

基于网络药理学结合 GEO 数据库多芯片分析法探讨糖痹外洗方治疗糖尿病足的作用机制

宁遵锡¹, 刘鹏宇¹, 杨宇¹, 魏秀岩², 高慧媛^{1*}

1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 基于网络药理学结合 GEO 数据库多芯片研究糖痹外洗方治疗糖尿病足相关疾病的潜在治疗靶点及可能作用机制。方法 采用 TCMSP、TCMIP、TCMID、HERB 数据库筛选糖痹外洗方化学成分及作用靶点。在 GEO 数据库中检索糖尿病足及相关疾病差异表达基因, 汇总得到糖尿病足靶点。使用微生信在线作图平台对疾病靶点和化学成分靶点取交集, 并构建交集靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络。采用 Metascape 平台工具对交集靶点进行基因本体 (GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。根据分析结果, 选取度值排名靠前的化合物和蛋白, 使用 AutoDock Vina 进行分子对接。结果 共得到糖痹外洗方活性成分 99 个, 成分靶点 427 个, 糖尿病足靶点 2 217 个, 交集靶点 64 个。关键靶点蛋白主要有表皮生长因子受体 (EGFR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、环加氧酶 2 (PTGS2)、Janus 激酶 2 (JAK2)、基质金属蛋白酶 1 (MMP1) 等, 关键成分有槲皮素、山柰酚、木犀草素等。GO 功能富集分析得到 665 个生物过程、30 个细胞组分、80 个分子功能。KEGG 通路富集分析共得到 100 条通路信息, 主要有脂质与动脉粥样硬化通路、Janus 激酶-信号传导及转录激活因子 1 (JAK-STAT) 信号通路、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、糖尿病并发症晚期糖基化终末产物/AGEs 受体 (AGE-RAGE) 信号通路、核因子- κ B (NF- κ B) 通路等。分子对接结果显示, 地奥司明、鞣花酸、木犀草素、杨梅素和槲皮素与 EGFR、JAK2、MMP1 等关键靶点有较好的结合能力。结论 糖痹外洗方具有多成分、多靶点等特点, 其可能主要作用于糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、脂质与动脉粥样硬化通路和 JAK-STAT 信号通路等的多个关键靶点, 从而发挥治疗糖尿病足相关疾病的效果。

关键词: 糖痹外洗方; 糖尿病足; GEO 数据库; 网络药理学; 分子对接; 鞣花酸; 木犀草素; 杨梅素; 槲皮素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)09-1975-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.09.012

Mechanism of Tangbi Waixi Prescription in treatment of diabetic foot based on network pharmacology combined with GEO database multi-chip analysis

NING Zun-xi¹, LIU Peng-yu¹, YANG Yu¹, WEI Xiu-Yan², GAO Hui-Yuan¹

1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Faculty of life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: **Objective** To investigate the potential therapeutic targets and possible mechanism of Tangbi Waixi Prescription in treatment of diabetic foot-related diseases based on network pharmacology combined with GEO database multi-chip. **Methods** TCMSP, TCMIP, TCMID, and HERB database were used to screen the chemical constituents and targets of Tangbi Waixi Prescription. The differentially expressed genes of diabetic foot and related diseases were retrieved from GEO database, and the targets of diabetic foot were summarized. The intersection of disease targets and chemical component targets was obtained using the Weishengxin online mapping platform, and the intersection target protein interaction (PPI) network was constructed. Metascape platform tool was used to perform gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis for intersection targets. According to the analysis results, the compounds and proteins with the highest degree value were selected, and AutoDock Vina was used for molecular docking. **Results** A total of 99 components and 427 targets of Tangbi Waixi Prescription, 2 217 targets of

收稿日期: 2022-02-22

基金项目: 国家重点研发项目 (2019YFC1709300, 2019YFC1709305)

作者简介: 宁遵锡, 研究方向为天然药物化学。E-mail: nzx2388105581@163.com

*通信作者: 高慧媛, 主要从事中药及天然药物化学研究。E-mail: sypugaohy@163.com

diabetic foot were retrieved, and 64 intersecting targets were identified. The major target proteins include EGFR, PPARG, PTGS2, JAK2, MMP1, and the key components include quercetin, kaempferol, luteolin, and diosmin. GO analysis yielded 665 biological processes, 30 cell components, and 80 molecular functions. KEGG pathway enrichment analysis yielded 100 signaling pathways which mainly related to lipid and atherosclerosis, JAK-STAT signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, NF- κ B pathways, etc. The results of molecular docking showed that the diosmin, ellagic acid, luteolin, myricetin, quercetin had excellent binding abilities to EGFR, JAK2, MMP1 and other key targets. **Conclusion** Tangbi Waixi Prescription has the characteristics of multiple components and multiple targets, which may mainly act on the AGE-RAGE signaling pathway, lipid and atherosclerosis pathway, JAK-STAT signaling pathway, and other key targets of diabetic complications, so as to play a therapeutic effect on diabetic foot-related diseases.

Key words: Tangbi Waixi Prescription; diabetic foot; GEO database; network pharmacology; molecular docking; ellagic acid; luteolin; myricetin; quercetin

糖尿病足属于糖尿病过程中的一种并发症,其主要发病因素是由于糖尿病患者最先发生糖尿病周围神经病变和糖尿病周围血管病变等疾病,从而导致糖尿病患者足部组织的溃疡甚至坏死,临床症状主要表现为患者肢体麻木、疼痛、感觉异常等^[1]。糖尿病足具有极高的致残率和致死率,常导致患者截肢,目前糖尿病患者中约 25%以上出现了糖尿病足及其相关疾病^[2]。

按照中医学辨证论治理论,根据糖尿病足的各时期的临床症状,可归属于痹证(血痹、脉痹)、痛证、疮疡等范畴,发病多因饮食不节,膏粱厚味损伤脾胃,湿浊内生,痰凝经脉;或因气虚血瘀,经脉痹阻,气血不达四末,而致脉痹,病久肝肾亏虚,阴精消灼,致筋炼骨枯而成脱疽,在局部组织溃坏后易感外邪,从而导致创面难以愈合^[3-6]。因此中医治疗常以活血化瘀和通脉止痛作为糖尿病足的主要治疗方向。

糖痹外洗方由乳香、没药、辣椒、花椒、红花、忍冬藤、冰片 7 味中药组成,具有活血化瘀、通络止痛等功效,能起到针对性治疗糖尿病足以及相关疾病中痹症、血痹、脉痹、痛证、疮疡的效果,临床上已将糖痹外洗方作为治疗糖尿病足的常用复方,具有很好的疗效^[7-8]。但目前对于其物质基础及作用机制尚不明确。本研究立足于网络药理学方法^[9],结合 GEO 数据库进行基因芯片分析,对糖痹外洗方治疗糖尿病足的物质基础和作用机制进行初步探究,为后续深入研究糖痹外洗方治疗糖尿病足的靶点及通路提供新的依据和思路。

1 材料与方法

1.1 糖痹外洗方活性成分收集及靶点筛选

采用中药系统药理学数据库和分析平台^[10](TCMSP, <https://tcmsp-e.com/>),以“乳香”“没药”

