

基于网络药理学的肾气丸治疗糖尿病作用机制研究

徐 锋, 黄旭龙, 吴红梅, 王祥培

贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

摘 要: **目的** 运用网络药理学方法筛选肾气丸的活性成分及核心靶标, 探讨肾气丸治疗糖尿病的作用机制。**方法** 经中药系统药理学分析平台 (TCMSP) 并结合文献查询, 筛选肾气丸的活性成分; 通过 TTD 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库筛选肾气丸活性化合物的作用靶点, 建立靶点数据集; 通过 OMIM 数据库和 DrugBank 数据库筛选糖尿病相关的靶标; PPI 数据库构建肾气丸和糖尿病的交互靶标; 用 Cytoscape 软件构建成分-靶点-疾病交互网络图, 并通过 ClueGO 富集分析涉及的靶点基因功能及信号通路; 应用 Autodock 软件进行核心靶标分子对接。**结果** 筛选得到肾气丸 100 个活性成分, 网络分析表明肾气丸活性成分涉及低密度脂蛋白受体相关蛋白 6、胰岛素受体底物 1、SHC 转化蛋白 1 等靶点 58 个, 靶点与调控基因的转录、细胞凋亡、细胞增殖、胰岛素受体等生物过程相关, 通过调节胰岛素抵抗、TNF 信号通路、2 型糖尿病信号通路、胰岛素信号通路等通路来发挥其抗糖尿病作用。**结论** 肾气丸治疗糖尿病具有多成分-多靶点-多途径的特点, 为进一步研究肾气丸治疗糖尿病的作用及分子机制提供了新思路和新方向。

关键词: 肾气丸; 糖尿病; 网络药理学; 胰岛素抵抗; TNF 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)16-3880-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.021

Mechanism of anti-diabetes of Shenqi Pills based on network pharmacology

XU Feng, HUANG Xu-long, WU Hong-mei, WANG Xiang-pei

College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective The active ingredients and core targets of Shenqi Pills were screened using network pharmacology to explore the underlying mechanism of Shenqi Pills with anti-diabetic activity. **Methods** The active compounds and targets of Shenqi Pills were obtained by literature, TCMSP database, Swiss Target Prediction database, and TTD database. Then the target dataset was established, OMIM database and DrugBank database were used to screen the diabetes-related targets, and the interactive target of Shenqi Pills and diabetes was constructed using PPI database. In addition, the “component-target-disease” interactive network map was constructed by Cytoscape software. The target gene function and signaling pathway were analyzed by ClueGO and the molecules and core targets were docked using Autodock software. **Results** The results showed that 100 active constituents of Shenqi Pills were screened. Network analysis indicated that the active components of Shenqi Pills involved 58 targets, including low-density lipoprotein receptor-related protein 6, insulin receptor substrate 1, SHC-transforming protein 1, etc. Targets were involved in biological processes such as transcription, apoptosis, cell proliferation, and insulin receptors. Shenqi Pills had anti-diabetic activity by regulating many signaling pathways such as insulin resistance, TNF signaling pathway, type II diabetes mellitus, and insulin signaling pathway. **Conclusion** This study demonstrates the characteristics of Shenqi Pills with multi-component-multi-target-multi-pathway to treat diabetes, and provides new ideas and targets for further research on the anti-diabetic activity and the underlying mechanism of Shenqi Pills.

Key words: Shenqi Pills; diabetes; network pharmacology; insulin resistance; TNF signaling pathway

糖尿病属于中医“消渴”证的范畴, 张仲景以肾气丸治疗。肾气丸包括干地黄 (玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根)、山药 (薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干

燥根茎)、山茱萸 (山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉)、泽泻 [泽泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎]、茯苓 [多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos*

收稿日期: 2019-01-21

基金项目: 贵阳医学院博士启动基金 (2017); 贵州省国内一流建设学科项目 (中药学) (GNYL [2017] 008 号)

作者简介: 徐 锋, 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药质量控制及中药药理学研究。Tel: 18286036768 E-mail: xf333666999@sina.com

