

## 归肾经补阳药的网络药理学机制研究

邹家丽<sup>1</sup>, 李安遥<sup>2</sup>, 王启铭<sup>1</sup>, 赵怡<sup>1</sup>, 于净<sup>2,3</sup>, 项荣武<sup>2,3\*</sup>

1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学医疗器械学院, 辽宁 沈阳 110016

3. 辽宁省医药大数据与人工智能工程技术研究中心, 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

**摘要:** **目的** 运用网络药理学的方法对归肾经补阳药的分子作用机制进行预测。**方法** 选择归肾经补阳中药肉苁蓉、菟丝子、冬虫夏草、韭菜子、沙苑子、仙茅、续断以及胡芦巴作为研究对象, 通过 TCMSP 数据库检索中药化学成分, 利用口服生物利用度 (OB)、类药性 (DL) 值筛选活性成分及 PubChem 数据库的化学相似性靶点预测方法对中药活性成分进行靶点预测; 通过 STRING 数据库寻找归肾经补阳药靶蛋白之间的相互作用关系以及 KEGG 通路分析; 通过加权 PageRank 算法评价蛋白互作 (PPI) 网络中的节点, 并对信号通路进行打分。基于通路富集分析及 PPI 分析筛选核心靶蛋白。利用 Cytoscape 3.6.0 软件, 分别构建化合物-关键靶点网络、药材-关键靶点 PPI 网络和关键靶点-通路网络, 并对其作用机制进行了初步探讨。**结果** 筛选出归肾经补阳药核心靶蛋白 21 个, 信号通路 40 条。归肾经补阳中药可能通过 T 细胞调节、性激素调节、免疫反应、延缓衰老等途径发挥温补肾阳的作用, 其作用机制可能与甲状腺激素、神经营养因子、TNF 及雌激素等信号通路有关。**结论** 基于网络药理学的研究方法有助于寻找归肾经补阳药的关键靶点和信号通路, 为深入诠释补肾阳药的分类含义提供有益的信息和数据支撑。

**关键词:** 归肾经补阳药; 网络药理学; PPI 网络; 靶蛋白; 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1838-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.011

## Mechanism of *Yang*-tonifying herbs distributing along kidney meridians in molecular level by network pharmacology

ZOU Jia-li<sup>1</sup>, LI An-yao<sup>2</sup>, WANG Qi-ming<sup>1</sup>, ZHAO Yi<sup>1</sup>, YU Jing<sup>2,3</sup>, XIANG Rong-wu<sup>2,3</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. School of Medical Equipment, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

3. Liaoning Medical Big Data and Artificial Intelligence Engineering Technology Research Center, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

**Abstract: Objective** To predict the unique mechanism of *Yang*-tonifying herbs distributing along kidney meridians in molecular level through network pharmacology technology. **Methods** Eight kidney-*yang* tonifying herbs with common clinical effects and clear therapeutic effects were selected in study. The chemical ingredients of traditional Chinese medicines were searched by TCMSP database. OB and DL values were applied to screen the active substance and the chemical similarity target prediction methods of Pub Chem database were used to predict the target proteins of TCM; The PPI between the target proteins of the kidney-*yang* tonifying herbs and the KEGG signal pathway were searched by the STRING database; The nodes in the PPI network were evaluated by the weighted PageRank algorithm and then the core target protein was screened. Using the Cytoscape 3.6.0 software, a compound-target network, a herb-target-PPI network, and a target-pathway network were constructed. **Results** Through the network analysis, 21 key targets and 40 signal pathways of the kidney-*yang* tonifying herbs were screened. The medicinal played the role of warming and tonifying kidney-*yang* by T cell regulation, sex hormone regulation, immune response, and delaying aging. The mechanism may be related to thyroid hormone signaling pathway, neurotrophin signaling pathway, TNF signaling pathway and estrogen signaling pathway. **Conclusion** The method based on network pharmacology could help to find the key targets and signal pathways of the kidney-*yang* tonifying herbs, which provides useful information and data support for further interpretation of the classification meaning of the kidney-*yang* tonifying herbs in TCM. **Key words:** *Yang*-tonifying medicinals distributing along kidney meridians; network pharmacology; PPI network; target protein; signal pathway

收稿日期: 2018-10-22

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(20170540850); 辽宁省高等学校基本科研项目(自然科学类)(2017LFW02); 辽宁省自然科学基金项目(20180550345)

作者简介: 邹家丽(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学信息学。Tel: 18071629112 E-mail: 1157259653@qq.com

\*通信作者 项荣武, 男, 硕士研究生导师, 教授, 主要从事药理学信息学研究。Tel: (024)23986529 E-mail: xrwlove@163.com

肾阳虚证是中医常见证候之一。肾阳虚患者表现出腰腿酸软、四肢乏力、夜间多梦、气短盗汗，部分患者出现阳痿早泄、不孕不育。目前研究发现肾阳虚证主要与神经、内分泌、免疫功能异常有关。归肾经补阳中药能温补人体一身阳气，普遍应用于肾阳虚证的治疗。现代药理研究表明该类中药具有广泛的药理活性：增强免疫功能、性激素样作用、抗衰老、抗氧化、抗肿瘤、抗骨质疏松等作用<sup>[1]</sup>。但这类中药具体的靶标及分子机制尚不明确，有待进一步研究。

传统药物单靶点的研究模式无法解释中药多成分、多靶点协同作用机制，使中药研究在现代化进程中步履维艰。随着网络药理学的兴起，其整体性、系统性的特点有望揭示中药中不同成分之间的协同效应，阐明中药理论的奥秘，目前已被广泛应用于中药复方研究中<sup>[2-5]</sup>。Liu 等<sup>[6]</sup>应用系统药理学方法分别构建了补气类和补血类中药-活性化合物-靶点-疾病网络，用以探究补气类和补血类中药治疗多种复杂疾病的分子机制；余甘树等<sup>[7]</sup>运用计算机网络药理学技术对活血化瘀类中药所含化学成分的抗凝血作用机制进行预测。研究结果显示网络药理学方法应用于中药药效分类研究具有显著优势，与传统实验研究相结合可谓优势互补。

本研究采用网络药理学方法，对临床常用且药效确切的 8 味归肾经补阳药进行研究和分析，从多维度寻找其共性，探索其分子作用机制，为归肾经补阳药后续研究提供依据，并为中药药效分类的深入诠释和解析提供一种新思路和新方法。

