

基于网络药理学的黄芪治疗肾病综合症的机制研究

杨 柳^{1,2,3}, 张王宁^{1,3}, 刘月涛^{1,3}, 李爱平^{1,3*}, 秦雪梅^{1,3*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 运用网络药理学的方法探讨黄芪治疗肾病综合征(NS)的分子作用机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库和文献挖掘获取黄芪主要活性成分, 利用 PharmMapper 服务器、GeneCards 和 CoolGeN 数据库预测和筛选黄芪活性成分的作用靶点。采用 String 数据库和 Cytoscape 软件绘制蛋白相互作用网络, 通过 Systems Dock Web Site 对成分与靶点进行分子对接验证。借助 DAVID 数据库对靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路分析, 采用 Cytoscape 软件构建成分-靶点-通路-疾病网络。

结果 筛选得到黄芪 25 个活性成分, 涉及 47 个作用靶点。网络分析结果表明, 靶点主要涉及氧化应激、足细胞凋亡和脂质代谢等生物过程, 通过调节 Ras、Rap1、MAPK、PI3K-Akt 和 AGE-RAGE 等信号通路来发挥治疗 NS 的作用。**结论** 黄芪中黄酮类、皂苷类等活性成分可能是其治疗 NS 的物质基础, 其作用机制涉及抗细胞凋亡、抗氧化应激和调节脂质代谢等。

关键词: 网络药理学; 黄芪; 肾病综合征; 分子机制; 分子对接

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1828-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.010

Mechanistic analysis of *Astragali Radix* in treatment of nephrotic syndrome using network pharmacology

YANG Liu^{1,2,3}, ZHANG Wang-ning^{1,3}, LIU Yue-tao^{1,3}, LI Ai-ping^{1,3}, QIN Xue-mei^{1,3}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of *Astragali Radix* in the treatment of nephrotic syndrome (NS) by the network pharmacology. **Methods** The main active ingredients of *Astragali Radix* were obtained through TCMSP and literature search. PharmMapper, Gene Cards and CoolGeN were used to predict and screen the targets of *Astragali Radix*. The protein interaction network was constructed using the String database and Cytoscape software. The relation between the main active ingredients and targets was validated by Systems Dock Web Site. The GO and KEGG pathways involved in the targets were analyzed by DAVID. The ingredients-targets-pathways-diseases network was constructed by Cytoscape software. **Results** The results showed that 25 active components and 47 targets of *Astragali Radix* were involved. The network results showed that the process of oxidative stress, podocyte apoptosis, lipid metabolism were mainly involved, which played a role in the treatment of nephrotic syndrome by adjusting the Ras, Rap1, MAPK, PI3K-Akt, AGE-RAGE and other signal pathways. **Conclusion** This research method initially revealed that the active ingredients of flavonoids and saponins in *Astragali Radix* are the material basis for the treatment of NS. Its mechanism of action involved anti-oxidative stress, anti-apoptosis and regulation of lipid metabolism.

Key words: network pharmacology; *Astragali Radix*; nephrotic syndrome; molecular mechanism; molecular docking

收稿日期: 2018-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: 多效中药黄芪的定向药效化学成分研究(31570346); 山西省优秀科技创新项目: 黄芪生长年限与化学成分积累规律研究(201605D211030); 山西省中药产业重点科技攻关项目: 道地药材种质资源与规范化生产技术研究(201603D311101); 山西省药材行业标准-恒山黄芪药材与精品饮片商品等级标准研究(2014ZD0401)

作者简介: 杨 柳(1993—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药体内分析。Tel: 15735653961 E-mail: m15735653961@163.com

***通信作者** 李爱平, 女, 博士, 讲师, 主要从事中药质量评价及中药药理研究工作。Tel: (0351)7018379 E-mail: aipingli@sxu.edu.cn

秦雪梅, 女, 博士, 教授, 主要从事中药质量控制及新药研发工作。Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

肾病综合征(NS)是儿童和成人中最常见的肾脏疾病之一,其临床特征主要是大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症和全身性水肿^[1]。NS 发病机制非常复杂,主要与足细胞损伤与凋亡、脂质代谢紊乱和氧化应激等有关^[2-4]。目前 NS 的治疗仍以化学药物为主,但化学药会引起严重的毒副作用以及并发症^[5-6]。而中医注重整体调节,毒副作用较小,研究发现防己黄芪汤、当归补血汤和参芪地黄汤等复方皆以黄芪 *Astragali Radix* 为君药,在治疗肾病方面疗效显著^[7-10]。黄芪始载于东汉末年的《神农本草经》,为豆科多年生草本植物,基原有蒙古黄芪和膜荚黄芪,是一味重要的传统中药,其用药历史迄今已有 2 000 多年,其味甘、性温,具有补气固表、利水消肿、托毒生肌等功效,是中医治疗“肾病水肿”的常用药物^[11-13]。近年来研究发现^[14-15],单味药黄芪可以减少尿蛋白而减轻肾脏的损伤。临床研究发现^[16],NS 患者的氧化应激增强,而黄芪具有一定的抗氧化作用。虽然黄芪干预 NS 的疗效比较明确,但存在分子机制不明确的问题,仍需要进一步研究探索。因此,本研究以人类常见疾病靶标为研究对象,基于反向分子对接技术研究黄芪治疗 NS 的作用机制。

由于中药多成分、多途径和多靶点的特点,很难明确药效物质基础及作用机制。许多学者尝试用现代医学解释中药的作用机制。网络药理学^[17]这一概念于 2007 年由英国药理学家 Hopkins 率先提出,基于系统生物学和多向药理学等多学科理论,从多维度视角理解药物干预疾病的分子机制。已有研究表明,通过网络药理学的方法研究中药的作用机制符合中医药的整体作用特点,方法准确可靠。如已有学者利用网络药理学方法研究脑震宁颗粒干预脑外伤的作用机制^[18]、柴胡的抗抑郁作用机制^[19]、款冬花止咳化痰的作用机制^[20]。本研究以黄芪的 25 个成分为基础,运用网络药理学方法构建成分-靶点-通路-疾病网络,探讨其多成分、多靶点、多通路的作用机制,为黄芪治疗 NS 作用机制深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 黄芪化学成分的收集及筛选

