

基于网络药理学和分子对接的黄蜀葵花干预糖尿病肾病的作用机制研究

陈学麟¹, 胡剑卓^{2*}, 陶灵霞²

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410006

摘要: **目的** 运用网络药理学和分子对接的方法研究黄蜀葵花干预糖尿病肾病的多成分、多靶点、多通路作用机制, 旨在为其基础研究及临床应用提供依据。 **方法** 通过 ETCM、HERB 数据库结合文献报道, 筛选黄蜀葵花活性成分, 并通过 PharmMapper 数据库预测其潜在靶点, 建立靶点数据库。通过 Genecards、OMIM、Drugbank、TTD 等数据库筛选糖尿病肾病相关靶点, 应用 R4.1.0 软件取两者交集靶点。通过 STRING 平台获得蛋白互作 (PPI) 关系, 并应用 Cytoscape 3.8.2 构建 PPI 网络并分析其中关键靶点。通过 David 数据库进行基因本体论 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 基因富集分析, 得到黄蜀葵花干预糖尿病肾病的潜在作用通路, 采用 Cytoscape 3.8.2 构建“成分-作用靶点-通路”调控网络, 使用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接验证。 **结果** 从黄蜀葵花中筛选出 43 个活性成分, 其中涉及糖尿病肾病作用靶点 44 个, Cytoscape 分析最终筛选出 9 个关键靶点。GO 富集分析结果显示, 根据 P 值 < 0.05 , 筛选出生物过程 (BP) 120 个, 细胞组分 (CC) 23 个, 分子功能 (MF) 37 个。KEGG 富集分析结果显示, 黄蜀葵花主要作用于肿瘤坏死因子 (TNF)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路。分子对接结果显示, 大部分靶点与成分的结合活性较好。 **结论** 基于网络药理学探讨了黄蜀葵花干预糖尿病肾病多成分-多靶点-多通路的作用特点, 预测黄蜀葵花主要活性成分槲皮素-3-O-刺槐糖苷、芦丁、槲皮素-3'-O-葡萄糖苷、银槲苷等, 可能通过白蛋白 (ALB)、表皮生长因子受体 (EGFR)、雌激素受体 (ESR1)、过氧化物酶体增殖因子活化受体 (PPARG)、凝血酶原 (prothrombin, F2) 等靶点, 作用于肿瘤坏死因子 TNF、MAPK 等信号通路干预糖尿病肾病, 为进一步开展黄蜀葵花干预糖尿病肾病作用机制研究提供了新的思路和方法。

关键词: 黄蜀葵花; 糖尿病肾病; 网络药理学; 分子对接; 槲皮素-3-O-刺槐糖苷; 芦丁; 槲皮素-3'-O-葡萄糖苷; 银槲苷
中图分类号: R287.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)02-0252-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.02.005

Based on the network pharmacology and molecular docking method to explore the mechanism of flowers of *Abelmoschus manihot* in the intervention of diabetic kidney disease

CHEN Xue-lin¹, HU Jian-zhuo², TAO Ling-xia²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410006, China

Abstract: **Objective** Using the methods of network pharmacology and molecular docking, the mechanism of multicomponent, multitarget and multipathway action of flowers of *Abelmoschus manihot* in the intervention of diabetic kidney disease was studied, aiming to provide basis for its basic research and clinical application. **Methods** ETCM and HERB database combined with literature reports were used to screen the active ingredients of flowers of *Abelmoschus manihot*, and PharmMapper database was used to predict its potential targets and establish target database. Genecards, OMIM, Drugbank, TTD and other databases were used to screen the related targets of diabetic kidney disease, and R4.1.0 software was used to select the intersection targets. Protein interaction (PPI) relationships were obtained using STRING platform, and PPI networks were constructed using Cytoscape3.8.2 and the key targets were analyzed. David database was used for gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) gene enrichment analysis to obtain the potential pathway of flowers of *Abelmoschus manihot* in the intervention of diabetic kidney disease. Cytoscape 3.8.2

收稿日期: 2021-10-15

基金项目: 湖南省自然科学基金计划资助项目 (2018JJ6037)

作者简介: 陈学麟, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治内分泌代谢疾病。E-mail: 463961810@qq.com

*通信作者: 胡剑卓, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中医药防治内分泌代谢疾病。E-mail: jian88886@126.com

was used to construct the "components-target-pathway" regulatory network. AutoDock Vina 1.1.2 software was used for molecular docking verification. **Results** Forty-three active components were screened from flowers of *Abelmoschus manihot*, including 44 targets of diabetic kidney disease, and 9 key targets were screened by Cytoscape analysis. According to the results of GO enrichment analysis, 120 biological processes, 23 cell components, and 37 molecular functions were screened out according to $P < 0.05$. KEGG enrichment analysis showed that flowers of *Abelmoschus manihot* mainly acted on tumor necrosis factor (TNF) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. The results of molecular docking showed that most of the targets had good binding activity with the compounds. **Conclusion** Based on network pharmacology, the effects of multicomponent, multitarget and multipathway on the flowers of *Abelmoschus manihot* in the intervention of diabetic kidney disease were discussed. The main active components, such as quercetin-3-*O*-robinobioside, rutin, quercetin 3'-*O*-glucoside, and tiliroside may act on TNF, MAPK and other signaling pathways through ALB, EGFR, ESR1, PPARG and F2 to intervene diabetic nephropathy. This study provided a new idea and method for further study on the mechanism of the intervention on diabetic kidney disease.

Key words: flowers of *Abelmoschus manihot*; diabetic kidney disease; network pharmacology; molecular docking; quercetin-3-*O*-robinobioside; rutin; quercetin 3'-*O*-glucoside; tiliroside

糖尿病肾病是糖尿病患者常见微血管并发症，起病隐匿，通常以进行性肾功能衰退和蛋白尿为显著特征，其病变范围可累及肾脏的血管、间质、肾小球，甚至损伤全肾，且进展至终末期肾病的速度大约是其他肾脏疾病的 14 倍，在严重影响患者的生存质量的同时，给社会带来了巨大的经济负担^[1-2]。2019 年国际糖尿病联盟（International Diabetes Federation, IDF）发布的数据显示^[3]，全球 20~79 岁成人糖尿病患者约 4.63 亿，其中 20%~40% 的患者合并糖尿病肾病，可见糖尿病肾病的高患病率已成为世界性的重大公共卫生问题之一。随着中医药治疗糖尿病肾病研究的不断深入，中药在调节糖脂代谢、改变血流动力学等延缓肾脏病变作用越来越受到人们的关注^[4]。