## 1 方法

### 1.1 归肾经补阳药的选择及活性成分筛选

《中药学》<sup>[8]</sup>中记载了 25 味典型补阳药并且 100% 归足少阴肾经，以临床常用且治疗效果明确为依据，从中选择 8 味植物药作为研究对象，分别是肉苁蓉、菟丝子、冬虫夏草、韭菜子、沙苑子、仙茅、续断、胡芦巴。利用 TCMSP 2.3 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmspsearch.php>) 收集 8 味中药含有的化学成分，以口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$  且类药性 (DL)  $\geq 0.18$  作为筛选标准，并将 OB  $< 30\%$  但具有生物活性的少数分子增补为候选活性分子。

### 1.2 靶蛋白的预测及蛋白名称的标准化

利用 PubChem 数据库 (<https://testpubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)，采用化学相似性搜索的靶点预测方法，对中药各活性成分按照 80%~99% 的相似

度从高到低依次进行靶点预测，保留连续 5 个相似度下所有预测的靶点，构建活性成分的个数及靶点数量图，利用肘点法，判别化合物靶点预测的结果。使用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对靶点蛋白进行名称标准化，并剔除非人类的靶点蛋白，最终获得 307 个靶蛋白。

### 1.3 归肾经补阳药蛋白互作 (PPI) 网络建立

为了探究归肾经补阳药靶蛋白在系统水平上的相互作用，将 307 个靶蛋白同时导入 STRING 10.5 数据库中 (<https://string-db.org/>)，通过靶点删除、名称统一化等操作最终构建了包含 302 个靶蛋白的 PPI 网络。

### 1.4 PPI 网络节点评价

PageRank 算法<sup>[9-10]</sup>普遍用于网络评价，该算法的优点<sup>[11]</sup>是不需要预先知道一部分关键蛋白来训练分类器，而是直接通过给蛋白质打分来预测关键蛋白。本研究采用加权 PageRank 算法，将 STRING 10.5 数据库中蛋白质相互作用综合得分值 (combined\_score<sup>[12]</sup>) 作为权重，对 PPI 网络中的所有节点打分，以筛选对网络影响重大的节点，以加权 PageRank 值大于 2 倍平均值为筛选条件，得到 26 个潜在靶蛋白。

### 1.5 药材对信号通路的影响

将 PPI 网络中的靶蛋白导入 STRING 10.5 数据库中进行 KEGG 通路分析，最终得到 125 条显著富集的信号通路。对信号通路上每味药材作用的基因得分求和，即为药材对信号通路影响的得分。

### 1.6 基于通路富集分析及 PPI 分析筛选核心靶蛋白

根据每味药材对信号通路的得分，计算加权得分平均值，即为补肾阳中药相关信号通路的得分。研究纳入了 8 味补阳药中得分高于平均值的通路 40 条，涉及到 151 个靶蛋白。结合 PPI 网络中的 26 个潜在靶蛋白，最终获得补肾阳中药 21 个核心靶蛋白。

### 1.7 网络构建及分析

将归肾经补阳药候选化合物、化合物分类、21 个关键靶点及 40 条通路数据导入 Cytoscape 3.6.0 软件中，分别构建化合物-靶点网络、药材-靶点 PPI 网络和靶点-通路网络。

## 2 结果与分析

### 2.1 活性成分筛选结果

采用文献检索和 TCMSP 数据库相结合的方法查找化合物，共得到 8 味补肾阳中药 103 个化合物，其中肉苁蓉 13 个、菟丝子 14 个、冬虫夏草 12 个、韭菜

子 7 个、沙苑子 15 个、仙茅 10 个、续断 11 个、胡芦巴 21 个。剔除重复项, 最终获得归肾经补阳药 78 个候选成分。分别为黄酮类 22 个、生物碱类 10 个、萜类 10 个、甾体类 10 个、脂肪族类 9 个、糖苷类 7 个、

酚类 4 个、苯丙素类 3 个、吡啶衍生物类 2 个以及含硫类化合物 1 个。化合物信息见表 1。其中槲皮素<sup>[13]</sup>、山柰酚<sup>[14]</sup>、 $\beta$ -谷甾醇<sup>[15]</sup>、芒柄花素<sup>[16]</sup>及咖啡因<sup>[17]</sup>等成分在多味药材中出现, 具有广泛的药理活性。