(Schw.) Wolf 的干燥菌核]、牡丹皮(毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根茎)、桂枝(樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝)和附子(毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Decx. 的子根加工品)共 8 味中药^[1], 主治肾阳不足证, 如腰痛脚软, 身半以下常有冷感, 少腹拘急, 小便不利, 或小便反多, 入夜尤甚, 阳痿早泄, 舌淡而胖, 脉虚弱, 尺部沉细或沉弱而迟, 以及痰饮、水肿、消渴、脚气、转胞等。现代研究发现肾气丸具有丰富的药理活性, 包括治疗慢性心力衰竭、非酒精性脂肪性肝炎、肾损伤、抗氧化、抗糖尿病肾病、抗糖尿病等^[2-7]。有报道推测肾气丸的药效物质基础为桂皮醛、马钱苷和丹皮酚^[8-10], 但是针对肾气丸治疗不同疾病的药效物质基础尚不明确。而关于肾气丸组方中药的药效物质基础研究丰富, 如地黄主要含有的活性成分为梓醇、益母草苷、毛蕊花糖苷和地黄苷 D^[11]; 山药的药效活性物质包括山药多糖、总黄酮等^[12]; 山茱萸的活性成分主要包括莫诺苷、马钱苷、当归苷、齐墩果酸和熊果酸等^[13]; 泽泻的活性物质基础有泽泻多糖、泽泻醇 A~O 及泽泻二醇等萜类化合物^[14]; 茯苓的主要药效物质基础为茯苓多糖、茯苓三萜类化合物、甾醇、脂肪酸、挥发油等^[15]; 牡丹皮的主要活性成分包括丹皮酚、芍药苷、没食子酸、氧化芍药苷、牡丹皮苷 C、儿茶素等^[16]; 桂枝的主要活性部位为挥发油, 其活性成分包括桂皮醛、桂皮酸等^[17-18]; 附子的主要活性成分为生物碱类、黄酮类、多糖、甾醇等^[19]。肾气丸组方中药的活性成分众多, 表明肾气丸不是通过单一或几个成分发挥治疗疾病的药效, 其作用的发挥应该是多成分协同的结果。

目前报道肾气丸中主要组成中药或其提取成分或部位具有良好的抗糖尿病活性^[20-25], 肾气丸治疗糖尿病具有多靶点、多途径的作用特点。目前关于肾气丸治疗糖尿病的药理活性的研究较多, 但是关于肾气丸治疗糖尿病的分子机制尚不明确, 不利于肾气丸这一经典名方的开发和利用。网络药理学研究思路为整合多个数据库的相关信息构建生物信息网络, 进一步分析网络拓扑结构以及选取特定信号节点实现药物作用多靶点预测^[26]。网络药理学研究策略涵盖了多个靶点, 将药物-靶点网络与生物系统网络相结合, 可为新药研发提供新途径和新策略^[27]。为了促进肾气丸在抗糖尿病方面的利用开发, 本研究应用多个数据库综合挖掘和筛选肾气丸

的活性化学成分及药物作用靶点, 从而预测肾气丸治疗糖尿病的作用及分子机制, 以期能为肾气丸治疗糖尿病的研究提供新思路和新途径。

1 材料与方法

1.1 肾气丸中活性成分的整理及靶点筛选

通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)查询评价得到化合物的吸收、分布、代谢及排泄(ADME)性质并进行靶点预测, 通过查阅文献整理肾气丸组成中药的抗糖尿病活性成分, 结合 SwissTarget Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)靶点预测结果纳入分析。再进行治疗靶点数据库(TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)筛选肾气丸的作用靶点, 通过人类基因和基因表型综合数据库(OMIM, <http://www.omim.org/>)和 DurgBank 数据库筛选出肾气丸治疗糖尿病的相关基因和蛋白靶点, 人类的靶点连接蛋白由交互蛋白数据库(<http://dip.doe-mbi.ucla.edu>)获得。最后将筛选得到的所有靶点经 UniProt 数据库转化成蛋白质 ID 格式。

1.2 网络构建、拓扑分析及 PPI 网络分析

为了阐明肾气丸中化学成分与糖尿病靶点之间的关系, 通过 PPI(<http://www.genome.jp/kegg/>)数据库分析, 将筛选得到的肾气丸化学成分、成分相关的靶点、糖尿病相关的靶点和交互蛋白对应的靶点连接成“成分-靶点-疾病”网络。利用 Cytoscape 3.6.1 软件将以上网络进行可视化分析, 并进行筛选, 筛选标准为选择节点度值(degree)和介数中心度(betweenness centrality)大于等于所有点中位数值 2 倍的靶点, 并满足接近中心度(closeness centrality)大于所有点中位数值值的靶点作为肾气丸治疗糖尿病的潜力靶点。节点度值反映了网络节点与其他节点的连接数量, 而介数中心度能反映该节点对网络中其他节点的影响, 值越大, 则表明该节点在网络中的作用越大。此外, 接近中心度表示不同节点之间的关联紧密程度。进一步将上述筛选得到的靶点导入 STRING(<http://string-db.org/>)数据库用于搜寻已知蛋白质之间和预测蛋白质之间的相互作用, 并结合 Cytoscape 软件中 MCODE 插件进行聚类分析, 筛选核心靶标用于分子对接。

1.3 生物过程分析、通路分析及分子对接分析

利用 Cytoscape 3.6.1 软件中插件 ClueGO 对筛选所得的化合物潜力靶点进行 GO(gene ontology)生物学过程和 KEGG 通路分析。从 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/pdb>)中获得上述 PPI 网络筛选

