

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.22.014

基于网络药理学探析黄连治疗糖尿病肾病的作用机制*

张志勇¹, 唐爱华^{2△}, 李双蕾², 许淑华¹, 高 美¹

(1. 广西中医药大学研究生学院, 广西 南宁 530000; 2. 广西中医药大学第一附属医院内分泌科, 广西 南宁 530000)

摘要:目的 基于网络药理学探讨黄连治疗糖尿病肾病(DN)的作用机制。方法 在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)中筛选黄连的活性成分及靶点基因,在 GendCards、OMIM 数据库中寻找 DN 相关靶点基因,取黄连靶点基因与 DN 相关靶点基因的交集,筛选出黄连和 DN 共同作用的靶点基因。通过 Cytoscape 3.5.0 软件,构建疾病-活性成分-靶点基因的相互网络。通过 String 平台构建蛋白互作(PPI)网络,绘制 PPI 网络柱状图,对靶点基因进行基因本体论(GO)富集通路及京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路进行分析。结果 从黄连中筛选获得 14 个活性成分,与 DN 相关的关键靶点基因 101 个,KEGG 富集通路主要包括 AGE-RAGE 信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化信号通路、缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路等,推测黄连可能是通过以上通路等对 DN 产生干预作用。结论 黄连具有多个活性成分,能通过多个靶点、多个通路发挥治疗 DN 的作用。

关键词:网络药理学;黄连;糖尿病肾病;靶点基因;信号通路;作用机制

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)22-0057-05

Mechanism of Coptidis Rhizoma in the Treatment of Diabetic Nephropathy Based on Network Pharmacology

ZHANG Zhiyong¹, TANG Aihua², LI Shuanglei², XU Shuhua¹, GAO Mei¹

(1. Graduate School of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530000; 2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530000)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Coptidis Rhizoma in the treatment of diabetic nephropathy(DN) based on network pharmacology. **Methods** The active components and target genes of Coptidis Rhizoma were screened from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform(TCMSP), and the DN-related target genes were searched in GendCards and Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM) databases. The target genes of Coptidis Rhizoma were intersected with the DN-related target genes, and the target genes of Coptidis Rhizoma and DN were screened. Cytoscape 3.5.0 software was used to construct an inter-network of disease-active component-target genes. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by the String platform, and the PPI network histogram was drawn. The gene ontology (GO) enrichment pathway and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway of target genes were analyzed. **Results** A total of 14 active components were screened from Coptidis Rhizoma, and 101 key target genes related to DN. KEGG enrichment pathways mainly included advanced glycation end products(AGE)-receptor for AGE(RAGE) signal pathway, fluid shear stress and atherosclerosis signal pathway, hypoxia inducible factor-1(HIF-1) signal pathway, etc. It is speculated that Coptidis Rhizoma might interfere with DN through the above pathways. **Conclusion** Coptidis Rhizoma has multiple active components, which can play a role in the treatment of DN through multiple targets and pathways.

Key words: network pharmacology; Coptidis Rhizoma; diabetic nephropathy; target genes; signal pathway; mechanism

近年来,我国糖尿病肾病(DN)发病率呈逐年上升趋势,其中香港 DN 发病率达 31.6%^[1],目前尚无治愈方法,只能通过饮食控制,以及采用降糖、控制血压、减少尿蛋白、护肾等对症治疗,疗效欠佳。研究 DN 的新靶点和开发新药物成为公众关注的焦点。网络药理学是研究中药活性成分控制基因靶点表达,通过信号通路治疗疾病的新方法学,是初步探讨中药治疗疾病作用机制的新思路。中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)包含 499 味草药及每味草药的化合物成分(超 29000 个),针对每个化合物成分提供了较全面的人体吸收、分布、代谢(ADME)等评价数据,同时提供了潜在活性成分的

靶标及其相关疾病信息,形成了针对每味草药的药物-靶标-疾病网络,为从系统水平研究中药作用机理提供了依据^[2]。此外,该平台提供了许多中草药的药物代谢动力学数据,如口服生物利用度、药物相似度、肠上皮通透性、血脑屏障、水溶性等,广泛用于药物成分的筛选和评估^[3]。本研究中基于 TCMSP 数据库,通过网络药理学挖掘出黄连治疗 DN 的基因靶点和信号通路,探析其作用机制。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 活性成分及其相关靶点