表 1 补肾阳中药 78 个候选化合物信息

Table 1 Information of 78 candidate compounds of kidney-*yang* tonifying herbs

分类	PubChem CID	化合物	药材	分类	PubChem CID	化合物	药材	
黄酮类	5280343	槲皮素	胡芦巴、肉苁蓉、沙苑子、菟丝子	甾体类	222284	$\beta$ -谷甾醇	冬虫夏草、胡芦巴、韭菜子、肉苁蓉、沙苑子、菟丝子、仙茅、续断	
	5280863	山柰酚	胡芦巴、沙苑子、菟丝子		5997	胆固醇	冬虫夏草、菟丝子	
	5280378	芒柄花素	胡芦巴、沙苑子		173183	菜油甾醇	菟丝子	
	5280448	毛蕊异黄酮	胡芦巴、沙苑子		246520	胆固醇棕榈酸酯	冬虫夏草	
	5281643	金丝桃苷	沙苑子、菟丝子		5280794	豆甾醇	仙茅	
	114776	异荛苌素	胡芦巴		5281326	异岩藻甾醇	菟丝子	
	162350	异牡荆苷	胡芦巴		10181133	酵母甾醇	冬虫夏草	
	5280373	鹰嘴豆芽素 A	胡芦巴		11870467	ZINC03982454	仙茅	
	5280441	牡荆素	胡芦巴		12303645	谷甾醇	续断	
	5280445	木犀草素	胡芦巴		12304433	新替告皂苷元	胡芦巴	
	5280961	染料木黄酮	肉苁蓉		生物碱类	2519	咖啡因	冬虫夏草、仙茅
	5281654	异鼠李素	菟丝子			12800099	adenyldeoxyriboside	冬虫夏草
	5318267	毛蕊异黄酮-7-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷	沙苑子			15480629	(2R,3R,4S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-4-(hydroxymethyl)oxolan-3-ol	冬虫夏草
	5281672	杨梅素	沙苑子			1174	尿嘧啶	冬虫夏草
	5281702	小麦黄素	胡芦巴			14296	川芎嗪	仙茅
	5281708	大豆黄酮	胡芦巴			72341	土布洛生	肉苁蓉
	5281779	德鸢尾素	胡芦巴			73400	蝙蝠葛碱	肉苁蓉
	5282102	黄芪苷	沙苑子			91466	苦参碱	菟丝子
	5282154	laricitrin	沙苑子			442915	臭山羊碱	续断
	5281666	山柰素	沙苑子			619052	sophranol	菟丝子
	5322022	小麦黄素苷	胡芦巴		糖苷类	5742590	西托糖苷 ( $\beta$ -谷甾醇葡萄糖苷)	胡芦巴、肉苁蓉、沙苑子、菟丝子、仙茅、续断
	5492406	沙苑子苷	沙苑子			73296	$\alpha$ -常春藤皂苷	续断
萜类	5356634	豆甾酮	沙苑子、菟丝子	87691		马钱素	续断	
	64945	熊果酸	续断	132567		仙毛苷 b	仙茅	
	64971	桦木酸	胡芦巴	159278		红景天苷	肉苁蓉	
	73145	白桦酯醇	菟丝子	5281800		麦角甾苷	肉苁蓉	
	92110	环阿廷醇	仙茅	101967018		林生续断苷 III	续断	
	99474	薯蓣皂苷元	胡芦巴	脂肪族类		10467	花生酸	韭菜子、沙苑子
	259846	羽扇豆醇	胡芦巴			444899	花生四烯酸	冬虫夏草、肉苁蓉
	638072	角鲨烯	韭菜子			8181	棕榈酸甲酯	仙茅
	5281471	大麻叶佩兰内酯	胡芦巴		11197	木焦油酸	韭菜子	
	10466307	马钱苷元	续断		16898	henicosanoic acid	肉苁蓉	
酚类	10393	酪醇	肉苁蓉		68972	正三十烷醇	肉苁蓉	
	5281636	龙胆根素	续断		5280435	植醇 (叶绿醇)	韭菜子	
	6474310	3,5-二咖啡酰奎尼酸	续断		5282769	反-11-二十碳烯酸	韭菜子	
	20980941	3,2',4',6'-四羟基-4,3'-二甲氧基查耳酮	仙茅		21159087	醋酸亚油酯	冬虫夏草	
苯丙素类	72307	芝麻素	菟丝子		吡啶衍生物	936	烟酰胺	冬虫夏草
	443028	yangambin	肉苁蓉	938		烟酸	冬虫夏草	
	5280460	东莨菪内酯	胡芦巴					
含硫类	16590	二烯丙基二硫	韭菜子					

## 2.2 靶蛋白的预测结果

利用 PubChem 数据库预测得到肉苁蓉、菟丝子、冬虫夏草、韭菜子、沙苑子、仙茅、续断、葫芦巴的靶点蛋白数量分别为 249、204、171、82、227、265、269、185，共得到 1 652 个靶点蛋白，剔除重复项，最终获得 307 个靶点蛋白。

## 2.3 PPI 网络的构建及评价

利用 STRING 数据库寻找蛋白质之间的相互作用，比较归肾经补阳药的 PPI 网络与人类全基因组

中随机产生的相似大小的蛋白质之间的 PPI 网络连接情况是否有显著差异。结果见表 2，归肾经补阳药蛋白质之间的连接显著，从分子生物学角度看存在共性关系。综合蛋白质数量和蛋白质相互作用得分值，本研究构建了一个包含 285 个节点，2 200 条边的 PPI 网络。采用加权 PageRank 算法评价 PPI 网络中的节点，以加权 PageRank 值大于 2 倍平均值为筛选条件，得到 26 个补肾阳药潜在靶蛋白，见表 3。

表 2 PPI 网络参数及差异结果

Table 2 Parameters and difference in PPI network

combined_score	节点数量	边数量	平均节点度值	Excepted number of edges	PPI enrichment P 值	显著性
>0.15	302	8 031	26.6	5 339	$<1.0 \times 10^{-16}$	***
>0.4	285	2 200	7.7	1 341	$<1.0 \times 10^{-16}$	***
>0.7	253	964	3.8	544	$<1.0 \times 10^{-16}$	***
>0.9	227	689	3.0	365	$<1.0 \times 10^{-16}$	***

“Excepted number of edges”是人类全基因组中随机产生的相似大小的蛋白质之间的相互作用数量；\*\*\* $P < 0.001$

“Excepted number of edges” represents amount of interactions between similar-sized proteins randomly generated from human genome; \*\*\* $P < 0.001$

表 3 PPI 网络中 26 个靶蛋白信息

Table 3 Top 26 target protein in PPI network

基因	Uniprot ID	加权 PageRank 值	加权度值	基因	Uniprot ID	加权 PageRank 值	加权度值
TP53	P04637	0.025 192	85.243	SUMO1	P63165	0.008 661	29.519
AKT1	P31749	0.017 985	62.602	BRCA1	P38398	0.008 419	30.943
JUN	P05412	0.017 274	61.656	SMARCA4	P51532	0.008 308	30.615
GAPDH	P04406	0.016 957	56.792	ABL1	P00519	0.008 243	28.025
MAPK1	P28482	0.015 584	54.613	IL1B	P01584	0.008 123	27.713
TNF	P01375	0.012 958	45.517	NCOA1	Q15788	0.008 060	29.427
CXCL8	P10145	0.011 746	42.357	MDM2	Q00987	0.007 965	29.069
ESR1	P03372	0.011 414	41.398	PPARG	P37231	0.007 959	28.252
NFKB1	P19838	0.010 676	40.142	HIF1A	Q16665	0.007 821	28.183
CASP3	P42574	0.010 328	37.785	HDAC9	Q9UKV0	0.007 463	26.773
H2AFX	P16104	0.009 303	33.466	GNAI1	P63096	0.007 356	23.518
ATM	Q13315	0.009 167	32.515	NR3C1	P04150	0.007 326	26.868
AR	P10275	0.009 039	32.434	IL2	P60568	0.007 307	24.203

加权 PageRanks 平均值为 0.003 509

Average PageRanks value is 0.003 509

## 2.4 通路富集分析

KEGG 信号通路富集的结果中每味药材所含的通路大体相同（相似度在 80% 以上），结果见表 4，表明这些药材虽然直接作用的靶点不同，在生物体中却作用到同一条通路，说明归肾经补阳药具有“同病异治”的潜在分子学机制。8 味药材共同的通路