“辣椒”“花椒”“红花”“冰片”作为检索关键词进行检索。对于 TCMSP 数据库未收录的中药忍冬藤则采用中医药整合药理学研究平台^[11](TCMIP, <http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/home/>)、中医药研究综合数据库^[12](TCMID, <http://47.100.169.139:8000/tcmid/search/>)、本草组鉴数据库^[13](HERB, <http://herb.ac.cn/>)查找其中所含化学成分,将忍冬藤查找到的化学成分在 TCMSP 数据库中检索,以获得其对应的 MOL ID 和化合物详细信息。根据 Lipinski 的药物分子类药性“五规则”^[14],对检索到的各味药中化合物进行筛选,由于糖痹外洗方为外用药,可以忽略其口服利用度(OB)等因素的影响,因此采取药物类药性(DL) ≥ 0.18 ,脂水分配系数 $\lg P < 0.5$,得到糖痹外洗方中 7 味中药的候选活性成分。

1.2 糖痹外洗方活性成分靶点筛选及网络构建

在 TCMSP、TCMIP、TCMID 和 HERB 等数据库中预测候选活性成分的靶点,同时结合 UniProt 数据库^[15](<https://www.uniprot.org/>)对得到的靶点进行校正,得到对应的标准靶点基因名称。将没有对应靶点的候选活性成分去除,最后得到糖痹外洗方活性成分及对应靶点信息。利用 Cytoscape 3.7.2 软件^[16]导入糖痹外洗方单味中药名、候选活性成分、作用靶点信息,以此构建糖痹外洗方药物-成分-靶点的网络图,同时利用 Cytoscape 3.7.2 工具中的 Network Analyzer 插件对所有信息进行拓扑分析,从而根据度(degree)值的大小判别出网络中的重要化合物。

1.3 GEO 数据库糖尿病足相关差异基因表达及靶点筛选

以“diabetic foot ulcer”“diabetic peripheral neuropathy”“diabetic peripheral vascular disease”等

与糖尿病足发生发展密切相关的疾病作为关键词,在 GEO 数据库^[17]中检索与其相关的基因芯片实验信息。并与 HOME for Researchers 平台^[18]对所查找到的基因芯片统一进行 log2 化处理。将从 GEO 数据库中筛选后得到的各芯片实验的差异靶点进行合并,全部导入 EXCEL 表格中并删除重复靶标,从而得到糖尿病足以及相关疾病的主要靶点。将复方的活性成分靶点与糖尿病足的相关靶点导入微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 在线作图平台取交集,获得糖痹外洗方与糖尿病足的共同靶点。

1.4 蛋白互相作用 (PPI) 网络构建

将糖痹外洗方治疗糖尿病足的靶点导入 String 11.5 数据库^[19] (<https://www.string-db.org/>) 中,选择 medium confidence (0.400) 作为最小互作分数,对其进行 PPI 网络分析,删除孤立的蛋白,得到 PPI 数据并保存为 TSV 格式文件。将该网络导入 Cytoscape 3.7.2 中,利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络进行可视化,并重新构建核心靶点的 PPI 网络图。

1.5 共有基因基因本体 (GO) 富集分析与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

为了进一步探究糖痹外洗方治疗糖尿病足中参与的生物学过程、涉及的分子功能、成分以及信号通路等,将复方与疾病的交集靶点上传至 Metascape 在线 GO 分析平台^[20] (<http://metascape.org/>),采用 Metascape 对糖痹外洗方治疗糖尿病足的作用靶点进行分析。将上述靶点导入分析平台后,在输入物种和分析物种 2 个选项中选择“H. sapiens (2)”进行分析。最后得到 GO 富集分析、KEGG 通路分析的结果,根据 lgP 值大小及靶点数目的多少对结果进行排序,设定 $P < 0.01$,从中筛

选出排名前 20 位的生物学过程和信号通路。同时,根据所属通路将各靶点进行归类,将信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件中进行可视化处理,构建“通路-靶点”网络图。

1.6 分子对接

通过分子对接对活性化合物和关键靶点的结合能力进行验证。分子对接程序采用 AutoDock Vina^[21],对接方式选择半柔性对接。各靶点的蛋白质晶体结构从 ProteinData Bank (PDB) 数据库^[22] (<http://www1.rcsb.org/>) 下载,利用 Discovery Studio 4.5 Client 将各蛋白的原配体与其蛋白分离,去除水分子后分开保存,使用 AutoDockTools 为各蛋白质结构加氢,保存为 PDBQT 格式用于下一步对接。从 TCMSP 数据库下载用于对接的化合物结构,对接前使用 AutoDockTools 对蛋白质结构和预对接的化合物进行前处理,随后使用 AutoDock Vina 对接。统计各个化合物与蛋白最佳对接结果的结合自由能,并用 Discovery Studio 4.5 Client 对结合自由能低的对接结果进行可视化。

2 结果

2.1 糖痹外洗方活性成分及靶点筛选结果

共得到乳香有效成分 5 个,没药有效成分 37 个,辣椒有效成分 8 个,红花有效成分 35 个,花椒有效成分 6 个,忍冬藤有效成分 6 个,冰片有效成分 4 个,其中槲皮素为没药、红花、花椒 3 味中药的共有成分,共计有效成分 99 个。利用 UniProt 数据库将所有活性成分的蛋白名称转化为基因名称,得到乳香靶点基因 150 个、没药靶点基因 182 个、辣椒靶点基因 55 个、红花靶点基因 229 个、花椒靶点基因 145 个、忍冬藤靶点基因 29 个、冰片靶点基因 51 个,对靶点基因整合去除重复值,得到活性成分对应的靶点基因 427 个,结果见表 1、图 1。

表 1 糖痹外洗方中药活性成分基本信息

Table 1 Basic information of TCM ingredients from Tangbi Waixi Prescription

化合物 ID	化合物名称	脂水分配系数	DL	来源
MOL001279	isoincense oxide	3.735	0.289 83	乳香
MOL001278	isoincense acetate	4.902	0.281 13	乳香
MOL001232	TES	3.333	0.348 05	乳香
MOL001222	estan	3.538	0.386 33	乳香
MOL000390	daidzein	2.332	0.186 94	乳香
MOL001000	quercetin-3-O- α -L-rhamnoside	0.301	0.736 49	没药
MOL001001	quercetin-3-O- β -D-glucuronide	-0.416	0.736 45	没药