黄芪的化学成分从 TCMSP 数据库^[21](<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)中获取,输入关键词“黄芪”,得到活性成分信息。本研究通过口服生物利用度(OB)和类药性(DL),筛选出同时满足

OB $\geq$ 30%和 DL $\geq$ 0.18 的化学成分以及文献报道的有活性的成分^[22]。

1.2 预测潜在靶点

登录反向药效团匹配数据库 PharmMapper(<http://59.78.98.102/pharmmapper/index.php>)筛选得到黄芪候选成分的 mol2 格式文件,下载计算结果。提交后获得 PDB ID、靶点名称(target name)和得分(fit score),其中 fit score 为分子和靶点的匹配度,越高代表越匹配。选取 fit score $>$ 3 的靶点蛋白作为该化合物的靶标蛋白,并用 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)输入筛选获得的蛋白靶点 PDB ID,经检索和转化操作得到的黄芪主要成分的潜在作用靶点。

通过在 CooLGeN(<http://ci.smu.edu.cn/CooLGeN/>)和 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库中输入关键词“nephrotic syndrome”搜索已报道与 NS 相关的基因,去除重复基因和假阳性基因,与上述成分靶点匹配分析,筛选与黄芪活性成分相关的作用靶点。

1.3 蛋白相互作用网络构建与分析

String 数据库^[23](<https://string-db.org/>)收集了大量蛋白相互作用关系,通过将黄芪的蛋白靶点导入 String 数据库,限定物种为人,进行蛋白互作分析。为确保数据的可靠性,选取 0.7 的高置信度,保存结果。将导出文件中的 node1、node2 和 combined score 信息导入 Cytoscape 软件绘制相互作用网络,并对网络进行分析,并将节点(node)大小设置用于反映度值(degree)的大小,边(edge)的粗细设置用于反映 combined score 的大小,获得最终的蛋白相互作用网络。

1.4 分子对接

Systems Dock Web Site^[24](<http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>)是一个基于网络药理学预测和分析的网络服务器,用于说明配体如何作用于复杂的分子网络。采用 Systems Dock Web Site 对蛋白相互作用网络中度值靠前的 5 个靶点与黄芪主要药效成分进行分子对接验证。保存分子对接结果,并对其 docking score 进行分析,用以评价黄芪活性成分与靶点之间的结合活性。并用临床上广泛应用于治疗 NS 的药物他克莫司(Tacrolimus)进行对照分析,整理对接结果中的 docking score 并分析。

1.5 生物过程与通路分析

将黄芪的作用靶点导入 DAVID 数据库,select

identifier 设置为 official gene symbol, list type 设置为 gene list, 限定物种为人, 对黄芪作用靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路分析, 保存结果。设定阈值 $P < 0.05$, 并按照涉及的靶点数目多少进行排序, 筛选排名靠前的生物过程或通路, 用 GraphPad Prism 5 绘图。

1.6 成分-靶点-通路-疾病网络构建

将 25 个药效成分的预测靶点结果和通路分析, 在 Excel 表中分别构建“药材-药效成分”“药效成分-靶点”“靶点-通路”和“通路-疾病”之间的相互关系, 图中以药材、药效成分、靶点蛋白、通路和疾病为 5 类节点, 它们之间有相互关系的分别用边相连, 采用 Cytoscape 3.6.1 软件的关联 (Merge) 功能构建黄芪-成分-靶点-通路-疾病网络模型。

1.7 靶点通路分析

利用 KEGG (<https://www.kegg.jp/>) 数据库 KEGG mapping 中的 Search Pathway, 输入黄芪与疾病相关的靶点蛋白, 获取黄芪治疗 NS 的通路图, 筛选前 10 条通路并整合绘制最终的通路图。

2 结果

2.1 黄芪活性成分的筛选

在 TCMSP 数据库中, 根据 OB、DL 值筛选到符合此条件的 20 种化学成分, 连同文献报道的有活性的成分 5 种, 共 25 种, 结果见表 1。虽然部分成分 (黄芪皂苷和甜菜碱) [25-26] DL 值较低, 但研究显示这些成分有明显的药理作用, 并且在肾病方面有独特疗效, 因此将这些成分也纳入后续的研究中。

表 1 黄芪中代表成分信息

Table 1 Chemical information of main compounds in *Astragali Radix*

编号	化合物	相对分子质量	OB/%	DL	Algp	度值
1	黄芪皂苷 III (astragaloside III)	785.09	31.83	0.10	-0.35	22
2	常春藤皂苷元 (hederagenin)	414.79	36.91	0.75	8.08	22
3	黄芪皂苷 I (astragaloside I)	869.17	46.79	0.11	0.41	22
4	黄芪皂苷 II (astragaloside II)	827.13	46.06	0.13	0.03	21
5	C1	462.49	36.74	0.92	0.74	17
6	黄芪甲苷 (astragaloside IV)	785.09	22.50	0.15	-0.35	16
7	叶酸 (folic acid)	441.45	68.96	0.71	0.01	13
8	C2	428.82	36.23	0.78	8.54	13
9	异鼠李素 (isorhamnetin)	316.28	49.60	0.31	1.76	11
10	甜菜碱 (betaine)	117.17	40.92	0.01	-2.04	10
11	C3	642.67	41.72	0.69	-0.95	9
12	梔子醇 (jaranol)	314.31	50.83	0.29	2.09	6
13	丁子香酚 (mairin)	456.78	55.38	0.78	6.52	6
14	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	626.67	49.28	0.62	-0.68	6
15	联苯双酯 (bifendate)	418.38	31.10	0.67	2.56	5
16	3,9-di-O-methylisissolin	314.36	53.74	0.48		5
17	槲皮素 (quercetin)	302.25	46.43	0.28	1.50	5
18	山柰酚 (kaempferol)	286.25	41.88	0.24	1.77	5
19	7-O-methylisomucronulatol	316.38	74.69	0.30	3.38	5
20	毛蕊异黄酮 (calycosin)	284.28	47.75	0.24	2.32	5
21	C4	300.33	64.26	0.42	2.64	4
22	C5	314.31	39.05	0.48	3.11	4
23	C6	302.35	67.67	0.26	3.13	2
24	二氢异黄酮 (isoflavanone)	316.33	109.99	0.30	2.42	2
25	刺芒柄花素 (formononetin)	268.28	69.67	0.21	2.58	2

