动物实验研究及数据分析,并完成论文初稿撰写;朱琳参与动物实验研究及数据处理;沈霞参与实验设计,研究项目管理与指导及论文审阅与修订;韩奇峰参与实验数据整理;刘莹参与动物实验研究;颜永刚参与实验设计验证与核实及研究资金获取;张岗参与研究课题监管与指导;彭亮参与实验设计验证与核实;陈艳琰参与研究概念生成及研究基金获取。

利益冲突:本研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Liu X, Chen M, Liu Q, et al. LncRNA PTCSC3 is upregulated in osteoporosis and negatively regulates osteoblast apoptosis [J]. BMC Med Genomics, 2022, 15: 57.
- [2] Tan D, Fang PH, Sun X, et al. Mechanism of Bushen Tongluo Formula on intervention for osteoporosis by inhibiting chemerin and inflammatory factors [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 5899-5909.
- [3] An FY, Yan CL, Zhang YX, et al. Effects of Youguiwan on PI3K/Akt/NF- κ B signal pathway of knee osteoarthritis rats [J]. Chin J Osteoporos Bone Miner Res (中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志), 2019, 12: 479-487.
- [4] Yi SH, Zhao WH, Ren H, et al. Traditional Chinese and western medicine in treatment of postmenopausal osteoporosis: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2022, 28: 274-282.
- [5] Zhu XY, Zhang WG, Zhao ZG. Research status of drug therapy for osteoporosis at home and abroad [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学杂志), 2020, 36: 588-592.
- [6] Kentaro TN. Aldehydic components of cinnamon bark extract suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis through NFATc1 downregulation [J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16: 9176-9183.
- [7] Wu LC, Li JF, Zhang TT, et al. Anti-inflammatory effects of stigmasterol based on network pharmacology and cell experiments [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2022, 44: 609-615.
- [8] Wang J, Wei JL, He R, et al. Prediction of mechanism of Fuzi-Shudihuang compatibility in treatment of COPD by network pharmacology and preliminary validation study [J]. Chin J Immunol (中国免疫学杂志), 2022, 38: 419-428.
- [9] Mo Z, Xu P, Li H. Stigmasterol alleviates interleukin-1 β -induced chondrocyte injury by down-regulatingsterol regulatory element binding transcription factor 2 to regulateferroptosis [J]. Bioengineered, 2021, 12: 9332-9340.
- [10] Feng YY, Lai JF, Dong WT, et al. Study on the mechanism of the combination of herba epimedii and radix rehmanniae praeparata

- in the treatment of osteoporosis based on network pharmacology [J]. *Chin J Osteoporos* (中国骨质疏松杂志), 2021, 27: 875-881.
- [11] Li S, Zhang P, Gu J, et al. Principle, method and application of relationship inference based on biological networks [J]. *Sci Sin Inf* (中国科学: 信息科学), 2022, 52: 856-869.
- [12] Pei LS, Shen X, Yan YG, et al. The two-way regulation molecular network mechanism of Taohechengqi decoction in prevention and treatment of stroke based on vascular endothelial growth factor signaling pathway/tumor necrosis factor signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 898-906.
- [13] Ping F, Wang YX, Shen X, et al. Virtual screening and molecular docking to study the mechanism of Chinese medicines in the treatment of coronavirus infection [J]. *Med Sci Monit*, 2022, 28: e934102.
- [14] Tian G, Hu YZ, Li C, et al. The mechanism of action of Pudilan Xiaoyan oral liquid against LPS-induced acute respiratory infection in mice based on biological network analysis and metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2021, 56: 816-822.
- [15] Shi Z, Zou S, Shen Z, et al. High-throughput metabolomics using UPLC/Q-TOF-MS coupled with multivariate data analysis reveals the effect and mechanism of syringin against ovariectomized osteoporosis [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, 1183: 122957.
- [16] Kim P, Nam YJ, Kim WJ, et al. *Edgeworthia papyrifera* regulates osteoblast and osteoclast differentiation *in vitro* and exhibits anti-osteoporosis activity in animal models of osteoporosis [J]. *Planta Med*, 2019, 85: 766-773.
- [17] Liu R, Guo XL, Zhang YK, et al. A methodological review on morphometric parameters of Micro-CT trabecular bone images [J]. *Chin J Biomed Eng* (中国生物医学工程学报), 2018, 37: 237-246.