利用 TCMSP 数据库搜索黄连的所有化学成分,将

*基金项目:广西名老中医民族医传承工作室建设项目[桂卫中〔2014〕9号]。

第一作者:张志勇,男,硕士研究生,研究方向为中医防治内分泌代谢性疾病,(电子信箱)1916633986@qq.com。

△通信作者:唐爱华,男,主任医师,研究方向为中医防治内分泌代谢性疾病,(电子信箱)tah2668@163.com。

口服生物利用度(OB)和类药性(DL)作为筛选参数,对药物所有成分进行筛选。设 $OB > 30\%$, $DL > 0.18^{[4]}$, 筛选出候选活性成分。选择 TCMSP 数据库中 Related Targets 项,可得药物名称等相关靶点信息。

1.2 靶点基因转换

使用 Perl 语言对所有 DN 相关的靶点基因进行名称转换,得到靶点基因的标准名称。

1.3 疾病相关基因靶点预测

通过 GeneCards 和 OMIM 数据库搜索糖尿病肾病英文名 diabetic nephropathy,得到所有与 DN 相关的靶点基因,作为疾病的候选靶点基因。

1.4 药物靶点基因与疾病靶点基因交集

通过 R 3.6.3 软件分析出药物和疾病的共同靶点基因,绘制 venny 图^[2]。

1.5 网络构建与分析

将药物和疾病的共同靶点基因导入文件,进行中药网络药理学可视化,利用 Cytoscape 3.5.0 软件构建网络,可得到疾病-活性成分-靶点基因相互作用的网络图;利用 String 数据库构建蛋白互作(PPI)网络,用 R 软件绘制出 PPI 网络核心基因柱状图,对黄连治疗 DN 潜在的靶点基因进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。

2 结果

2.1 活性成分及其相关基因靶点

通过筛选,共得到 14 种候选药效成分,主要包含众多生物碱类,详见表 1。据此得到所有药物相关靶点信息,并通过转换得到靶点基因的标准名称。

表 1 黄连活性成分

Tab.1 The active components of Coptidis Rhizoma

序号	活性成分	OB(%)	DL	序号	活性成分	OB(%)	DL
1	黄连碱	30.67	0.86	8	甲基黄连碱	45.83	0.87
2	掌叶二萜酮 A	35.36	0.65	9	槲皮素	46.43	0.28
3	小檗红碱	35.74	0.73	10	(R)-氢化小檗碱	55.37	0.77
4	小檗浸碱	36.68	0.82	11	广玉兰内酯	63.71	0.19
5	小檗碱	36.86	0.78	12	巴马汀	64.60	0.65
6	表小檗碱	43.09	0.78	13	穆坪马兜铃酰胺	86.71	0.26
7	黄柏酮	43.29	0.77	14	黄麻苷 A	104.95	0.78

2.2 疾病靶点预测

共检索到 3 273 个靶点基因,其中 GeneCards 数据库 3 082 个,OMIM 数据库 191 个。

2.3 药物靶点基因与疾病靶点基因交集

共得到 101 个靶点基因。

2.4 网络构建

疾病-活性成分-靶点基因相互作用的网络图中可发现 6 个治疗 DN 的关键有效活性成分,分别为小檗

碱、小檗红碱、表小檗碱、槲皮素、黄连碱、甲基黄连碱(见图 1)。PPI 网络图中共有 101 个节点,1 680 条作用连线,平均节点度 33.3,平均局部类聚系数 0.673。PPI 网络核心基因柱状图见图 2。

