

结合网络药理学和实验验证揭示茶多酚对高糖环境骨细胞增殖的影响

于浩洋¹, 张佳怡², 胡婷婷¹, 郭勇^{1*}

1. 桂林医学院智能医学与生物技术学院, 广西桂林

2. 桂林医学院公共卫生学院, 广西桂林

DOI:10.62836/medicine.v3i1.1035

摘要: 背景: 网络药理学 (network pharmacology) 是一种基于系统生物学和生物信息学的研究策略, 可用于解析药物的多靶点作用机制。高糖环境对骨细胞的生长和代谢产生显著不良影响, 加速骨质疏松的发生与进展。茶多酚因其卓越的抗氧化和细胞保护作用, 在代谢性疾病研究中受到广泛关注。目的: 本研究结合网络药理学和细胞实验, 探讨茶多酚对糖尿病性骨质疏松 (DOP) 的潜在作用机制, 并评估其在高糖环境下对小鼠骨样细胞MLO-Y4增殖活性、一氧化氮合酶 (NOS) 活性及氧化应激水平的调控作用。方法: 采用网络药理学方法筛选茶多酚的潜在作用靶点, 并进行蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析、基因本体 (GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。细胞实验中, 将MLO-Y4细胞分为对照组、高糖组、茶多酚组、高糖+茶多酚组及甘露醇组, 并检测细胞增殖活性 (MTT法)、NOS活性、超氧化物及丙二醛 (MDA) 水平, 以评估氧化应激状态及生化指标变化。结果: 高糖环境显著抑制MLO-Y4细胞增殖, 降低NOS活性 ($P < 0.001$), 并显著升高超氧化物及MDA水平 ($P < 0.001$)。茶多酚显著增强细胞增殖活性 ($P < 0.05$), 提高NOS活性 ($P < 0.05$), 并降低氧化应激水平 (超氧化物: $P < 0.05$; MDA: $P < 0.01$)。高糖+茶多酚组相比高糖组, 细胞增殖活性及NOS活性显著提高 ($P < 0.05$), 超氧化物 ($P < 0.05$) 和MDA ($P < 0.01$) 水平显著下降。结论: 本研究系统性解析了茶多酚在DOP中的作用机制, 表明其通过抗氧化和调控代谢功能, 有效缓解高糖环境对骨细胞的不良影响, 发挥显著的骨保护作用。这一发现为茶多酚在糖尿病相关骨病的防治应用提供了重要的实验依据。

关键词: 网络药理学; 茶多酚; 高糖环境; MLO-Y4细胞; 增殖; 氧化应激

Combined Network Pharmacology and Experimental Validation Reveal the Effects of Tea Polyphenols on Osteocyte Proliferation in High-Glucose Environment