有 81 条，其加权得分平均值为 0.048 430。本研究纳入了得分高于平均值的通路 40 条，见表 5。

## 2.5 补肾阳中药核心靶蛋白

基于通路富集分析及 PPI 分析筛选出核心靶蛋白 21 个，基于 Uniprot 数据库寻找核心靶蛋白与肾虚证相关的分子功能，结果见表 6。其中参与 T



表 4 每味药材包含通路情况

Table 4 Number of pathways in each herb

药材	通路数量	8 味药总通路数量	占比/%
冬虫夏草	116	125	92.80
胡芦巴	107	125	85.60
韭菜子	100	125	80.00
肉苁蓉	123	125	98.40
沙苑子	119	125	95.20
菟丝子	122	125	97.60
仙茅	125	125	100.00
续断	124	125	99.20

细胞相关调节、性激素的调节、抗癌或炎症反应的靶蛋白分别有 8 个,参与衰老过程的靶蛋白有 6 个。说明补肾阳中药核心功能为 T 细胞相关调节、性激素的调节、抗癌、抗炎,其次为延缓衰老等功能。AKT1、NFKB1、CASP3、IL1B 等基因涉及到多个相关分子功能,可能是肾阳虚症分子网络中起到关键枢纽作用的靶点群。

2.6 成分-关键靶点网络

通过 Cytoscape 3.6.0 构建成成分-关键靶点网络,如图 1 所示,其中包含 99 个节点,810 条边。绿色圆形节点代表活性成分(78 个),数字编号来源于 PubChem

表 5 归肾经补阳药 40 条 KEGG 信号通路

Table 5 Forty KEGG signal pathways of kidney-yang tonifying herbs

通路	KEGG ID	加权得分								
		冬虫夏草	胡芦巴	韭菜子	肉苁蓉	沙苑子	菟丝子	仙茅	续断	平均值
pathways in cancer	5200	0.109 992	0.080 033	0.134 624	0.118 351	0.104 506	0.096 889	0.145 805	0.120 035	0.113 779
thyroid hormone signaling pathway	4919	0.101 589	0.082 784	0.070 696	0.117 762	0.114 593	0.099 927	0.130 575	0.117 762	0.104 461
microRNAs in cancer	5206	0.100 208	0.086 091	0.061 882	0.122 563	0.105 256	0.081 431	0.119 240	0.122 563	0.099 904
MAPK signaling pathway	4010	0.070 869	0.074 694	0.093 641	0.108 591	0.095 844	0.096 192	0.106 520	0.108 591	0.094 368
PI3K-Akt signaling pathway	4151	0.086 445	0.078 015	0.064 439	0.115 134	0.094 658	0.090 569	0.109 902	0.115 134	0.094 287
apoptosis	4210	0.065 255	0.097 970	0.064 520	0.111 815	0.097 970	0.083 660	0.116 907	0.114 764	0.094 108
proteoglycans in cancer	5205	0.071 809	0.073 351	0.072 969	0.098 226	0.093 575	0.075 282	0.104 989	0.098 226	0.086 053
hepatitis B	5161	0.064 949	0.058 996	0.103 297	0.088 425	0.074 580	0.069 437	0.085 256	0.088 425	0.079 171
HTLV-I infection	5166	0.048 080	0.076 888	0.081 808	0.087 564	0.076 888	0.077 000	0.092 876	0.087 564	0.078 584
viral carcinogenesis	5203	0.076 731	0.061 472	0.079 122	0.090 901	0.077 056	0.061 416	0.087 732	0.090 901	0.078 166
Alzheimer's disease	5010	0.067 438	0.061 036	0.056 829	0.092 178	0.089 009	0.074 091	0.089 910	0.093 079	0.077 946
neurotrophin signaling pathway	4722	0.069 461	0.054 436	0.078 593	0.087 446	0.073 601	0.084 277	0.084 277	0.087 446	0.077 442
chronic myeloid leukemia	5220	0.062 864	0.059 385	0.058 089	0.088 814	0.074 969	0.077 680	0.085 645	0.088 814	0.074 533
neuroactive ligand-receptor interaction	4080	0.049 194	0.081 240	0.016 951	0.094 050	0.086 842	0.065 831	0.091 065	0.100 225	0.073 175
epstein-barr virus infection	5169	0.046 184	0.068 214	0.067 229	0.082 471	0.071 795	0.073 109	0.082 471	0.082 471	0.071 743
hepatitis C	5160	0.059 189	0.045 772	0.096 161	0.075 201	0.061 356	0.072 032	0.082 170	0.075 201	0.070 885
prostate cancer	5215	0.063 660	0.051 142	0.067 128	0.080 571	0.066 726	0.069 437	0.086 441	0.080 571	0.070 710
metabolic pathways	1100	0.068 313	0.047 905	0.045 712	0.069 247	0.065 023	0.070 793	0.083 184	0.077 646	0.065 978
transcriptional misregulation in cancer	5202	0.059 326	0.056 926	0.071 043	0.069 169	0.056 926	0.048 139	0.083 380	0.070 853	0.064 470
colorectal cancer	5210	0.054 273	0.053 505	0.061 280	0.072 258	0.069 089	0.058 761	0.069 089	0.072 258	0.063 814
tuberculosis	5152	0.048 583	0.050 753	0.045 818	0.080 182	0.066 337	0.061 194	0.077 013	0.080 182	0.063 758
TNF signaling pathway	4668	0.045 518	0.045 366	0.070 104	0.071 626	0.060 950	0.061 298	0.074 703	0.074 703	0.063 034
measles	5162	0.039 752	0.062 491	0.042 505	0.074 136	0.062 491	0.073 167	0.073 167	0.074 136	0.062 731
melanoma	5218	0.045 004	0.055 251	0.040 776	0.075 063	0.071 894	0.063 929	0.071 894	0.075 063	0.062 359
pancreatic cancer	5212	0.054 621	0.043 177	0.054 682	0.072 606	0.058 761	0.069 437	0.069 437	0.072 606	0.061 916
chagas disease (American trypanosomiasis)	5142	0.030 418	0.038 880	0.078 105	0.069 298	0.058 622	0.069 298	0.069 298	0.069 298	0.060 402
glioma	5214	0.044 357	0.051 142	0.040 776	0.070 307	0.070 307	0.062 342	0.070 307	0.070 307	0.059 981
influenza A	5164	0.035 176	0.037 624	0.083 137	0.063 884	0.053 208	0.066 93	0.068 916	0.068 916	0.059 724

