

基于网络药理学及分子对接技术探究 润肺益肾饮治疗糖尿病肾病的作用机制

曹宇翔^{1*}, 黄海玲², 高智^{3#}

¹湖北中医药大学中医临床学院, 湖北 武汉

²湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉

³武汉市中医医院肾病科, 湖北 武汉

收稿日期: 2023年3月13日; 录用日期: 2023年4月19日; 发布日期: 2023年4月29日

摘要

目的: 利用网络药理学方法来探讨润肺益肾饮治疗糖尿病肾病的作用机制。方法: 通过TCMSP数据库获取润肺益肾饮的主要化学成分及其靶点, 并运用UniProt数据库和SwissTargetPrediction数据库对靶点信息进行矫正和补充; 通过Genecards数据库, 筛选糖尿病肾病的相关靶点; 利用bioinformatics网站, 获取药物和疾病的交集靶点; 通过Cytoscape 3.9.1软件构建“药物-成分-靶点”网络; 采用STRING数据库构建PPI网络, 获取关键靶点; 对交集靶点进行基因本体论(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析; 此外, 通过分子对接实验对核心成分和关键靶点进行对接验证。结果: 通过筛选得到润肺益肾饮活性成分56个以及相应的作用靶点630个, 得到糖尿病肾病相关的基因靶点1022个, 二者共同靶点172个。进一步网络分析显示, 主要活性成分为 β -谷甾醇、槲皮素、花生四烯酸、啤酒甾醇等; 关键靶点为SRC、STAT3、MAPK3、MAPK1、AKT1、EGFR等; KEGG富集分析交集靶点主要富集在AGE-RAGE信号通路中; 分子对接结果显示核心成分与核心靶点具有较好的构象。结论: 润肺益肾饮对于糖尿病肾病的治疗具有多成分、多靶点、多通路的特点, 可能通过抑制炎症、抗纤维化、调控自噬等发挥治疗糖尿病肾病的作用。

关键词

润肺益肾饮, 糖尿病肾病, 网络药理学, 分子对接, 作用机制

Exploring the Mechanism of Runfei Yishen Decoction in the Treatment of Diabetes Nephropathy Based on Network Pharmacology

*第一作者。

#通讯作者。

Yuxiang Cao^{1*}, Hailing Huang², Zhi Gao^{3#}

¹Clinical School of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan Hubei

²School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan Hubei

³Department of Nephrology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Hubei

Received: Mar. 13th, 2023; accepted: Apr. 19th, 2023; published: Apr. 29th, 2023

Abstract

Objective: this paper uses network pharmacology to explore the mechanism of Runfei Yishen Decoction in the treatment of diabetes nephropathy by network pharmacology. **Methods:** The main chemical components and targets of Runfei Yishen Decoction were obtained through TCMSP database, and the target information was corrected and supplemented by UniProt database and SwissTargetPrediction database. Through the Genecards database, relevant targets of diabetic nephropathy were screened; use the Bioinformatics website to access targets at the intersection of drugs and diseases; build a drug-ingredient-target network through Cytoscape 3.9.1 software; the STRING database is used to construct a PPI network to obtain key targets. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of intersection targets; in addition, the core components and key targets were verified by molecular docking experiments. **Results:** Through screening, 56 active ingredients and 630 corresponding targets were obtained, and 1022 gene targets related to diabetic nephropathy were obtained, and 172 common targets were obtained. Further network analysis showed that the main active ingredients were beta-sitosterol, quercetin, arachidonic acid (AA), cerevisterol, etc. The key targets are SRC, STAT3, MAPK3, MAPK1, AKT1, EGFR, etc. The key targets of KEGG enrichment analysis were mainly enriched in the AGE-RAGE signaling pathway. The results of molecular docking showed that the core components and the core targets had good conformation. **Conclusion:** Runfei Yishen Decoction has the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway for the treatment of diabetic nephropathy, and may play a role in the treatment of diabetic nephropathy by inhibiting inflammation, anti-fibrosis and regulating autophagy.