C1-9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside; C2-(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta [a] phenanthren-3-ol; C3-5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside; C4-(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano [3,2-c] chromen-3-ol; C5-1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene; C6-(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl) chroman-7-ol

2.2 作用靶点预测

将 PharmMapper 数据库得到的所有靶点, 删除重复并去除假阳性, 整合得到黄芪活性成分作用靶点 337 个。通过与 GeneCards 和 CooLGeN 数据库中 NS 相关基因进行比对, 筛选出 47 个可能与治疗 NS 相关的作用靶点 (表 2)。

2.3 蛋白相互作用网络构建与分析

将筛选到的靶点输入 String 数据库中, 限定物种为人, 将结果导入 Cytoscape 软件得到靶点之间相互作用网络, 见图 1。图中节点表示蛋白, 边表示蛋白之间的关联, 共涉及 47 个节点, 282 条边。图中节点的大小表示度值的大小, 节点越大, 对应

表 2 黄芪活性成分治疗 NS 潜在靶点

Table 2 Potential targets of *Astragali Radix* for treatment of nephrotic syndrome

编号	UniProt	靶点	编号	UniProt	靶点	编号	UniProt	靶点
1	P12821	ACE	17	P09211	GSTP1	33	P08254	MMP3
2	P31751	AKT2	18	P04035	HMGCR	34	P14780	MMP9
3	P02768	ALB	19	P00492	HPRT1	35	P35228	NOS2
4	P08758	ANXA5	20	P01112	HRAS	36	P04150	NR3C1
5	P02652	APOA2	21	P28845	HSD11B1	37	P08235	NR3C2
6	P56817	BACE1	22	P05019	IGF1	38	P63000	RAC1
7	Q07817	BCL2L1	23	P60568	IL2	39	P02753	RBP4
8	P09871	C1S	24	P06213	INSR	40	P00797	REN
9	P29466	CASP1	25	P35968	KDR	41	P16581	SELE
10	P42574	CASP3	26	P80188	LCN2	42	P01009	SERPINA1
11	P13501	CCL5	27	P17931	LGALS3	43	P12931	SRC
12	P60953	P60953	28	P61626	LYZ	44	P08842	STS
13	P00734	F2	29	Q16539	MAPK14	45	P02766	TTR
14	P02774	GC	30	P08473	MME	46	P11473	VDR
15	P07359	GP1BA	31	P03956	MMP1	47	P43403	ZAP70
16	P09488	GSTM1	32	P08253	MMP2			

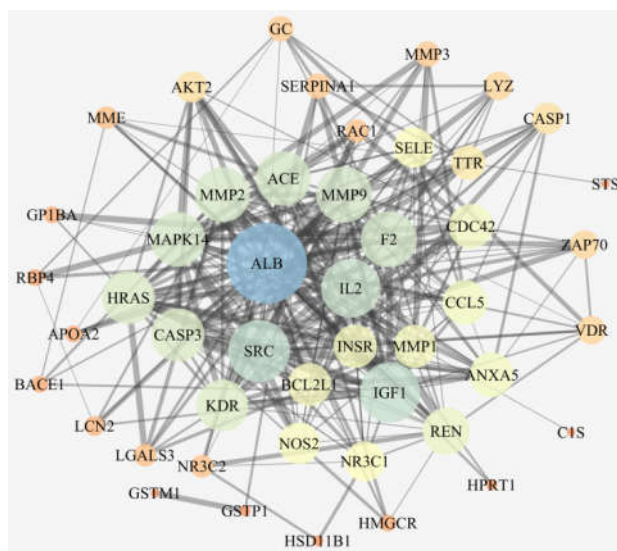


图 1 黄芪治疗 NS 潜在作用靶点之间的相互作用网络

Fig. 1 Interaction network of potential targets of *Astragali Radix* for treatment of nephrotic syndrome

的度值越大。边的粗细表示 combine score, 边线越粗 combine score 值越大。其中排名前 5 的蛋白包括 ALB (40)、SRC (27)、IGF1 (26)、IL2 (25) 和 MMP9 (23)。

2.4 分子对接

在蛋白相互作用网络分析中, 一般认为具有高度值的节点, 为所有节点的“中枢节点”, 在整个网络中占据重要地位。将上述排名前 5 的靶点与表 1 中排名前 9 的活性成分及阳性对照药 Tacrolimus 进行分子对接验证, 对接结果见表 3。一般认为 docking score 值在 4.25 以上时表示分子与靶点之间有一定的结合活性^[26], 大于 5.0 表明分子与靶点有较好的结合活性, 大于 7.0 则说明具有强烈的结合活性。分子对接结果表明, 黄芪主要活性成分与重要靶点的结合性好, 且与阳性对照药 Tacrolimus 的 docking score 值较接近。