续表 1

化合物 ID	化合物名称	脂水分配系数	DL	来源
MOL001002	ellagic acid	1.483	0.434 17	没药
MOL001004	pelargonidin	1.933	0.212 04	没药
MOL001009	guggulsterol-VI	3.974	0.430 55	没药
MOL001012	(5R,8R,9R,10R,13R,14R)-4,4,8,10,14-pentamethyl-1,2,5,6,7,9,11,12,13,15-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one	4.905	0.400 34	没药
MOL001020	(7S,8S,9S,10R,13S,14S,17R)-17-ethyl-7-hydroxy-10,13-dimethyl-2,6,7,8,9,11,12,14,15,17-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,16-dione	2.582	0.475 88	没药
MOL001022	11 α -hydroxypregna-4,17(20)-trans-diene-3,16-dione	4.004	0.470 61	没药
MOL001024	(8R,9S,10R,11R,13S,14S,15S,17E)-17-ethylidene-11,15-dihydroxy-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,16-dione	1.969	0.519 65	没药
MOL001031	epimansumbinol	4.944	0.398 24	没药
MOL001033	diayangambin	2.602	0.809 18	没药
MOL001040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	2.298	0.211 41	没药
MOL001047	(+)-epiexcelsin	2.204	0.929 98	没药
MOL001049	16-hydroperoxymansumbin-13(17)-en-3 β -ol	4.319	0.494 05	没药
MOL001051	16-hydroperoxy-3,4-seco-mansumbin-3(28),13(17)-dien-3-oic acid	4.543	0.403 26	没药
MOL001052	mansumbin-13(17)-en-3,16-dione	3.958	0.448 06	没药
MOL001058	picropolygamain	3.025	0.833 28	没药
MOL001063	28-acetoxy-15 α -hydroxymansumbinone	3.893	0.670 10	没药
MOL001125	erlangerin B	3.417	0.881 34	没药
MOL001126	[(5aS,8aR,9R)-8-oxo-9-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5,5a,6,9-tetrahydroisobenzofurano[6,5-f][1,3]benzodioxol-8a-yl] acetate	2.790	0.902 83	没药
MOL001127	erlangerin D	2.790	0.902 74	没药
MOL001128	7-O-methylaloeresin A	1.565	0.821 56	没药
MOL001130	fellavine	1.704	0.839 66	没药
MOL001131	phellamurin_qt	3.609	0.392 83	没药
MOL001140	petunidin 3-rhamnoglucoside	-1.300	0.645 51	没药
MOL001141	(20S)-3 β -acetoxy-12 β ,16 β -trihydroxydammar-24-ene	4.937	0.807 30	没药
MOL001142	(20S)12 β ,16 β -trihydroxydammar-24-ene-3 β -O- β -glucopyranoside	2.811	0.532 85	没药
MOL001150	3 β -acetoxy-16 β -hydroxydammar-24-ene	3.527	0.795 22	没药
MOL001156	3-methoxyfuranoguaia-9-en-8-one	2.981	0.183 82	没药
MOL001175	guggulsterone	3.752	0.435 48	没药
MOL000490	petunidin	1.649	0.307 12	没药
MOL000098	quercetin	1.504	0.275 25	没药、红花、花椒
MOL000986	1-asarinine	2.237	0.827 21	没药
MOL000988	4,17(20)-(cis)-pregnadiene-3,16-dione	4.198	0.478 26	没药
MOL000990	guggulsterol-II	4.929	0.743 80	没药
MOL000998	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2R,3R,4S,5S)-3,4,5-trihydroxytetrahydropyran-2-yl]oxy-chromone	-0.076	0.702 68	没药
MOL000999	quercetin-3-O- β -D-galactoside	-0.587	0.769 03	没药
MOL002579	capsaicin	3.885	0.195 79	辣椒
MOL000416	lariciresinol	2.463	0.379 41	辣椒
MOL000433	FA	0.007	0.705 70	辣椒
MOL008683	alpha-solamarine_qt	4.368	0.807 80	辣椒
MOL008688	capsicastrine_qt	4.379	0.830 14	辣椒
MOL008715	icarside E5	0.746	0.723 04	辣椒
MOL008716	icarside E5_qt	2.399	0.287 65	辣椒
MOL008738	solasonine_qt	4.368	0.807 76	辣椒
MOL002008	myricetin	318.250	-1.007 44	红花
MOL002681	fluoranthene	202.260	1.670 10	红花
MOL002692	amoenin A3	448.410	-2.009 51	红花
MOL002693	nicotiflorin	594.570	-2.551 21	红花

续表 1

化合物 ID	化合物名称	脂水分配系数	DL	来源
MOL002694	4-[(E)-4-(3,5-dimethoxy-4-oxo-1-cyclohexa-2,5-dienylidene)but-2-enylidene]-2,6-dimethoxycyclohexa-2,5-dien-1-one	356.400	-0.335 46	红花
MOL002695	lignan	458.550	-0.161 85	红花
MOL002696	lirioresinol-A	404.450	-0.424 98	红花
MOL002701	neocarthamin	450.430	-2.020 24	红花
MOL002708	precathamin	464.510	-1.983 91	红花
MOL002710	pyrethrin II	372.500	-0.212 69	红花
MOL002712	6-hydroxykaempferol	302.250	-0.712 61	红花
MOL002714	baicalein	270.250	-0.050 23	红花
MOL002717	qt_carthamone	286.250	-0.917 32	红花
MOL002721	quercetagenin	318.250	-0.933 41	红花
MOL002724	qt_safflomin-C	452.440	-1.382 52	红花
MOL002725	qt_safflow-yellow-A	448.410	-2.458 07	红花
MOL002728	sesquiterpene	626.570	-3.987 57	红花
MOL002730	vitamin-G	376.410	-1.768 78	红花
MOL002737	scutellarein	286.250	-0.537 31	红花
MOL002739	tagetin	480.410	-2.151 93	红花
MOL002740	thymopentin	679.880	-2.909 46	红花
MOL002751	6-hydroxykaempferol-3-O-β-D-glucoside	464.410	-2.305 05	红花
MOL002757	7,8-dimethyl-1H-pyrimido[5,6-g]quinoxaline-2,4-dione	242.260	-0.669 56	红花
MOL002761	sophoraflavonolside	610.570	-3.271 98	红花
MOL002766	quercetin-3,7-di-O-β-d-glucoside	626.570	-3.736 72	红花
MOL002776	baicalin	446.390	-1.744 26	红花
MOL002781	carthamone	448.410	-2.428 73	红花
MOL000347	syrigin	372.410	-1.809 10	红花
MOL000396	(+)-syringaresinol	418.480	-0.336 52	红花
MOL000415	rutin	610.570	-2.753 17	红花
MOL000422	kaempferol	286.250	-0.553 35	红花
MOL000561	astragalin	448.410	-1.969 00	红花
MOL000006	luteolin	286.250	-0.843 49	红花
MOL000008	apigenin	270.250	-0.610 90	红花
MOL013271	kokusaginin	2.330	0.195 84	花椒
MOL002663	skimmianin	2.330	0.196 38	花椒
MOL002881	diosmetin	2.318	0.274 42	花椒
MOL004368	hyperin	-0.587	0.769 05	花椒
MOL005093	diosmin	-0.445	0.662 74	花椒
MOL003022	secoxyloganin	-2.030	0.390 00	忍冬藤
MOL000655	loganic acid	-2.330	0.400 00	忍冬藤
MOL001680	loganin	-2.080	0.440 00	忍冬藤
MOL000009	luteolin-7-O-glucoside	0.160	0.780 00	忍冬藤
MOL003018	secologanin	-1.980	0.360 00	忍冬藤
MOL002649	coniferin	-0.490	0.270 00	忍冬藤
MOL006861	asiatic acid	4.296	0.710 97	冰片
MOL003437	isobrucine	1.260	0.770 00	冰片
MOL002620	dryocrassin	4.160	0.360 00	冰片
MOL001654	oleanolic acid-28-O-β-D-glucopyranoside	4.520	0.410 00	冰片

2.2 GEO 数据库筛选糖尿病足差异基因表达结果

共查找到 4 个相关的基因芯片实验, 分别为 GSE24290、GSE43950、GSE68183、GSE80178, 各芯片实验差异基因表达结果如图 1 所示。将从 GEO 数据库中筛选得到的各芯片实验的差异靶点进行