Keywords

Runfei Yishen Decoction, Diabetic Nephropathy, Network Pharmacology, Molecular Docking, Action Mechanism

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着人们的生活方式和生活水平发生的巨大的改变，肥胖已经成为了一个公共卫生问题，随之糖尿病患者也越来越多，流行病学研究表明，2015年成人糖尿病患病率约为8.8%，到2024年这一数字将上升到10.4%。随着糖尿病患病率的逐年增加，糖尿病肾病患者数量也大幅度增多[1]。糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是糖尿病常见的微血管并发症，其临床症状主要为持续性蛋白尿、高血糖、高血压、水肿、肾小球滤过率低，如果不能有效地治疗，最终会发展为慢性肾脏病(Chronic Kidney Disease, CKD)

和终末期肾病(Endstage Renal Disease, ESRD) [2]。目前, 针对 DN 的临床治疗仍以控制血糖、降低血压、降低尿蛋白为主, 常用 DPP-4 抑制剂、SGLT2 抑制剂、RAAS 抑制剂等来降糖、降压、控治蛋白尿[3], 但不能有效阻断糖尿病肾病的进展, 当发展为终末期肾病, 将行肾脏替代疗法, 严重影响患者生活质量, 加重家庭及社会负担, 因此能够有效延缓或阻断 DN 进展的药物有待开发。

润肺益肾饮是为武汉市中医医院的院内制剂, 已有 20 多年的临床使用记录, 在治疗 DN 方面有着显著疗效, 主要成分包括冬虫夏草、茯苓、红参、西洋参、枸杞子。在中医学理论中“肺”“肾”两脏关系密切, 现代不少医家主张“肺肾同治” [4] [5]。而方中冬虫夏草、红参、西洋参均入肺经, 在补脾益肾的基础上注重调理肺之功能, 以达到补肺阴以滋肾水、肺肾协同调控水液的输布及代谢之效果。现代药理学研究显示, 冬虫夏草可降低 DN 患者蛋白尿, 改善肾功能[6]。茯苓具有抗炎、抗癌、护肝、调节免疫等药理作用[7], 其主要成分茯苓多糖可以抑制肝脏糖异生, 能够有效降低 2 型糖尿病大鼠的血糖水平[8], 且对肾脏有保护作用[9]。红参、西洋参、枸杞子均有良好的降血糖作用[10] [11], 其中, 枸杞子的主要成分——枸杞多糖, 还可通过抑制 NF- κ B 活化来改善 DN 的炎症[12]。此外, 已有临床研究表明, 润肺益肾饮能够改善行维持性血液透析的肾脏病患者的微炎症状态, 提高其生活质量[13] [14]。但润肺益肾饮治疗 DN 的作用机制尚不清楚, 因此本研究采用网络药理分析方法, 对润肺益肾饮治疗 DN 的活性成分和靶点及相关通路进行筛选, 并构建了药理学网络, 以进一步揭示其分子作用机制, 为润肺益肾饮后续研究和临床应用提供理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 润肺益肾饮的活性成分筛选和潜在靶点的预测

在 TCMSP 数据库(<https://old.tcm-sp-e.com/>)中检索润肺益肾饮中的相关药物。在口服生物利用度(Oral Bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(Drug Likeness, DL) ≥ 0.18 的条件下, 并结合相关文献报道, 获得冬虫夏草、茯苓、红参、西洋参、枸杞子的活性成分。通过 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)逐一检索活性成分的潜在靶点信息, 获得相应的药物靶点基因名称。对于其他尚未检索到的活性成分, 首先, 从 PubChem 网站(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载其化学成分的 2D 结构并以 SDF 格式保存, 然后逐个提交到 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 以获得相应的化合物靶点。

2.2. DN 相关靶点的筛选

以“Diabetic Nephropathy”为关键词, 使用 Genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>)进行检索, 获得 DN 的相关靶点。

2.3. 润肺益肾饮与 DN 共同靶点的筛选

利用微生信网站(<https://www.bioinformatics.com/>), 导入药物活性成分的潜在靶点和 DN 的疾病靶点, 得到作用于 DN 的润肺益肾饮活性成分的预测靶点, 并绘制韦恩图。

2.4. 蛋白质 - 蛋白质相互作用(PPI)网络构建和分析

将预测靶点基因上传到 STRING 数据库, 将物种限制为“Homo sapiens”, 选择得分条件大于 0.90 的中等置信度, 并将分离的蛋白质隐藏在图中, 构建蛋白相互作用的 PPI 网络。然后, 使用 Cytoscape 3.9.1 软件对 PPI 网络数据进行可视化和分析, 并利用 CytoNCA 插件进一步获取核心靶标。选择介于中心性、接近度中心性和度中心性作为计算 PPI 网络拓扑特征参数。

2.5. “药物 - 成分 - 靶点”网络构建和分析

将润肺益肾饮中主要药物、活性成分以及交集靶点基因导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中, 构建“药物 - 成分 - 靶点”网络。

