

基于网络药理学和分子对接探讨糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的作用机制

杨锐锋¹, 仝智玮¹, 刘聪毅¹, 王宁¹, 黄泳欣¹, 李雯婧¹, 吴丽丽², 秦灵灵³, 刘铜华^{2*}

1. 北京中医药大学 中医学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学 教育部中医养生学重点实验室, 北京 100029

3. 北京中医药大学 科技处, 北京 100029

摘要: **目的** 通过网络药理学和分子对接的方法, 探究糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变 (DPN) 的机制。 **方法** 利用检索中药系统药理学数据库及分析平台 (TCMSP) 对筛选糖脉康颗粒的组方药物的化学活性物质, 药物靶标采用 Swiss Target Prediction 平台进行预测, 并搜索 Genecards 数据库、OMIM 数据库、TTD 数据库和 DisGeNET 数据库预测 DPN 相关靶点。对药物与疾病的靶标基因取交集后采用 Cytoscape 软件构建活性成分-靶点网络图, 并导入 String 数据库构建 PPI 网络, 进行拓扑分析寻找核心基因。采用 R 软件进行基因本体 (GO) 注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析。 **结果** 糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的关键化学成分为巴马汀、广玉兰内酯和 11,14,17-三烯酸甲酯等; 药物-疾病共同靶点共 331 个, 关键蛋白包括细胞肿瘤抗原 p53、连环蛋白 β -1 (CTNNB1)、热休克蛋白 90- α (HSP90AA1) 等。GO 富集分析显示, 生物过程主要包括细胞对化学应激的反应、对营养素水平的反应和肽基酪氨酸磷酸化等, 细胞组成主要包括膜筏膜微域和膜区等, 分子功能主要包括蛋白酪氨酸激酶活性、细胞表面受体蛋白酪氨酸激酶活性和细胞表面受体蛋白激酶活性等。KEGG 富集分析所涉及的通路有糖尿病并发症中的高糖基化终产物-高糖基化终产物受体信号通路、脂质和动脉粥样硬化、前列腺癌、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂耐药性和癌症的中枢碳代谢等。分子对接结果显示, 糖脉康颗粒中的 7 个关键活性成分与 5 个核心靶点蛋白的结合能均 ≤ -5.0 kcal/mol, 说明成分和靶点蛋白结合性可能较好。 **结论** 利用网络药理学和分子对接揭示了糖脉康颗粒通过多种途径, 多种信号通路作用于多种靶点发挥药效, 为进一步阐释糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的作用机制提供了依据。

关键词: 糖脉康颗粒; 糖尿病周围神经病变; 网络药理学; 分子对接; 巴马汀; 广玉兰内酯; 11,14,17-三烯酸甲酯

中图分类号: R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)04-0876-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.04.009

Mechanism of Tangmaikang Granules in treatment of diabetes peripheral neuropathy based on network pharmacology and molecular docking

YANG Ruifeng¹, QI Zhiwei¹, LIU Congyi¹, WANG Ning¹, HUANG Yongxin¹, LI Wenjing¹, WU Lili², QIN Lingling³, LIU Tonghua²

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Health Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Science and Technology Division, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Tangmaikang Granules in treatment of diabetes peripheral neuropathy based on network pharmacology and molecular docking. **Methods** The Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) was searched to screen the chemical active ingredients in the Tangmaikang Granules. The drug targets were predicted by the SwissTargetPrediction Platform. Genecards Database, OMIM database, TTD database, and DisGeNET database were searched to predict DPN-related targets. After crossing the target genes of drugs and diseases, Cytoscape software was used to construct the drug-ingredient-target-disease network, and the PPI network plot was constructed by importing the String database. Gene Ontology (GO) annotation and

收稿日期: 2023-11-23

基金项目: 中医药防治糖尿病国际联合研究中心基金项目 (2015B01022); 兵团财政科技计划项目 (2020AA005)

作者简介: 杨锐锋, 男, 硕士研究生, 研究方向为中医康复学。E-mail: yangruifeng43@163.com

*通信作者: 刘铜华, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治内分泌代谢疾病的临床与实验研究。E-mail: thliu@vip.163.com

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signal pathway enrichment were conducted by R software. **Results** The key chemical ingredients in Tangmaikang Granules for DPN are palmatine, magnograndiolide, and icosan-11,14,17-trienoic acid methyl ester, etc., there are 331 common targets for drug-disease, the key proteins include cellular tumor antigen p53 (TP53), catenin beta-1 (CTNNB1), heat shock protein HSP 90- α (HSP90AA1). GO enrichment analysis showed that biological process included cellular response to chemical stress, response to nutrient levels, and peptidyl-tyrosine phosphorylation. Cellular component included membrane raft, membrane microdomain, and membrane region. Molecular function included protein tyrosine kinase activity, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity, and transmembrane receptor protein kinase activity. The pathways involved in KEGG enrichment analysis are the AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, lipid and atherosclerosis, prostate cancer, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance, and central carbon metabolism in cancer, etc. The results of molecular docking showed that the binding energies of the seven key active components with the five core target proteins in Tangmaikang Granules were mostly ≤ -5.0 kcal/mol, indicating that the components may possess good binding ability with the target proteins. **Conclusion** Network pharmacology and molecular docking have revealed that Tangmaikang Granules exerts its pharmacodynamic effect through multiple pathways and multiple signal pathways acting on multiple targets, it provides a basis for further explaining the mechanism of Tangmaikang Granule in the treatment of DPN.