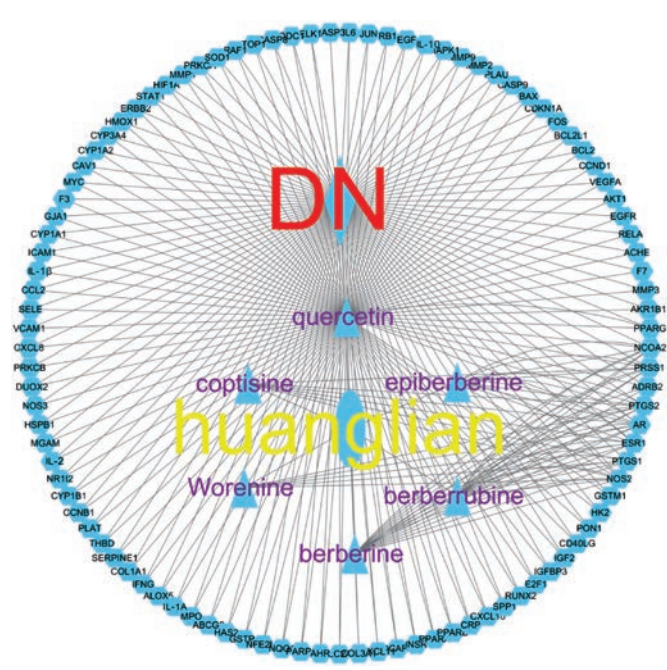


图 1 疾病-活性成分-靶点基因网络图

Fig.1 Disease-active components-target genes network

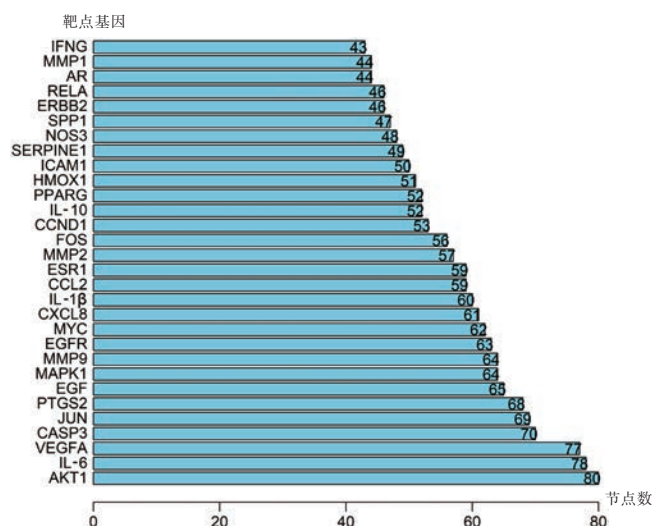


图 2 PPI 网络核心基因柱状图

Fig.2 PPI network histogram of core genes

2.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

GO 功能富集分析图见图 3,KEGG 富集分析图见图 4。可见,黄连治疗 DN 涉及靶点的生物学功能及信号通路众多,但与 DN 密切相关靶点的生物学功能涉及受体结合、酶的活性、氧化还原等,主要富集在细胞因子受体结合、受体配体活性、DNA 结合转录激活剂活性和 RNA 聚合酶 II 特异性、细胞因子活性、RNA 聚合酶 II 转录因子结合、丝氨酸水解酶活性、激酶调节活性、氧化还原酶活