2.6. GO 和 KEGG 途径富集分析

DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)可用于基因本体论(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)的注释、可视化和集成发现, 采用 DAVID 数据库对潜在靶点进行富集分析。GO 富集分析包括生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)。GO 和 KEGG 的富集结果通过设置 $P < 0.01$ 获得。

2.7. 分子对接

应用 Pubchem 数据库获得核心成分的 Smile 号, 再借助 Open Babe GUI 2.4.1 软件以 mol 格式保存, 从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载核心靶标的 PDB 格式文件。运用分子对接软件对蛋白质进行预处理, 进行蛋白质氨基酸残基的修复、加氢加电荷操作、设置力场参数、删除水分子、能量最小化, 之后对配体进行能量最小化操作, 最后利用 AutoDock Vina 1.1.2 分子对接软件进行分子对接。对接完成后得到每个蛋白和配体的复合物的对接打分值, 打分值越低, 配体与受体结合越稳定。

3. 结果

3.1. 润肺益肾饮的活性成分筛选和潜在靶点的预测

经 TCMSp 数据库检索, 以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件, 获取药物活性成分, 冬虫夏草 7 种、茯苓 15 种、红参 4 种、西洋参 8 种、枸杞子 31 种, 其中冬虫夏草、茯苓共有成分为 cerevisterol, 冬虫夏草、枸杞子共有成分为 CRL, 冬虫夏草、红参、西洋参、枸杞子共有成分为 beta-sitosterol, 红参、西洋参共有成分为 ginsenoside rh2, 西洋参、枸杞子共有成分为 daucosterol_{qt}, 除去重复成分, 最后获取活性成分 58 种, 如表 1 所示。使用 UniProt 数据库以及 SwissTarget 数据库检索活性成分的靶点基因, 剔除重复数据后, 得到润肺益肾饮靶点基因共 630 个。

Table 1. The main active ingredients of Runfei Yishen Decoction

表 1. 润肺益肾饮的主要活性成分

成分	MOL 编号	化合物名称	OB/%	DL
冬虫夏草	MOL001439	arachidonic acid	45.57	0.2
	MOL001645	Linoleyl acetate	42.1	0.2
	MOL011169	Peroxyergosterol	44.39	0.82
	MOL008999	cholesteryl palmitate	31.05	0.45
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL008998	cerevisterol	39.52	0.77
	MOL000953	CRL	37.87	0.68
茯苓	MOL000273	16 α -Hydroxydehydrotrametenolic acid	30.93	0.81
	MOL000275	trametenolic acid	38.71	0.8
	MOL000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	35.11	0.81

Continued

	MOL000280	Dehydrotumulosic acid	31.07	0.82
	MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.51	0.72
	MOL000283	Ergosterol peroxide	40.36	0.81
	MOL000285	Polyporenic acid C	38.26	0.82
	MOL000287	Eburicoic acid	38.7	0.81
	MOL000289	pachymic acid	33.63	0.81
	MOL000290	Poricoic acid A	30.61	0.76
	MOL000291	Poricoic acid B	30.52	0.75
	MOL000292	poricoic acid C	38.15	0.75
	MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
	MOL000300	dehydroeburicoic acid	44.17	0.83
	MOL008998	cervisterol	39.52	0.77
	MOL002032	DNOP	40.59	0.4
红参	MOL002372	(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene	33.55	0.42
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL005344	ginsenoside rh2	36.32	0.56
	MOL011394	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hydroxymethyl)-6-[[[(3S,5R,8R,9R,10R,12R,13R,14R,17S)-12-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-17-[(2S)-6-methyl-2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyhept-5-en-2-yl]-2,3,5,6,7,9,11,12,13,15,16,17-dodecahydro-1H-c	36.43	0.25
西洋参	MOL011442	(8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R,4R)-4-ethyl-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-1,2,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-7-one	43.87	0.75
	MOL011455	20-Hexadecanoylengenol	32.7	0.65
	MOL006774	stigmast-7-enol	37.42	0.75
	MOL006980	papaverine	64.04	0.38
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
	MOL008173	daucosterol_qt	36.91	0.75
	MOL005344	ginsenoside rh2	36.32	0.56
	MOL001323	Sitosterol alpha1	43.28	0.78
枸杞子	MOL003578	Cycloartenol	38.69	0.78
	MOL001494	Mandenol	42	0.19
	MOL001495	Ethyl linolenate	46.1	0.2