得到的核心靶标蛋白晶体结构导入 Autodock 软件, 对活性成分和核心靶标蛋白进行虚拟分子对接分析。

2 结果

2.1 活性化合物和疾病靶点的筛选

经 TCMSP 数据库和文献整理肾气丸中各味中药的化学成分共 400 个, 通过 TCMSP 数据库进行化合物的筛选, 得到药物口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、药物相似性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 的化合物 101 个, 不计药材中重复化合物共 91 个, 通过文献检索得到肾气丸中各中药的抗糖尿病活性成分共 9 个^[20,28-32], 共 100 个化合物纳入分析, 各味药材筛选得到的化合物结果见表 1。通过中草药活性成分数据库和治疗靶点数据库筛选得到肾气丸的作用靶点共 135 个, 并通过人类基因和基因表型综合数据库筛选出与糖尿病的相关基因和蛋白靶点 644 个。

2.2 肾气丸成分及疾病共同直接作用靶点及其拓扑参数

通过网络药理学构建出肾气丸治疗糖尿病的交互网络, 通过“成分-靶点-疾病”交互网络分析结果发现, 在肾气丸活性成分所直接作用的 135 个蛋白靶点和糖尿病直接作用的 644 个蛋白靶点中, 有 63 个为共有蛋白靶点, 其可能是肾气丸治疗糖尿病最相关的蛋白靶点。对网络中所有节点的拓扑参数分析结果显示, 节点度值、介数中心度和接近中心度的中位数分别为 1、0 和 0.226 049。按节点度值和介数中心度的中位数的 2 倍, 及满足接近中心度数值大于所有节点中位数值筛选, 共得到肾气丸化合物的潜在靶点 58 个, 结果见表 2。将筛选得到的潜在靶点导入 STRING 数据库, 物种为人, 获得蛋白靶点的相互作用网络 (图 1), 共涉及 57 个节点, 561 条边。经 Cytoscape 软件 MCODE 插件进行聚

表 1 肾气丸组方及筛选得到的候选化合物信息

Table 1 Formula of Shenqi Pills and screened information of candidate compounds

编号	化合物	药材归属
1	黄山药皂苷 C (dioscoreside C)	山药
2	薯蓣皂苷元 (diosgenin)	山药
3	伽升沃 B (garcinone B)	山药
4	豆甾醇 (stigmasterol)	山药、山茱萸、生地黄
5	异岩藻酯醇 (isofucosterol)	山药
6	24-甲基胆甾醇-3 β -O-吡喃葡萄糖苷 (24-methylcholest-5-en-3 β -O-glucopyranoside)	山药
7	菜油甾醇 (campesterol)	山药
8	胆固醇 (CLR)	山药
9	皮黄素 (doradexanthin)	山药
10	应山茱萸酮 C (hancinone C)	山药
11	白玉兰亭 B (denudatin B)	山药
12	海风藤酮 (kadsurenone)	山药
13	山茱萸醇 (hancinol)	山药
14	(-)-紫杉叶素 [(-)-taxifolin]	山药
15	甲基升麻苷 (methylcimicifugoside)	山药
16	荜茇宁 (piperlonguminine)	山药
17	羊毛甾醇乙酸盐 (lanosta-8,24-dien-3-ol,3-acetate)	山茱萸
18	四氢鸭脚木碱 (tetrahydroalstonine)	山茱萸
19	远华蟾蜍精 (telocinobufagin)	山茱萸
20	日当药黄素 (leucanthoside)	山茱萸
21	β -谷甾醇 (β -sitosterol)	山茱萸、桂枝
22	谷甾醇 (sitosterol)	山茱萸、泽泻、牡丹皮、桂枝、附子、生地黄
23	多孔-5-烯-3 β -醇 (poriferast-5-en-3 β -ol)	山茱萸