为明确靶点蛋白与所对应成分之间的结合活

表 3 黄芪 5 个重要靶点的分子对接

Table 3 Molecular docking of five important targets from *Astragali Radix*

靶点	PDB ID	成分	docking score	靶点	PDB ID	成分	docking score
ALB	1BKE	astragaloside III	6.401	ALB	1BKE	astragaloside IV	8.383
IGF1	1IMX	astragaloside III	5.504	IGF1	1IMX	astragaloside IV	5.662
IL2	1M48	astragaloside III	5.280	IL2	1M48	astragaloside IV	6.309
MMP9	1ITV	astragaloside III	5.335	MMP9	1ITV	astragaloside IV	5.491
SRC	1O4R	astragaloside III	5.548	SRC	1O4R	astragaloside IV	6.400
ALB	1BKE	hederagenin	7.994	ALB	1BKE	folic acid	3.946
IGF1	1IMX	hederagenin	5.033	IGF1	1IMX	folic acid	3.036
IL2	1M48	hederagenin	5.462	IL2	1M48	folic acid	3.331
MMP9	1ITV	hederagenin	4.988	MMP9	1ITV	folic acid	3.037
SRC	1O4R	hederagenin	5.711	SRC	1O4R	folic acid	3.506
ALB	1BKE	astragaloside I	8.176	ALB	1BKE	C2	8.017
IGF1	1IMX	astragaloside I	5.361	IGF1	1IMX	C2	5.138
IL2	1M48	astragaloside I	6.440	IL2	1M48	C2	5.383
MMP9	1ITV	astragaloside I	5.367	MMP9	1ITV	C2	4.980
SRC	1O4R	astragaloside I	7.778	SRC	1O4R	C2	5.584
ALB	1BKE	astragaloside II	8.324	ALB	1BKE	isorhamnetin	4.246
IGF1	1IMX	astragaloside II	5.629	IGF1	1IMX	isorhamnetin	3.385
IL2	1M48	astragaloside II	6.308	IL2	1M48	isorhamnetin	3.358
MMP9	1ITV	astragaloside II	5.404	MMP9	1ITV	isorhamnetin	3.154
SRC	1O4R	astragaloside II	7.585	SRC	1O4R	isorhamnetin	3.785
ALB	1BKE	C1	6.240	ALB	1BKE	Tacrolimus	8.325
IGF1	1IMX	C1	5.681	IGF1	1IMX	Tacrolimus	5.368
IL2	1M48	C1	5.546	IL2	1M48	Tacrolimus	6.624
MMP9	1ITV	C1	5.563	MMP9	1ITV	Tacrolimus	5.320
SRC	1O4R	C1	5.504	SRC	1O4R	Tacrolimus	7.820

性, 本研究选取 2 个打分较高的关键靶点白细胞介素-2 (IL2) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP9) 与黄芪中关键成分黄芪甲苷 (astragaloside IV) 和阳性药 Tacrolimus 进行分子对接分析, 结果见图 2。结果显示, 黄芪甲苷和阳性药 Tacrolimus 与 IL2 和 MMP9 对接得分, 均高于结合 IL2 和 MMP9 的天然配体 (3.98 和 4.84)。例如黄芪甲苷与 MMP9 有 4 个结合位点, 故对接得分较高, 且黄芪甲苷与阳性对照药 Tacrolimus 的 docking score 值较接近。

2.5 基因功能和通路分析

将黄芪活性成分预测出的 47 个作用靶点通过 DAVID 数据库进行 GO 分析和 KEGG 分析。GO 富集分析 (图 3) 包括生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular component)、分子功能 (molecular function)。生物过程涉及细胞凋亡的调节、细胞内信号级联、系统过程的调控、氧化应激反应、细胞增殖的调控等方面; 细胞组成涉及质膜、细胞质、

细胞质囊泡等方面; 分子功能涉及内肽酶活性、钙离子结合、脂质结合、蛋白激酶活性、酶抑制剂活性、类固醇结合等方面。通路分析结果如图 4 所示, 黄芪治疗 NS 主要涉及 Ras 信号通路、Rap1 信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、relaxin 信号通路、AGE-RAGE 信号通路等。

2.6 黄芪-活性成分-作用靶点-通路-疾病网络构建

采用 Cytoscape 软件构建黄芪-成分-靶点-通路-疾病的网络模型。该网络有 59 个节点 (包括 1 个药材、25 个成分、20 个靶点、12 条通路和 1 个疾病) 和 203 条边 (图 5)。其中 V 字形节点代表药材和疾病、菱形节点代表成分、三角形节点代表靶点、圆形节点代表通路、边代表相互作用关系。度值在网络分析中是比较重要的, 度值越大说明与之相连的节点数越多。图中菱形节点代表成分, 其大小与度值相关, 节点越大代表成分的度值越大, 结合表 1 中所列的成分度值可知, 黄芪皂苷 (astragaloside I、II、III、IV)、