Continued

MOL001979	LAN	42.12	0.75
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
MOL005438	campesterol	37.58	0.71
MOL006209	cyenin	47.42	0.76
MOL007449	24-methylidenelophenol	44.19	0.75
MOL008400	glycitein	50.48	0.24
MOL010234	delta-Carotene	31.8	0.55
MOL009617	24-ethylcholest-22-enol	37.09	0.75
MOL009618	24-ethylcholesta-5,22-dienol	43.83	0.76
MOL009622	Fucosterol	43.78	0.76
MOL009634	31-norlanosterol	42.2	0.73
MOL009639	Lophenol	38.13	0.71
MOL009640	4alpha,14alpha,24-trimethylcholesta-8,24-dienol	38.91	0.76
MOL009641	4alpha,24-dimethylcholesta-7,24-dienol	42.65	0.75
MOL009642	4alpha-methyl-24-ethylcholesta-7,24-dienol	42.3	0.78
MOL009653	Cycloeucalenol	39.73	0.79
MOL009660	methyl(1R,4aS,7R,7aS)-4a,7-dihydroxy-7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,5,6,7a-tetrahydrocyclopenta[d]pyran-4-carboxylate	39.43	0.47
MOL009662	Lantadene A	38.68	0.57
MOL009665	Physcion-8-O-beta-D-gentiobioside	43.9	0.62
MOL009677	lanost-8-en-3beta-ol	34.23	0.74
MOL009681	Obtusifoliol	42.55	0.76
MOL000098	quercetin	46.43	0.28
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL000953	CRL	37.87	0.68
MOL008173	daucosterol Qt	36.91	0.75

3.2. DN 靶点的预测

利用在 Genecards 数据库, 在 keyword 中检索 Diabetic Nephropathy (糖尿病肾病, DN), 获取疾病靶点 3580 个, 设置 Relevance Score > 5, 获疾病靶点 1022 个。

3.3. 润肺益肾饮与 DN 共同靶点的筛选

将筛选的润肺益肾饮活性成分靶点与 DN 疾病靶点取交集, 并通过微生信软件绘制韦恩图, 得到润

肺益肾饮与 DN 的共同靶点 172 个, 如图 1 所示。

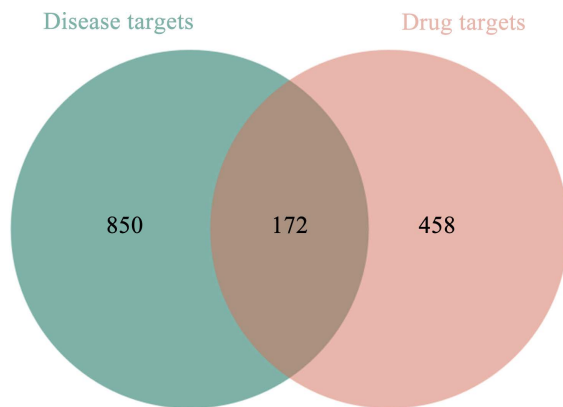


Figure 1. Venn diagram of Runfei Yishen Decoction for the treatment of DN
图 1. 润肺益肾饮治疗 DN 的韦恩图

3.4. 蛋白质 - 蛋白质相互作用(PPI)网络构建和分析

将 172 个共有靶点导入 STRING 网络平台, 构建 PPI 网络, 并用 Cytoscape 软件进行可视化。去除孤立节点后的 PPI 网络, 由 598 条边, 172 个节点组成如图 2 所示。分析网络中参数信息, 根据自由度值将节点进行统计分析及可视化处理, 度值排名较高的核心靶点分别为 SRC (Degree = 82)、STAT3 (Degree = 74)、MAPK3 (Degree = 64)、MAPK1 (Degree = 62)、AKT1 (Degree = 54)、EGFR (Degree = 50)。如图 2、图 3 所示。