Haoyang Yu¹, Jiayi Zhang², Tingting Hu¹, Yong Guo^{1*}

1. School of Intelligent Medicine and Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi;

2. School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi

* 作者简介: 于浩洋 (1998.05-), 男, 汉族, 山东威海人, 硕士在读, 研究方向: 生物力学与组织工程。

通讯作者: 郭勇 (1974.03-), 男, 汉族, 甘肃陇南人, 博士, 教授, 研究方向为生物医学工程与系统生物学。

Abstract: Background: Network pharmacology is a research strategy based on systems biology and bioinformatics, which can be used to analyze the multi-target mechanisms of drugs. High-glucose environment has significant adverse effects on the growth and metabolism of osteocytes, accelerating the occurrence and progression of osteoporosis. Tea polyphenols have attracted widespread attention in metabolic disease research due to their excellent antioxidant and cellular protective effects. Objective: This study combines network pharmacology and cell experiments to investigate the potential mechanism of tea polyphenols in diabetic osteoporosis (DOP) and evaluate their regulatory effects on proliferation activity, nitric oxide synthase (NOS) activity, and oxidative stress levels in murine osteocyte-like MLO-Y4 cells under high-glucose conditions. Methods: Network pharmacology was employed to screen potential targets of tea polyphenols, followed by protein-protein interaction (PPI) network analysis, gene ontology (GO) functional enrichment analysis, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. In cell experiments, MLO-Y4 cells were divided into five groups: control group, high-glucose group, tea polyphenol group, high-glucose + tea polyphenol group, and mannitol group. Cell proliferation activity (MTT assay), NOS activity, superoxide levels, and malondialdehyde (MDA) levels were measured to evaluate oxidative stress status and biochemical changes. Results: The high-glucose environment significantly inhibited MLO-Y4 cell proliferation, decreased NOS activity ($P < 0.001$), and markedly increased superoxide and MDA levels ($P < 0.001$). Tea polyphenols significantly enhanced cell proliferation activity ($P < 0.05$), increased NOS activity ($P < 0.05$), and reduced oxidative stress levels (superoxide: $P < 0.05$; MDA: $P < 0.01$). Compared with the high-glucose group, the high-glucose + tea polyphenol group showed significantly improved cell proliferation activity and NOS activity ($P < 0.05$), with significantly decreased superoxide ($P < 0.05$) and MDA ($P < 0.01$) levels. Conclusion: This study systematically elucidated the mechanism of tea polyphenols in DOP, demonstrating that they effectively alleviate the adverse effects of high-glucose environment on osteocytes through antioxidant and metabolic regulatory functions, exerting significant bone-protective effects. These findings provide important experimental evidence for the application of tea polyphenols in the prevention and treatment of diabetic-related bone diseases.

Keywords: second language acquisition; English education; China

糖尿病性骨质疏松 (diabetes-associated osteoporosis, DOP) 是一种由于糖代谢异常引发的骨量减少、骨微结构破坏和骨脆性增加的骨骼疾病[1], 其发病机制涉及氧化应激、炎症反应及成骨-破骨平衡紊乱等多个因素。随着糖尿病患病率的持续上升, DOP已成为严重影响糖尿病患者生活质量的重要并发症之一, 因此, 探索其分子机制及有效的防治策略具有重要的临床意义。

茶多酚 (tea polyphenols, TP) 是茶叶中的主要生物活性成分, 主要包括表儿茶素 (epicatechin, EC)、表没食子儿茶素 (epigallocatechin, EGC)、表儿茶素没食子酸酯 (epicatechin gallate, ECG) 及表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 等。研究表明, 茶多酚具有抗氧化、抗炎及调节骨代谢等多种生物学功能, 在骨骼健康维持方面具有潜在的保护作用[2]。

网络药理学 (network pharmacology) 是一种基于生物信息学的研究策略, 能够从分子网络层面解析药物的多靶点作用机制。本研究基于网络药理学方法, 筛选茶多酚主要成分的潜在靶点, 并结合蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析、基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析, 探讨茶多酚在DOP中的作用机制。随后, 通过细胞实验验证茶多酚对高糖环境下骨样细胞增殖及氧化应激水平的影响, 为茶多酚在DOP防治中的潜在应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 DOP疾病靶点与茶多酚的主要成分靶点

收集在GeneCards (<https://www.genecards.org>) 中取前1000个作为DOP潜在靶点, 得到DOP疾病靶点。通过PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站搜索茶多酚中主要成分表儿茶素 (EC)、表没食子儿茶素 (EGC)、表儿茶素没食子酸酯 (ECG) 和表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)

的SMILES, 通过SwissTargetPrediction(<http://swisstargetprediction.ch/>)和PharmMapper (<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 网站得到茶多酚主要成分的靶点。

1.1.2 确定交集靶点

利用Venny 2.8.1平台 (<https://www.omicstudio.cn/>), 将DOP的靶点与EC、EGC、ECG和EGCG靶点进行映射和交集分析, 通过绘制维恩图确定茶多酚在治疗DOP中的潜在作用靶点。

1.1.3 构建PPI网络

将1.1.2部分所得交集靶点导入STRING (<https://string-db.org>) 数据库, 构建EC、EGC、ECG和EGCG针对DOP的PPI网络。进一步将数据集导入Cytoscape 3.10.3软件中, 并应用BisoGenet与CytoNCA插件探究药物靶点与疾病靶点之间的相互作用。选取通过计算度值 (Degree)、介度中心性 (BC) 和紧密度中心性 (CC) 识别核心靶点。