续表 5

通路	KEGG ID	加权得分									平均值
		冬虫夏草	胡芦巴	韭菜子	肉苁蓉	沙苑子	菟丝子	仙茅	续断		
chemokine signaling pathway	4062	0.040 066	0.042 756	0.044 643	0.073 174	0.062 498	0.067 889	0.073 174	0.073 174	0.059 672	
HIF-1 signaling pathway	4066	0.046 798	0.036 469	0.051 038	0.070 559	0.059 883	0.070 559	0.070 559	0.070 559	0.059 553	
non-small cell lung cancer	5223	0.052 094	0.043 177	0.045 344	0.065 511	0.062 342	0.062 342	0.066 910	0.065 511	0.057 904	
ras signaling pathway	4014	0.048 150	0.033 186	0.029 490	0.072 340	0.058 495	0.069 171	0.069 171	0.072 340	0.056 543	
small cell lung cancer	5222	0.045 748	0.048 668	0.052 385	0.059 344	0.048 668	0.053 853	0.069 224	0.059 344	0.054 654	
osteoclast differentiation	4380	0.034 219	0.032 402	0.074 318	0.058 662	0.047 986	0.058 662	0.066 621	0.058 662	0.053 942	
endometrial cancer	5213	0.043 945	0.043 177	0.040 776	0.061 930	0.058 761	0.058 761	0.058 761	0.061 930	0.053 505	
herpes simplex infection	5168	0.048 939	0.043 643	0.075 967	0.057 062	0.043 643	0.043 991	0.054 319	0.057 062	0.053 078	
non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	4932	0.034 199	0.045 063	0.069 767	0.055 739	0.045 063	0.040 529	0.065 877	0.055 739	0.051 497	
estrogen signaling pathway	4915	0.031 156	0.034 141	0.048 195	0.053 883	0.053 883	0.053 883	0.065 297	0.053 883	0.049 290	
pertussis	5133	0.045 365	0.024 182	0.080 245	0.050 442	0.039 766	0.043 160	0.055 474	0.055 474	0.049 264	
toxoplasmosis	5145	0.045 069	0.028 313	0.054 397	0.057 742	0.043 897	0.044 245	0.059 885	0.057 742	0.048 911	

表 6 补肾阳中药 21 个核心靶蛋白及其功能

Table 6 Twenty-one core target protein and their functions of kidney-yang tonifying herbs

基因	靶蛋白名称	功能
TP53	tumor protein P53	抗癌、衰老
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	T 细胞相关调节、炎症反应、衰老
JUN	transcription factor AP-1	抗癌、衰老
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	其他
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	性激素的调节、T 细胞相关调节
TNF	tumor necrosis factor	炎症反应、抗癌
CXCL8	interleukin 8	炎症反应、抗癌
ESR1	estrogen nuclear receptor alpha	性激素的调节
NFKB1	nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit isoform 1	T 细胞相关调节、炎症反应、抗癌
CASP3	caspase-3 preproprotein	性激素的调节、T 细胞相关调节、抗癌
ATM	serine-protein kinase ATM	抗癌、衰老
AR	androgen receptor	性激素的调节
BRCA1	breast cancer 1	性激素的调节、抗癌
ABL1	tyrosine-protein kinase ABL1	T 细胞相关调节、衰老
IL1B	interleukin-1 beta proprotein	T 细胞相关调节、炎症反应、衰老
NCOA1	nuclear receptor coactivator 1 isoform 1	性激素的调节
MDM2	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 isoform a	性激素的调节
PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma	性激素的调节、炎症反应
HIF1A	hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit	T 细胞相关调节、炎症反应
NR3C1	glucocorticoid receptor isoform gamma	其他
IL2	T-cell growth factor	T 细胞相关调节、炎症反应

数据库的 CID 号,红色三角形节点代表靶点(21 个),而边则表示活性成分与靶点的相互作用关系。补肾阳中药发挥药效的成分有黄酮类(22 个)、生物碱类(10 个)、萜类(10 个)、甾体类(10 个)、脂肪族类(9 个)、糖苷类(7 个)、酚类(4 个)、苯丙素类(3 个)、含硫化合物(1 个)以及吡啶衍生物(2 个)。

其中黄酮类成分最多,平均每个化合物作用 11.6 个靶点,度值最大的是 5280863(山柰酚, kaempferol)、5281643(金丝桃苷, hyperoside)及 5280961(染料木黄酮, genistein)均为 13 个靶点;甾体类平均每个化合物作用 7.5 个靶点,度值最大的是 246520(胆固醇棕榈酸酯, cholesteryl palmitate)和 12304433