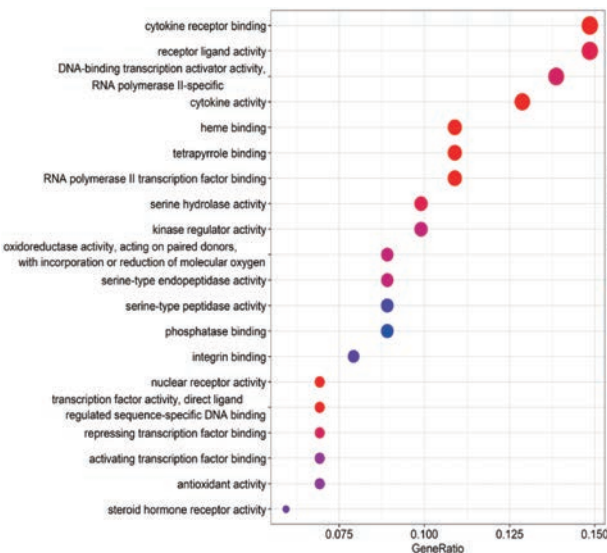


图 3 GO 功能富集分析图
Fig. 3 GO function enrichment analysis diagram

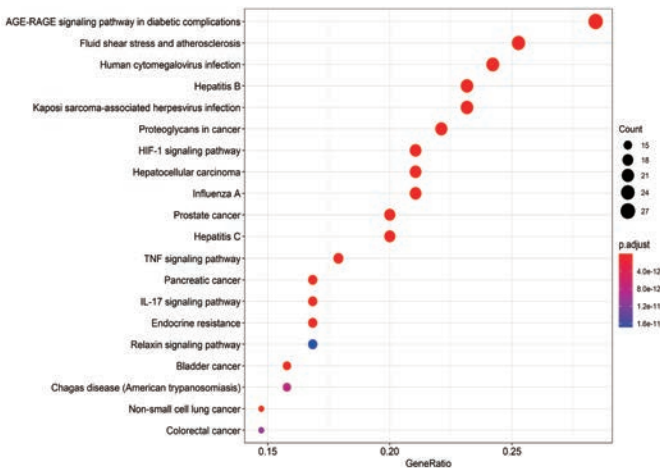


图 4 KEGG 富集分析图
Fig. 4 KEGG enrichment analysis diagram

表 2 黄连治疗 DN 的靶点功能信息

Tab. 2 Target function information of Coptidis Rhizoma in the treatment of DN

靶点功能	pvalue	p. adjust	Count
细胞因子受体结合	7.95×10^{-11}	2.79×10^{-8}	15
受体配体活性	9.41×10^{-8}	4.13×10^{-6}	15
DNA 结合转录激活剂活性和 RNA 聚合酶 II 特异性	1.95×10^{-7}	6.23×10^{-6}	14
细胞因子活性	3.70×10^{-10}	4.33×10^{-8}	13
RNA 聚合酶 II 转录因子结合	1.31×10^{-9}	9.23×10^{-8}	11
丝氨酸水解酶活性	1.08×10^{-7}	4.23×10^{-6}	10
激酶调节活性	2.94×10^{-7}	8.29×10^{-6}	10
氧化还原酶活性, 作用于成对的供体, 与分子氧结合或还原	3.14×10^{-7}	8.29×10^{-6}	9

性, 作用于成对的供体, 与分子氧结合或还原等(见表 2)。密切相关的信号通路主要包括 AGE - RAGE 信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化信号通路、缺氧诱导因子 - 1(HIF - 1)信号通路(见表 3)^[13]。

表 3 黄连治疗 DN 的主要通路信息

Tab. 3 The main pathway information of Coptidis Rhizoma in the treatment of DN

通路信息	pvalue	p. adjust	Count
AGE - RAGE 信号通路	1.77×10^{-30}	4.03×10^{-28}	27
流体剪切应力和动脉粥样硬化信号通路	4.95×10^{-22}	5.64×10^{-20}	24
HIF - 1 信号通路	5.69×10^{-19}	3.24×10^{-17}	20

3 讨论

中医称糖尿病为消渴病, DN 由消渴日久发展而来, 饮食无度、胃强脾弱、脾气虚、太阴湿阻、郁阻中焦、气机壅滞、化为燥热、消渴肾水、阴虚火旺、引起下焦湿热损伤肾络; 肾虚阴阳失衡, 气化失司, 水液潴留。黄连具有降血糖、消炎、抗氧化、调血脂等作用, 能清邪热, 化水湿, 《名医别录》中记载黄连“主治五藏冷热……止消渴”, 《本草纲目》中指出其主治“消渴尿多”“小便如油”^[4]。有研究表明, 黄连可激活蛋白激酶、抑制肝脏将非糖物质转化为葡萄糖、促进 B 细胞修复、促进胰岛素受体相关基因表达、提高胰高血糖素样肽 - 1(GLP - 1) 水平等, 从而发挥降血糖效果^[5]。黄连所含黄连总生物碱能降低 DN 模型大鼠肿瘤坏死因子 - α (TNF - α) 和肌酐水平, 改善肾组织细胞损伤^[6]。长期应用黄连可逐渐缓解肾小球病理改变, 延缓疾病进程, 从而达到治疗 DN 的目的^[7]。黄连及其复方不仅控制血糖、血压效果较佳, 在调节脂质代谢紊乱和减少蛋白尿排泄方面也有显著疗效^[8]。