1.1.4 GO功能与KEGG通路富集分析

通过DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 平台对交集靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析, 以探索EC、EGC、ECG和EGCG在治疗DOP中的潜在生物学效应。使用R语言对结果进行可视化, 以识别关键的生物学功能和代谢通路。

1.2 材料

1.2.1 细胞

小鼠骨样细胞MLO-Y4购自上海通派生物科技有限公司。

1.2.2 实验中使用的试剂和仪器

茶多酚由克鲁尼 (中国) 提供; 甘露糖购自碧云天 (中国); 葡萄糖来源于索莱宝 (中国); DMEM培养基由赛默飞世尔 (中国) 供应; 胎牛血清来自Gemini (美国); 酶标仪为BIO-RAD (美国) 产品; NOS试剂由南京建成 (中国) 提供; 超氧化物测定试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒均来

自碧云天(中国); MTT细胞增殖检测试剂盒由蓝季(中国)提供; 丙二醛测定试剂盒购自伊莱瑞特(中国)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与收集

将小鼠骨样细胞系MLO-Y4复苏后, 置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 在37℃、5%CO₂的培养箱中孵育。每48小时更换一次培养基, 并利用显微镜监测细胞生长状态。每孔加入100 μL裂解液, 并将六孔板置于冰上裂解30分钟。裂解完成后, 用细胞刮刀轻轻刮下细胞, 将裂解液转移至预冷的离心管中, 于4℃、12000 rpm离心15分钟, 收集上清液即为细胞裂解液。

1.3.2 实验分组处理

取MLO-Y4细胞, 分为5组处理:

对照组	10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的DMEM培养液	葡萄糖浓度为5.5 mmol/L
茶多酚组	10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的DMEM培养液	葡萄糖浓度为5.5 mmol/L+1 μg/mL 茶多酚
高糖组	10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的DMEM培养液	葡萄糖浓度为33 mmol/L
高糖+茶多酚组	10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的DMEM培养液	葡萄糖浓度为33 mmol/L+1 μg/mL 茶多酚
甘露醇组	10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的DMEM培养液	葡萄糖浓度为5.5 mmol/L+27.5 mmol/L 甘露醇

各组均采用相同的基础培养条件, 通过调整葡萄糖浓度和添加茶多酚或甘露醇, 模拟不同实验环境以观察细胞反应。

分组后, 以 1×10^5 /孔的密度把MLO-Y4细胞接种在6孔板中, 加入2mL完全培养基, 培养24h。弃掉旧培养基, 根据分组情况加入2mL培养基培养48h。

1.3.3 MTT法检测细胞增殖状态

将处于对数生长期的MLO-Y4细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于96孔板中并加入100 μL完全培养基,

置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24小时。弃上清, 根据分组加入相应培养基, 培养1、2、3、4天每天结束后, 加入50 μL MTT溶液(浓度为0.5mg/mL)培养4h。弃上清加入150 μL DMSO, 放入37℃烘箱30min, 使用酶标仪, 设定波长490nm测定各孔的吸光度。

1.3.4 一氧化氮合酶检测

按照1.2.1和1.2.2的方法进行细胞培养与收集。取部分上清, 根据BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。剩余每组上清液根据一氧化氮合酶试剂盒检测细胞内的一氧化氮合酶含量。使用酶标仪在530nm处测量吸光度并换算成一氧化氮合酶活力值。

1.3.5 骨细胞超氧化物检测

按照1.2.1和1.2.2的方法进行细胞培养与收集。取部分上清, 根据BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 采用超氧化物试剂盒检测细胞内超氧化物含量。

1.3.6 骨细胞丙二醛检测

按照1.2.1和1.2.2的方法进行细胞培养与收集。取部分上清, 根据BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 采用丙二醛试剂盒检测蛋白样品的丙二醛浓度。

1.4 主要观察指标

各组骨细胞的增殖活性、一氧化氮合酶、超氧化物及丙二醛含量检测结果。

1.5 统计学分析

采用Graph Pad Prism 10软件进行数据处理与绘图分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 网络药理学研究