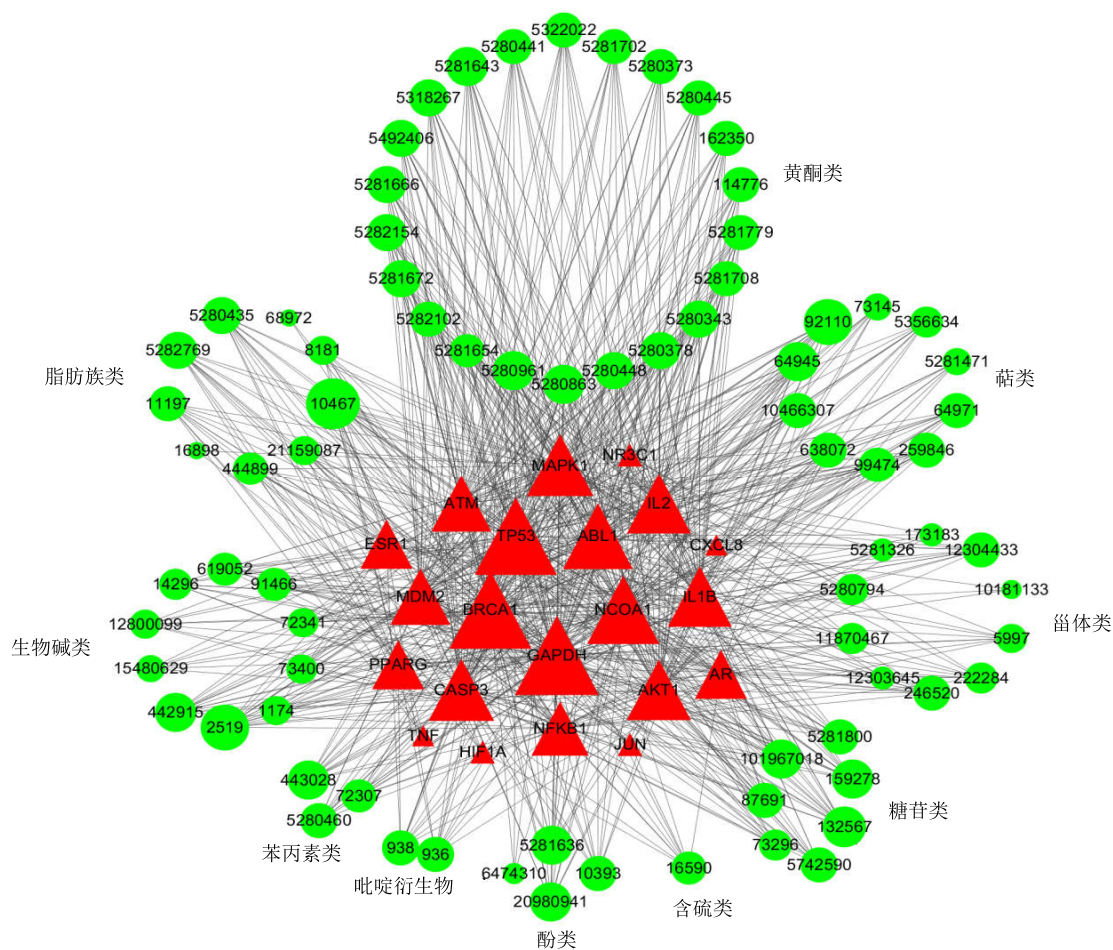


图 1 成分-关键靶点网络

Fig. 1 Component-key target protein network

(新替告皂苷元, neotigogenin) 均为 11 个靶点; 生物碱类平均每个化合物作用 9.8 个靶点, 度最大的是 2519 (咖啡因, caffeine) 有 17 个靶点, 其次为 442915 (臭山羊碱, japonine) 有 13 个靶点; 萜类平均每个化合物作用 10.8 个靶点, 度值最大的是 92110 (环阿廷醇, cycloartenol) 有 17 个靶点, 其次为 64945 (熊果酸, ursolic acid) 有 13 个靶点。以上可以看出不同类型成分的作用靶点数目不同。所有的活性化合物都作用于至少一个或多个关键靶点, 说明本研究获得的关键靶点群在所有靶点中具有代表性, 可能是归肾经补阳药的主要活性靶点群。

### 2.7 药材-关键靶点-PPI 网络

通过 STRING 数据库建立 21 个关键靶点之间的相互作用关系 (combined\_scores 值大于 0.9), 通过 Cytoscape 3.6.0 构建药材-关键靶点-PPI 网络, 如图 2 所示, 共有 29 个节点, 157 条边。粉红色圆形节点表示关键靶点 (21 个), 绿色三角形节点代表

归肾经补阳中药 (8 个)。补肾阳药平均作用于 12.4 个关键靶点, 其中仙茅的关键靶点最多有 17 个, 续断和肉苁蓉有 13 个关键靶点, 韭菜子和沙苑子有 12 个关键靶点、冬虫夏草和胡芦巴有 11 个关键靶点, 菟丝子有 10 个关键靶点。每个关键靶点平均关联的药材数量约为 4.7 个, 并非每味补肾阳药都直接作用于这些关键靶点, 而是通过复杂的 PPI 网络间接相互作用, 共同发挥温补肾阳的作用。

### 2.8 关键靶点-通路网络

通过 Cytoscape 3.6.0 构建关键靶点-通路网络, 如图 3 所示, 共有 61 个节点, 228 条边。红色三角形节点表示关键靶点 (21 个), 绿色圆形节点代表信号通路 (40 个), 数字编号来源于 KEGG 数据中的通路编号, 边代表靶点和信号通路之间的相互关系。归肾经补阳药主要信号通路 40 条, 其中神经内分泌相关信号通路 6 条、细胞和免疫相关信号通路 4 条、信号转导相关信号通路 5 条、癌症相关信号

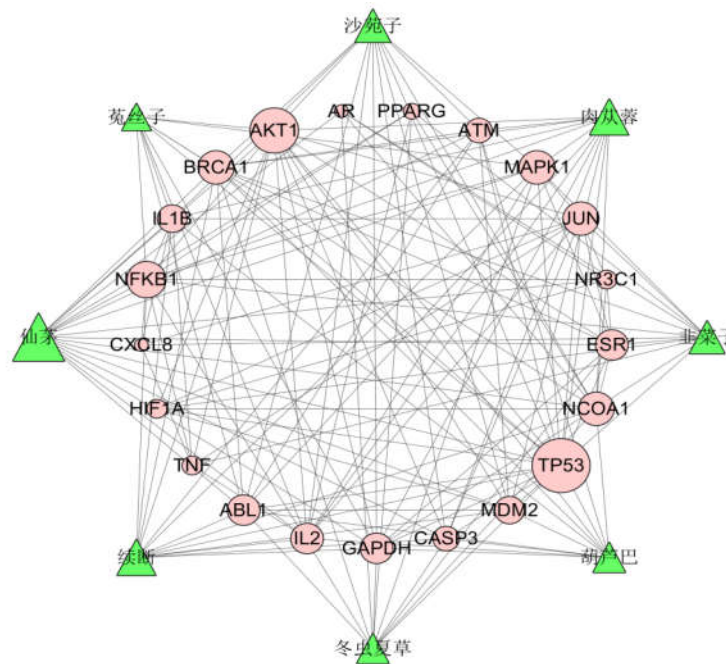


图 2 药材-关键靶点-PPI 网络

Fig. 2 Herb-key target-protein PPI network

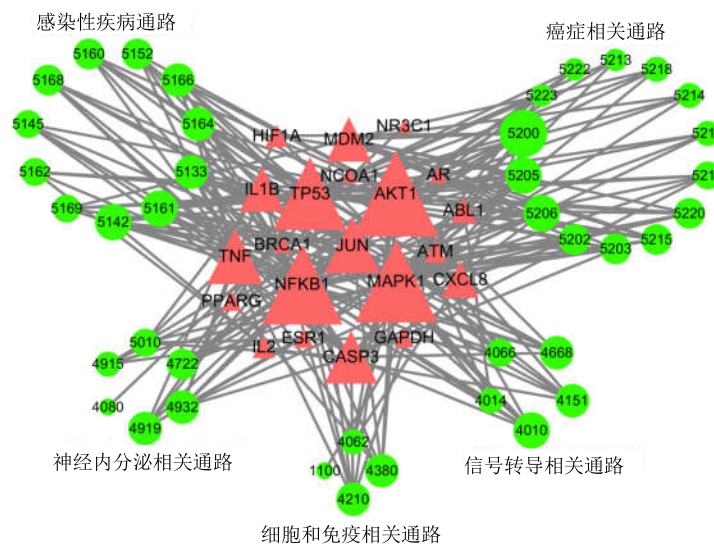


图 3 关键靶点-通路网络

Fig. 3 Key target protein-pathway network

通路 14 条以及感染性疾病通路 11 条。信号转导相关通路中度值前 3 位的为 4010 (MAPK 信号通路, MAPK signaling pathway) 富集了 8 个关键靶点, 4151 (PI3K-Akt 信号通路, PI3K-Akt signaling pathway) 和 4668 (TNF 信号通路, TNF signaling pathway) 均富集了 7 个关键靶点; 神经内分泌相关通路中度值前 4 位的为 4919 (甲状腺激素信号通路, thyroid hormone signaling pathway) 富集了 7 个关键