Key words: Tangmaikang Granules; diabetic peripheral neuropathy; network pharmacology; molecular docking; palmatine; magnograndiolide; icosan-11,14,17-trienoic acid methyl ester

糖尿病周围神经病变 (DPN) 是糖尿病常见的慢性并发症, 是指排除其他病因的情况下, 患者出现肢体麻木、疼痛或其他异常感觉等周围神经功能障碍相关症状的疾病^[1]。糖尿病周围神经病变诊断主要依靠糖尿病病史筛查、临床症状和体征及神经电生理检查, 患者通常会出现四肢对称性疼痛, 尤其是远端疼痛, 最典型表现为手套样、袜套样的感觉^[2-3]。糖尿病周围神经病变的发病率较高, 据研究显示糖尿病患者患病 5、10、20 年后, 发病率分别达到 30%、60%、90%^[4]。糖尿病周围神经病变的发病机制目前尚不完全明确, 可能与糖脂代谢紊乱、氧化应激、炎症反应亢进、神经营养因子缺乏、凋亡与自噬等相关^[5], 病理改变主要表现为神经脱髓鞘或轴索变性^[6]。目前临床治疗多使用营养神经、抗氧化应激、醛糖还原酶抑制剂、改善微循环药物等疗法, 虽然取得了一定的疗效, 但存在不良反应较明显且易复发等缺点^[7-8]。糖尿病周围神经病变是导致下肢截肢和神经性疼痛残疾的主要原因, 对患者的生活质量造成严重影响, 仍需新的干预方法^[9]。

根据糖尿病周围神经病变的症状和体征, 中医学理论将其归属于“消渴病痹证”。糖脉康颗粒是治疗糖尿病并发症常用中成药, 由葛根、丹参、赤芍、黄芪、生地黄、熟地黄、牛膝、桑叶、黄连、黄精、淫羊藿 11 味药组成, 具有补气活血、化瘀通痹的功效。糖脉康颗粒在《中医临床诊疗指南 (2016 年版)》中被推荐为治疗糖尿病周围神经病变气虚血瘀证药物 (弱推荐, IIa 级)^[10], 并且有系统评价与 Meta 分析表明, 糖脉康颗粒能提高临床有效率、改善周

围神经症状、提高神经传导速度和改善血糖水平, 且不增加不良反应发生率, 有较好的应用前景^[11]。

网络药理学是一个能预测药物治疗疾病作用机制的方法, 通过已研究出的大量生物学信息数据库, 构建“药物-靶点-疾病”的生物网络, 分析三者之间可能的关联。现已成为中药作用机制研究的重要方法, 能提供新的药物研发策略, 推动中药复方的深入研究^[12-13]。糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变应用前景较好, 但其药理学作用仍有待研究。本研究拟通过网络药理学探究糖脉康颗粒活性化合物及治疗糖尿病周围神经病变的分子机制和特征靶点, 为后续动物和细胞水平实验进一步阐释药理学作用提供预测参考分析, 以期临床合理用药决策提供依据。

1 资料与方法

1.1 化学成分筛选

在中药系统药理学数据库及分析平台 (TCMSP) 数据库 (<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 检索糖脉康颗粒组成药物葛根、丹参、赤芍、黄芪、熟地黄、牛膝、桑叶、黄连、黄精、淫羊藿的有效化学成分, 并进行药动学筛选, 筛选标准为口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 药物相似性 (DL) ≥ 0.18 , 采用 PubMed、CNKI 数据库检索相关文献, 对 TCMSP 数据库未收录的药物生地黄的活性成分和其他药物未收录或未通过药动学筛选但有相关文献报道的成分进行收集。

1.2 共同靶点预测

在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索预测活性成分获取 Canonical SMILES

式,然后在 SwissTargetPrediction 平台进行靶标预测,剔除无对应靶标信息或预测靶标 Probability < 0.1。以“Diabetic peripheral neuropathy”为检索词检索 Genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>)、TTD 数据库(<https://db.idrblab.net/ttd>)和 DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)的糖尿病周围神经病变疾病相关靶点,Genecards 数据库的靶点采用 Score 中位数值限制。采用微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn>)对靶点信息进行映射,得到药物-疾病共同靶点,并绘制韦恩图。

1.3 药物-活性成分-靶点-疾病的网络可视化

采用 Cytoscape 软件(v3.7.2)对关键化学成分与疾病的共同靶点的相互关联信息进行图像可视化处理,对节点的度值(degree)、接近中心性和中介中心性进行拓扑参数分析,构建药物-活性成分-靶点-疾病网络图。节点表示活性成分和靶点,边表示节点之间相互作用的关系。degree 表示一个节点和其他节点相连的路线的条数,与其他节点关联连接越多,代表该节点重要性越高。

1.4 PPI 网络构建及核心基因筛选

将药物和疾病交集靶点导入 String 数据库(<https://string-db.org/>),生物体种类选择“Homo sapiens”,设置隐藏网络中的离散点,调整最低要求交互得分参数,导出 PPI 网络图。将蛋白质相互作用关系数据导入 Cytoscape 软件,对靶点的 degree 进行拓扑参数分析,筛选出 PPI 网络中的关键基因。

1.5 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析

采用 R 软件(v4.2.1)及 Bioconductor 程序包对药物-疾病共同靶点进行 GO 功能生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)和 KEGG 信号通路富集分析,设定阈值 $P < 0.05$ 为显著相关,物种为“Homo sapiens”,并绘制相应柱状图和气泡图。

1.6 分子对接

在 RSCB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中获取 PPI 网络中按 degree 值排序的前 5 个核心靶点蛋白结构,设置来源生物为 Homo sapiens,解构方法为 X-RAY DIFFRACTION,优先选择分辨率高[至少 $< 3 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$)]、有三维结构、有蛋白与配体的复合物。下载蛋白质 3D 结构 pdb 格式文件,导入 PyMOL 软件(v2.5)进行去除水分子、分离原始配体,在 AutoDock Vina 软件(v1.1.2)加氢、计

算电荷,保存为 pdbqt 格式。在 TCMSP 和 PubChem 数据库获取关键活性成分的 mol2 格式文件,加氢、计算电荷、设置可旋转键后保存为 pdbqt 格式。设定原配体位置为活性口袋中心,对接盒子大小设置 $40 \times 40 \times 40$ (相邻格点间距为 $0.375 \text{ \AA}$),将活性成分和关键靶点蛋白在 AutoDock Vina 软件(v1.1.2)中进行分子对接^[14],以分子对接结合能评估两者的结合关系。分子对接过程中其结合能的绝对值越高,代表受体与配体的亲和力越好,本研究选取结合能 $\leq -5.0 \text{ kcal/mol}$ ($1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$)作为关键活性成分与核心靶点有效结合的筛选依据^[15]。