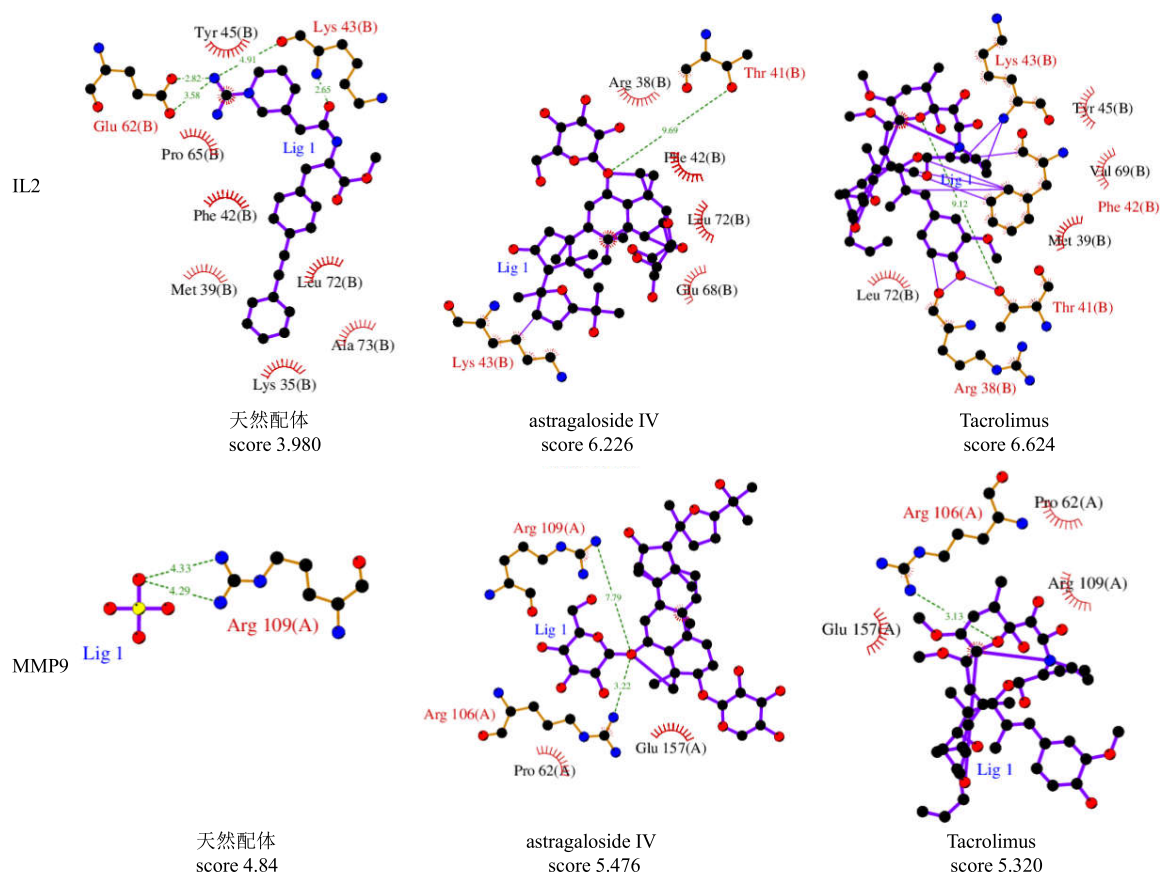


图 2 Astragaloside IV 和 Tacrolimus 与 IL2 和 MMP9 的对接分析
Fig. 2 Docking analysis of astragaloside IV and Tacrolimus binding to IL2 and MMP9

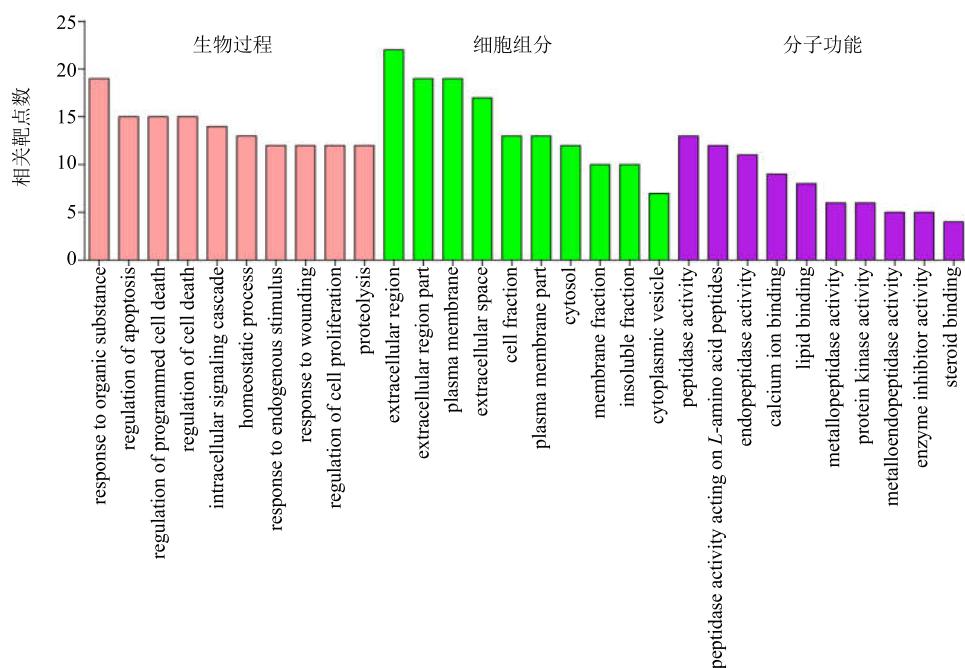


图 3 黄芪活性成分潜在治疗 NS 靶点的生物功能分析
Fig. 3 Biological function analysis of potential targets of *Astragali Radix* for treatment of nephrotic syndrome

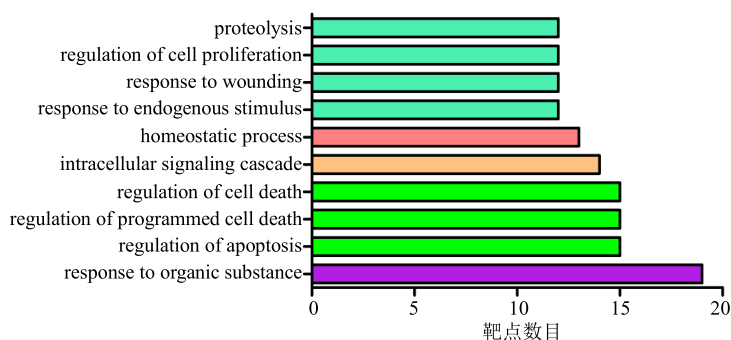


图4 黄芪活性成分潜在治疗NS靶点的KEGG通路分析

Fig. 4 Enrich KEGG pathways analysis of potential targets of *Astragali Radix* for treatment of nephrotic syndrome