黄蜀葵花为锦葵科秋葵属植物黄蜀葵 *Abelmoschus manihot* (Linn.) Medic. 的花，其味甘、辛；性凉，归心、肾、膀胱经，具有清热利湿、利尿通淋、活血、止血、消肿解毒的功效，主治淋证、吐血、衄血、崩漏、胎衣不下、痈肿疮毒、水火烫伤^[5]。现代研究表明，黄蜀葵花主要含有黄酮类、有机酸类、核苷和氨基酸类等多种化学成分，其中黄酮类化合物具有抗炎、抗氧化、保护心肌、脑缺血性损伤等多种药理活性^[5]。近年来，黄蜀葵花及其制剂—黄葵胶囊在糖尿病肾病的治疗中应用广泛且疗效显著^[6-8]。但目前对于黄蜀葵花干预糖尿病肾病的药理学作用机制的研究相对匮乏。网络药理学通过高通量筛选及分析技术预测药物及其作用靶点、疾病之间相互作用的复杂性与整体性及相关药理学机制，为目前揭示中药的复杂作用机制方面重要方法之一^[9]。本研究通过网络药理学及分子对

接的方法，在分子的水平上，从化学成分、作用靶点和信号传导通路对黄蜀葵花干预糖尿病肾病的作用机制进行系统研究，以期为进一步揭示黄蜀葵花的药理作用机制提供理论基础。

1 方法

1.1 黄蜀葵花相关成分及靶点筛选

通过中医药百科全书数据库（ETCM，<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/home/index/>）^[10]、本草组鉴（HERB）数据库（<http://herb.ac.cn/>）^[11]检索黄蜀葵花中所有化学成分，并结合查阅文献对化学成分信息进行补充整理，并通过 ChemBioDraw 14.0 画出其 2D 结构图，构建黄蜀葵花活性成分二维数据库。将所获取化合物结构导入 SwissADME 平台（<http://www.swissadme.ch/>）^[12]。设置潜在核心化合物的标准为：（1）肠胃吸收（gastrointestinal absorption; GIabsorption）为“High”，表明成分具备良好口服生物利用度；（2）设置 5 类药性预测（lipinski、ghose、veber、egan、muegge）结果中有 2 个及 2 个以上为“yes”。通过文献核查根据筛选标准所排除的化合物，若化合物药理作用明显且与糖尿病肾病研究主题相关，仍予以纳入，最终获得研究主题相关的潜在化合物。将筛选的潜在化合物导入 PharmMapper 平台（<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>）^[13]获取靶点，选择 NF>0.9 的靶点蛋白作为潜在靶点，在此基础上根据已发表的药物相关成分文献报道，补充已验证的相关靶点。

1.2 糖尿病肾病相关靶点获取

以“diabetic kidney disease”“diabetic nephropathy”“DKD”“DN”为关键词，分别在 Genecards 数据库（<https://www.genecards.org/>）^[14]、

OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)^[15]、Drugbank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>)^[16]、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)^[17]、DisGeNet 数据库 (<https://www.disgenet.org/>)^[18]等疾病基因数据库进行检索与筛选,将结果合并去重后即得糖尿病肾病相关靶点。用 R4.1.0 软件将成分、靶点相互映射,得到黄蜀葵花干预糖尿病肾病的潜在靶点。

1.3 活性成分-靶点网络的构建

依据黄蜀葵花干预糖尿病肾病的潜在靶点建立活性成分-靶点网络文件,将结果导入 Cytoscape 3.8.2 软件中,构建“活性成分-靶点”网络。网络图的节点 (node) 分别为活性成分、靶点。各节点之间的相互关系以边 (edge) 表示。利用 Cytoscape 3.8.2 软件中 CytoNCA 插件对网络图进行分析,导出分析结果,得到黄蜀葵花候选成分中干预糖尿病肾病的主要药效成分及核心靶点。

1.4 蛋白互作 (PPI) 网络的构建及关键靶点筛选

将 1.2 项中得到的交集基因导入 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>)^[19],限定研究物种为“Homo sapiens”,最低相互作用评分设置为 0.400,其余参数保持默认设置,得到黄蜀葵花干预糖尿病肾病的 PPI 网络,并将结果导入 Cytoscape 3.8.2 软件中,利用网络分析功能分析 PPI 网络中核心靶点,筛选出 PPI 网络中药物和疾病核心靶点。

1.5 基因本体论 (GO) 功能分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

将 1.2 项中得到的交集基因导入 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 进行 GO 的生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cell component, CC) 及 KEGG 通路富集分析,并使用 R4.1.0 软件将结果可视化。

1.6 “成分-靶点-通路”网络的构建

将上述得到的黄蜀葵花活性成分、潜在作用靶点、KEGG 富集到的主要相关通路富集分析结果导入 Cytoscape 3.8.2 中,构建“成分-靶点-通路”网络。

1.7 分子对接

选择 1.4 项中筛选出的 PPI 网络中核心靶点与 1.3 中筛选出的黄蜀葵花前 10 种主要活性成分进行分子对接。第 1 步从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 PPI 网络中关键靶点 PDB 格式的 3D 结构,将筛选的黄蜀葵花活性成分使用 ChemOffice

2014 软件使其能量最小化并另存为 mol2 格式;第 2 步运用 AutoDock Tools 1.5.6 软件对蛋白质靶点进行去水、加氢等操作,并将活性成分及靶蛋白格式转换为 pdbqt 格式;最后通过 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接。若结合能 < -4.25 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.4 \text{ J}$),表明配体分子能与受体蛋白进行自发的结合,若结合能 < -5.0 kcal/mol 表明两者具有较好的结合性,若结合能 < -7.0 kcal/mol 表明两者具有强烈的结合活性,最后选取部分结合力较强结果利用 Pymol 软件进行可视化。

2 结果

2.1 化学成分及对应靶点的采集

通过 ETCM、HERB 数据库结合文献^[7, 20-25]查询,包括《中国药典》(2020 年版)^[26]等,共搜索到 80 个化合物,主要包括金丝桃苷、杨梅素等黄酮类化合物 38 个,赖氨酸、丝氨酸等氨基酸类化合物 10 个,腺嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷等核苷类化合物 10 个,没食子酸、5-羟甲基糠酸等有机酸类化合物 13 个,豆甾醇、 β -谷甾醇等甾类化合物 4 个,正三十烷醇、黄蜀葵神经酰胺等其他化合物 5 个。通过 SwissADME 平台结合文献查询共筛选出高活性成分 43 个,见表 1。