2.1.1 CDF与DOP的共同靶点

通过GeneCards与OMIM数据库共收集DOP疾病靶点1000个采用Swiss和PharmMapper数据库获取

EC、EGC、ECG和EGCG药物靶点260个，去除重复项后80个，取交集后共有靶点49个（图1）。

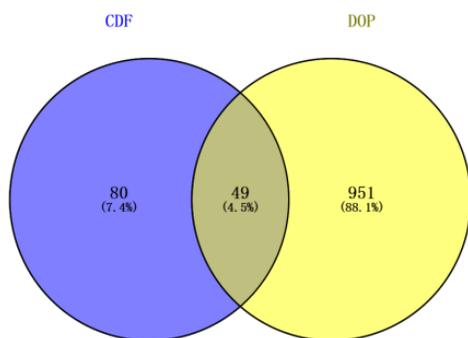


图1. DOP疾病靶点与药物靶点韦恩图

2.1.2 PPI网络

利用STRING在线平台构建EC、EGC、ECG和EGCG治疗DOP的 PPI 网络，包括49个节点，384

条互相作用边（图2）。进一步将数据集导入Cytoscape3.7.2中，根据Degree>15、BC>0.59、CC>0.026筛选出核心基因AKT1，MMP2，REN，APP，PPARG，GSK3B，HSP90AA1，MMP9，SRC，BCL2，ESR1，HIF1A（图3）。

2.1.3 建立多成分、多靶点以及多通路的复杂网状关系

利用Cytoscape将筛选到的活性成分和交集靶点构建“药物—成分—靶点—通路”网络图。这些靶点包括各种已知与成骨、破骨、炎症和血管生成等过程的基因，如AKT1,VEGFA,Src,MMP9,MAPK8等。从网络的拓扑结构分析来看，并按照Degree值排序，EC和山柰酚EGC排名最前，表明这两个成分可能在中药组方治疗DOP的作用机理中占据核心地位(图4)。

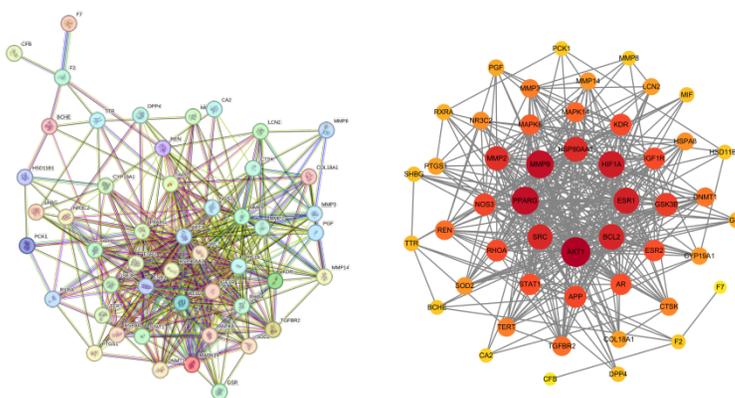


图2. DOP的核心靶蛋白筛选图

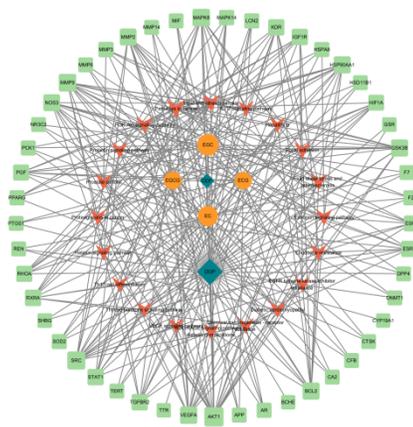


图3. 针对CDF治疗DOP的“成分—靶标—通路”多维网络关系

2.1.4 GO和KEGG通路富集分析结果

对49个共有靶点进行GO富集分析，如图5所示，GO富集分析显示主要涉及细胞信号传导、基因表达调控、细胞迁移、应对外界刺激、细胞外基质降解、蛋白质相互作用等，可能在癌症、骨代谢疾病（如糖尿病性骨质疏松）、组织重塑等病理过程中发挥作用。KEGG通路富集如图6所示，靶点主要富集癌症、代谢疾病、心血管疾病、内分泌调节、免疫炎症反应等通路上。