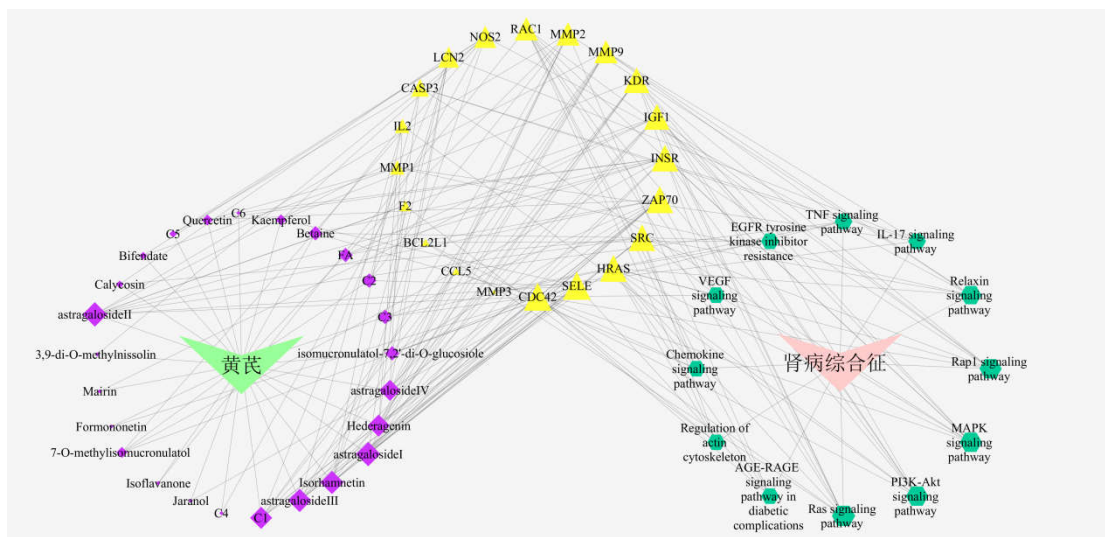


图5 黄芪-成分-靶点-通路-疾病网络

Fig. 5 Ingredients-targets-pathways-diseases network of *Astragali Radix*

异鼠李素 (isorhamnetin)、山柰酚 (kaempferol) 等成分的度值较大, 因此可能是发挥药效的成分。三角形节点代表靶点, 其面积大小与度值相关, 节点面积越大代表节点度值越大, 图中 RAC1、KDR、MMP9 和 SRC 节点较大, 提示可能是黄芪干预 NS 发挥作用的靶点。圆形节点代表通路, 靶点富集的越多, 节点越大, 显示出 Ras、Rap1、PI3K-Akt 和 MAPK 等通路节点较大, 代表这几条通路的重要性。

2.7 黄芪潜在作用靶点途经分析

将黄芪治疗 NS 的 47 个潜在作用靶点通过 KEGG 数据库进行通路注释分析。利用 KEGG Mapper 工具获取黄芪治疗 NS 的通路图, 筛选靠前的几条通路并进行整合绘制最终的通路图 (图 6)。通路靶点标记为长方形, 黄芪治疗 NS 的靶点标记

为椭圆形。图中显示出了 Ras、Rap1、PI3K-Akt、MAPK、VEGF、TNF 等信号通路, 涉及 18 个治疗 NS 的靶点。提示黄芪治疗 NS 靶点分散于这几条通路中, 绝大多数靶点在多条通路中发挥作用, 如 SRC、RAS、RAC 和 CASP3 等。

3 讨论

本研究借助网络药理学的方法,探讨黄芪治疗 NS 的物质基础及其分子机制,发现其通过调节 Ras、Rap1、MAPK、PI3K-Akt 等多条通路发挥保护肾脏的作用。此外,发现黄芪中黄芪皂苷成分和黄酮类成分具有较大的度值,因此黄芪治疗 NS 的主要物质基础可能是皂苷和黄酮类成分。

黄芪具有利尿消肿的作用，是治疗 NS 的重要药物，以其为主要药物的复方在 NS 治疗中占了绝大比例，因此，黄芪治疗 NS 的研究具有重要意义。

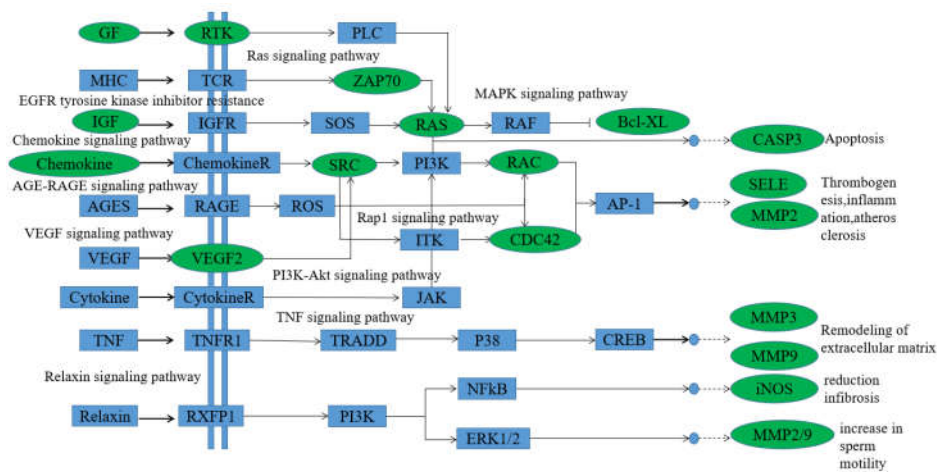


图 6 黄芪在 NS 相关通路中的作用靶点

Fig. 6 Target of *Astragali Radix* in nephrotic syndrome pathway

黄芪中的黄芪皂苷、黄酮类（异鼠李素、槲皮素、山柰酚）、甜菜碱（betaine）等多个成分均已报道具有治疗肾脏疾病的作用。陈吉刚等^[26]研究发现甜菜碱可能通过减轻内质网应激及相关的炎症反应治疗糖尿病肾病小鼠。黄芪皂苷提取物^[27]对糖尿病肾病大鼠具有一定的肾脏保护作用。而黄芪甲苷是皂苷类最主要的成分之一，黄芪甲苷^[28]治疗阿霉素肾病，可能与足细胞氧化应激反应的减少有关。作为黄酮类成分异鼠李素^[29]对糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用，可能与抑制肾小球系膜细胞中的核转录因子- κ B（NF- κ B）信号传导活性，减少炎症介质的产生和减弱氧化应激有关。槲皮素^[30]可减少炎症细胞浸润，同时可以显著减少肾小球和肾间质实质细胞损伤。山柰酚^[31]通过调控 p38 MAPK 信号通路，对高糖环境下大鼠肾系膜细胞起到保护作用。此外本课题组^[32]前期通过代谢组学方法研究黄芪总黄酮对阿霉素诱导的肾病综合征模型具有一定回调作用，与本研究网络药理学预测相互佐证，可证明结果的准确性。