合并, 全部导入 Excel 表格中并删除重复靶标, 从而得到糖尿病足及其相关疾病主要靶点共 2 217 个。将复方的活性成分靶点与糖尿病足的相关靶点在线作图平台取交集, 获得糖痹外洗方与糖尿病足的共同靶点 64 个, 见图 2。

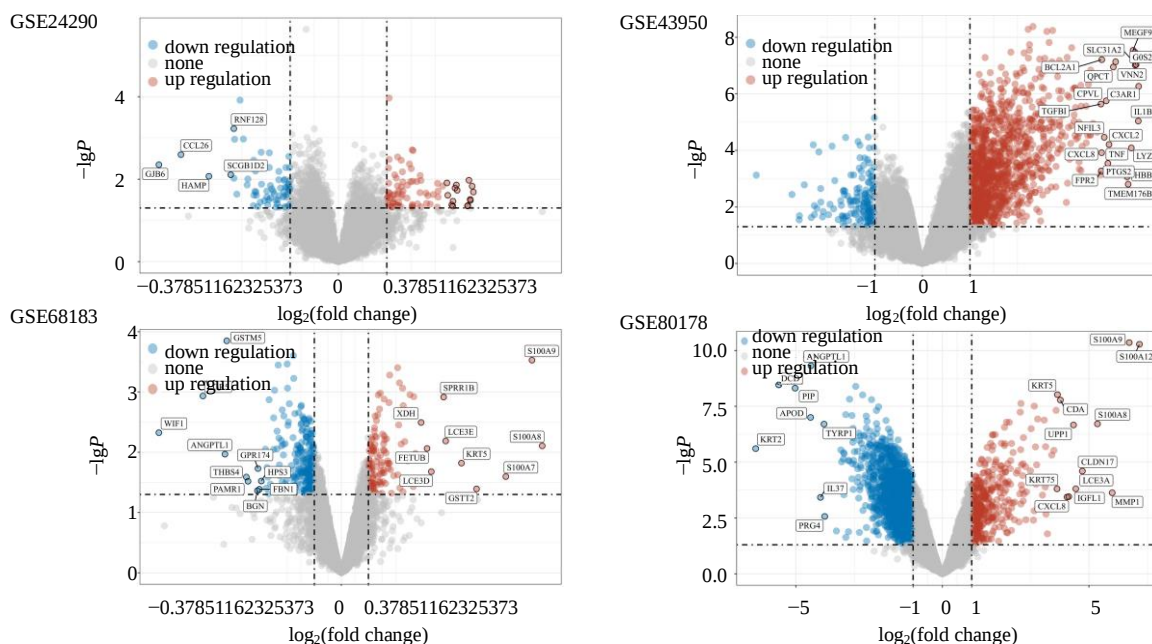


图 1 GEO 数据库筛选糖尿病足不同基因芯片中差异基因表达分析

Fig. 1 Differential gene expression maps in different GeneChip of diabetic foot were screened by GEO database

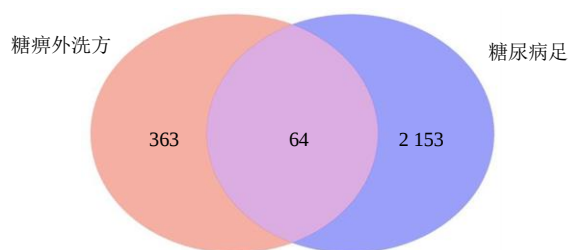


图 2 糖痹外洗方治疗糖尿病足靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of diabetic foot targets treated by Tangbi Waixi Prescription

2.3 糖痹外洗方与糖尿病足交集靶点 PPI 网络

将上述糖痹外洗方治疗糖尿病足的 64 个靶点导入 String 数据库, 对糖痹外洗方治疗糖尿病足的潜在作用靶点进行 PPI 分析, 将置信度设置为 > 0.400 , 剔除孤立的靶点蛋白, 获取蛋白互作信息; 导入 Cytoscape 3.7.2 软件中进行可视化处理及网络拓扑学分析, 得到糖痹外洗方治疗糖尿病足的相关靶点的 PPI, 该网络由 59 个节点、256 条边组成, 见图 3。根据 PPI 网络图可知, 核心靶点主要有肿瘤蛋白 P53 (TP53)、表皮生长因子受体 (EGFR)、趋化因子 8 (CXCL8)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、环加氧酶 2 (PTGS2)、E1A 结合蛋白 P300 (EP300)、细胞周期素 D1 (CCND1) 基因。

2.4 GO 富集分析结果

使用 Matescape 平台对筛选出的 64 个交集靶

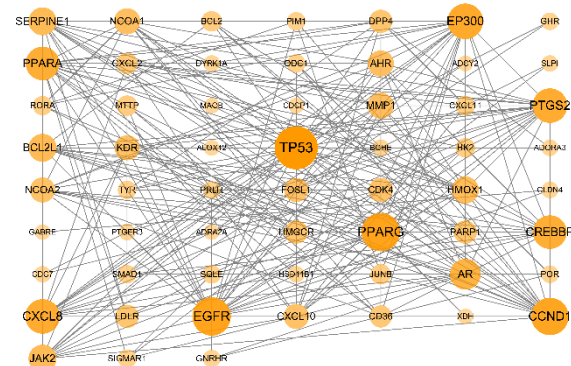


图 3 糖痹外洗方与糖尿病足交集靶点的 PPI 网络分析
Fig. 3 PPI analysis of intersection targets of Tangbi Waixi Prescription and diabetic foot

点进行 GO 分析, 得到 665 个生物过程 (BP)、30 个细胞组分 (CC)、80 个分子功能 (MF)。以 Benjamini 校正法和 $P < 0.01$ 作为筛选条件, 筛选出排名前 20 的条目进行可视化分析, 见图 4。

GO 富集结果表明, 糖痹外洗方治疗糖尿病足的主要 BP 包括激素反应 (response to hormone)、对细胞外刺激的反应 (response to extracellular stimulus)、多肽反应 (response to peptide)、对类固醇激素的反应 (response to steroid hormone)、对糖皮质激素的反应 (response to glucocorticoid)。主要 CC 包括转录调节复合物 (transcription regulator complex)、受体复合物 (receptor complex)、核被膜