2.2 实验结果

2.2.1 茶多酚对高糖环境下骨细胞增殖的影响

MTT实验的吸光度值反映细胞增殖活性水平，活性越高吸光度值越大。如图5所示，培养48h，72h，96h时，对照组的吸光度低于高糖组的

吸光度，表明高糖环境对骨细胞的增殖具有抑制作用。在培养24h，48h，72h，96h时，高糖+茶多酚组细胞增殖活性高于高糖组，说明茶多酚明显提高了骨细胞的增殖活性。这表明茶多酚在缓解高糖对骨细胞的负面影响上具有潜在的调控作用。

2.2.2 茶多酚对高糖环境骨细胞一氧化氮合酶含量的影响

一氧化氮合酶含量能反映骨细胞的生理功能状态和代谢活性，一氧化氮合酶含量越高功能状态越高。如图6所示，培养3d后，与对照组相比，高糖组骨细胞的NOS含量降低（ $P < 0.001$ ），茶多酚组骨细胞的NOS含量提升（ $P < 0.05$ ）；与高糖组相比，高糖+茶多酚组骨细胞的一氧化氮合酶含量增加（ $P < 0.05$ ），说明高糖环境抑制骨细胞一氧化氮合酶的生成，茶多酚对高糖环境下骨细胞一氧化氮

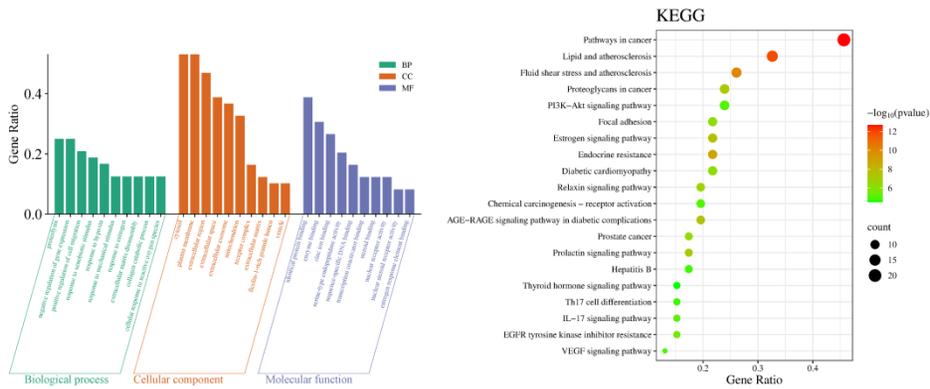


图4. CDF治疗DOP的GO和KEGG分析

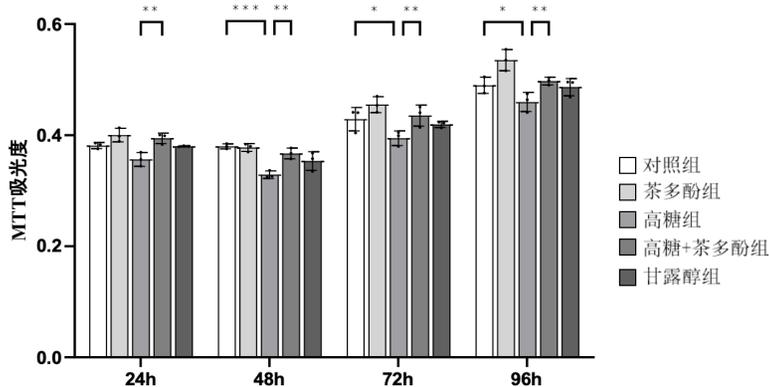


图5. 茶多酚在高糖环境下对骨细胞增殖活性的影响

注：*： $P < 0.05$ ；**： $P < 0.01$ ；***： $P < 0.001$

合酶含量提高有促进作用。

2.2.3 茶多酚对高糖环境下氧化应激水平的影响

细胞氧化应激水平可通过超氧化物和丙二醛含量来评估, 其含量越高, 表明氧化应激程度越严重。如图7所示, 与对照组相比, 高糖组的骨细胞中超氧化物水平和丙二醛含量明显上升 ($P<0.001$)。与高糖组相比, 高糖+茶多酚组的超氧化物 ($P<0.05$) 和丙二醛含量 ($P<0.01$) 有所减少。这些结果表明, 高糖环境显著加剧了骨细胞的氧化应激反应, 而茶多酚能够有效抑制这一过程, 显著缓解高糖诱导的氧化损伤。