采用反向分子对接的方法预测活性成分的作用靶点，并结合相关数据库，筛选得到 47 个与 NS 相关的作用靶点。其中，基质金属蛋白酶（MMP）是一组特定的酶，通过锌依赖性蛋白质水解进行细胞外基质降解。MMP-2 和 MMP-9 在足细胞损伤中具有关键作用，足细胞迁移和阿霉素诱导细胞损伤可能与 MMP-2 和 MMP-9 表达的上调有关^[33]。Sai 等^[34]发现阿霉素诱导的足细胞损伤组 MMP-2 和 MMP-9 表达水平均下降，而黄芪甲苷干预组能够抑

制这种下降，防止足细胞的损伤。Ras 相关的 C3 肉毒杆菌毒素底物 1（Rac1）参与纤维化疾病的病理生理学，研究显示 Rac1 在缺血再灌注损伤后的肾纤维化中起关键作用^[35]。各种半胱氨酸蛋白酶（Caspase）^[36]参与细胞凋亡过程，Caspase 一旦被激活，就在细胞内信号级联中发挥关键作用，从而发生凋亡。研究发现山柰酚抑制 Caspase 的活化^[37]，从而减轻内质网应激引起的细胞凋亡。

靶点 GO 分析结果表明，靶基因涉及细胞死亡调控、调节细胞增殖和氧化应激等生物过程；涉及细胞质、细胞膜等细胞组分；涉及脂质结合、蛋白激酶活性和钙离子结合等分子功能。提示黄芪治疗 NS 可能通过调控足细胞的生成、增殖和抑制氧化应激诱导的足细胞凋亡；对细胞膜的调控可能与脂质调控有关。足细胞损伤被认为是肾小球滤过屏障功能障碍引起的蛋白尿发展的最关键因素之一，连续损伤可能导致严重的细胞凋亡^[38]。黄芪水提物^[39]通过抑制氧化应激和内皮型一氧化氮合酶，改善阿霉素肾病大鼠的蛋白尿。NS 的临床表现为高胆固醇、高血脂和低蛋白血症，研究发现与脂质代谢紊乱有关^[3]。刘超等^[40]发现黄芪具有调节血脂代谢和提高抗脂质氧化的能力。这与本研究预测结果一致，为本课题组研究黄芪对阿霉素诱导的 NS 脂质代谢紊乱的调节起到指导作用。并且为黄芪治疗 NS 提供理论依据以及为未来的相关研究提供了基础。

事实上，Ras 和 Rap1 通路均与 MAPK、VEGF、PI3K-Akt 和 TNF 信号通路均有关联。提示 Ras 和 Rap1 通路在黄芪治疗 NS 的过程中发挥重要作用。

Potla 等^[41]发现足细胞中 Rap1 信号传导的减少会诱发小鼠严重的肾小球疾病,并与人类肾小球疾病的发病机制有关。PI3K/Akt 在细胞中广泛存在,对细胞增殖、分化、凋亡和代谢的调节至关重要^[42],PI3K/Akt 信号通路在足细胞凋亡的抗性中起关键作用^[43]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),包括 ERK、JNK 和 p38,是一系列丝氨酸/苏氨酸激酶,可调节细胞增殖和凋亡^[44]。黄芪甲苷通过 MAPK 途径减弱补体膜攻击复合物诱导的足细胞损伤^[45]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是一种有效的促炎细胞因子,它通过促进炎症和细胞凋亡而与肾损伤的发病机制有关,在糖尿病肾病中,肾小管上皮细胞的凋亡与 TNF- α 表达相关,导致肾小管萎缩和随后的肾小管间质纤维化^[46-47]。

本研究基于网络药理学方法对黄芪治疗 NS 的活性成分和作用机制进行了分析,并通过 Systems Dock Web Site 分子对接软件验证黄芪活性成分与重要靶点之间存在较好的结合活性,验证了网络药理学预测靶点的可靠性。建立成分-靶点-通路-疾病网络发现,黄芪中皂苷类化合物、黄酮类化合物、甜菜碱、亚麻酸等药效成分可能通过抑制氧化应激反应减轻足细胞损伤,通过 Ras、Rap1、MAPK、TNF 和 PI3K-Akt 信号通路调节足细胞增殖与凋亡而发挥治疗的作用,说明中药多成分-多靶点-多通路治疗疾病,为发病机制复杂的 NS 提供了研究方向。此外,本课题组正在进行黄芪的活性成分针对 NS 关键靶点的相关实验研究。

参考文献

- [1] Agrawal S, Zaritsky J J, Fornoni A, *et al.* Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: Mechanisms and treatment [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 14(1): 70.
- [2] Ding W Y, Saleem M A. Current concepts of the podocyte in nephrotic syndrome [J]. *Kidney Res Clin Pract*, 2012, 31(2): 87-93.
- [3] Vaziri N D. Disorders of lipid metabolism in nephrotic syndrome: Mechanisms and consequences [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(1): 41-52.
- [4] Bulucu F, Vural A, Aydin A, *et al.* Oxidative stress status in adults with nephrotic syndrome [J]. *Clin Nephrol*, 2000, 53(3): 169-173.
- [5] Al-Azzawi H F, Obi O C, Safi J, *et al.* Nephrotic syndrome-induced thromboembolism in adults [J]. *Int J Crit Illn Injury Sci*, 2016, 6(2): 85-88.
- [6] Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E, *et al.* Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity [J]. *Toxicology*, 2006, 218(2): 164-171.
- [7] 王闻婧, 陈春艳, 符强. 防己黄芪汤对阿霉素肾病大鼠肾组织 Podocin 表达的影响 [J]. *中医药学报*, 2014, 42(6): 57-59.
- [8] 姚琼, 叶太生, 黄蓓. 当归补血汤不同配比对高糖作用下大鼠肾组织系膜细胞增殖的影响 [J]. *湖北中医杂志*, 2015, 37(10): 11-13.
- [9] 朱勤, 陈洪宇. 参芪地黄汤对阿霉素肾病大鼠足细胞 Nephlin 蛋白和 mRNA 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(2): 296-299.
- [10] 胡勇, 付荣国, 吕治安. 黄芪注射液联合他克莫司对原发性肾病综合征患者血液黏稠状态、免疫功能及炎症因子的影响 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(11): 2078-2081.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [12] 洪海都, 温俊茂, 陈宗俊. 黄芪主要活性成分的药理作用研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(14): 49-50.
- [13] 吴云波, 张峤, 门操. 黄芪在临床应用中的研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(32): 216-219.
- [14] Zuo C, Xie X, Qiu H, *et al.* Astragalus mongholicus ameliorates renal fibrosis by modulating HGF and TGF- β in rats with unilateral ureteral obstruction [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10(5): 380-390.
- [15] 阮诗玮, 丘余良, 李秋景, 等. 黄芪对阿霉素肾病大鼠的足细胞影响实验研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(10): 851-853.
- [16] 莫湛宇, 梁东, 司徒玉, 等. 黄芪对肾病综合征患者氧化应激影响的研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2004, 5(4): 209-211.
- [17] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [18] 卢紫娟, 刘海霞, 李昆, 等. 基于网络药理学的脑震荡颗粒治疗脑外伤的机制分析 [J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3531-3540.
- [19] 吴丹, 高耀, 向欢, 等. 基于网络药理学的柴胡抗抑郁作用机制研究 [J]. *药学报*, 2018, 53(2): 210-219.
- [20] 李静, 高丽, 高耀, 等. 基于网络药理学的款冬花止咳化痰活性成分靶点探究 [J]. *中草药*, 2018, 49(1): 179-187.
- [21] 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(1): 13-17.
- [22] 张潇, 高耀, 向欢, 等. 基于网络药理学的交泰丸治疗抑郁症作用机制研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(8):