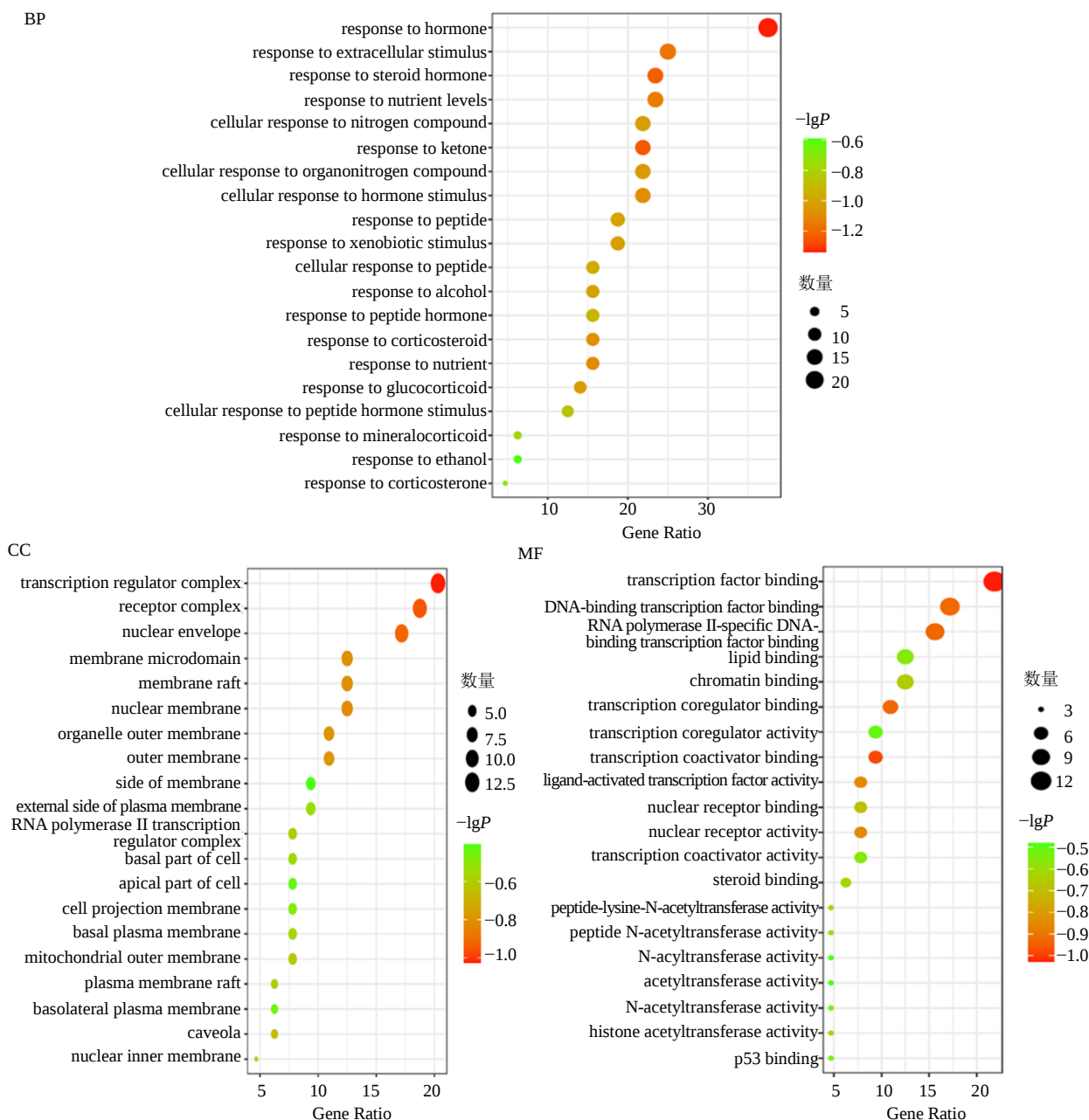


图 4 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

(nuclear envelope)、膜微区 (membrane microdomain)、脂筏 (membrane raft), 主要 MF 包括转录因子结合 (transcription factor binding)、DNA-结合转录因子结合 (DNA-binding transcription factor binding)、RNA 特异性聚合酶 IIDNA-结合转录因子结合 (RNA polymerase II-specific DNA-binding transcription factor binding)、染色质结合 (chromatin binding)、脂结合 (lipid binding)。

2.5 KEGG 通路富集分析结果

使用 Matescape 平台对筛选出的 64 个交集靶点进行分析, 得到 KEGG 通路富集分析共得到 100 条通路信息。以 Benjamini 校正法及 $P < 0.01$ 作为筛选条件, 筛选出排名前 20 的条目进行可视化分析, 见图 5。同时, 根据所属通路将各靶点进行归类, 将信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件中进行可视化处理, 并构建“通路-靶点”网络图, 见图 6。