2.2 疾病靶点获取

以“diabetic kidney disease”“diabetic nephropathy”“DKD”为关键词,在 Genecards、OMIM、drugbank、TTD、DisGeNet 等疾病基因数据库进行检索与筛选,其中 Genecards 数据库 3 488 个,选择 relevance score > 5.84 的靶点作为目标靶点,OMIM 数据库 253 个,Drugbank 数据库 10 个,TTD 数据库 19 个。汇总后去重,共得到 1 814 个疾病基因。将疾病靶点与活性成分靶点取交集,得交集靶点 44 个,运用 R4.1.0 软件绘制韦恩图,见图 1。

2.3 活性成分-靶点网络构建

运用 Cytoscape 3.8.2 构建成分-靶点网络图,并通过 CytoNCA 插件分析黄蜀葵花干预糖尿病肾病靶点网络拓扑学参数,得到核心成分及核心作用靶点。如图 2 所示,此网络由 87 个节点和 268 条边构成,包括 43 个活性成分,44 个潜在靶点节点,其中圆形节点代表潜在靶点,方形节点代表黄蜀葵花中的活性成分,连线代表三者之间的相互作用,图中节点面积越大,表明其在网络中越重要。

通过分析可知,该网络平均连接度为 7.30,平均介度为 0.015,平均紧密度为 0.426,进一步分析

表 1 主要活性成分基本信息

Table 1 General information of active ingredients

编号	化合物	CAS 号	分子式	类型
Kh1	二氢杨梅素 (dihydromyricetin)	27200-12-0	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	黄酮类
Kh2	槲皮素-3-O-刺槐糖苷 (quercetin-3-O-robinobioside)	52525-35-6	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	黄酮类
Kh3	槲皮素-7-O-葡萄糖苷 (quercetin-7-O-glucoside)	491-50-9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	黄酮类
Kh4	芦丁 (rutin)	153-18-4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	黄酮类
Kh5	金丝桃苷 (hyperin)	482-36-0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	黄酮类
Kh6	异槲皮苷 (isoquercetin)	482-35-9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	黄酮类
Kh7	棉皮素-8-葡萄糖醛酸苷 (hibifolin)	55366-56-8	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₄	黄酮类
Kh8	杨梅素 (myricetin)	529-44-2	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	黄酮类
Kh9	槲皮素-3'-O-葡萄糖苷 (quercetin 3'-O-glucoside)	19254-30-9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	黄酮类
Kh10	槲皮素 (quercetin)	117-39-5	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	黄酮类
Kh11	银槲苷 (tiliroside)	20316-62-5	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	黄酮类
Kh12	acortatarin A	—	C ₁₂ H ₁₅ NO ₅	黄酮类
Kh13	杨梅素-3-O-β-D-葡萄糖苷 (myricetin-3-O-β-D-glucopyranoside)	19833-12-6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	黄酮类
Kh14	杨梅素-3-O-β-D-半乳糖苷 (myricetin-3-O-β-D-galactopyranoside)	15648-86-9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	黄酮类
Kh15	棉皮素 (gossypetin)	489-35-0	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	黄酮类
Kh16	槲皮素-3-O-芸香糖苷 (quercetin 3-O-rutinoside)	153-18-4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	黄酮类
Kh17	槲皮素-7-O-β-D-葡萄糖苷 (quercetin-7-O-β-D-glucopyranoside)	491-50-9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	黄酮类
Kh18	赖氨酸 (L-lysine)	56-87-1	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	氨基酸类
Kh19	丝氨酸 (L-serine)	56-45-1	C ₃ H ₇ NO ₃	氨基酸类
Kh20	苏氨酸 (L-threonine)	72-19-5	C ₄ H ₉ NO ₃	氨基酸类
Kh21	谷氨酸 (L-glutamic acid)	56-86-0	C ₅ H ₉ NO ₄	氨基酸类
Kh22	脯氨酸 (L-proline)	147-85-3	C ₅ H ₉ NO ₂	氨基酸类
Kh23	缬氨酸 (L-valine)	72-18-4	C ₅ H ₁₁ NO ₂	氨基酸类
Kh24	酪氨酸 (L-tyrosine)	60-18-4	C ₉ H ₁₁ NO ₃	氨基酸类
Kh25	异亮氨酸 (L-isoleucine)	73-32-5	C ₆ H ₁₃ NO ₂	氨基酸类
Kh26	亮氨酸 (L-leucine)	61-90-5	C ₆ H ₁₃ NO ₂	氨基酸类
Kh27	苯丙氨酸 (L-phenylalanine)	63-91-2	C ₉ H ₁₁ NO ₂	氨基酸类
Kh28	2'-脱氧腺苷 (2'-deoxyadenosine)	958-09-8	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	核苷类
Kh29	胸腺嘧啶脱氧核糖核苷 (thymidine)	50-89-5	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	核苷类
Kh30	烟酰胺 (nicotinamide)	98-92-0	C ₆ H ₆ N ₂ O	核苷类
Kh31	反油酸[(E)-9-octadecenoic acid]	112-79-8	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	核苷类
Kh32	5'-deoxy-5'-methylsulphinyladenine	3387-65-3	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄ S	核苷类
Kh33	次黄嘌呤 (hypoxanthine)	68-94-0	C ₅ H ₄ N ₄ O	核苷类
Kh34	尿苷 (uridine)	58-96-8	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	核苷类
Kh35	胞苷 (cytidine)	65-46-3	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	核苷类
Kh36	没食子酸 (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)	149-91-7	C ₇ H ₆ O ₅	有机酸类
Kh37	5-羟甲基糠酸 (5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid)	6338-41-6	C ₆ H ₆ O ₄	有机酸类
Kh38	原儿茶酸 (3,4-dihydroxybenzoic acid)	99-50-3	C ₇ H ₆ O ₄	有机酸类
Kh39	绿原酸 (chlorogenic acid)	327-97-9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	有机酸类
Kh40	咖啡酸 (caffeic acid)	331-39-5	C ₉ H ₈ O ₄	有机酸类
Kh41	2,4-二羟基苯甲酸 (2,4-dihydroxybenzoic acid)	89-86-1	C ₇ H ₆ O ₄	有机酸类
Kh42	异绿原酸 B (3,4-dicaffeoylquinic acid)	14534-61-3	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	有机酸类
Kh43	异绿原酸 A (3,5-dicaffeoylquinic acid)	2450-53-5	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	有机酸类