2 结果

2.1 糖脉康颗粒活性化学成分

检索 TCMSP 数据库糖脉康颗粒包含药物,其中 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 的活性成分葛根含有 4 个,丹参含有 65 个,赤芍含有 29 个,黄芪含有 20 个,熟地黄含有 2 个,牛膝含有 20 个,桑叶含有 29 个,黄连含有 14 个,黄精含有 12 个,淫羊藿含有 23 个。经检索文献补充葛根 1 个成分葛根素^[16],丹参 1 个成分丹酚酸 B^[17-18],黄芪 1 个成分黄芪甲苷 IV^[19],生地黄 5 个成分梓醇、毛蕊花糖苷、水苏糖、地黄苷 D、密力特苷^[20-22]。共同活性成分和文献检索补充成分情况见表 1。

2.2 糖脉康颗粒和糖尿病周围神经病变共同靶点

搜索 PubChem 数据库获取活性成分的 Canonical SMILES 式,在 Swiss Target Prediction 平台进行靶标预测,剔除无对应靶标或靶标 Probability < 0.1。其中 β -谷甾醇、谷甾醇和 γ -谷甾醇,赤芍中的芍药苷和 paeoniflorin 检索得到的结构一致,只保留其中一个成分,最终共剩下 137 个活性成分,经去重后共得糖脉康颗粒作用靶点 992 个。糖尿病周围神经病变疾病相关靶点检索 GeneCards 数据库经限制后共得到 1 701 个,OMIM 数据库共得到 501 个,DisGeNET 数据库共得到 129 个,TTD 数据库共得到 2 个,合并去重共得糖尿病周围神经病变相关靶点 2 115 个。在微生信平台对药物疾病靶点取交集绘制韦恩图,共获得糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的 133 个可能活性成分的 331 个潜在作用靶点,见图 1。

2.3 药物-活性成分-靶点-疾病网络可视化

采用 Cytoscape 软件构建药物-活性成分-靶点-疾病网络,网络共有 477 个节点和 3 326 条边。进行网络参数拓扑分析,degree 平均值为 13.945,

表 1 糖脉康颗粒的部分活性成分
Table 1 Part of active ingredients of Tangmaikang Granules

MOL ID	PubChem CID	成分名称	英文名	所属中药	OB/%	DL	靶点个数
MOL000392	5280378	芒柄花黄素	formononetin	葛根、黄芪	69.67	0.21	56
MOL002959	5319422	3'-甲氧基大豆苷元	3'-methoxydaidzein	葛根、黄精	48.57	0.24	31
MOL000006	19009	木犀草素	luteolin	丹参、淫羊藿	64.60	0.65	104
MOL004355	5281331	菠菜甾醇	spinasterol	赤芍、牛膝	42.98	0.76	58
MOL000433	6037	叶酸	folic acid	黄芪、桑叶	68.96	0.71	16
MOL003847	455251	红厚壳内酯 E	inophyllum E	牛膝、桑叶	38.81	0.85	109
MOL002897	160876	表小檗碱	epiberberine	牛膝、黄连	43.09	0.78	11
MOL001454	2353	小檗碱	berberine	牛膝、黄连	36.86	0.78	11
MOL001458	72322	黄连碱	coptisine	牛膝、黄连	30.67	0.86	24
MOL000785	19009	巴马汀	palmatine	牛膝、黄连	64.60	0.65	102
MOL000622	5319198	广玉兰内酯	magnograndiolide	黄连、淫羊藿	63.71	0.19	51
MOL001792	114829	甘草素	liquiritigenin	黄精、淫羊藿	32.76	0.18	102
MOL002776	64982	黄芩苷	baicalin	丹参、赤芍、牛膝	40.12	0.75	15
MOL001771	457801	γ-谷甾醇	γ-clionasterol	丹参、桑叶、淫羊藿	36.91	0.75	44
MOL002714	5281605	黄芩素	baicalein	赤芍、牛膝、黄精	33.52	0.21	104
MOL000449	5280794	豆甾醇	stigmasterol	赤芍、熟地黄、牛膝、 桑叶	43.83	0.76	41
MOL000359	12303645	谷甾醇	sitosterol	赤芍、熟地黄、黄精、 淫羊藿	36.91	0.75	44
MOL000422	5280863	山柰酚	kaempferol	黄芪、牛膝、桑叶、 淫羊藿	41.88	0.24	104
MOL000358	222284	β-谷甾醇	beta-sitosterol	葛根、赤芍、牛膝、 桑叶、黄精	36.91	0.75	44
MOL000098	5280343	槲皮素	quercetin	黄芪、牛膝、桑叶、 黄连、淫羊藿	46.43	0.28	104
MOL012297	5281807	葛根素	puerarin	葛根	24.03	0.69	4
MOL007074	51066555	丹酚酸 B	salvianolic acid B	丹参	3.01	0.41	9
MOL000407	13943297	黄芪甲苷 IV	astragaloside IV	黄芪	17.74	0.15	0
—	91520	梓醇	catalpol	生地黄	—	—	0
—	5281800	毛蕊花糖苷	acteoside	生地黄	—	—	3
—	439531	水苏糖	stachyose	生地黄	—	—	1
—	92044472	地黄苷 D	rehmannioside D	生地黄	—	—	0
—	11968737	密力特苷	melittoside	生地黄	—	—	12

接近中心性平均值为 0.415，中介中心性平均值为 0.003，保留 degree 大于平均值以上的节点，设置节点的大小与其 degree 呈正比。生地黄成分作用靶点按 degree 平均值筛选时被剔除，葛根、熟地黄经筛选后剩下成分与其他药物相同故未单独列出。8 个菱形节点表示糖脉康颗粒组成药物，72 个 V 型节点代表靶点，中间 12 个圆形节点表示药物共同包