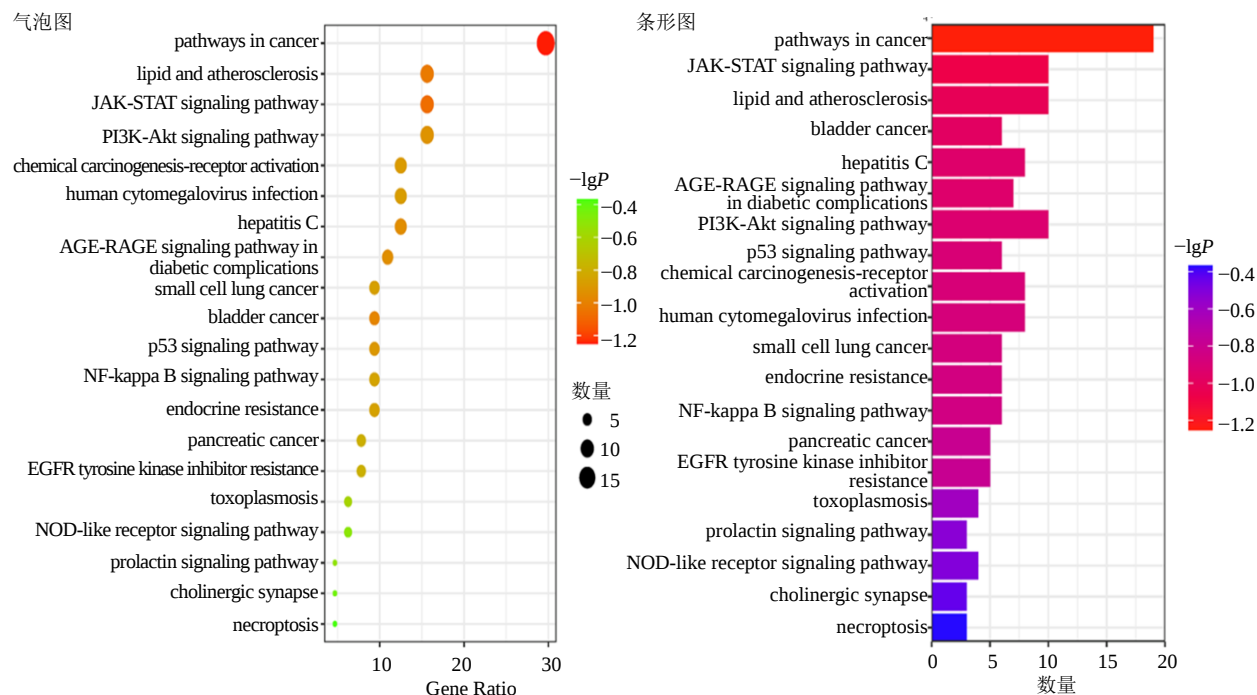


图 5 KEGG 通路分析
Fig. 5 KEGG pathway analysis

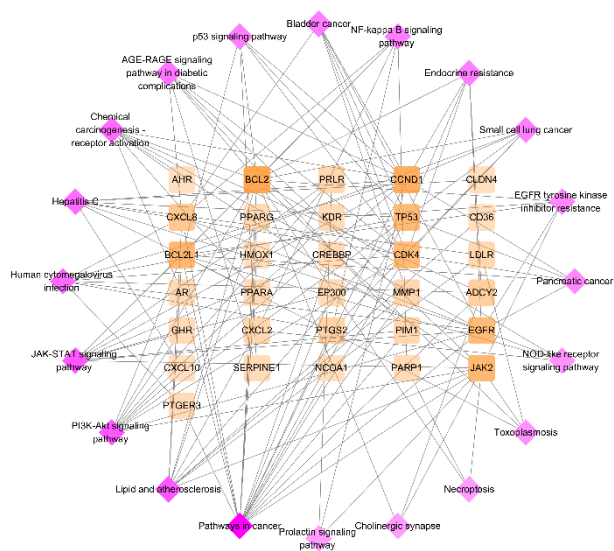


图 6 “通路 - 靶点”网络
Fig. 6 “Pathway - targets” network

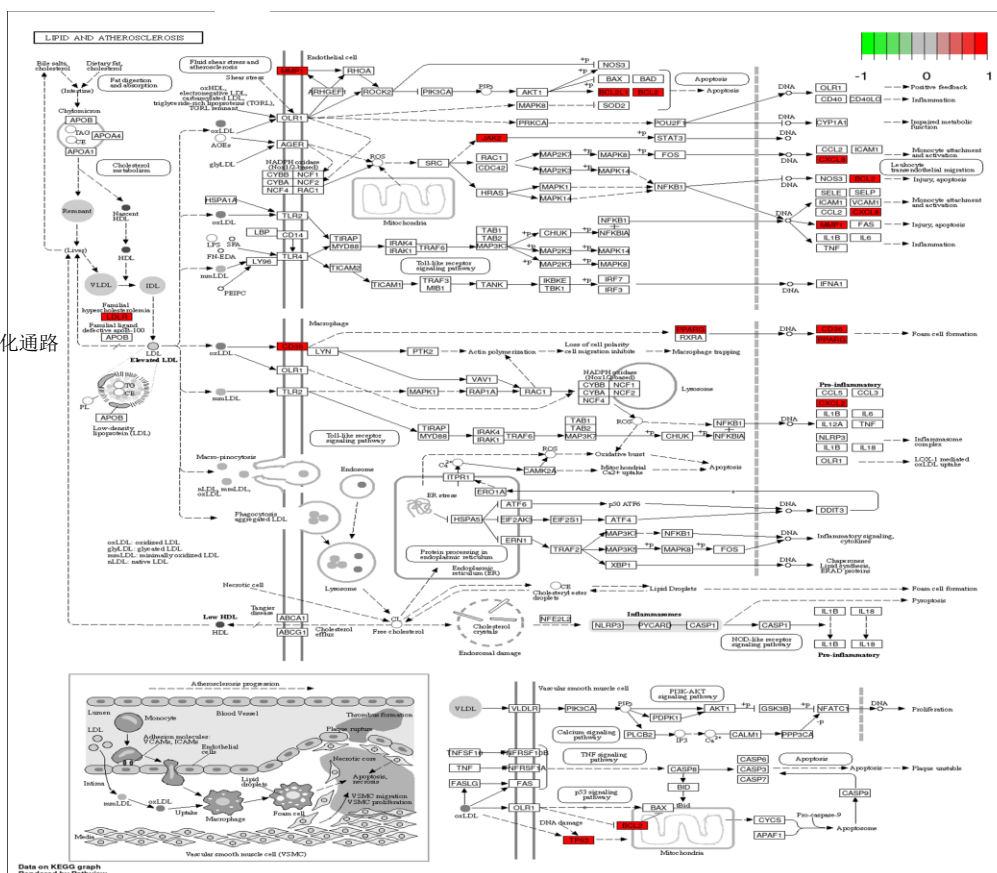
KEGG 通路富集分析结果表明, 糖尿病外洗方治疗糖尿病足的主要作用通路包括: 癌症通路 (pathways in cancer)、脂质与动脉粥样硬化通路 (lipid and atherosclerosis)、Janus 激酶-信号传导及转录激活因子 1 信号通路 (JAK-STAT signaling pathway)、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K) -蛋白激酶 B (Akt) 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、

糖尿病并发症晚期糖基化终末产物/AGEs 受体 (AGE-RAGE) 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、p53 信号通路 (p53 signaling pathway)、核因子- κ B (NF- κ B) 通路 (NF-kappa B signaling pathway)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抵抗通路 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance) 等。其中脂质与动脉粥样硬化通路和 JAK-STAT 信号通路详细信息见图 7。

2.6 分子对接结果

由 PPI 网络及通路分析结果可以看出, EGFR、PPARG、PTGS2、JAK2、MMP1 等属于不同类型或通路的靶点在糖尿病外洗方治疗糖尿病足的过程中扮演着重要的作用, 因此, 选取以上几个蛋白作为分子对接目标靶点。根据化合物的度值选取靠前的 10 个主要化合物, 包括槲皮素 (quercetin)、大豆苷元 (daidzein)、辣椒碱 (capsaicin)、山柰酚 (kaempferol)、木犀草素 (luteolin)、杨梅素 (myricetin)、积雪草酸 (asiatic acid)、鞣花酸 (ellagic acid)、松柏苷 (coniferin)、地奥司明 (diosmin), 分别与 EGFR (PDB ID:4HJO)、JAK2 (PDB ID:5AEP)、MMP1 (PDB ID:1HFC)、PPARG (PDB ID:7AWC)、PTGS2 (PDB ID:5IKT) 进行分子对接验证, 以 PDB 官网下载文件中各靶点蛋白自带配

脂质与动脉粥样硬化通路



JAK-STAT 信号通路

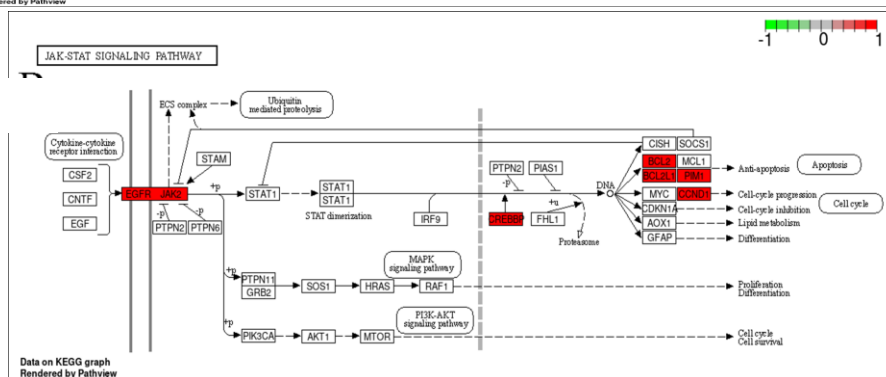


图 7 关键信号通路详解图

Fig. 7 Detail diagram of key signal pathway

体作为对照。目前普遍认为,化合物与蛋白结合自由能越低,说明二者之间结合越稳定,而结合能 <-5.0 kcal/mol ($1 \text{ cal}=4.4 \text{ J}$) 表明化合物与靶点结合情况较好^[23],因此使用结合自由能大小来预测各化合物与蛋白作用情况,各化合物与蛋白对接后结合自由能结果见图 8。使用 Discovery Studio 2016 Client 对靶点与化合物对接结合自由能低的结果进行可视化,见图 9。