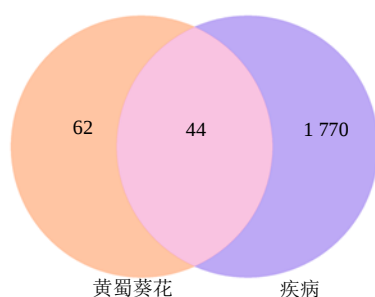


图 1 药物靶点和疾病靶点韦恩图

Fig. 1 Venny diagram of drug targets and disease targets

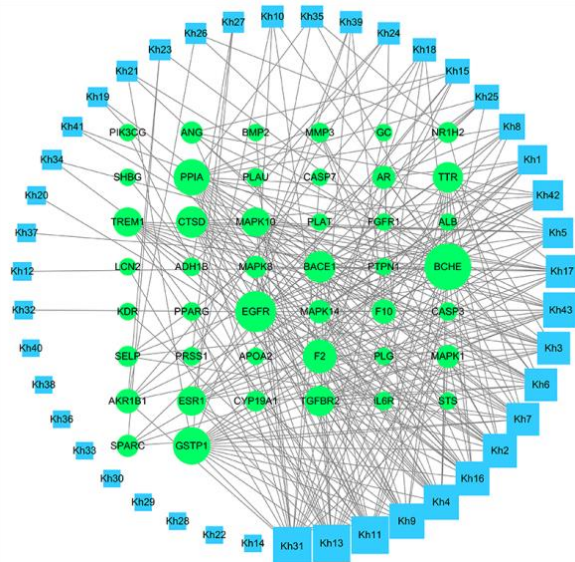


图 2 活性成分 - 靶点网络图

Fig. 2 Network of active components - therapeutic target

发现其中 10 种成分连接度、介度、紧密度大于或等于其平均值,如反油酸(Kh31)、银假甘(Kh11)、杨梅素-3-O-β-D-葡萄糖苷(Kh13)等,推测其可能为黄蜀葵花干预糖尿病肾病的主要成分,具体拓扑学参数见表 2。网络图中丁酰胆碱酯酶(BCHE)、表皮生长因子受体(EGFR)、谷胱甘肽硫转移酶 P1(GSTP1)、亲环蛋白(PPIA)、凝血酶原(prothrombin, F2)、β-分泌酶 1(BACE1)等靶点基因分别与 26、21、18、17、15、13 个成分相连,具体拓扑学参数见表 3。说明黄蜀葵花干预糖尿病肾病是多靶点、多成分共同作用的结果。

2.4 黄蜀葵花干预糖尿病肾病潜在作用靶点 PPI 网络构建

将 44 个交集基因上传至 STRING 数据库,将得到的 PPI 网络结果导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建网络图,节点颜色及大小根据度值(degree)调整,

表 2 主要活性成分网络节点特征参数

Table 2 Topological parameters of active components

成分	度值	介度	紧密度
Kh31	19	0.195	0.478
Kh11	18	0.068	0.473
Kh13	18	0.073	0.473
Kh4	16	0.036	0.463
Kh9	16	0.046	0.463
Kh43	16	0.041	0.458
Kh2	15	0.024	0.458
Kh16	15	0.024	0.458
Kh7	14	0.056	0.454
Kh42	12	0.027	0.444

表 3 作用靶点网络节点特征参数

Table 3 Topological parameters of the therapeutic target

靶点	度值	介度	紧密度
BCHE	26	0.105 0	0.509
EGFR	21	0.036 3	0.433
GSTP1	18	0.049 4	0.466
PPIA	17	0.034 5	0.451
F2	15	0.018 8	0.398
BACE1	13	0.015 1	0.413
CTSD	13	0.010 6	0.402
TTR	12	0.013 2	0.409
TGFBR2	12	0.008 7	0.391
MAPK10	11	0.011 3	0.406

度值越大,节点颜色越深、越大,见图 3。通过分析可知,该网络平均连接度为 9.49,平均介度为 0.539,平均紧密度为 0.022,进一步分析发现其中 9 种成分连接度、介度、紧密度大于或等于其平均值,即为黄蜀葵花干预糖尿病肾病的核心靶点,具体拓扑学参数见表 4。

2.5 GO 和 KEGG 通路富集分析

通过 David 数据库对交集基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析结果显示,根据 $P < 0.05$,筛选出 BP[如蛋白质水解、纤维蛋白分解、雌激素应答、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联的调控等]120 个,CC[如细胞外组份、细胞外外体等]23 个,MF[如酶结合、丝氨酸型内肽酶活性、MAP 激酶活性等]37 个,KEGG 富集共得到 60 条通路,排除与糖尿病肾病无关的通路,选取 P 值排名前 20 的信号通路进行可视化,其中主要包