含的成分，黄精包含 5 个独有活性成分，赤芍包含 4 个独有活性成分，牛膝包含 3 个独有活性成分，黄芪包含 10 个独有活性成分，黄连包含 4 个独有活性成分，丹参包含 24 个独有活性成分，桑叶包含 10 个独有活性成分，淫羊藿包含 6 个独有活性成分。乙酰胆碱酯酶（ACHE，degree=57）在靶点中 degree 最高，提示可能为关键作用靶点。degree 排

图 1 糖脉康颗粒和糖尿病周围神经病变共同靶点韦恩图
Fig. 1 Tangmaikang Granules and DPN common target

Venn diagram

名前 3 位的活性成分为来自牛膝和黄连的巴马汀 (degree=84), 来自黄连和淫羊藿的广玉兰内酯 (degree=58), 来自桑叶的 11,14,17-三烯酸甲酯 (degree=52), 这些成分可能在糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变中发挥关键作用, 见图 2。

2.4 PPI 网络及关键基因

将 331 个药物和疾病共同靶点导入 String 数据库以获取蛋白相互作用关系, 隐藏游离节点并设置最低要求交互得分设置为 0.990 后导出关系网络图。将蛋白相互作用关系 tsv 格式数据导入 Cytoscape 软件并进行拓扑参数分析, 得到的网络图含有 158 个节点, 304 条边, degree 平均值为 3.85, 中位数为 2, 其中节点表示靶标蛋白, 每条边表示蛋白之间的作用关系。degree 排名前 5 位的靶点分别为细胞肿瘤抗原 p53 (TP53, degree=27)、连环蛋白 β -1 (CTNNB1, degree=25)、热休克蛋白 90- α (HSP90AA1, degree=25)、磷酸肌醇-3-激酶调节亚基 α (PIK3R1, degree=19) 信号转导和转录激活因子 3 (STAT3, degree=19), 表明这些靶点可能在糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变中具有重要作用, 见图 3。