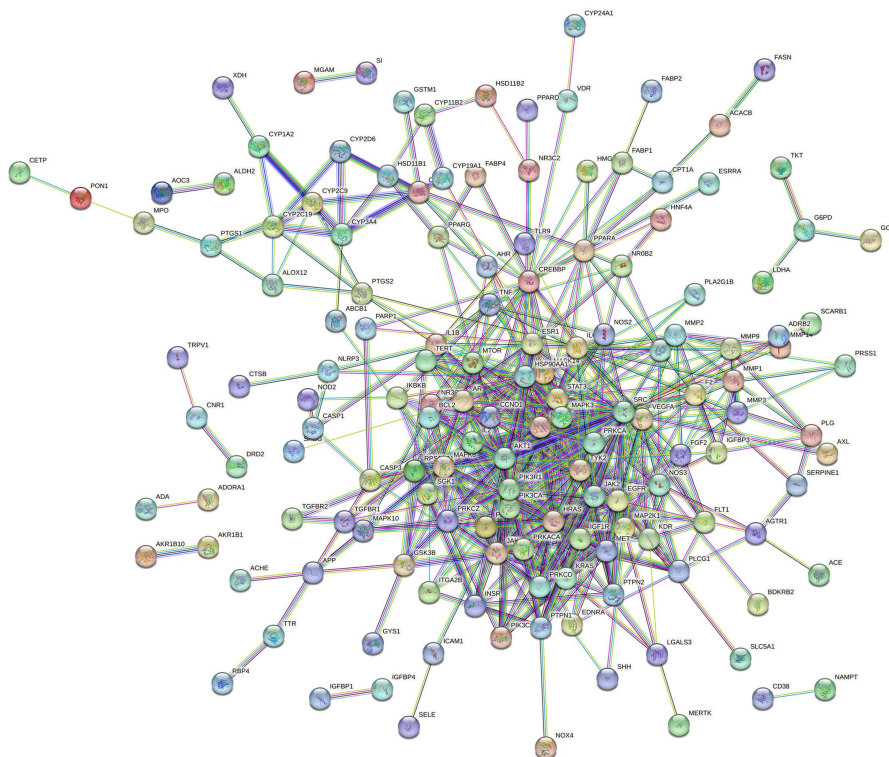
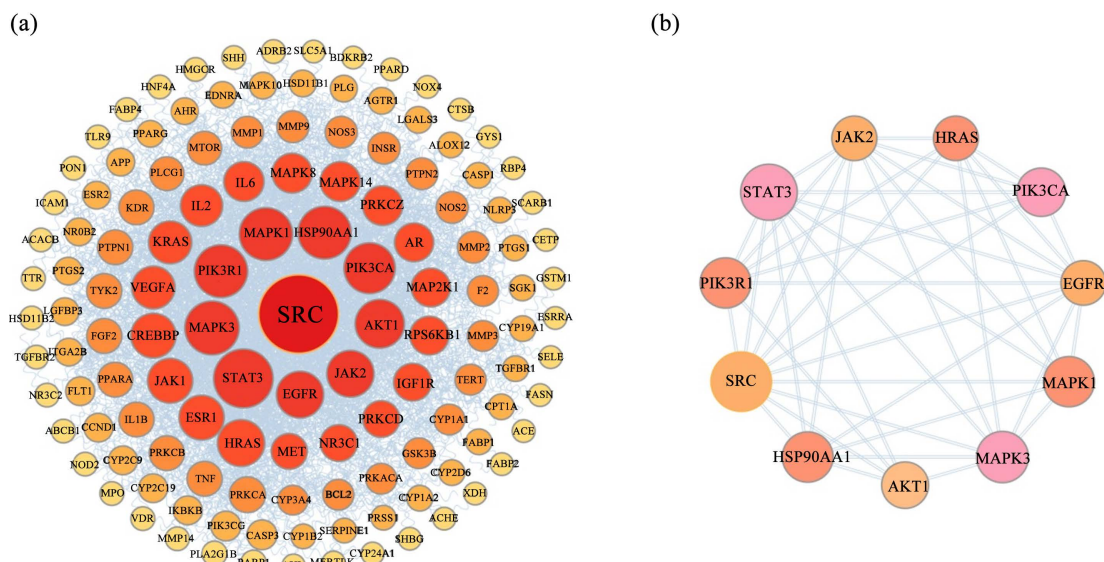


Figure 2. PPI network diagram of Runfei Yishen Decoction in the treatment of DN
图 2. 润肺益肾饮治疗 DN 的 PPI 网络图