续表 1

编号	化合物	药材归属
24	没食子酸-3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -没食子酰) 葡萄糖苷 [gallic acid-3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -galloyl)-glucoside]	山茱萸
25	3,6-二没食子酸葡萄糖 (3,6-digalloylglucose)	山茱萸
26	马尔肯久纳醇苯酯 (malkangunin)	山茱萸
27	路边青鞣质 D (gemin D)	山茱萸
28	3,4-去氢-16-番茄醛 (3,4-dehydrolycopen-16-al)	山茱萸
29	邻苯二甲酸二异辛酯 (diisooctyl 1,2-benzenedicarboxylate)	山茱萸
30	腺齿紫金牛蛄 (cornudentanone)	山茱萸
31	羟基芫花素 (hydroxygenkwanin)	山茱萸
32	2,6,10,14,18-pentamethylicosa-2,6,10,14,18-五烯 (2,6,10,14,18-pentamethylicosa-2,6,10,14,18-pentaene)	山茱萸
33	亚麻酸乙酯 (ethyl linolenate)	山茱萸
34	十八碳-6,9-二烯酸乙酯 (mandenol)	山茱萸
35	油酸乙酯 (ethyl oleate)	山茱萸
36	熊果酸 (ursolic acid)	山茱萸
37	齐墩果酸 (oleanolic acid)	山茱萸
38	泽泻醇 C-23-醋酸酯 (alisol C monoacetate)	泽泻
39	泽泻醇 B (alisol B)	泽泻
40	泽泻醇 C (alisol C)	泽泻
41	泽泻醇 B-23-醋酸酯 (alisol B-23-acetate)	泽泻
42	泽泻醇 B 乙酸酯 (alisol B monoacetate)	泽泻
43	(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,11 <i>S</i> ,14 <i>R</i>)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]butyl]acetate	泽泻
44	16β-甲氧基甲醇 B 单乙酸酯 (16β-methoxyalisol B monoacetate)	泽泻
45	1-亚油酸甘油单酯 (1-monolinolein)	泽泻
46	脱氢硼酸 (dehydroeburicoic acid)	茯苓
47	(2 <i>R</i>)-2-[(5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	茯苓
48	(2 <i>R</i>)-2-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	茯苓
49	麦角甾醇过氧化物 (ergosterol peroxide)	茯苓
50	3β-羟基-24-亚甲基-8-羊毛素-21-酸 (3β-hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid)	茯苓
51	7,9(11)-脱氢丙酸 [7,9(11)-dehydropachymic acid]	茯苓
52	厚皮酸 (pachymic acid)	茯苓
53	氢化松苓酸 (trametenolic acid)	茯苓
54	啤酒甾醇 (cerevisterol)	茯苓
55	茯苓酸 A (poricoic acid A)	茯苓
56	茯苓酸 C (poricoic acid C)	茯苓
57	常春藤皂苷元 (hederagenin)	茯苓
58	茯苓酸 B (poricoic acid B)	茯苓
59	麦角甾-7,22 <i>E</i> 二烯-3β-醇 (ergosta-7,22 <i>E</i> -dien-3β-ol)	茯苓
60	丁子香酚 (mairin)	牡丹皮
61	苯甲酰芍药甙 (benzoyl paeoniflorin)	牡丹皮
62	4- <i>O</i> -甲基芍药苷 (4- <i>O</i> -methylpaeoniflorin)	牡丹皮

续表 1

编号	化合物	药材归属
63	芍药苷 (paeoniflorin)	牡丹皮
64	牡丹皮苷 H (mudanpioside H)	牡丹皮
65	芍药素 (paeonidanin)	牡丹皮
66	5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene]barbituric acid	牡丹皮
67	槲皮素 (quercetin)	牡丹皮
68	(+)-儿茶素 [(+)-catechin]	牡丹皮、桂枝
69	茨非醇 (kaempferol)	牡丹皮
70	丹皮酚 (paeonol)	牡丹皮
71	过氧麦角甾醇 (peroxyergosterol)	桂枝
72	(-)-紫杉叶素 [(-)-taxifolin]	桂枝
73	二氢槲皮素 (taxifolin)	桂枝
74	(+)-表儿茶素 (ent-epicatechin)	桂枝
75	肉桂醛 (cinnamic aldehyde)	桂枝
76	肉桂酸 (cinnamic acid)	桂枝
77	新南五味子酸 (neokadsuranic acid B)	附子
78	肉质雪胆皂苷 I (carnosifloside I)	附子
79	多根乌头碱 (karakoline)	附子
80	异塔拉定 (isotalatizidine)	附子
81	6-去甲基二氢吡啶 (6-demethyl-desoline)	附子
82	苯甲酰欧乌头碱 (benzoylnapelline)	附子
83	2,7-二去乙酰基-2,7-二苯酰-云南紫杉宁 F (2,7-dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F)	附子
84	石防风素 (deltoin)	附子
85	水黄皮次素 (karanjin)	附子
86	穿心莲甲素 (deoxyandrographolide)	附子
87	飞燕草苷 (delphin)	附子
88	次乌头碱 (hyaconitine)	附子
89	惰碱 (ignavine)	附子
90	脱氧乌头碱 (deoxyaconitine)	附子
91	(3R,8S,9R,10R,13R,14S,17R)-3-hydroxy-4,4,9,13,14-pentamethyl-17-[(E,2R)-6-methyl-7-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyhept-5-en-2-yl]-1,2,3,7,8,10,12,15,16,17-decahydr	附子
92	(R)-去甲乌药碱 [(R)-norcoclaurine]	附子
93	11,14-二十碳二烯酸 (11,14-eicosadienoic acid)	附子
94	爱沙乌头碱 (jesaconitine)	附子
95	去甲基棱砂贝母碱 A (demethyl-delavaine A)	附子
96	去甲基棱砂贝母碱 B (demethyl-delavaine B)	附子
97	梓醇 (catalpol)	生地黄
98	地黄苷 D (rehmaglutin D)	生地黄
99	地黄苷 A (rehmaglutin A)	生地黄
100	地黄苷 B (rehmaglutin B)	生地黄

表 2 肾气丸抗糖尿病的成分-靶点-疾病交互网络中直接作用靶点的拓扑参数分析

Table 2 Topological parameter analysis of direct target in the component-target-disease interaction network of Shenqi Pills against diabetes