小檗碱、槲皮素是黄连治疗 DN 的主要活性成分。由疾病 - 活性成分 - 靶点基因网络图可见, 小檗碱、槲皮素所控制的靶点基因也是 DN 的靶点基因, 说明小檗碱、槲皮素可通过这些靶点基因改善 DN 症状。小檗碱可通过磷脂酰肌醇 - 3 激酶/蛋白激酶(P13K/AKT)途径降低体内 P13K、磷酸化 AKT 水平, 改善肾功能, 抑制足细胞功能障碍, 从而治疗 DN^[9]; 槲皮素是黄酮类化合物, 对链脲佐菌素(STZ)诱导的 DN 大鼠有抗氧化作用^[10]; 表小檗碱、黄连碱可抑制醛糖还原酶活性, 能预防糖尿病并发症, 但未明确指出可治疗 DN^[11]。目前未见小檗碱、甲基黄连碱治疗 DN 的文献报道, 需进一步研究。说明连治疗 DN 具有多成分的特点。

由 PPI 网络图中可见, 节点数排列前 10 的基因分别为蛋白激酶 1(AKT1)、白细胞介素 6(IL - 6)、血管内皮因子 A(VEGFA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(CASP3)、JUN 原癌基因(JUN)、前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2 或 COX - 2)、表皮生长因子(EGF)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK1)、基质金属蛋白酶 9(MMP - 9)、表皮生长因子受体(EGFR)等, 推测这些基因可能是黄连干预 DN 的主要基因靶点。余红等^[12]研究发现, 减弱 AKT1 蛋白的表达, 能部分抑制肾小管上皮细胞的转分

化过程,减少纤维连接蛋白(FN)沉积,改善 DN。IL-6 是趋化因子家族的一种细胞因子,在 DN 发病过程中扮演着重要角色。IL-6-174G/C 基因多态性与 DN 的风险相关^[13]。在高糖环境诱导下,IL-6 可能通过激活 Janus kinase2(JAK2)/STAT3 信号通路,对足细胞肥大的形成起到重要作用,从而加速 DN 的发展^[14]。CASP 基因是半胱氨酸家族的一部分,在细胞的衰老、凋亡等生理过程中起重要作用。ELENA 等^[15]发现,DN 的生理病理机制有着和细胞损伤、凋亡一样特征的超微机构变化,认为 DN 的发生与发展可能与 CASP 基因相关。COX-2 与 DN 有关,其在肾脏中的上调会导致肾小球损伤和蛋白尿的产生,选择性抑制 COX-2 可延缓肾损伤的进展^[16]。尿液 EGF 与 DN 进展密切,在区分早期 DN 和临床 DN,以及在非 DN 患者中区分微量蛋白尿时显示了良好的应用价值,提示 EGF 可作为 DN 的特异性诊断标志物^[17]。说明黄连治疗 DN 具有多靶点特点。

黄连的活性成分通过 AGE-RAGE、流体剪切应力和动脉粥样硬化、HIF-1 等信号通路治疗 DN^[5]。小檗碱可中断 AGE-RAGE 信号通路,降低细胞中 AGEs 和 RAGE 水平,并能抑制细胞膜增殖^[18]。槲皮素可抑制 AGE-RAGE 信号通路,减少血管损害,降低蛋白尿水平^[19]。流体剪切应力代表血流施加在血管内皮的摩擦力,低流体剪切力有助于血管动脉粥样硬化的发展^[20]。现代药理学研究表明,小檗碱具有多种药理活性,包括降血糖、调血脂、抗炎等活性,可发挥抗动脉粥样硬化作用,此外,小檗碱的抗炎和抗氧化特性能抑制血管平滑肌细胞增殖和改善内皮功能障碍^[21],从而改善肾脏血流,增加流体剪切力,达到治疗 DN 的目的。HIF-1 信号通路在炎症反应中激活 VEGFA 的表达,以抵消缺氧,并防止肾脏组织损伤^[22]。VEGFA 在 DN 的发病机理中起重要作用,过表达将促进微血管内皮细胞的增殖,并加剧血管疾病的发生。KALLINIKOU 等^[23]研究表明,VEGFA 可作为生物标志物识别 DN 的进展,并在 DN 患者的血浆和尿液中具有较高的表达水平。小檗碱能激活 HIF-1A 信号通路,抑制 DN 模型大鼠的肾小管上皮细胞凋亡^[24];槲皮素能通过调节 HIF-1A 和 VEGFA 水平改善肾功能,降低蛋白尿水平^[25-26]。