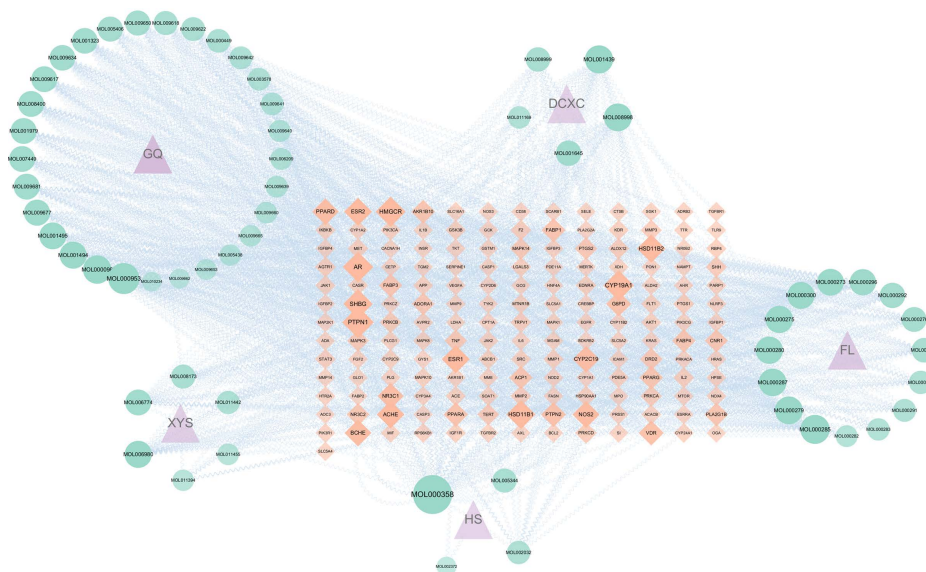
注：(a) 为交集靶点蛋白互作图；(b) 为核心靶点蛋白互作图。颜色深浅、形状大小与自由度值呈正相关。

Figure 3. Protein interaction diagram of Runfei Yishen Decoction in the treatment of DN

图 3. 润肺益肾饮治疗 DN 的蛋白互作图

3.5. “药物 - 成分 - 靶点”网络构建和分析

将润肺益肾饮中 56 个潜在活性成分与 172 个药物 - 疾病交集靶点输入 Cytoscape 软件中, 绘制出“药物 - 成分 - 靶点”相互作用的网络图。图中紫色代表药物, 绿色代表润肺益肾饮中的 56 种活性成分, 橘黄色代表 172 个共同靶点。网络节点颜色深浅与自由度呈正相关, 节点连线越多, 表明度值越高, 度值排名靠前的活性成分有 β -谷甾醇(Degree = 80)、槲皮素(Degree = 37)、花生四烯酸(Degree = 36)、啤酒甾醇(Degree = 35)等。如图 4 所示。



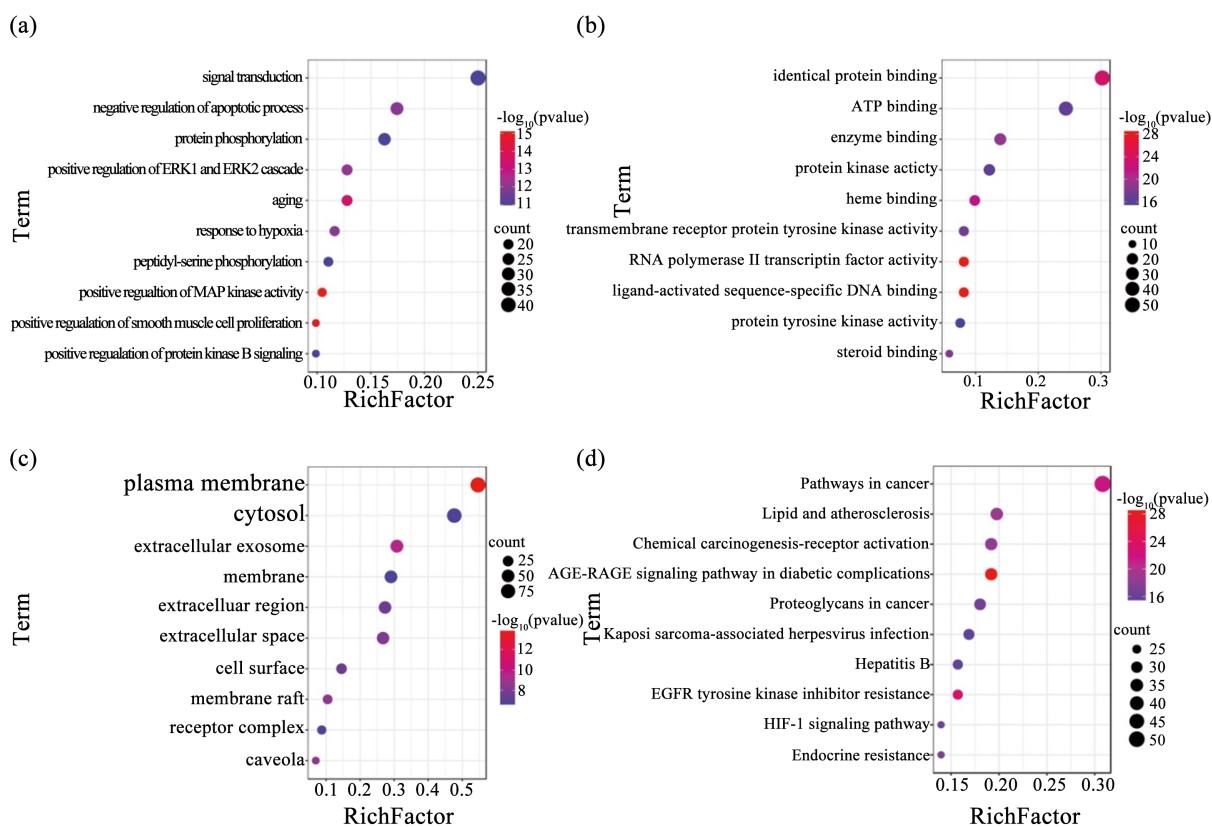
注：紫色三角形代表药物，绿色圆形代表活性成分，橘黄色菱形代表交集靶点，形状大小与自由度值呈正相关。