UniProt 数据 库识别码	靶点蛋白	介数中 心度	接近中 心度	节点 度值
O75581	low-density lipoprotein receptor-related protein 6	0.010 197	0.226 775	8
P35568	insulin receptor substrate 1	0.000 513	0.237 117	3
P29353	SHC-transforming protein 1	0.001 289	0.237 352	3
P27986	phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	0.010 612	0.239 434	9
P19838	nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	0.007 624	0.241 213	19
P05067	amyloid beta A4 protein	0.016 589	0.235 167	10
Q8N726	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4	0.002 863	0.261 713	7
Q14643	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	0.012 888	0.252 683	5
P25445	tumor necrosis factor receptor superfamily member 6	0.006 969	0.238 578	9
Q13191	E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B	0.003 445	0.249 481	5
Q12778	forkhead box protein O1	0.002 178	0.246 511	3
P32121	β -arrestin-2	0.005 482	0.253 109	8
Q7LG56	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 B	0.009 277	0.260 917	8
Q96EB6	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1	0.018 989	0.252 789	12
P06401	progesterone receptor	0.017 018	0.275 143	24
P08913	alpha-2A adrenergic receptor	0.002 714	0.243 907	5
P07550	beta-2 adrenergic receptor	0.009 766	0.300 626	14
P15121	aldose reductase	0.005 259	0.296 324	5
P29474	nitric oxide synthase, endothelial	0.024 454	0.308 740	12
P27487	dipeptidyl peptidase 4	0.006 559	0.291 930	9
P15692	vascular endothelial growth factor A	0.015 511	0.297 424	14
P04150	glucocorticoid receptor	0.022 654	0.270 252	28
P04637	cellular tumor antigen p53	0.103 974	0.315 803	61
Q16665	hypoxia-inducible factor 1-alpha	0.017 731	0.286 703	14
P35228	nitric oxide synthase, inducible	0.009 442	0.279 432	14
P03372	estrogen receptor	0.031 496	0.286 772	30
P49841	glycogen synthase kinase-3 beta	0.003 842	0.263 840	8
P09917	arachidonate 5-lipoxygenase	0.003 862	0.296 105	4
P37231	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	0.009 174	0.303 513	10
P42574	Caspase-3	0.022 971	0.299 352	22
P01137	transforming growth factor beta-1	0.010 270	0.291 363	8
P28845	corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	0.000 648	0.230 651	10
P17706	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2	0.004 876	0.237 775	14
P18031	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	0.013 023	0.267 424	15
P00734	prothrombin	0.009 535	0.231 853	9
P01375	tumor necrosis factor	0.009 254	0.298 979	9
P05231	interleukin-6	0.004 886	0.287 665	6
P16581	E-selectin	0.007 145	0.296 616	7
P11802	cyclin-dependent kinase 4	0.012 773	0.256 350	12
P45983	mitogen-activated protein kinase 8	0.006 762	0.279 302	6

续表 2

UniProt 数据 库识别码	靶点蛋白	介数中 心度	接近中 心度	节点 度值
Q03181	peroxisome proliferator-activated receptor delta	0.001 637	0.287 389	3
Q07869	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	0.002 093	0.294 869	4
P22301	interleukin-10	0.003 329	0.280 476	3
P42771	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3	0.002 188	0.284 328	3
Q03135	caveolin-1	0.009 113	0.303 820	9
P13500	C-C motif chemokine 2	0.016 975	0.282 190	6
P60568	interleukin-2	0.005 256	0.288 079	4
P60484	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN	0.001 572	0.290 869	4
P09874	poly[ADP-ribose]polymerase 1	0.014 161	0.298 237	12
P06213	insulin receptor	0.033 456	0.306 534	15
P02778	C-X-C motif chemokine 10	0.004 561	0.282 522	3
Q01094	transcription factor E2F1	0.012 041	0.287 734	14
Q14209	transcription factor E2F2	0.000 889	0.282 988	4
P21860	receptor tyrosine-protein kinase erbB-3	0.008 253	0.282 788	5
O14920	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	0.008 276	0.282 389	14
Q08209	serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	0.008 313	0.247 323	6
P45984	mitogen-activated protein kinase 9	0.003 700	0.245 855	4
P49682	C-X-C chemokine receptor type 3	0.008 241	0.233 703	8