3 讨论

本研究采用网络药理学分析与细胞实验相结合的方法, 探讨了茶多酚在高糖环境下对骨细胞增殖及氧化应激的调控作用。结果表明, 茶多酚通过多靶点、多通路机制, 能够有效逆转高糖诱导的骨细胞损伤, 这为糖尿病性骨质疏松 (DOP) 的潜在防治策略提供了新的理论依据。

基于网络药理学分析, 我们将茶多酚的四种主要活性成分 (EC、EGC、ECG、EGCG) 与DOP相关的49个交集靶点, 并通过PPI网络筛选出核心基因, 如AKT1、MMP2、PPARG、GSK3B和

ESR1等。这些核心基因广泛参与细胞增殖、炎症反应、氧化应激以及骨代谢调控等生物过程。例如, GSK3参与抑制成骨细胞凋亡[3], AKT1表达抑制骨关节炎软骨细胞增殖, 促进细胞凋亡[4]这些结果进一步证实, 茶多酚可能通过多靶点协同作用, 改善DOP的病理状态。

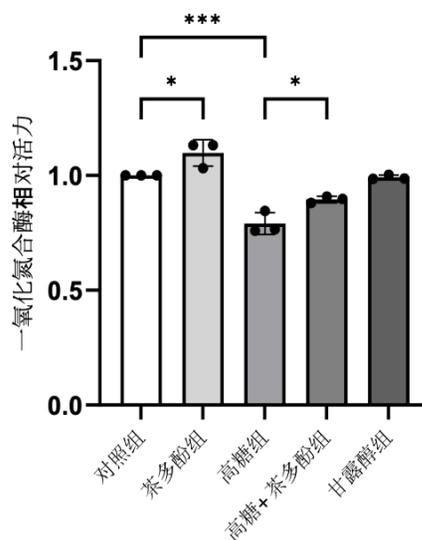


图6. 茶多酚对高糖环境骨细胞一氧化氮合酶含量的影响

注: *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$

KEGG通路富集分析显示, 茶多酚靶点富集于癌症、代谢疾病、心血管疾病及免疫炎症反应相关信号通路。例如, HIF-1信号通路在缺氧环境下促

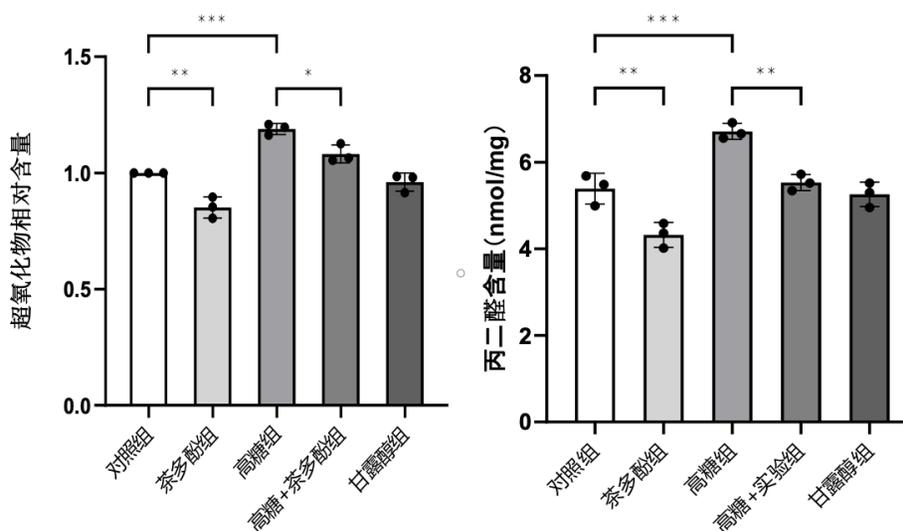


图7. 茶多酚对高糖环境下骨细胞超氧化物含量 (左) 和丙二醛 (右) 含量的影响

注: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

进成骨细胞分化[5], 而NF- κ B通路在炎症调节和氧化应激应答中具有核心地位。茶多酚可能通过抑制NF- κ B信号, 减少炎症反应, 抑制破骨细胞形成和吸收[6]。