Figure 4. “Drug-component-target” network diagram of Runfei Yishen Decoction for the treatment of DN

图 4. 润肺益肾饮治疗 DN 的“药物 - 成分 - 靶点”网络图

3.6. GO 和 KEGG 通路富集分析

对 172 个药物 - 疾病共同靶点进行 GO 分析, 富集得到生物学过程(Biological Process, BP)、细胞组成(Cell Component, CC)、分子功能(Molecular Function, MF)条目共 1006 个。以“ $P > 0.05$ ”为筛选条件, 获得具有统计学意义条目 448 个, 其中生物学过程 347 个, 主要涉及 MAP 激酶活性的调节, 细胞增殖、老化及凋亡, ERK 级联和 MAPK 级联的调节, 蛋白磷酸化, 缺氧反应, 炎症反应等; 细胞组成 20 个, 主要涉及细胞质膜、囊泡、细胞间隙、细胞质基质等; 分子功能 81 个, 主要涉及转录因子活性、DNA 结合、血红素结合、酶结合、类固醇结合、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、ATP 结合、蛋白激酶活性等。对药物 - 疾病共同靶点进行 KEGG 富集分析的结果显示, 共同靶点总共涉及 180 条代谢通路, 共同靶点主要富集到 AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、癌症的途径、脂质和动脉粥样硬化、化学致癌 - 受体激活、内分泌抵抗、癌症中的蛋白聚糖、HIF-1 信号通路、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、乙型肝炎、胰岛素抵抗等。其中, AGE-RAGE 信号通路富集分析结果最为显著, 在 DN 的发生发展过程中发挥极为关键的作用。如图 5 所示。



注: (a) BP 富集分析气泡图; (b) MF 富集分析气泡图; (c) CC 富集分析气泡图; (d) KEGG 富集分析气泡图。

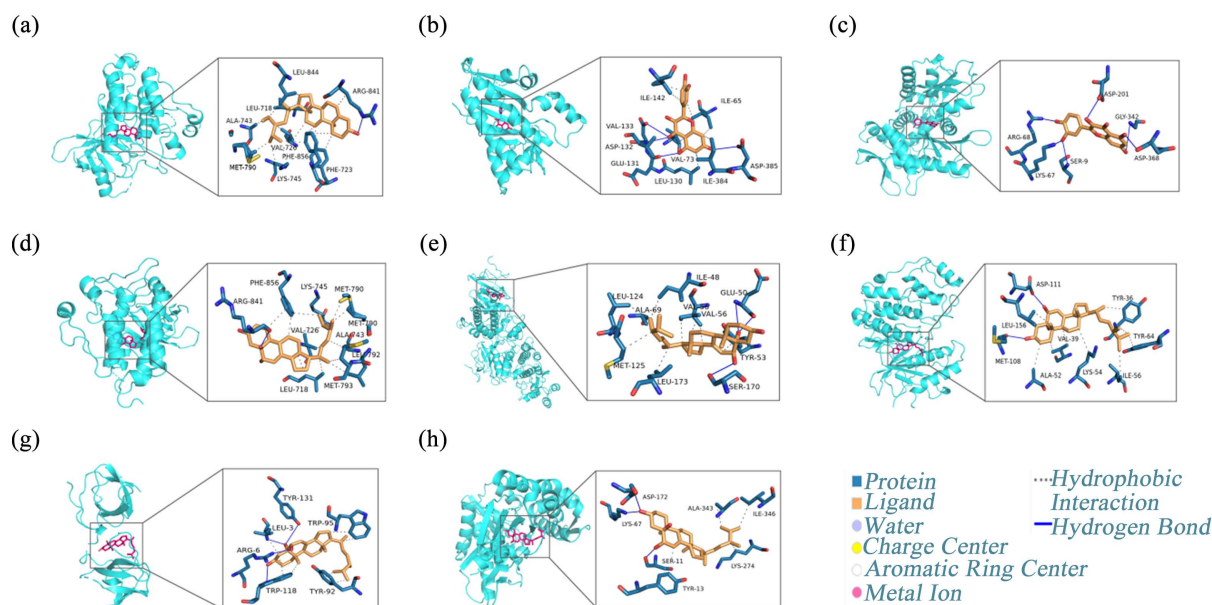
Figure 5. Bubble chart of enrichment analysis of DN in the treatment of Runfei Yishen Decoction