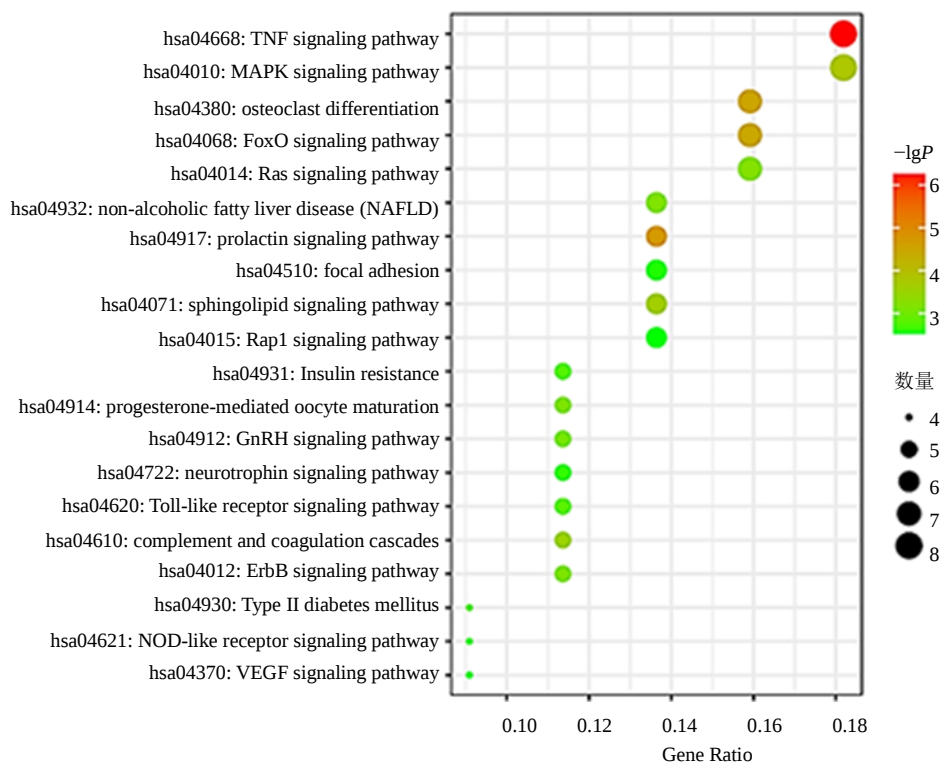


图 5 KEGG 通路富集结果

Fig. 5 Analysis results of KEGG pathway enrichment

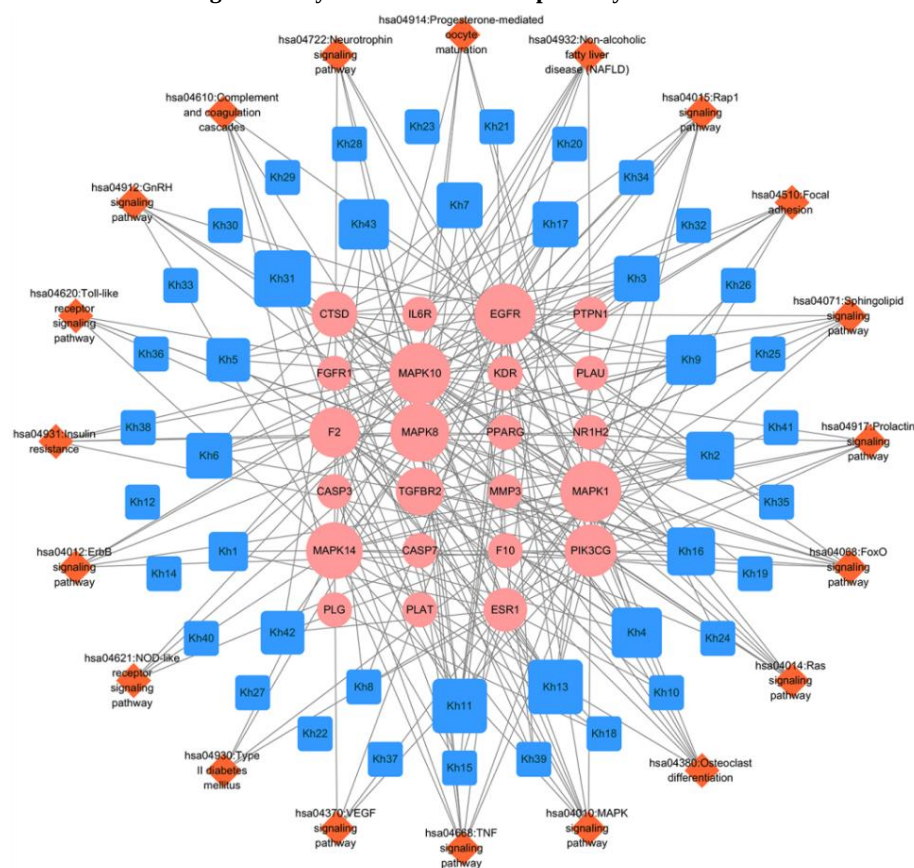


图 6 成分 - 靶点 - 通路网络

Fig. 6 Network of active components - therapeutic targets - signaling pathways

相互交织,表明黄蜀葵花可作用于多条通路,且各通路间相互影响,共同起到干预糖尿病肾病的作用。

2.6 分子对接分析

将 PPI 网络中筛选出的 9 个核心靶点白蛋白 (ALB, PDBID: 6YG9)、EGFR (PDBID: 5UG9)、ESR1 (PDBID: 7BAA)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3, PDBID: 5IBP)、纤溶酶原 (PLG, PDBID: 6D3Y)、MAPK1 (PDBID: 6SLG)、KDR (PDBID: 6GQQ)、过氧化物酶体增值因子活化受体 (PPARG, PDBID: 6MS7)、F2 (PDBID: 5AFY) 与黄蜀葵花前 10 种主要活性成分进行分子对接,结合能统计结果如图 7 所示,图中颜色越深,代表配体分子能与受体蛋白结合力越强。在 90 组受体-配体对接组合中,结合能 < -5.0 kcal/mol 有 87 组,结合能 < -7.0 kcal/mol 有 67 组,占 74.44%,表明黄蜀葵花主要活性成分与核心靶点有强烈的结合活性。因此,黄蜀葵花可能通过以上关键靶点干预糖尿病肾病相关通路,达到改善或者治疗糖尿病肾病的作用。部分关键靶点与活性较强的化合物的结合模式见图 8,由图可知,黄蜀葵花活性成分主要通过氢键、 π - π 和 π -cation 等相互作用与目标靶点结合,这些相互作用为活性成分与目标蛋白的结合提供了较强的结合力。

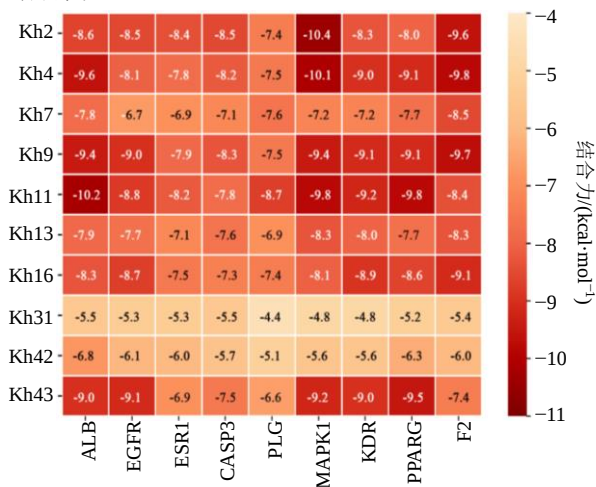


图 7 分子对接热图分析

Fig. 7 Thermal diagram analysis of molecular docking fraction

3 讨论

糖尿病肾病属于中医学“脾瘅”“肾消”“水肿”等范畴,通常以本虚标实、虚实夹杂为主要病机,并伴有瘀血、水湿、痰浊等实邪阻伤肾络,因此历代医家多以益气养阴、健脾补肾、活血逐瘀和利湿

化浊之法治疗。《医方考》云:“下焦之病,责之于湿热”。近年来,湿热与糖尿病肾病的发生发展越来越受到学术界重视^[27]。糖尿病肾病患者病位在肾,病久迁延不愈,肾阳温煦失司,脾阳不振,则水湿运化无力,凝聚下焦,郁久而化热,耗伤肾之阴液,进一步加重病情。诸多学者均主张在糖尿病肾病辨治时重视湿热论治^[28-30]。黄蜀葵花味甘、辛,性凉,归心、肾、膀胱经,长于清热利湿、利尿通淋,与糖尿病肾病治疗中从湿热论治不谋而合。