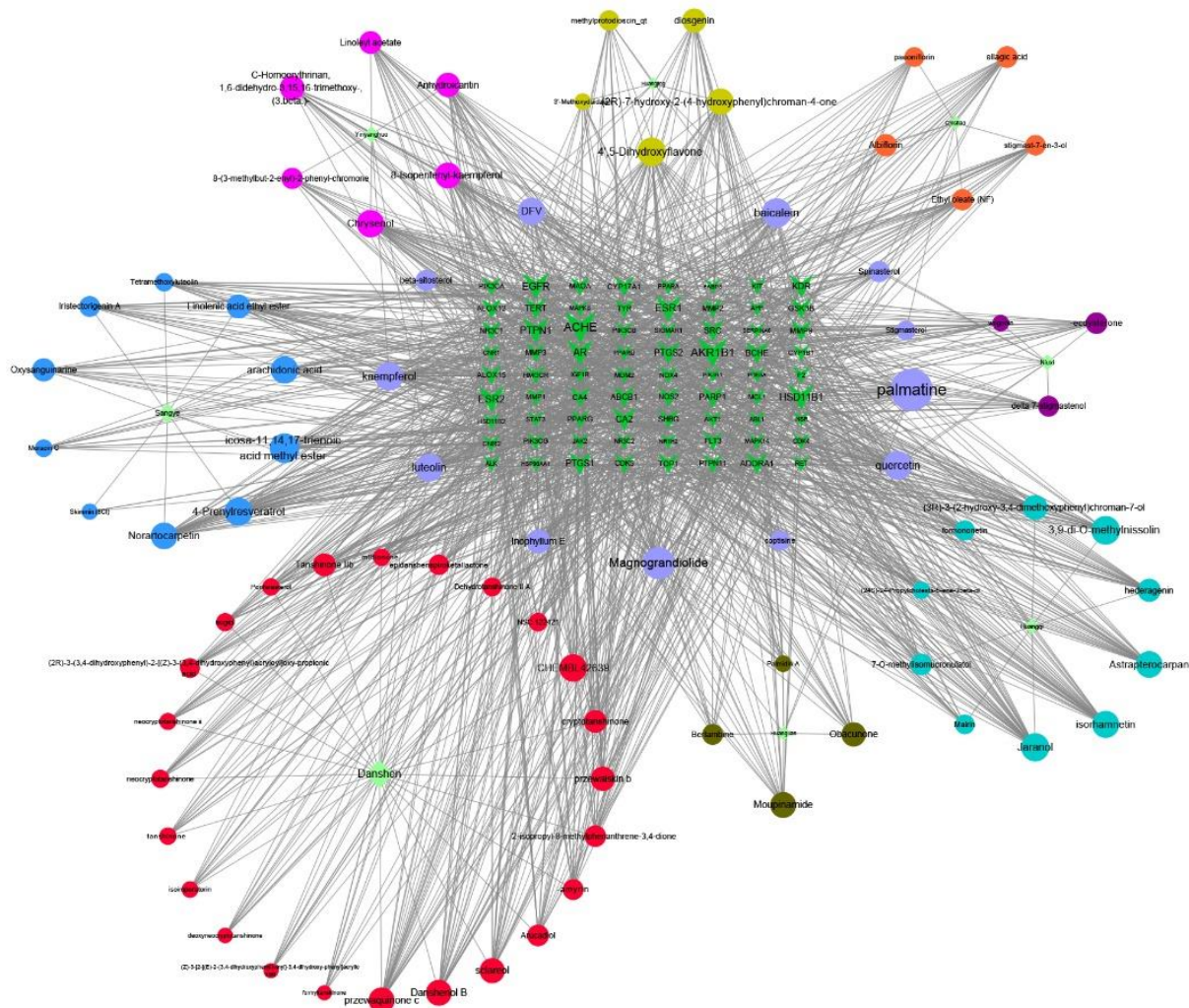


图2 药物-活性成分-靶点-疾病网络图

Fig. 2 Network diagram of drug-active ingredient-target-disease

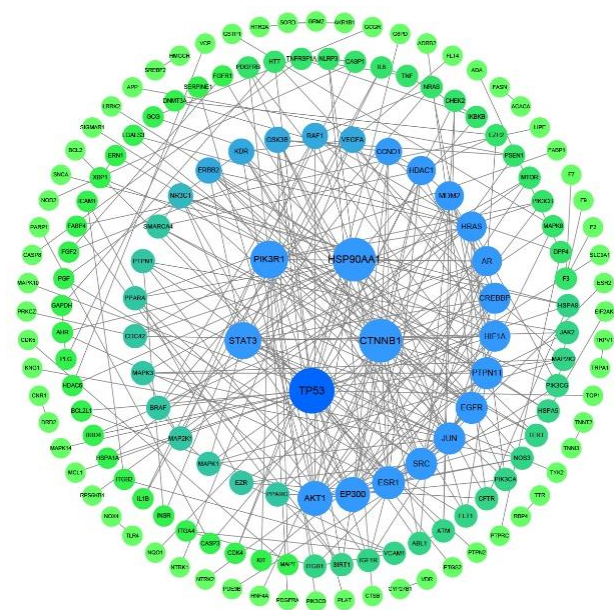


图 3 PPI 网络关键基因筛选图

Fig. 3 PPI network key gene screening map

2.5 GO 和 KEGG 富集分析

GO 富集柱状图柱状长度表示富集到此通路的基因数目, 结果显示 BP 显著相关 3 396 条, 包括细胞对化学应激的反应 (cellular response to chemical stress)、对营养素水平的反应 (response to nutrient levels) 和肽基酪氨酸磷酸化 (peptidyl-tyrosine phosphorylation) 等; CC 显著相关 172 条, 包括膜筏 (membrane raft)、膜微域 (membrane microdomain) 和膜区 (membrane region) 等; MF 显著相关 318 条, 包含蛋白酪氨酸激酶活性 (protein tyrosine kinase activity)、细胞表面受体蛋白酪氨酸激酶活性 (transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity) 和细胞表面受体蛋白激酶活性 (transmembrane receptor protein kinase activity) 等, 见图 4。KEGG 富集共获得 199 条信号通路, 气泡大小表示富集到此通路的基因数目, 取富集程度 P 值前 10 位的通路。糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的关键靶点蛋白主要富集的通路包括糖尿病并发症中的高糖基化终产物-高糖基化终产物受体信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、前列腺癌 (prostate cancer)、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂耐药性 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance) 和癌症的中枢碳代谢 (central carbon metabolism in cancer) 等, 见图 5。

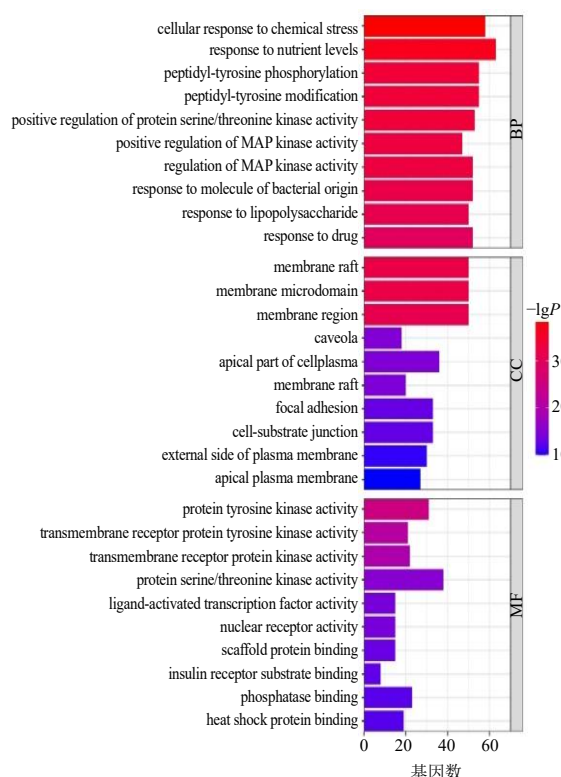


图 4 GO 功能富集分析柱状图

Fig. 4 GO functional enrichment analysis bar graph

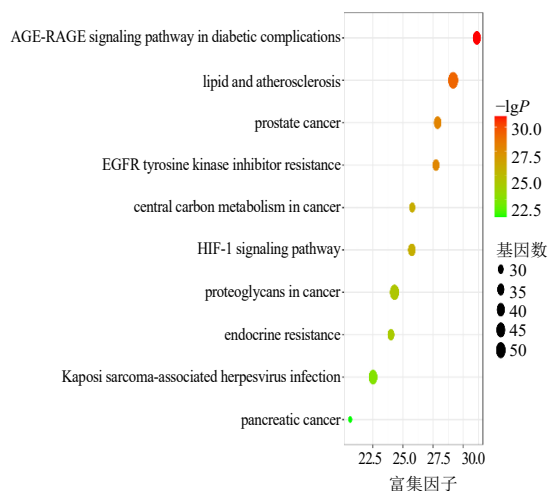


图 5 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis bubble graph

2.6 分子对接

选取关键活性成分巴马汀、广玉兰内酯、11,14,17-三烯酸甲酯和经实验验证的葛根素、丹酚酸 B、黄芪甲苷 IV、梓醇, 分别和 PPI 网络中度值前 5 位的核心靶点 TP53、CTNNB1、HSP90AA1、PIK3R1、STAT3 通过 AutoDock Vina 软件进行分子对接模拟计算, 分子对接结果见图 6。活性成分与

核心靶点分子对接结果显示糖脉康颗粒中关键活性成分与核心靶点的结合能 ≤ -5.0 kcal/mol, 表明关键活性成分与核心靶点可能具有较好的结合活性。选取各靶点蛋白结合能较低的对接结果通过 PyMOL 软件进行可视化, TP53 的 VAL-147 与葛根

素形成氢键, CTNNB1 的 ASN-206、THR-205 与梓醇形成氢键, HSP90AA1 的 LYS-112、SER-52、ASP-93、ASN-51 与丹酚酸 B 形成氢键, PIK3R1 的 TYR-813 与巴马汀形成氢键, STAT3 的 SER-636、GLU-638 与黄芪甲苷 IV 形成氢键, 见图 7。