综上所述,本研究从分子学角度出发,运用网络药理学方法,分析黄连的中药活性成分,挖掘出治疗 DN 的靶点基因,发现黄连是通过小檗碱、槲皮素等成分,AGE-RAGE 信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化信号通路、HIF-1 信号通路等来治疗 DN。但本研究范围仅局限于数据库,仍需进一步进行临床试验验证。

参考文献

[1] MOK KY, CHAN PF, LAI LKP, et al. Prevalence of diabetic

nephropathy among Chinese patients with type 2 diabetes mellitus and different categories of their estimated glomerular filtration rate based on the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation in primary care in Hong Kong: a cross-sectional study[J]. J Diabetes Metab Disord, 2019, 18(2): 281-288.

[2] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.

[3] LEE WY, LEE CY, KIM YS, et al. The Methodological Trends of Traditional Herbal Medicine Employing Network Pharmacology[J]. Biomolecules, 2019, 9(8): 362.

[4] 应敏, 王颖, 刘金坤. 薏苡汤治疗类风湿关节炎的网络药理学分析[J]. 中国药业, 2019, 28(17): 1-7.

[5] 盖晓红, 刘素香, 任涛, 等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4919-4927.

[6] 晋霞, 姚先梅, 汪琛媛, 等. 黄连总生物碱对糖尿病肾病大鼠的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 82-85.

[7] 郭杨志, 杜娟, 冯兴中, 等. 大剂量黄连对糖尿病肾病大鼠糖化血红蛋白、TNF- α 及肾脏病理的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(4): 830-832.

[8] 王元雪, 米杰. 黄连治疗 2 型糖尿病肾病的机制研究进展[J]. 中西医结合研究, 2014, 6(4): 214-215.

[9] NI WJ, ZHOU H, DING HH, et al. Berberine ameliorates renal impairment and inhibits podocyte dysfunction by targeting the phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B pathway in diabetic rats[J]. J Diabetes Investig, 2020, 11(2): 297-306.

[10] ISKENDER H, DOKUMACIOGLU E, SEN TM, et al. The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF- κ B and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90(3): 500-508.

[11] JUNG HA, YOON NY, BAE HJ, et al. Inhibitory activities of the alkaloids from Coptidis Rhizoma against aldose reductase[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(11): 1405-1412.

[12] 余红, 石明隽, 肖璵, 等. 丹芪合剂下调糖尿病肾病大鼠肾组织 Akt1 的表达[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 259-262.

[13] PAPAOIKONOMOU S, TENTOLOURIS N, TOUSOULIS D, et al. The association of the 174G > C polymorphism of interleukin 6 gene with diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Complications, 2013, 27(6): 576-579.

[14] JO HA, KIM JY, YANG SH, et al. The role of local IL6/JAK2/STAT3 signaling in high glucose-induced podocyte hypertrophy[J]. Kidney Research and Clinical Practice, 2016, 35(4): 212-218.

[15] ELENA B, ADRIANA ID, MIRELA C, et al. Caspases, Cell Death and Diabetic Nephropathy[J]. Rom J Intern Med, 2015, 53(4): 296-303.

[16] QUADRI SS, CULVER SA, LI C, et al. Interaction of the renin angiotensin and cox systems in the kidney[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2016, 21(8): 215-226.

[17] 刘帅辉. EGF 作为糖尿病肾病标志物的筛选验证与机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2018.