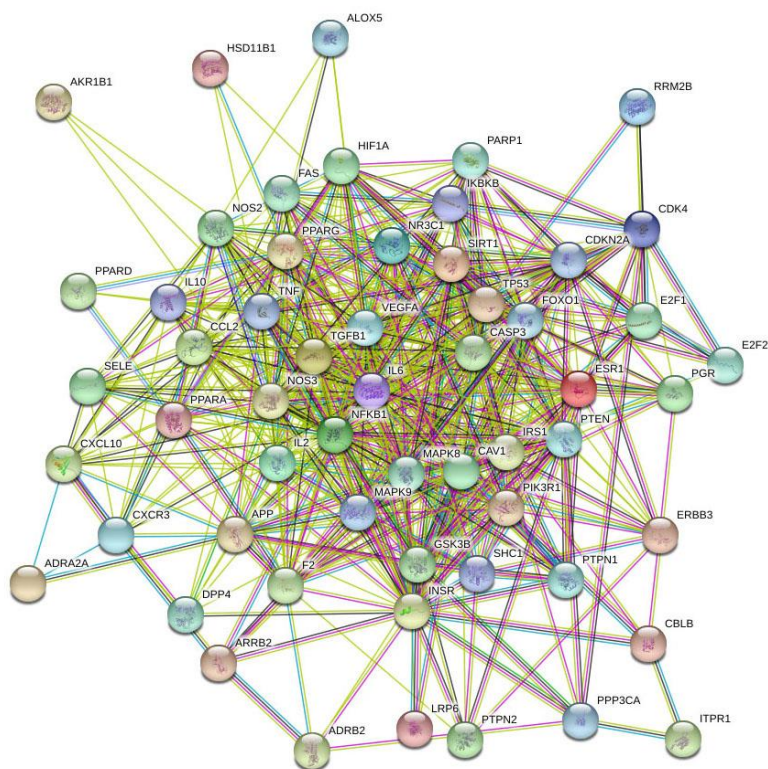


图1 肾气丸潜在作用蛋白靶点的相互作用网络

Fig. 1 Interaction network of potential protein targets of Shenqi Pills

类,得到 3 个子网络,并依据 MCODE 得分高低创建核心子网络,选择蛋白互作图中得分前 18 位的重要靶点作为后续研究的核心靶标,节点越大对应的得分越高,颜色由浅红色到深红色,对应的得分越高。分别为 NFKB1 (14.68)、MAPK8 (14.68)、IRS1 (14.41)、F2 (14.21)、CASP3 (14.14)、TP53 (14.14)、VEGFA (14.14)、TNF (14.14)、IL6 (14.14)、PPARG (13.86)、SIRT1 (13.82)、ESR1 (13.65)、PTEN (13.65)、IL2 (13.43)、CCL2 (13.31)、NOS3 (13.29)、INSR (13.24)、CDKN2A (13.18),结果见图 2。

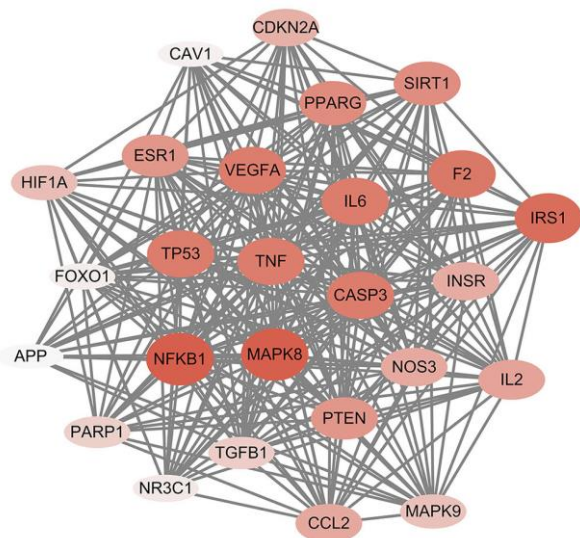


图 2 肾气丸核心子网络蛋白靶点的相互作用网络

Fig. 2 Interaction network of protein targets in Shenqi Pills core subnetwork network

2.3 靶点生物学功能分析

为了预测肾气丸治疗糖尿病的作用机制,对其进行 GO 生物过程富集分析。将 58 个潜在靶点映射到 ClueGO 插件中,进行生物学功能富集,以系统地分析其生物过程。共富集到 $P \leq 0.05$ 的生物过程共有 484 条。生物过程主要与 cellular response to peptide、response to oxygen levels 和 cellular response to peptide hormone stimulus 相关性最强;在分子功能中, $P \leq 0.05$ 的生物过程共有 26 条,其中与 transcription factor activity, direct ligand regulated sequence-specific DNA binding 和 nuclear receptor activity 相关性最强;在细胞组分中, $P \leq 0.05$ 的生物过程共有 5 条,与 protein kinase complex 和 caveola 相关性最强。部分 GO 富集结果见表 3。结果表明,这些靶点与调控基因的转录、细胞凋亡、细胞增殖、信号传导、炎症反应等生物学功能及胰岛素受体的

调节等生物过程相关,且通过分析发现这些生物过程与糖尿病的发生、发展密切相关。糖尿病发病涉及体内多个生物过程的异常,肾气丸可能是通过多组分、多靶点调节这些生物过程来发挥其抗糖尿病作用。

2.4 KEGG 通路分析

采用 ClueGO 插件中 KEGG 富集分析,共富集到 107 条通路与肾气丸治疗糖尿病的功效相关 ($P \leq 0.05$),部分信号通路 ($P < 9.802 \times 10^{-7}$) 见图 3。肾气丸可能通过作用于胰岛素抵抗、TNF 信号通路、2 型糖尿病信号通路、胰岛素信号通路等通路来发挥其抗糖尿病作用,可见肾气丸治疗糖尿病作用的分子机制较复杂、涉及多条信号通路。