本研究采用网络药理学方法,对黄蜀葵花治疗糖尿病肾病有效成分及作用机制进行初步探析。通过数据库检索并筛选得到黄蜀葵花 43 个有效活性成分,包括等金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、二氢杨梅素等,提示这些成分可能在治疗糖尿病肾病过程中发挥重要药理作用。研究显示,金丝桃苷可通过调节单磷酸腺苷活化蛋白激酶-Unc-51 样自噬激活激酶 1 (AMPK-ULK1) 信号通路,抑制自噬活性,保护肾脏免于衰老和损伤^[31],槲皮素可通过调控肾脏 Toll 样受体 4/核转录因子- κ B (TLR4/NF- κ B/Snail1) 信号通路,减轻炎症反应抑制肾脏纤维化,发挥对糖尿病大鼠的肾脏保护作用;同时,体外细胞实验证实,槲皮素能够显著抑制肾小管上皮细胞中转化生长因子 β 的表达,减轻肾组织的纤维化^[32]。陈杰彬等^[33]研究显示,异槲皮苷可通过抑制 ERK 激酶 (MEK)/细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 信号通路并促进核因子 E₂ 相关因子 1 (Nrf1) 表达,实现对糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化的修复。Cai 等^[34]研究显示,黄葵胶囊中黄酮类活性成分槲皮素-8-葡萄糖醛酸苷、金丝桃苷、异槲皮苷等可通过抑制 NADPH/ROS/ERK 信号通路改善慢性肾功能衰竭大鼠肾小管间质纤维化。

PPI 网络分析发现,ALB、EGFR、雌激素受体 (ESR1)、CASP3、PPARG、F2 等靶点在黄蜀葵花干预糖尿病肾病的生物过程中可能起关键作用。ALB 是由肝脏合成的一种球状蛋白,具有维持血清胶体渗透压、抗感染及抗氧化性的作用,常用于评价机体营养状态^[35],此外尿白蛋白是糖尿病肾病筛查、诊断、分期的重要依据,同时也是影响糖尿病肾病预后的重要因素^[36]。既往研究结果显示,血清白蛋白与糖尿病肾病严重程度呈负相关^[37]。肾小球滤过功能随疾病进展而进行性减退,尿白蛋白进行性增加,血清白蛋白水平下降,致使患者出现水肿,低蛋白血症等一系列并发症,进一步加重疾病进

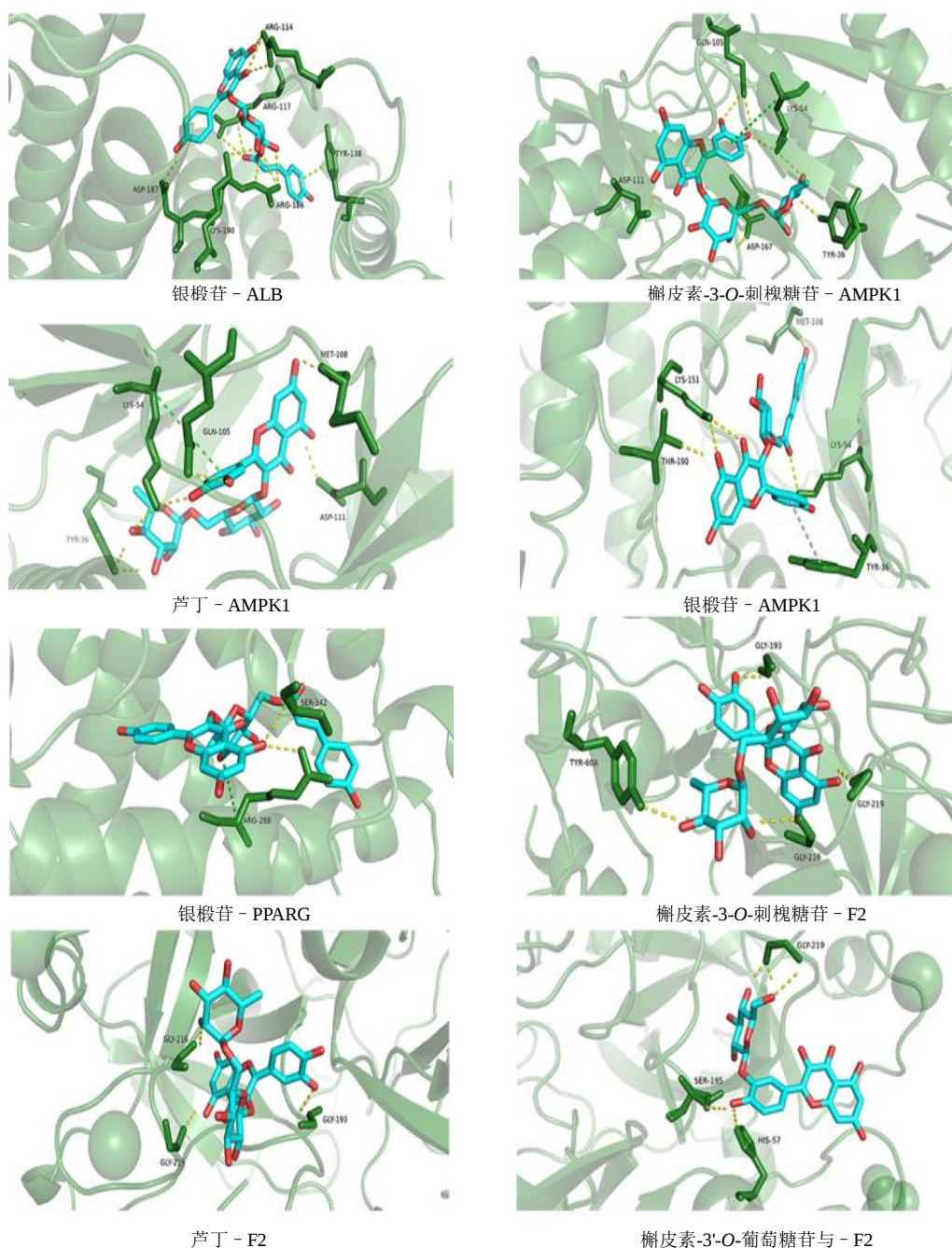


图 8 重要活性成分 - 关键靶点分子对接可视化

Fig. 8 Visualization of docking between key active components and core target molecules

展。EGFR 分布于所有血管上皮细胞, 可通过参与 RAS/RAF/MEK/MAPK、PI3K/PDK1/AKT 等途径干预细胞生长、分化、增殖。多项体内外研究表明, EGFR 参与血流动力学和代谢改变、慢性炎症和实质细胞功能障碍多种病理过程^[38]。Prada 等^[39]研究发现, 抑制 EGFR 可以显著改善胰岛素敏感性和胰腺 β 细胞功能来延缓糖尿病肾病进展。ESR1 可与激素发生特异性结合而形成激素 - 受体复合物, 使