3 讨论

本研究以网络药理学为基础,在 TCMSP、

TCMIP、TCMID、HERB 等数据库中检索并得到糖尿病外洗方的活性成分和对应靶点,结合 GEO 数据库对糖尿病相关基因芯片实验结果进行总结,得到 4 个与糖尿病足相关疾病基因芯片实验中的差异表达基因,将化合物对应靶点和疾病靶点取交集,最终得到复方治疗糖尿病足的相关靶点,对交集靶点进行 PPI 分析,初步得到了糖尿病外洗方治疗糖尿病足过程中的主要物质基础和可能的分子机制,并通过对糖尿病外洗方和糖尿病足的交集靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析,得到其治疗过程中可能

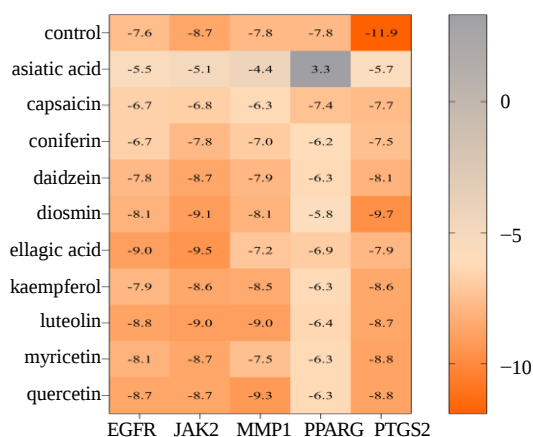


图 8 分子对接结合自由能热图

Fig. 8 Heat map of molecular docking binding free energy

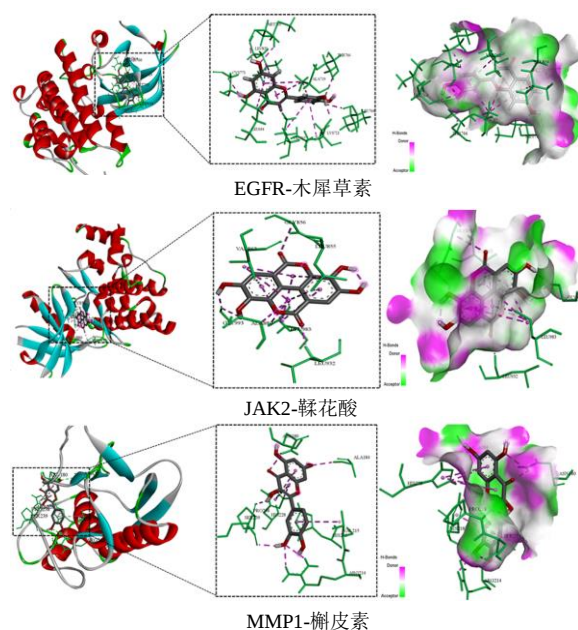


图 9 活性成分与靶点蛋白分子对接

Fig. 9 Molecule docking of active ingredients and targets

涉及的 BP、CC、MF、作用通路等信息。根据 KEGG 通路分析结果可知, 糖痹外洗方主要作用于脂质与动脉粥样硬化通路、JAK-STAT 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路、NF- κ B 通路等。

持续高血糖会导致糖尿病患者体内多种蛋白质非酶糖基化从而形成晚期糖基化终末产物 (AGEs), AGEs 属于 AGE-RAGE 信号通路中的核心因子, 它的产生会激活 AGE-RAGE 信号通路^[24], 并进一步激活 NF- κ B、血管内皮生长因子 (VEGF) 等信号通路, 进而引起大量炎症因子和活性氧 (ROS) 的释放、血管通透性的增加, 造成糖尿病足

创面形成和难愈^[25], 而机体中活性氧的增加会激活 JAK-STAT 信号通路, 可以在一定程度上降低炎症反应及氧化应激所导致的下肢神经炎症和损伤^[26]。有研究证明, PI3K-Akt 信号通路是影响胰岛素信号通路中最重要的一条^[27], 其可以通过抗胰岛 B 细胞凋亡、促进胰岛 B 细胞增殖以及减轻胰岛素抵抗等一系列作用发挥其调控胰岛 B 细胞的作用^[28-29]。而在糖尿病足的发展进程中, 首先会出现糖尿病下肢血管病变, 其发生的机制与炎症反应、血管内皮功能紊乱及胰岛素抵抗等密切相关, 在一定程度上属于糖尿病合并下肢动脉粥样硬化的范畴^[30], 因此, 动脉粥样硬化所导致的动脉硬化狭窄、闭塞, 下肢缺血缺氧, 在糖尿病足的发生发展中起着至关重要的作用。

本实验从糖痹外洗方 7 味中药中选取不同类型的代表性核心化合物 10 个, 以及 5 个在疾病发生发展中起着关键作用的靶点蛋白, 其中核心候选活性成分包括槲皮素、大豆苷元、辣椒碱、山柰酚、木犀草素、杨梅素、积雪草酸、鞣花酸、松柏苷、地奥司明, 其可能主要作用于 EGFR、PPARG、PTGS2、JAK2、MMP1 等靶点。为了进一步探究各化合物与靶点作用情况, 将此 10 个化合物分别与 5 个靶点蛋白进行分子对接初步验证, 结果显示, 除积雪草酸外, 其它 9 个核心化合物与靶点蛋白对接后的结合自由能 < -5.0 kcal/mol, 说明各化合物与靶点蛋白之间有良好的结合能力, 而积雪草酸与 PPARG 和 MMP1 对接后的结合结果较差, 推测可能是由于 PPARG 和 MMP1 活性空腔较小, 而积雪草酸分子量较大, 对接时位阻较大所致。从对接结果可以看出, 地奥司明、鞣花酸、木犀草素、杨梅素、槲皮素等与 EGFR、JAK2、MMP1 对接后的结合自由能甚至等于或低于 2 个靶点蛋白原有的自带配体, 说明地奥司明、鞣花酸、木犀草素、杨梅素和槲皮素等可能对于糖尿病足有着很好的治疗潜力, 推测其主要作用于 EGFR、JAK2、MMP1 等相关的通路和靶点发挥作用。此外, 10 个核心化合物中, 辣椒碱与 PPARG 的结合自由能最低, 地奥司明与 PTGS2 的结合自由能最低, 推测辣椒碱和地奥司明能够通过分别作用于与 PPARG 和 PTGS2 相关的通路和靶点发挥治疗糖尿病足的作用。

地奥司明常被用于增强静脉张力和血管保护, 可以降低静脉血管血瘀滞, 目前临床已有报道将地奥司明用于治疗糖尿病足, 证明其能够有效改善患

者下肢水肿的症状,提高足部创口愈合率^[31],作用机制是减少机体中糖基化产物 AGEs 的产生^[32]、激活 JAK-STAT 信号通路从而发挥抗炎抗氧化以及保护胰岛 B 细胞的作用^[33-34]。鞣花酸为天然多酚二内酯类化合物,具有很强的抗炎抗氧化作用^[35],有研究表明,其能够通过抑制炎症反应起到保护胰腺的作用^[36]。在糖尿病微血管病变中,木犀草素能够通过增强超氧化物歧化酶(SOD)的活性,从而起到抗氧化的作用^[37]。而杨梅素可以通过诱导胰岛素的分泌、缓解高血糖导致的体内氧化等而具有显著的降血糖作用,还可以降低一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 等炎症因子^[38],抑制 TNF- α 诱导的血管内皮生长因子 VEGF 表达和皮肤组织中 MMP-9 的表达,从而发挥抗炎、预防皮肤和血管损伤的作用^[39]。槲皮素为黄酮醇类化合物,对于氧化应激导致的神经损伤、细菌感染、炎症反应具有良好的治疗效果^[40-42],最近有研究发现,槲皮素还可通过保护胰岛 β 细胞从而改善糖尿病大鼠的糖代谢水平^[43]。