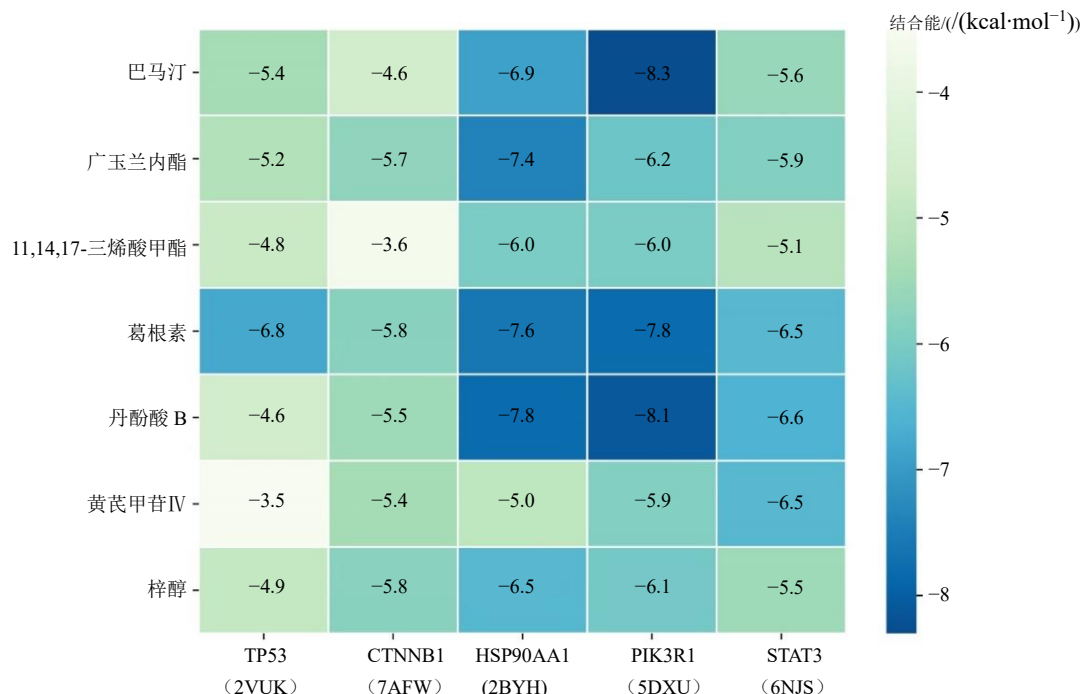


图 6 关键活性成分与核心靶点分子对接结合能

Fig. 6 Binding energy of molecular docking of key active components and core targets

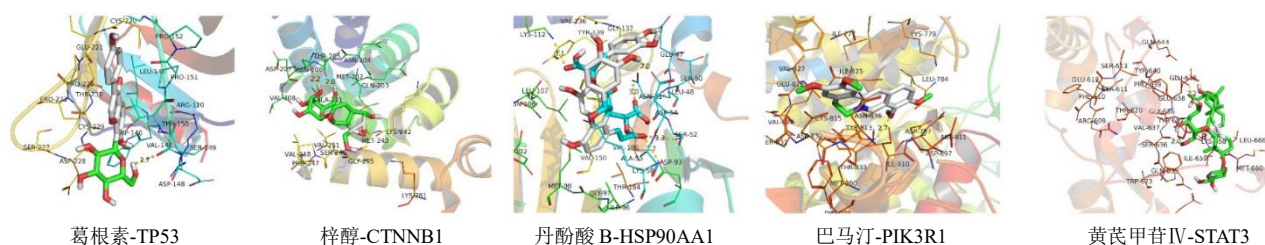


图 7 活性成分与核心靶点分子对接结果

Fig. 7 Molecular docking results of key active components and core targets

3 讨论

糖尿病周围神经病变中医学本无具体病名, 因其为糖尿病常见并发症, 又以疼痛、麻木或异常感觉为主要症状, 2010 年国家中医药管理局颁布的《22 个专业 95 个病种中医诊疗方案》中将本病中医病名正式确定为“消渴病痹证”^[23]。糖尿病周围神经病变病因病机复杂, 多本虚标实、虚实夹杂。以 771 名糖尿病周围神经病变患者为样本的数据挖掘文献显示, 糖尿病周围神经病变本虚以气虚、阴虚为主, 标实以血瘀为主, 常见证候依次为气阴两虚

血瘀、气阴两虚、湿热淤阻、湿浊淤阻等, 气虚和血瘀在糖尿病周围神经病变发生发展过程扮演重要角色, 补气活血为糖尿病周围神经病变最基本的治疗方法^[24]。数据库医案文献分析也证实血瘀、气虚、阴虚最为常见证素, 气阴两虚、瘀阻经络为主要证型^[25]。糖脉康颗粒组方来源于《丹溪心法·消渴方》、《景岳全书·玉女煎》和《金匱要略·肾气丸》, 广泛应用于临床治疗糖尿病及其并发症。糖脉康颗粒含药血清自由基清除实验发现, 该药具有体外抗氧化作用^[26]。系统评价表明糖脉康颗粒在提高神经传导

速度且安全性较好^[27-28], 而目前尚未见糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的机制研究, 因此本研究通过网络药理学系统分析糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的潜在重要靶点和作用通路。