2.5 核心靶标分子对接

应用 Autodock 软件对核心靶标进行虚拟对接,结果发现筛选出来的核心靶标与对应的化合物具有良好的亲和力,提示筛选结果具有一定的可靠性,见表 4。

3 讨论

中医药是利用辨证和整体的思维模式、方法来治疗疾病,所使用的中药或中药复方采用多组分针对人体多部位、多靶点、多环节发挥整体调节作用^[33]。网络药理学不再是只关注单个化学成分对疾病的作用,因此利用网络药理学来研究中医药具有显著的优势。鉴于肾气丸治疗糖尿病具有良好的作用,本研究筛选出了肾气丸中 100 个活性成分,构建了成分-靶点-疾病交互网络,确定了出 63 个活性化合物和疾病共同的直接作用靶点,58 个潜在抗糖尿病活性靶点,应用插件 ClueGO 进行 GO 分析和 KEGG 注释分析,发现肾气丸治疗糖尿病与调控基因的转录、细胞凋亡、细胞增殖、信号传导、炎症反应等生物学功能及胰岛素受体的调节等生物过程相关,且确定与肾气丸对糖尿病治疗作用相关的信号通路有 107 条。并进行了 PPI 网络分析,根据 MCODE 得分高低创建核心子网络,筛选出核心靶点 18 个,进一步运用 Autodock 软件对 9 个活性成分及 14 个靶点蛋白进行分子对接,提示筛选出的靶标可靠性较高,借助网络药理学的方法对肾气丸治疗糖尿病作用的机制进行了初步探讨。

经 PPI 网络分析确定核心靶点,作用于核心靶点的化合物包括熊果酸、gemin D、槲皮素、地黄苷 A、薯蓣皂苷元、 β -谷甾醇、garcinone B、四氢鸭脚木碱及梓醇,查阅文献发现熊果酸、槲皮素、 β -谷

表 3 肾气丸 GO 分析中部分生物过程、分子功能和细胞组分分析部分结果

Table 3 Partial results of analysis of biological processes, molecular functions, and cellular components in GO-analysis of Shenqi Pills

类型	GO 富集	数量	P 值
生物过程	cellular response to peptide	21	4.69×10^{-20}
	response to oxygen levels	19	8.69×10^{-18}
	cellular response to peptide hormone stimulus	17	5.77×10^{-16}
	cellular response to biotic stimulus	15	7.38×10^{-16}
	response to insulin	15	2.61×10^{-14}
	cellular response to lipopolysaccharide	13	8.15×10^{-14}
	positive regulation of small molecule metabolic process	12	9.61×10^{-14}
	cellular response to molecule of bacterial origin	13	1.64×10^{-13}
	regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	14	3.96×10^{-13}
	positive regulation of DNA-binding transcription factor activity	14	6.17×10^{-13}
	cellular response to insulin stimulus	13	6.24×10^{-13}
	extrinsic apoptotic signaling pathway	13	1.54×10^{-12}
	cellular response to oxygen levels	12	5.58×10^{-12}
	transcription initiation from RNA polymerase II promoter	12	8.42×10^{-12}
	insulin receptor signaling pathway	10	1.81×10^{-11}
	negative regulation of inflammatory response	10	3.00×10^{-11}
	receptor metabolic process	11	3.36×10^{-11}
	negative regulation of defense response	11	6.75×10^{-11}
	pri-miRNA transcription by RNA polymerase II	7	8.45×10^{-11}
	lipid storage	8	1.46×10^{-10}
分子功能	transcription factor activity, direct ligand regulated sequence-specific DNA binding	8	9.07×10^{-11}
	nuclear receptor activity	8	9.07×10^{-11}
	steroid hormone receptor activity	8	5.66×10^{-10}
	protein tyrosine kinase binding	8	6.59×10^{-10}
	receptor tyrosine kinase binding	7	4.87×10^{-9}
	insulin-like growth factor receptor binding	4	2.27×10^{-7}
	growth factor receptor binding	7	4.07×10^{-7}
	insulin receptor binding	4	1.80×10^{-6}
	steroid binding	6	1.83×10^{-6}
	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity	5	4.70×10^{-6}
细胞组成	caveola	6	7.17×10^{-7}
	protein kinase complex	6	2.28×10^{-6}
	plasma membrane raft	6	2.94×10^{-6}
	platelet alpha granule lumen	4	1.13×10^{-4}

甾醇、四氢鸭脚木碱和梓醇对糖尿病具有治疗作用或保护作用,验证了本研究筛选结果^[34-38]。关于肾气丸整体抗糖尿病的作用机制研究较少,据报道肾气丸能显著降低糖尿病大鼠空腹血糖、胰岛素水平

及提高血清 C 肽含量^[39],本研究预测肾气丸治疗糖尿病机制与胰岛素抵抗、TNF 信号通路、2 型糖尿病信号通路、胰岛素信号通路等信号通路相关。研究结果也提示了肾气丸多成分、多靶点和多途径的