在高糖条件下, 活性氧(ROS)的积累引发氧化应激, 导致成骨细胞和骨细胞的损伤和凋亡, 进一步削弱了骨的形成功能[7]。与此同时, 糖基化终产物(AGEs)在高糖环境中大量生成, 对小鼠胚胎成骨细胞系MC3T3-E1细胞的增殖和分化具有抑制作用, 能够诱导细胞凋亡并降低其成骨分化能力[8]。

高糖条件会增加体内活性氧(ROS)的生成, 进一步加剧氧化应激。氧化应激通过破坏骨骼抗氧化防御机制和增强破骨细胞活性, 促进骨质疏松症的发展, 而抗氧化剂的补充可能有效减缓骨质流失并促进骨折愈合[9]。茶多酚是茶中的主要活性成分, 是强抗氧化剂, 具有显著的自由基清除活性[10]。更重要的是, 茶多酚能帮助维持骨细胞的正常功能, 并促进骨基质的矿化, 进一步抵抗高糖环境所导致的骨质流失和代谢失衡[11]。

本研究基于网络药理学分析和细胞实验, 系统探讨了茶多酚在高糖环境下对骨细胞增殖及氧化应激的调控作用。结果表明, 茶多酚可通过多靶点、多通路机制, 有效改善高糖诱导的骨细胞损伤, 可能通过调控AKT1、MMP2、PPARG、GSK3B和ESR1等核心基因, 以及HIF-1、NF- κ B等信号通路, 发挥抗炎、抗氧化及促进成骨的作用。此外, 茶多酚的抗氧化特性能够缓解高糖环境诱导的ROS积累, 减少氧化应激损伤, 从而维持骨细胞功能和骨代谢平衡。

参考文献

- [1] 杨琦. 去甲基化酶FTO介导m6A甲基化影响糖尿病骨质疏松成骨细胞铁死亡机制的研究[D]. 辽宁: 中国医科大学, 2023.
- [2] 叶晴, 刘毅, 陈金鹏, 等. 绿茶化学成分及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2021, 44(12): 2711-2719.
- [3] 肖建生, 张鹏, 赵洪洲, 等. miR-135b靶向GSK3B抑制地塞米松诱导成骨细胞凋亡[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(11): 1588-159.
- [4] 张健博, 宋建锋, 武海发. miR-378c靶向AKT1调控骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡的机制[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(17): 3748-3753.
- [5] 高丹丹. HIF-1 α 在低氧诱导的成骨细胞RANKL表达中作用及低氧下红景天苷对破骨细胞HIF-1 α 通路调控作用的研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2020.
- [6] 赵晨晨, 屈国新, 蔡迅梓. 茶多酚通过p38、NF- κ B信号途径抑制RANKL诱导的破骨细胞生成及骨吸收[C].
- [7] 董善坤, 孙水. 氧化应激在激素性股骨头坏死发病机制中的研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(04): 526-533.
- [8] 吴培连, 胡赞, 刘东蓉, 等. 晚期糖基化终产物通过调控F-actin/YAP抑制小鼠胚胎成骨细胞成骨分化[J]. 海军军医大学学报, 2022, 43(05): 490-496.
- [9] 程韶, 舒冰, 赵永见, 等. 氧化应激对骨重建的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(10): 1478-1482.
- [10] 陈志云, 李杰, 冯雨, 等. 茶多酚生物活性及作用机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 333-341.
- [11] 曹振, 潘光玉, 王丽萍, 等. 茶多酚对骨组织细胞的影响及其在组织工程中的应用进展[J]. 国际生物医学工程杂志, 2020, 43(03): 239-243.