网络药理分析显示糖脉康颗粒中所含的 133 个可能活性成分中巴马汀、广玉兰内酯、11,14,17-三烯酸甲酯在与靶点网络中具有较高的中心性。巴马汀为黄连、牛膝含有的生物碱, 可以降低 db/db 小鼠的空腹血糖和血脂含量并减轻氧化应激反应^[29]。链脲佐菌素糖尿病模型大鼠试验发现巴马汀能抑制伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78 和钙网蛋白的表达, 可能激活了抗氧化蛋白, 保护细胞免受活性氧类和内质网应激^[30]。广玉兰内酯存在于黄连和淫羊藿, 计算机虚拟分子对接结果与 α -葡萄糖苷酶具有较强的结合活性, 有通过抑制该酶活性延缓肠道碳水化合物吸收, 从而调整血糖水平、治疗糖尿病的潜力^[31]。11,14,17-三烯酸甲酯存在于桑叶, 目前相关文献较少, 后续可开展相关研究以验证其有效性。葛根素为葛根提取单体, 目前已广泛应用于糖尿病并发症的临床治疗。体外实验表明, 丹酚酸 B 可下调可能通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 p38 激活的炎症和细胞凋亡来治疗糖尿病周围神经病变^[32]。黄芪甲苷 IV 通过上调 miR-155 表达来抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活化, 增强细胞自噬以减轻由施旺细胞凋亡引起的糖尿病周围神经病变的髓鞘损伤^[18]。梓醇是从地黄提取的抗氧化剂, 已被证明具有抗氧化、抗炎、抗细胞凋亡和抗纤维化的特性, 从而对糖尿病并发症产生有益的作用^[33]。

筛选出 331 个潜在作用靶点的 degree 最高为 ACHE, PPI 网络中 degree 排名前 3 位的靶点蛋白为 TP53、CTNNB1、HSP90AA1。ACHE 通过快速水解释放到突触裂缝的乙酰胆碱来终止信号转导神经肌肉接点, 在神经元凋亡中有重要作用。TP53 根据生理环境和细胞类型诱导生长停滞或凋亡, 抑制肿瘤的形成。TP53 基因多态性与糖尿病周围神经病变发病有关, 并且 2 型糖尿病患者血清 TP53 水平显著升高可能反映慢性高血糖所引起的新陈代谢及氧化应激^[34-35]。CTNNB1 是 Wnt 信号通路的主要下游成分, 在中医辨证为肾虚证糖尿病组中荧光定量 PCR 检测 CTNNB1 的表达水平与非肾虚证糖尿病组相比较有表达上调的趋势, 但差异不显著^[36]。HSP90AA1 可促进特定靶蛋白的成熟、结构维持和适当调节, 参与细胞周期控制和信号转导。血糖波

动近年来被认为是糖尿病并发症和治疗靶点的促进因素, 有研究运用基因优先级分析发现了 HSP90AA1 可能是与血糖波动相关的新的候选基因^[37]。

GO 分析显示, 糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的靶基因涉及细胞对化学应激的反应、对营养素水平的反应和肽基酪氨酸磷酸化等生物过程, 膜筏、膜微域和膜区等细胞组成, 蛋白酪氨酸激酶活性、细胞表面受体蛋白酪氨酸激酶活性、细胞表面受体蛋白激酶活性等分子功能。KEGG 富集分析所涉及的通路有糖尿病并发症中的高糖基化终产物-高糖基化终产物受体信号通路、脂质和动脉粥样硬化和前列腺癌等。AGEs 来源主要为外源性的食物和烟草及内源性体内蛋白质的氨基部分与还原糖的羰基的代谢产物, RAGE 主要负责与配体结合后的信号转导、诱发相关基因上调^[38]。AGE-RAGE 信号通路可被血液中过高的葡萄糖与循环中大分子物质激活, 使 AGEs 在细胞内外广泛积聚, 促进细胞凋亡和基底膜增厚, 导致血管和神经病变的发生^[39]。显著富集的信号通路中也存在着部分调控其他疾病的通路, 例如脂质和动脉粥样硬化、前列腺癌和表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂耐药性等信号通路。人体是一个有机整体, 机体代谢相互关联, 糖脉康颗粒可能通过作用于多种信号通路发挥治疗糖尿病周围神经病变的作用。分子对接结果显示, 糖脉康颗粒中 4 个关键活性成分与 3 个核心靶点的结合能均 ≤ -5.0 kcal/mol, 说明网络药理分析预测的成分可能与靶点结合较好。