- 1584-1590.
- [23] Mering C V, Jensen L J, Snel B, *et al.* STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 433-437.
- [24] Hsin K Y, Matsuoka Y, Asai Y, *et al.* systemsDock: A web server for network pharmacology-based prediction and analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: W507-W513.
- [25] 赛依帕, 宋元春, 高霞, 等. 黄芪总苷对阿霉素诱导的足细胞损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(3): 70-73.
- [26] 陈吉刚, 庞琦, 曾薇, 等. 甜菜碱对糖尿病肾病小鼠的治疗作用及其机制 [J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(11): 1040-1043.
- [27] 肖峰, 胡雅国, 吴石楠, 等. 黄芪皂苷提取物对糖尿病大鼠肾脏的保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(10): 2014-2018.
- [28] Sai Y P, Song Y C, Chen X X, *et al.* Protective effect of astragalosides from *Radix Astragali* on adriamycin-induced podocyte injury [J]. *Exper Ther Med*, 2018, 15(5): 4485-4490.
- [29] Qiu S, Sun G, Zhang Y, *et al.* Involvement of the NF- κ B signaling pathway in the renoprotective effects of isorhamnetin in a type 2 diabetic rat model [J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(5): 628-634.
- [30] 王蓝天, 王天然. 槲皮素对慢性肾衰大鼠肾脏细胞的保护作用研究 [J]. *西南国防医药*, 2014, 24(2): 144-146.
- [31] 陈妮, 韩鹏定, 陈文, 等. 山柰酚对高糖诱导大鼠肾系膜细胞增殖的影响 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2017, 48(4): 526-530.
- [32] Zhang W N, Li A P, Qi Y S, *et al.* Metabolomics coupled with system pharmacology reveal the protective effect of total flavonoids of *Astragali Radix* against adriamycin-induced rat nephropathy model [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 158: 128-136.
- [33] Merkle M, Ribeiro A, Köppel S, *et al.* TNF α enhances TLR3-dependent effects on MMP-9 expression in human mesangial cells [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 36(12): 1155-1160.
- [34] Sai Y P, Song Y C, Chen X X, *et al.* Protective effect of astragalosides from *Radix Astragali* on adriamycin-induced podocyte injury [J]. *Exper Ther Med*, 2018, 15(5): 4485-4490.
- [35] Liang H, Huang J, Huang Q, *et al.* Pharmacological inhibition of Rac1 exerts a protective role in ischemia/reperfusion-induced renal fibrosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2517-2523.
- [36] Seo H, Jin M K, Choi H, *et al.* Quercetin induces caspase-dependent extrinsic apoptosis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells [J]. *Oncol Reports*, 2016, 36(1): 31-42.
- [37] Abdullah A, Ravanian P. Kaempferol mitigates endoplasmic reticulum stress induced cell death by targeting caspase 3/7 [J]. *Sci Rep*, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20499-7.
- [38] Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(1): 253-307.
- [39] You H, Lu Y, Gui D, *et al.* Aqueous extract of *Astragali Radix* ameliorates proteinuria in adriamycin nephropathy rats through inhibition of oxidative stress and endothelial nitric oxide synthase [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(1): 176-182.
- [40] 刘超, 张学武. 黄芪对高脂血症小鼠血脂及脂质过氧化的影响 [J]. *延边大学医学学报*, 2006, 18(3): 178-180.
- [41] Potla U, Ni J, Vadaparampil J, *et al.* Podocyte-specific RAP1GAP expression contributes to focal segmental glomerulosclerosis-associated glomerular injury [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(4): 1757-1769.
- [42] Patel R K, Mohan C. PI3K/AKT signaling and systemic autoimmunity [J]. *Immunol Res*, 2005, 31(1): 47-55.
- [43] Liu J, Zhang Y D, Chen X L, *et al.* The protective effect of the EP2 receptor on TGF- β 1 induced podocyte injury via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197158.
- [44] Wada T, Penninger J M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2838-2849.
- [45] Zheng R, Deng Y, Chen Y, *et al.* Astragaloside IV attenuates complement membranous attack complex induced podocyte injury through the MAPK pathway [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(6): 892-898.
- [46] Adachi T, Sugiyama N, Yagita H, *et al.* Renal atrophy after ischemia-reperfusion injury depends on massive tubular apoptosis induced by TNF α in the later phase [J]. *Med Mol Morphol*, 2014, 47(4): 213-223.
- [47] Kuwagata S, Kume S, Chin-Kanasaki M, *et al.* MicroRNA148b-3p inhibits mTORC1-dependent apoptosis in diabetes by repressing TNFR2 in proximal tubular cells [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(6): 1211-1225.