- [7] 刘仙菊, 胡方林. 肾气丸对 2 型糖尿病模型大鼠血糖、血清胰岛素及 C 肽的影响 [J]. 中医学报, 2012, 40(2): 25-27.
- [8] 卓廉佳. 基于体外、体内化学物质基础对肾气丸“阴中求阳”配伍机制的研究 [D]. 广东: 广州中医药大学, 2010.
- [9] 李政木, 卓廉佳, 陈炜璇, 等. 肾气丸“阴中求阳”配伍对丹皮酚含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2855-2857.
- [10] 李政木, 陈炜璇, 卓廉佳, 等. 肾气丸“阴中求阳”配伍对桂皮醛含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2618-2620.
- [11] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
- [12] 董庆海, 吴福林, 王 涵, 等. 山药的化学成分和药理作用及临床应用研究进展 [J]. 特产研究, 2018, 40(4): 98-103.
- [13] 郭 盛, 段金庵, 朱邵晴, 等. 基于多元功效成分的山茱萸药材质量标准提升研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(15): 3017-3021.
- [14] 邢增智, 陈 旺, 曾 宇. 泽泻的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中医药导报, 2017, 23(15): 75-78.
- [15] 刘 淼, 吴玉冰. 药食同源植物茯苓的研究现状与展望 [J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(12): 1476-1480.
- [16] 夏成凯, 詹云武, 胡云飞, 等. HPLC 法同时测定不同产地牡丹皮中 13 种化学成分的含量 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 970-974.
- [17] 徐 锋, 王德健, 曾 南. 桂枝挥发油化学成分的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(3): 532-541.
- [18] Xu F, Wang F, Wen T, *et al.* Protective effect of cinnamic acid in endotoxin-poisoned mice [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(12): 1946-1953.
- [19] 唐 梅, 赵立春, 徐 敏, 等. 附子化学成分和药理作用研究进展 [J]. 广西植物, 2017, 37(12): 1614-1627.
- [20] 黄链莎, 刘铜华, 孙 文, 等. 桂皮醛对糖尿病小鼠血糖水平的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 95-100.
- [21] 张明丽, 陈吉全, 周新强. 泽泻多糖对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及脂代谢紊乱的改善作用及机制研究 [J]. 中国药房, 2018, 29(1): 42-45.
- [22] 范思思, 朱晶晶, 徐登球, 等. 山茱萸总萜的降糖作用途径研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(7): 1014-1019.
- [23] 邢文会, 侯金丽, 韩鸿鹏, 等. 山药多糖对 I 型糖尿病小鼠血糖和抗氧化能力的影响 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(17): 107-110.
- [24] 李 莉. 生地黄治疗糖尿病的药理研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(4): 670-672.
- [25] 闵存云. 牡丹皮对糖尿病患者 CRP、TNF、IL-6 的影响 [J]. 中药材, 2009, 32(9): 1490-1492.
- [26] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [27] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [28] Huang D W, Shen S C, Wu J S B. Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(17): 7687-7692.
- [29] 石亚静, 张 欢, 李云翠, 等. 熊果酸对糖尿病大鼠一般表征和糖脂代谢的影响 [J]. 中国执业药师, 2016, 13(7): 25-30.
- [30] 顾锦华, 黄 华, 薛 华, 等. 齐墩果酸对糖尿病小鼠胰岛损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1866-1870.
- [31] 李 莉. 生地黄治疗糖尿病的药理研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(4): 670-672.
- [32] Liu J, Wang S, Feng L, *et al.* Hypoglycemic and antioxidant activities of paeonol and its beneficial effect on diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Med Food*, 2013, 16(7): 577-586.
- [33] 王 月, 于海龙, 郭利平. 浅谈中医药现代化的关键点 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(7): 768-770.
- [34] 郭艳芳, 张 皓, 朱 玲, 等. 槲皮素改善糖尿病肥胖大鼠糖脂代谢紊乱及总胆固醇的作用 [J]. 解剖学研究, 2018(6): 505-509.
- [35] 李 明, 韩淑英. 熊果酸对 2 型糖尿病大鼠的降糖作用 [J]. 华北理工大学学报: 医学版, 2016, 18(5): 353-355.
- [36] 赵素容, 卢尧伟, 陈金龙, 等. 地黄梓醇降糖作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 171-172.
- [37] Gupta R, Sharma A K, Dobhal M P, *et al.* Antidiabetic and antioxidant potential of β -sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia [J]. *J Diabet*, 2011, 3(1): 29-37.
- [38] Kocalski A B, Marozzi J F J, Malone M H. Effects of certain nonsteroid anti-inflammatory drugs, tolbutamide, and tetrahydroalstonine on blood glucose and carrageenin-induced pedal edema in rats [J]. *J Pharm Sci*, 1972, 61(8): 1202-1205.
- [39] 刘仙菊, 胡方林. 肾气丸对 2 型糖尿病模型大鼠血糖、血清胰岛素及 C 肽的影响 [J]. 中医学报, 2012, 40(2): 25-27.