综上所述, 糖脉康颗粒可通过巴马汀、广玉兰内酯、11,14,17-三烯酸甲酯等多种有效成分, 作用于 TP53、CTNNB1、HSP90AA1 等位点起到抗氧化应激等作用, 进而治疗糖尿病周围神经病变的作用。但是, 网络药理学分析选择不同数据库和方法学结果可能有差异, 并且存在中药材的用药部位、有效成分筛选标准等问题导致预测成分多为槲皮素等黄酮类化合物的现象。本次分析中葛根素等成分经实验验证但均未通过药动学筛选并且预测靶点数目较少, 这使得网络药理学预测分析结果可信度应谨慎看待^[40]。本研究仅基于网络药理学和分子对接初步探究糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的可能作用靶点及相关通路, 但其具体机制仍需深入探讨, 后续仍需在细胞和动物水平更进一步阐明验证糖脉康颗粒在治疗糖尿病周围神经病变方面的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- [2] Jeyam A, McGurnaghan S J, Blackbourn L A K, *et al.* Diabetic neuropathy is a substantial burden in people with type 1 diabetes and is strongly associated with socioeconomic disadvantage: A population-representative study from Scotland [J]. *Diabetes Care*, 2020, 43(4): 734-742.
- [3] Yang K, Wang Y, Li Y W, *et al.* Progress in the treatment of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 148: 112717.
- [4] Deli G, Bosnyak E, Pusch G, *et al.* Diabetic neuropathies: Diagnosis and management [J]. *Neuroendocrinology*, 2013, 98(4): 267-280.
- [5] 郭钊霞, 李露冰, 方语嫣, 等. 糖尿病周围神经病变机制及 α -硫辛酸治疗作用的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(8): 2029-2036.
- [6] 姚思成, 孙宇, 张锡玮, 等. 中医药治疗糖尿病周围神经病变相关信号通路的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(9): 261-267.
- [7] 聂竹青. 糖尿病周围神经病变中西医药物治疗研究进展 [J]. 实用中西医结合临床, 2022, 22(22): 125-128.
- [8] Khdour M R. Treatment of diabetic peripheral neuropathy: A review [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(7): 863-872.
- [9] Selvarajah D, Kar D, Khunti K, *et al.* Diabetic peripheral neuropathy: Advances in diagnosis and strategies for screening and early intervention [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(12): 938-948.
- [10] 方朝晖, 吴以岭, 赵进东. 糖尿病周围神经病变中医临床诊疗指南(2016 年版) [J]. 中医杂志, 2017, 58(7): 625-630.
- [11] 谢文莹, 张晨, 辛竞妍, 等. 糖脉康颗粒治疗糖尿病周围神经病变有效性及安全性的系统评价与 Meta 分析 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(2): 542-554.
- [12] Luo T T, Lu Y, Yan S K, *et al.* Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: Methodology, application and prospective [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(1): 72-80.
- [13] 赵韦欣, 王晴, 王梦齐, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨鸦胆子治疗结直肠癌的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1850-1859.
- [14] 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.
- [15] 徐森楠, 庄莉, 翟园园, 等. 基于网络药理学研究二至丸防治骨质疏松症的物质基础与作用机制 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(22): 1913-1920.
- [16] 胡锐, 雷洁, 刘继平. 葛根素注射液联用甲钴胺治疗糖尿病周围神经病变 Meta 分析 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(16): 4445-4447.
- [17] 田霞. 丹酚酸 B 镁对血管收缩的作用以及抑制激动剂诱导平滑肌细胞内钙升高的药理学机制研究 [D]. 上海: 中国科学院研究生院, 2005.
- [18] Yu Y T, Zhu Z Y, Xie M J, *et al.* Investigation on the Q-Markers of Bushen Huoxue Prescriptions for DR treatment based on chemometric methods and spectrum-effect relationship [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 285: 114800.
- [19] Yin Y D, Qu H, Yang Q N, *et al.* Astragaloside IV alleviates Schwann cell injury in diabetic peripheral neuropathy by regulating microRNA-155-mediated autophagy [J]. *Phytomedicine*, 2021, 92: 153749.
- [20] 朱珏, 朱香梅, 石雨荷, 等. 地黄的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中药材, 2022, 45(5): 1273-1281.
- [21] Lv X, Dai G Y, Lv G H, *et al.* Synergistic interaction of effective parts in *Rehmanniae Radix* and *Cornus officinalis* ameliorates renal injury in C57BL/KsJ-db/db diabetic mice: Involvement of suppression of AGEs/RAGE/SphK1 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 185: 110-119.
- [22] Chen Y P, Chen J, Jiang M, *et al.* Loganin and catalpol exert cooperative ameliorating effects on podocyte apoptosis upon diabetic nephropathy by targeting AGEs-RAGE signaling [J]. *Life Sci*, 2020, 252: 117653.
- [23] 庞国明, 孙扶, 谢卫平, 等. 中医药治疗糖尿病周围神经病变临床研究进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(12): 2339-2342.
- [24] 段力. 2 型糖尿病周围神经病变中医诊治规律及诊疗信息挖掘研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [25] 王帅虎, 戴娜, 陆翔, 等. 基于数据挖掘的糖尿病周围神经病变证素及用药规律研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(12): 4717-4725.
- [26] 赵启鹏, 兰莎, 张艺. 糖脉康颗粒清除 DPPH 自由基的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 41-45.
- [27] 左进红, 肖晶旻, 谢倩文, 等. 6 种常用活血化瘀中成药治疗糖尿病周围神经病变的网状 Meta 分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(7): 867-873.
- [28] 朱章志, 张萌, 谢欣颖, 等. 糖脉康颗粒干预糖尿病周围神经病变疗效及安全性的系统评价 [C]. // 第十五次全国中医糖尿病大会论文集. 2014: 256-266.
- [29] 李端芳, 严军, 张克斌, 等. 巴马汀对糖尿病小鼠主动脉的保护作用及机制研究 [J]. 重庆医科大学学报,

- 2017, 42(11): 1522-1526.
- [30] Okechukwu P N, Ekeuku S O, Chan H K, *et al.* Palmatine inhibits up-regulation of GRP78 and CALR protein in an STZ-induced diabetic rat model [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2021, 22(2): 288-298.
- [31] 周国勤, 周鹏. 基于分子对接预测黄芩-黄连药对抑制 α -葡萄糖苷酶的活性成分 [J]. *现代中药研究与实践*, 2021, 35(4): 41-45.
- [32] Wang Q Q, Li X G, Cao L J, *et al.* Combining network pharmacology with experimental validation to elucidate the mechanism of salvianolic acid B in treating diabetic peripheral neuropathy [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 4997327.
- [33] Spitsina E V, Iakunina N I, Chudakova D A, *et al.* Association of polymorphous markers Pro72Arg and C(-594) CC of TP53 gene with diabetic polyneuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus living in Moscow [J]. *Mol Biol*, 2007, 41(6): 989-993.
- [34] Bhattamisra S K, Koh H M, Lim S Y, *et al.* Molecular and biochemical pathways of catalpol in alleviating diabetes mellitus and its complications [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 323.
- [35] Sliwinska A, Kasznicki J, Kosmalski M, *et al.* Tumour protein 53 is linked with type 2 diabetes mellitus [J]. *Indian J Med Res*, 2017, 146(2): 237-243.
- [36] 秦乐, 秦玉花, 孙玉文, 等. 2型糖尿病肾虚证基因表达谱研究 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(3): 738-740.
- [37] Saik O V, Klimontov V V. Bioinformatic reconstruction and analysis of gene networks related to glucose variability in diabetes and its complications [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8691.
- [38] 王绍欣, 谢云. AGE-RAGE 系统与糖尿病周围神经病变 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2008, 16(6): 379-381.
- [39] Saleh I, Maritska Z, Parisa N, *et al.* Inhibition of receptor for advanced glycation end products as new promising strategy treatment in diabetic retinopathy [J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7(23): 3921-3924.
- [40] 马焱彬, 贾利军, 李玉婷, 等. 网络药理学研究中“槲皮素类现象”与对策的探讨 [J]. *成都大学学报: 自然科学版*, 2021, 40(3): 223-230.

[责任编辑 金玉洁]