靶点、4722 (神经营养因子信号通路, neurotrophin signaling pathway) 富集了 6 个关键靶点、5010 (Alzheimer's disease, 阿尔茨海默病) 富集了 5 个关键靶点、4915 (雌激素信号通路, estrogen signaling pathway) 富集了 4 个关键靶点; 细胞和免疫相关通路度值前 3 位的为 4210 (细胞凋亡, apoptosis) 和 4380 (破骨细胞分化, osteoclast differentiation) 均富集了 7 个关键靶点以及 4062 (趋化因子信号通路,

chemokine signaling pathway)富集了 4 个关键靶点; 癌症相关通路中的度值最大的是 5200 (pathways in cancer) 富集了 12 个关键靶点; 感染性疾病通路中的度值最大的是 5142 (南美锥虫病, chagas disease) 和 5161 (乙型肝炎, hepatitis B) 均富集了 8 个关键靶点。补肾阳中药既可通过不同靶点与同一通路相连接, 也可通过同一靶点与不同的通路相连接, 说明不同的补肾阳药其靶点具有协同作用, 充分体现了补肾阳中药多靶点、多通路的复杂机制。

### 3 讨论

肾阳虚证是中医常见症候之一, 其发病机制是因肾脏阳气不足, 温煦功能减弱所引起的, 现代机制研究涉及神经、免疫、内分泌等多系统功能的紊乱, 表现为一个复杂的、多维的分子网络失衡状态<sup>[18]</sup>。

蛋白质分子在整个生物学过程中并非彼此独立毫不干涉, 往往通过与大量生物分子的相互作用来实现一定的生物学功能。本研究尝试以网络药理学的方法, 通过 PPI 网络对归肾经补阳药进行分析, 8 味药中的不同成分具有共同或相似的靶点, 共同发挥温补肾阳的功效。关键靶点对肾阳虚证密切相关的 T 细胞功能变化、性激素水平异常、衰老等现象具有调节作用。肾虚与衰老具有共同的外部证候, 肾虚证的辨证标准如腰脊酸痛、腿软、耳鸣耳聋、齿落发脱、性功能减退等都是老年人生理机能衰退的表现<sup>[19]</sup>。沈自尹<sup>[19]</sup>提出肾虚证是未老先衰, 而衰老就是生理性肾虚。T 淋巴细胞是免疫系统的重要组成部分, T 细胞过早、过度凋亡是 T 细胞数量减少及功能低下的重要机制。郭为民等<sup>[20]</sup>研究发现 2 个补肾复方均能有效降低皮质酮大鼠 (肾阳虚证大鼠) T 细胞的过度凋亡, 下调促凋亡基因 FASL 及 TNFR1 的表达, 同时上调抗凋亡基因 BCL-2、TNFR2、CIAP1、CIAP2 的表达, 抑制 Caspase-8、Caspase-3 的凋亡级联反应。TNFR1 (TNF- $\alpha$ ) 和 TNFR2 (TNF- $\beta$ ) 均是 TNF 作用的受体<sup>[21]</sup>, TNF 蛋白可能为补肾阳中药核心靶蛋白。

通路富集结果显示甲状腺激素信号通路、神经营养因子信号通路、阿尔茨海默病 (AD) 及雌激素信号通路为补肾阳中药调节神经内分泌相关的主要通路。临床研究表明<sup>[22]</sup>, 肉苁蓉总苷胶囊可以延缓中度 AD 患者的认知能力减退、海马体积萎缩, 并降低 AD 患者脑脊液中总 tau 蛋白和炎症因子的水平。补肾阳中药肉苁蓉提取物能增加 C6 细胞中神经生长因子 (NGF) 的水平, 促进 PC12 细胞的神经

突起的延伸, 刺激小鼠皮质和海马区 NGF 的产生, 促进海马区神经细胞的分化、轴突生长和突触形成<sup>[23]</sup>。沈自尹<sup>[24]</sup>采用现代医学知识和方法进行“肾”本质的探索性研究, 得出肾阳虚证患者下丘脑-垂体及其所辖的 3 个靶腺 (性腺、甲状腺和肾上腺皮质) 轴功能上均有一定程度的退化, 温补肾阳中药治疗后, 这 3 个靶腺功能明显恢复, 提出温补肾阳中药可调整改善这 3 个靶腺轴上的隐潜性变化。肾阳虚证患者临床指标就性激素水平而言, 表现在血清睾酮 (T) 浓度降低、雌二醇 (E<sub>2</sub>) 浓度升高、促黄体激素 (LH) 浓度升高<sup>[25]</sup>。本研究核心靶点与性激素调节相关的有 AR、BRCA1、CASP3、ESR1、MAPK1、MDM2、NCOA1、PPARG。其中雄激素受体 (AR) 已有研究表明其浓度的降低可以作为肾阳虚证的一个诊断标准及标志<sup>[26]</sup>, 其他靶点还有待实验验证, 可能也是肾阳虚证的诊断标志。补肾阳中药菟丝子提取物对雄激素部分缺乏大鼠具有生殖保护作用, 能显著提高血清睾酮浓度、增加大鼠体质量、增加生殖器官睾丸的质量<sup>[27]</sup>。