激素发挥其生物学效应, 且研究发现其在维持线粒体稳态, 降低血管紧张素 2 和内皮素的合成, 抑制肾脏血管收缩及减轻肾脏炎症方面也发挥着重要作用^[40]。半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 是细胞凋亡的核心成分, 其中 Caspase (CASP) -3 是位于最下游的执行性凋亡蛋白酶, 诱导组织细胞凋亡。Wen 等^[41]研究发现, 糖尿病肾病是一种由效应物 CASP3、CASP6 和 CASP7 介导的细胞程序性死亡,

抑制 CASP3 可改善糖尿病小鼠的蛋白尿、肾功能和肾小管间质纤维化。过氧化物酶体增值因子活化受体 (PPARs) 主要参与脂肪生成、能量平衡和脂质生物合成的调节, 主要包括 3 种亚型 PPAR α 、PPAR γ 、PPAR β/δ , 是治疗糖尿病、糖尿病肾病的一大重要靶点^[42]。此外, 研究显示 PPAR α 、 γ 双重激动剂有可能用作治疗 2 型糖尿病和糖尿病肾病的新药物, 并且不会引起与 PPAR γ 激活相关的心脏副作用^[43]。Ge 等^[44]研究显示, 黄葵胶囊可通过激活 PPAR α 、 γ 减轻糖尿病肾病大鼠的内质网应激和脂质代谢紊乱, 从而改善肾病损伤, 延缓疾病进展。F2 是凝血酶的前身物质, 研究表明, 凝血纤溶系统异常及微血管内皮细胞损伤均参与了糖尿病肾病的发病过程^[45]。糖尿病肾病患者因代谢紊乱往往合并血管内皮细胞损伤, 导致血小板和凝血纤溶系统异常及血液流变学改变, 且随着病情的持续发展, 患者的凝血因子活性上调, 进而引起纤维蛋白沉积及肾小球细胞外基质增加, 最终导致肾小球硬化的发生^[46]。Wang 等^[47]对 550 名糖尿病患者进行横断面研究表明, 血浆中持续低水平的凝血酶可以延缓内皮细胞、足细胞的凋亡, 保护肾小球滤过屏障, 减轻蛋白尿。分子对接结果显示, 黄蜀葵花中的主要活性成分槲皮素-3-O-刺槐糖苷、芦丁、槲皮素-3'-O-葡萄糖苷、银槲苷等与主要靶点 (ALB、EGFR、ESR1、PPARG、F2 等) 的结合活性较强, 这在侧面反映了网络预测结果的可靠性。故今后在设计相关基础实验或临床研究时可重点关注槲皮素-3-O-刺槐糖苷、芦丁、槲皮素-3'-O-葡萄糖苷、银槲苷等在干预糖尿病肾病相关机制中的作用。

GO 富集分析结果显示, BP 包括如蛋白质水解、纤维蛋白分解、雌激素应答、MAPK 级联的调控等, 主要涉及酶结合、丝氨酸型内肽酶活性、MAP 激酶活性等功能, 通过 KEGG 富集分析可以判断, 黄蜀葵花干预糖尿病肾病的信号通路主要与细胞增殖、分化、免疫、炎症反应相关通路有关, 例如 TNF 信号通路、催乳素信号通路、FoxO 信号通路、MAPK 信号通路等。炎症反应是糖尿病肾病的一个重要病理生理因素。在 KEGG 富集分析中, MAPK 信号通路和 TNF 信号通路是富集基因最多的信号通路且与炎症反应密切相关, 因此推测 MAPK、TNF 信号通路可能是通过抗炎干预糖尿病肾病的关键通路。p38 MAPK 信号通路是 MAPK 家族成员之一, 参与调控炎症反应、凋亡、细胞分化等多种生理过程。

既往研究表明, 促炎症因子白细胞介素 (IL)-10 β 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 和 IL-6 可以激活 p38 MAPK 信号通路促进炎症介质的合成和释放, 加重肾组织炎症损伤^[48-49]。多项研究表明黄葵胶囊可通过抑制肾组织 p38 MAPK 信号通路活性以及致纤维化细胞因子、炎症因子蛋白表达水平, 改善糖尿病肾病大鼠肾纤维化^[50-52]。FoxO 信号通路是体内调控细胞增殖、氧化应激、细胞凋亡和免疫反应等重要通路, 其关键转录因子叉头框转录因子 O1 (FoxO1) 在肾脏病发病机制中发挥重要作用。研究发现, FoxO1 活化可抑制高糖诱导的足细胞上皮-间充质细胞转化进而减轻肾组织纤维化^[53]。由此可以推测 TNF 信号通路、MAPK 信号通路、FoxO 信号通路等在黄蜀葵花干预糖尿病肾病过程中发挥重要作用。

本研究采用网络药理学研究方法, 对黄蜀葵花多成分、多靶点、多信号通路干预糖尿病肾病的药理机制进行了系统研究。黄蜀葵花可能通过 ALB、EGFR、ESR1、CASP3、PPARG 等靶点作用于 TNF、FoxO、MAPK 等多条信号通路发挥作用, 为黄蜀葵花的进一步研究提供了基础和参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gallagher H, Suckling R J. Diabetic nephropathy: Where are we on the journey from pathophysiology to treatment? [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2016, 18(7): 641-647.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组. 中国糖尿病肾脏病防治指南 (2021 年版) [J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(8): 762-784.
- [3] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157: 107843.
- [4] 张颖, 张梦婷, 黄鼻, 等. 基于 Nrf2 信号通路探讨中医药防治糖尿病肾病的研究进展 [J/OL]. *辽宁中医药大学学报*: 1-11. [2022-01-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1543.R.20210916.1130.016.html>.
- [5] 李楠, 王丽娟, 黄莉吉, 等. 中药黄蜀葵花及其提取物治疗慢性肾脏病的研究进展 [A]// 第十二次全国中西医结合内分泌代谢病学术大会暨糖尿病、甲状腺疾病高峰论坛论文资料汇编 [C]. 沈阳: 中国中西医结合学会内分泌专业委员会, 2019: 326.
- [6] 黎望. 黄蜀葵花黄酮的提取及抗氧化性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [7] 黎晶晶, 徐柏颐. 黄蜀葵花黄酮类化合物的化学成分