综上所述,本研究以网络药理学为基础,筛选出糖痹外洗方治疗糖尿病足的核心药效成分。糖痹外洗方中各成分主要通过降低血糖、抗炎、抗氧化、降低血瘀、促进血管生成和皮肤愈合等相关靶点及通路发挥作用,充分体现了复方多成分、多靶点的特点,其报道出的良好活性也与分子对接中所得出的结果相佐证,证明本研究网络药理学结果的可行性。本次结果得出的核心活性成分中也有许多尚未用于糖尿病足相关疾病的研究,后续可以在各化合物治疗糖尿病足方面进行更加深入具体的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邵蕊,何庆.老年糖尿病足的中西医认识及治疗进展[J].天津医科大学学报,2022,28(4):452-455.
- [2] Peter-Riesch B. The diabetic foot: The never-ending challenge [J]. *Endocr Dev*, 2016, 31: 108-134.
- [3] Tan M K H, Goodall R, Hughes W, Langridge B, et al. A methodological assessment of diabetic foot syndrome clinical practice guidelines [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2020, 60(2): 274-281.
- [4] 刘建新,沈宏.中西医结合治疗糖尿病周围血管病变 90 例疗效观察 [J]. *中国医药指南*, 2012, 10(10): 269-270.
- [5] 黄鹏展.当归四逆汤治疗糖尿病周围神经病变疗效观察 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2015, 25(23): 53-54.
- [6] 周创业,彭金军.神效生肌散对糖尿病足溃疡创面的修复作用 [J]. *临床医学研究与实践*, 2021, 6(6): 106-107.
- [7] 卢绮韵,梁庆顺,刘振杰,等.中医综合治疗糖尿病周围神经病变临床研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(9): 53-56.
- [8] 卢绮韵,陈本坚,范冠杰.袋泡糖痹外洗方治疗 2 型糖尿病周围血管病变的临床研究 [J]. *中医药导报*, 2019, 25(15): 81-84.
- [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] 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.
- [11] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, et al. ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [12] Huang L, Xie D, Yu Y, et al. TCMID 2.0: A comprehensive resource for TCM [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1117-D1120.
- [13] Fang S 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.
- [14] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1-3): 3-26.
- [15] UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D480-D489.
- [16] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [17] Barrett T, Wilhite S E, Ledoux P, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets--update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D991-D995.
- [18] Zhang X, Zhang W, Jiang Y, et al. Identification of functional lncRNAs in gastric cancer by integrative analysis of GEO and TCGA data [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17898-17911.
- [19] Szklarczyk D, Gable A L, Nastou K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021,

- 49(D1): D605-D612.
- [20] Zhou Y, Zhou B, Pache L, *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [21] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [22] Ormö M, Cubitt A B, Kallio K, *et al.* Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein [J]. *Science*, 1996, 273(5280): 1392-1395.
- [23] 凌晓颖, 陶嘉磊, 孙逊, 等. 基于网络药理学的连花清瘟方抗冠状病毒的物质基础及机制探讨 [J]. *中草药*, 2020, 51(7): 1723-1730.
- [24] 王丽, 李杰辉. AGEs-RAGE 信号通路 with 糖尿病难愈合创面 [J]. *中国烧伤创疡杂志*, 2015, 27(6): 406-409.
- [25] 杨超茅, 杨志新, 马晓玲. AGEs-RAGE 信号通路在糖尿病肾病中的作用机制及中医药研究进展 [J]. *中医学报*, 2019, 34(9): 1864-1868.
- [26] 王英, 冷锦红. JAK-STAT 信号传导通路 with 痛性糖尿病周围神经病变关系的研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(10): 1176-1178.
- [27] 詹巾卓, 李娜, 孙汇, 等. PI-3K 转导通路 in II 型糖尿病发病机制中作用的研究进展 [J]. *北华大学学报: 自然科学版*, 2012, 13(2): 186-189.
- [28] Wang C, Chen X, Ding X, *et al.* Exendin-4 promotes beta cell proliferation via PI3k/Akt signalling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(6): 2223-2232.
- [29] Blaabjerg L, Christensen G L, Matsumoto M, *et al.* CRFR1 activation protects against cytokine-induced β -cell death [J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 53(3): 417-427.
- [30] 韩孟冉, 敖娜, 王鹤, 等. 单核细胞/高密度脂蛋白比值 with 2 型糖尿病患者下肢动脉粥样硬化性疾病的相关性分析 [J]. *中国全科医学*, 2021, 24(6): 663-668.
- [31] 李亚, 张丹. 地奥司明对糖尿病足的治疗效果分析 [J]. *双足与保健*, 2018, 27(18): 71-72.
- [32] Urios P, Kassab I, Grigorova-Borsos A M, *et al.* A flavonoid fraction purified from *Rutaceae aurantiae* (Daflon(R)) inhibiting AGE formation, reduces urinary albumin clearance and corrects hypoalbuminemia in normotensive and hypertensive diabetic rats [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 105(3): 373-381.
- [33] 刘晓霞. 地奥司明激活 JAK2/STAT3 信号通路减轻小鼠脑缺血再灌注损伤的实验研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- [34] 邹浩生, 虞林湘. 地奥司明治疗糖尿病微血管并发症展望性研讨 [J]. *生物加工过程*, 2016, 14(5): 70-73.
- [35] Verotta L, Panzella L, Antenucci S, *et al.* Fermented pomegranate wastes as sustainable source of ellagic acid: Antioxidant properties, anti-inflammatory action, and controlled release under simulated digestion conditions [J]. *Food Chem*, 2018, 246: 129-136.
- [36] 古丽海夏·哈勒玛合拜, 田亚丽, 巴合提别克·托合塔尔拜克, 等. 鞣花酸对糖尿病小鼠胰腺炎的改善作用 [J]. *中成药*, 2020, 42(3): 744-747.
- [37] 周亚男, 李琰, 李猛, 等. 木犀草素对糖尿病大鼠视网膜病变氧化应激通路的影响 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(74): 113-114.
- [38] 徐畅, 刘意隆, 高志伟, 等. 杨梅素及其苷类药理活性研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(15): 3575-3583.
- [39] 王璐, 周云英. 杨梅素抗感染、抗炎及抗氧化活性研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 778-784.
- [40] Khan H, Ullah H, Aschner M, *et al.* Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease [J]. *Biomolecules*, 2019, 10(1): 59.
- [41] Demkovich A. Effects of flavonol quercetin on activity of lipid peroxide oxidation in experimental bacterial-immune periodontitis [J]. *Interv Med Appl Sci*, 2019, 11(1): 55-59.
- [42] Feng K, Chen Z, Peng L, *et al.* Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18192-18205.
- [43] 李文雯, 钟大鹏, 张卫, 等. 槲皮素对糖尿病大鼠胰岛 β 细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. *广西医科大学学报*, 2021, 38(2): 298-303.

[责任编辑 高源]