补肾阳中药活性成分主要分为 5 大类: 黄酮类、生物碱类、萜类、甾体类以及脂肪族类, 其中黄酮类占总成分的 28%, 5 类成分共占总成分的 78.2%。补肾阳中药菟丝子主要成分为黄酮类化合物, 对雄性生殖系统、生殖内分泌的功能具有促进作用, 具有促性腺激素 (HCG) 样作用<sup>[27]</sup>。补肾阳中药性激素样作用可能的黄酮类活性成分为山柰酚、染料木黄酮、异鼠李素、金丝桃苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、槲皮素、沙苑子苷、山柰素、大豆黄酮、德鸢尾素、异苾草素、异牡荆苷、木犀草素、鹰嘴豆芽素 A、小麦黄素、牡荆素、毛蕊异黄酮-7-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、黄芪苷等。其中毛蕊异黄酮<sup>[28]</sup>、槲皮素<sup>[29]</sup>、大豆黄酮<sup>[30]</sup>及鹰嘴豆芽素 A<sup>[31]</sup>等绝大多数化合物已被证实具有植物雌激素作用。补肾阳中药可能通过这些成分发挥性激素调节作用。

综上, 本研究首次将网络药理学方法联合加权 PageRank 算法应用到中药药效分类研究中, 试图挖掘归肾经补阳药的特性。通过对代表性补肾阳中药活性成分的系统网络分析, 发现了该类中药入体后作用的分子靶标和主要信号通路, 后续将以另一种补肾阳药的网络药理学研究为切入点加以验证这项成果的准确性。本项研究尽管有一些新的发现, 但还有很多局限性: ①由于数据库中信息不完全, 归肾经补阳药中的一些化合物可能会被忽略。②一些



活性成分在筛选过程中可能会被遗漏。③并未考虑药材所含的成分入体之后的代谢转化。④肾阳虚证十分复杂,涉及面广,本研究难以全面解释其治疗肾阳虚证的作用机制。因此,在以后的研究中,针对肾阳虚证某一种重要疾病发生机制进行网络药理学研究是必要的。

参考文献

[1] 王瑞鹤. 补肾阳中药的现代药理作用研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(4): 63-66.

[2] 盛蕾, 刘元月, 胡丹, 等. 柴胡疏肝散治疗卒中后抑郁的网络药理学研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3509-3515.

[3] 高耀, 吴丹, 田俊生, 等. 逍遥散和开心散“同病异治”抑郁症的网络药理学作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3483-3492.

[4] 白隆博, 马逍遥, 常念伟, 等. 基于整合网络药理学和化学物质组学的灯台叶片的抗炎作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3861-3867.

[5] Liu C X, Liu R, Fan H R, *et al.* Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1): 3-17.

[6] Liu J L, Pei M J, Zheng C L, *et al.* A Systems-pharmacology analysis of herbal medicines used in health improvement treatment: Predicting potential new drugs and targets [J]. *Evid Based Compl Altern Med*, 2013, 2013: 1-17.

[7] 余甘树, 林育愉, 吴钉红. 中药抗凝血作用的网络药理学 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 224-230.

[8] 高学敏. 中药学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013.

[9] Brin S. The anatomy of a large-scale hypertextual web search engine [J]. *Computer Networks ISDN Syst*, 1998, 30(1): 107-117.

[10] Page L. The PageRank citation ranking: Bringing order to the Web, online manuscript [J]. *Stanford Dig Lib Work Paper*, 1999, 9(1): 1-14.

[11] 洪海燕. 基于 PPI 网络的关键蛋白质识别方法研究及应用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2017.

[12] von Mering C, 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: D433-D437.

[13] 马纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 221-224.

[14] 汤喜兰, 刘建勋, 李澎, 等. 山柰酚和槲皮素对乳鼠心肌缺氧复氧及过氧化损伤的保护作用 [J]. 中药药理

与临床, 2012, 28(1): 56-59.

[15] 肖志彬, 刘小雷, 成日青, 等.  $\beta$ -谷甾醇对阿司匹林致胃黏膜损伤副作用及其药理作用的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 148-152.

[16] 王健, 孙瑜, 陈磊, 等. 芒柄花素的现代研究进展 [J]. 山西中医学院学报, 2017, 18(5): 74-76.

[17] 杨晓燕, 母得志. 咖啡因在早产儿的应用及其对预后的影响 [J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33(5): 346-348.

[18] 沈自尹. 中西医结合肾本质研究回顾 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 304-306.

[19] 沈自尹. 补肾法调节肾阳虚证 T 细胞凋亡的规律—重塑基因平衡 [J]. 中西医结合学报, 2004, 2(5): 321-322.

[20] 郭为民, 沈自尹, 陈瑜, 等. 补肾、活血类复方对老年大鼠 T 细胞凋亡相关基因表达调控模式的比较研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(3): 203-217.

[21] Ono M, Horita S, Sato Y, *et al.* Structural basis for tumor necrosis factor blockade with the therapeutic antibody golimumab [J]. *Protein Sci*, 2018, 27(6): 1038-1046.

[22] Li N, Wang J, Ma J, *et al.* Neuroprotective effects of *Cistanches Herba* therapy on patients with moderate Alzheimer's disease [J]. *Evid Based Comp Alter Med*, 2015, 2015: 1-12.

[23] Jin G C, Moon M, Jeong H U, *et al.* *Cistanches Herba* enhances learning and memory by inducing nerve growth factor [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 216(2): 652-658.

[24] 沈自尹. 肾阳虚证的下丘脑-垂体-甲状腺、性腺、肾上腺皮质轴功能的对比观察 [J]. 医学研究通讯, 1983(10): 21-22.

[25] 王文健, 沈自尹, 张新民, 等. 肾阳虚患者和老年人(男性)的下丘脑-垂体-性腺轴功能初步观察 [J]. 中西医结合杂志, 1982, 2(3): 149-152.

[26] 杨宏杰, 赵瑛, 郑敏, 等. 阳虚证患者雄激素受体及其服助阳药前后受体变化的研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 1999, 6(3): 179-180.

[27] 章振保, 杨庆涛, 杨镜秋, 等. 淫羊藿甙、菟丝子提取物对雄激素部分缺乏大鼠生殖保护作用的比较研究 [J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(10): 1389-1392.

[28] 包龙棠. 毛蕊异黄酮对心肌肥厚影响的实验研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2017.

[29] 李炜, 牛建昭, 王继峰, 等. 槲皮素的植物雌激素作用及其受体机制研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(2): 91-95.

[30] 赵必迁. 大豆黄酮在产蛋鸡生产上应用的研究进展 [J]. 广东饲料, 2017, 26(8): 31-33.

[31] 周延萌, 童玲, 张雪, 等. 鹰嘴豆芽素 A 对过氧化氢诱导大鼠原代海马神经元损伤的作用及抗凋亡机制 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(10): 809-814.