- 及药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(7): 120-124.
- [8] Shi L, Feng L, Zhang M, et al. *Abelmoschus manihot* for diabetic nephropathy: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019: 9679234.
- [9] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [10] Xu H, Zhang Y, Liu Z, et al. ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [11] Fang S, Dong L, Liu L, et al. HERB: A high-throughput experiment-and reference-guided database of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1197-D1206.
- [12] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42717.
- [13] Wang X, Shen Y, Wang S, et al. PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [14] Safran M, Dalah I, Alexander J, et al. GeneCards Version 3: The human gene integrator [J]. *Database (Oxford)*, 2010, 2010: baq020.
- [15] Amberger J S, Hamosh A. Searching online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): A knowledgebase of human genes and genetic phenotypes [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2017, 58: 1.2.1-1.2.12.
- [16] Wishart D S, Feunang Y D, Guo A C, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
- [17] Wang Y, Zhang S, Li F, et al. Therapeutic target database 2020: Enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D1031-D1041.
- [18] Piñero J, Piñero J, Queralt-Rosinach N, et al. DisGeNET: A comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D833-D839.
- [19] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [20] 殷圣鑫, 魏丽芳, 梅余琪, 等. 超快速液相色谱 - 三重四极杆/线性离子阱质谱法同时测定黄蜀葵花药材中的多元活性成分 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(10): 2527-2536.
- [21] 陆林玲. 黄葵胶囊主要成分 PK、PD 研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [22] 夏昆瑜, 张春磊, 曹征宇, 等. 黄蜀葵花的化学成分研究 [J]. 海峡药学, 2019, 31(9): 58-61.
- [23] 李春梅, 王涛, 张祎, 等. 中药黄蜀葵花化学成分的分离与鉴定(I) [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(9): 711-714.
- [24] 李春梅, 王涛, 张祎, 等. 中药黄蜀葵花化学成分的分离与鉴定(II) [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(10): 803-807.
- [25] 李春梅, 安雅婷, 王涛, 等. 中药黄蜀葵花化学成分的分离与鉴定(III) [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(7): 520-525.
- [26] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- [27] 王梦迪, 王珍, 闫润泽, 等. 应用德尔菲法对糖尿病肾脏病“热邪”证候特点的调查研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18(11): 953-956.
- [28] 苏克雷, 朱垚, 郭立中. 国医大师周仲瑛治疗糖尿病肾病经验 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2854-2857.
- [29] 姚洁琼. 王耀献从热分期治疗糖尿病肾病经验浅析 [A]// 中国中西医结合学会肾脏疾病专业委员会 2015 年学术年会资料汇编 [C]. 中国中西医结合学会肾脏疾病专业委员会, 2015: 1424-1425.
- [30] 王珍, 王梦迪, 刘笑慈, 等. 王耀献教授从热邪论治糖尿病肾病经验 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(5): 379-380.
- [31] 刘不悔. 金丝桃苷调控 AMPK-ULK1 介导自噬改善 D-半乳糖诱导肾脏衰老与损伤的作用和机制 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [32] Cao Y, Hu J, Sui J, et al. Quercetin is able to alleviate TGF- β -induced fibrosis in renal tubular epithelial cells by suppressing miR-21 [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 2442-2448.
- [33] 陈杰彬, 魏连波, 李成杰, 等. 异槲皮苷对糖尿病肾病大鼠 MEK/ERK/Nrf1 信号通路及肾脏纤维化的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(10): 853-856, 941.
- [34] Cai H D, Su S L, Qian D W, et al. Renal protective effect and action mechanism of Huangkui capsule and its main five flavonoids [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 206: 152-159.
- [35] 柳杨青, 汪艳芳, 郭丽君. 2 型糖尿病患者血清白蛋白水平变化及影响因素分析 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(11): 1085-1088.
- [36] Chen C, Wang C, Hu C, et al. Normoalbuminuric diabetic

- kidney disease [J]. *Front Med*, 2017, 11(3): 310-318.
- [37] Kwiendacz H, Kwiendacz H, Stompór T, *et al.* What do we know about biomarkers in diabetic kidney disease? [J]. *Endokrynol Pol*, 2020, 71(6): 545-550.
- [38] Sheng L, Bayliss G, Zhuang S. Epidermal growth factor receptor: A potential therapeutic target for diabetic kidney disease [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 598910.
- [39] Prada P O, Ropelle E R, Mourão R H, *et al.* EGFR tyrosine kinase inhibitor (PD153035) improves glucose tolerance and insulin action in high-fat diet-fed mice [J]. *Diabetes*, 2017, 66(7): 2059.
- [40] Ma H Y, Chen S, Du Y. Estrogen and estrogen receptors in kidney diseases [J]. *Ren Fail*, 2021, 43(1): 619-642.
- [41] Wen S, Wang Z H, Zhang C X, *et al.* Caspase-3 promotes diabetic kidney disease through gasdermin E-mediated progression to secondary necrosis during apoptosis [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 313-323.
- [42] Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications - a review [J]. *Nutr J*, 2014, 13: 17.
- [43] Liu K, Zhao X, Qi X, *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of a novel dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist for the treatment of diabetic kidney disease through anti-inflammatory mechanisms [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 218: 113388.
- [44] Ge J, Miao J J, Sun X Y, *et al.* Huangkui capsule, an extract from *Abelmoschus manihot* (L.) medic, improves diabetic nephropathy via activating peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α/γ and attenuating endoplasmic reticulum stress in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 189: 238-249.
- [45] Oe Y, Hayashi S, Fushima T, *et al.* Coagulation factor Xa and frotease-activated receptor 2 as novel therapeutic targets for diabetic nephropathy [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(8): 1525-1533.
- [46] 尹归东, 席一, 魏明刚, 等. 凝血、纤溶相关物质与肾脏病的关系及中医探讨 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(12): 2849-2853.
- [47] Wang H, Madhusudhan T, He T, *et al.* Low but sustained coagulation activation ameliorates glucose-induced podocyte apoptosis: Protective effect of factor V Leiden in diabetic nephropathy [J]. *Blood*, 2011, 117(19): 5231-5242.
- [48] Qian J, Yin S, Ye L, *et al.* An indole-2-carboxamide derivative, LG4, alleviates diabetic kidney disease through inhibiting MAPK-mediated inflammatory responses [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14:1633-1645.
- [49] Fornoni A, Ijaz A, Tejada T, *et al.* Role of inflammation in diabetic nephropathy [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2008, 4(1): 10-17.
- [50] 毛志敏, 万毅刚, 孙伟, 等. 黄葵胶囊抑制糖尿病肾病肾组织氧化应激和 p38MAPK 信号通路活性改善肾纤维化的作用和机制 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(21): 4110-4117.
- [51] Mao Z M, Shen S M, Wan Y G, *et al.* Huangkui capsule attenuates renal fibrosis in diabetic nephropathy rats through regulating oxidative stress and p38MAPK/Akt pathways, compared to α -lipoic acid [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 173: 256-265.
- [52] Gu L Y, Sun Y, Tang H, *et al.* Huangkui capsule in combination with metformin ameliorates diabetic nephropathy via the Klotho/TGF- β 1/p38MAPK signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 281:113548.
- [53] Guo F, Zhang Y, Wang Q, *et al.* Effects of FoxO1 on podocyte injury in diabetic rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(2): 260-266.

[责任编辑 高 源]