- [18] Qiao XW, Deng Q, Li ZF, et al. Discussion on the pathogenesis and TCM treatment of osteoporosis based on the theory of "kidney and marrow deficiency" [J]. *Chin J Osteoporos* (中国骨质疏松杂志), 2022, 28: 760-765.
- [19] Chen YC, Tsai YJ, Wang CC, et al. Decisive gene strategy on osteoporosis: a comprehensive whole-literature-based approach for conclusive candidate gene targets [J]. *Aging* (Albany NY), 2022, 14: 3484-3528.
- [20] Rocha RM, Barra GB, Rosa ÉC, et al. Prevalence of the rs1801282 single nucleotide polymorphism of the *PPARG* gene in patients with metabolic syndrome [J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2015, 59: 297-302.
- [21] Sharma D, Kumari S, Rani P, et al. Organochlorine pesticide dieldrin upregulate proximal promoter (PII) driven *CYP19A1* gene expression and increases estrogen production in granulosa cells [J]. *Reprod Toxicol*, 2021, 106: 103-108.
- [22] Zhang L, Yin X, Wang JC, et al. Retraction note: associations between *VDR* gene polymorphisms and osteoporosis risk and bone mineral density in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 9030.
- [23] Chen P, Li Y, Hu WW, et al. Promotion of TNF- α on RANKL-induced osteoclast formation by activating NF- κ B in postmenopausal osteoporosis [J]. *Genomics Appl Biol* (基因组学与应用生物学), 2019, 38: 960-965.
- [24] Du XZ, Huang HX, Xiong XL, et al. The protective effect of cinnamic aldehyde on bone mineral density and bone mass in ovariectomy-induced osteoporotic rats [J]. *Chin J Osteoporos* (中国骨质疏松杂志), 2019, 25: 1217-1220.
- [25] Shini S, Shini A, Bryden WL. Unravelling fatty liver haemorrhagic syndrome: 2. Inflammation and pathophysiology [J]. *Avian Pathol*, 2020, 49: 131-143.
- [26] Zuo HL, Lin SQ, Gao XL, et al. Multicenter clinical study on the effect of two kinds of conjugated estrogen on estrogen level and lipid metabolism in perimenopausal women [J]. *Chin J Pract Gynecol Obstet* (中国实用妇科与产科杂志), 2018, 34: 84-88.
- [27] Liu ZP, Liu R, Chou J, et al. Targeted metabolomics analysis reveals the association between maternal folic acid supplementation and fatty acids and amino acids profiles in rat pups [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1090: 101-109.
- [28] Guañabens N, Ruiz-Gaspà S, Gifre L, et al. Sclerostin expression in bile ducts of patients with chronic cholestasis may influence the bone disease in primary biliary cirrhosis [J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31: 1725-1733.
- [29] Hu CF, Zhu DW, Li L. Research progress of intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. *Chin J Pract Gynecol Obstet* (中国实用妇科与产科杂志), 2021, 37: 248-252.
- [30] Nguyen VT, Nardini M, Ruggiu A, et al. Platelet lysate induces in human osteoblasts resumption of cell proliferation and activation of pathways relevant for revascularization and regeneration of damaged bone [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 5123.
- [31] Li JC, Zhang DM, Xie J, et al. Co-culturing of osteoblasts and chondrocytes upregulates HIF-1 pathway of chondrocytes *via* MAPK signaling [J]. *J Sichuan Univ Med Sci Ed* (四川大学学报 医学版), 2022, 53: 92-97.
- [32] Zhu P, Wang L, Xu P, et al. GANT61 elevates chemosensitivity to cisplatin through regulating the Hedgehog, AMPK and cAMP pathways in ovarian cancer [J]. *Future Med Chem*, 2022, 14: 479-500.
- [33] Shi W, Gao Y, Wang Y, et al. The flavonol glycoside icariin promotes bone formation in growing rats by activating the cAMP signaling pathway in primary cilia of osteoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292: 20883-20896.
- [34] Lee EJ, Kang MK, Kim YH, et al. Coumarin ameliorates impaired bone turnover by inhibiting the formation of advanced glycation end products in diabetic osteoblasts and osteoclasts [J]. *Biomolecules*, 2020, 10: 1052.
- [35] Song F, Mao YJ, Hu Y, et al. Acacetin attenuates diabetes-induced cardiomyopathy by inhibiting oxidative stress and energy metabolism *via* PPAR- α /AMPK pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 922: 174916.