图 5. 润肺益肾饮治疗 DN 的富集分析气泡图

3.7. 分子对接

为了验证药物 - 靶点相互作用的可靠性, 将自由度值排名靠前的核心成分(β -谷甾醇、槲皮素、花生四烯酸(AA)、啤酒甾醇)与关键靶点(SRC, STAT3, MAPK3, MAPK1, AKT1, EGFR)进行分子对接验证, 若结合能越小, 则对接效果越好。所有复合物的结合能均小于 $-5.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明其均具有良好的结合活性,

其中利用 Pymol 软件将对接分数较高的复合物可视化, 如图 6、表 2 所示。



注: (a) β -谷甾醇-EGFR; (b) 槲皮素-AKT1; (c) 槲皮素-STAT3; (d) 啤酒甾醇-EGFR; (e) 啤酒甾醇-MAPK3; (f) 啤酒甾醇-MAPK1; (g) 啤酒甾醇-SRC; (h) 啤酒甾醇-STAT3。

Figure 6. Molecular docking model diagram

图 6. 分子对接模式图

Table 2. Binding energy of main active ingredients and key targets of Runfei Yishen Decoction

表 2. 润肺益肾饮主要活性成分和关键靶点对接的结合能

活性成分	关键靶点	结合能/ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
β -谷甾醇	EGFR	-9.6
槲皮素	AKT1	-7.5
	STAT3	-9.2
	EGFR	-10.6
啤酒甾醇	MAPK3	-10.4
	MAPK1	-9.2
	SRC	-9
	STAT3	-9.2

4. 讨论

糖尿病肾病是一种与代谢相关的复杂病理过程, 它不仅对肾脏产生直接损伤, 同时也会减缓代谢活动, 进而引发其他代谢系统疾病。传统的中医药对 DN 的显著效果已引起科研工作者的重视, 但由于其作用成分与作用机制尚不清楚, 限制了它们的运用与推广。因此, 我们通过网络药理学的方法预测润肺益肾饮的主要作用成分和其治疗 DN 的分子机制, 为润肺益肾的研究提供参考。

本研究通过“药物-成分-靶点”网络预测润肺益肾饮作用的核心成分, 经分子对接验证发现, β -

谷甾醇、啤酒甾醇、槲皮素、花生四烯酸与核心靶点对接具有可靠的亲和力。槲皮素是一种具有多种生物活性的类黄酮,现代药理研究表明,槲皮素具有抗氧化、抗过敏、抗炎、抗凋亡等多种生物学功能[15]。胡廷彦等[16]研究显示,槲皮素可改善肾功能并减弱 DN 动物模型中的肾脏氧化应激水平和炎症反应。有证据显示, β -谷甾醇、啤酒甾醇均可通过下调 MAPK 信号传导来减少促炎细胞因子的释放,进而发挥抗炎作用[17] [18]。此外, Jayaraman 等人[19]研究表明, β -谷甾醇能够激活肥胖诱导的 2 型糖尿病大鼠脂肪细胞中的胰岛素受体和葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT-4)来控制高血糖和胰岛素抵抗。花生四烯酸是一种多元不饱和脂肪酸,在人和动物体内广泛存在,在细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP)表氧化酶催化下可生成环氧二十碳三烯酸(Epoxyeicosatrienoic Acids, EETs),EETs 能够抗炎、舒张血管、抑制内皮细胞凋亡、促进内皮细胞增殖以及新生血管生成,许多研究表明[20] [21], EETs 可以改善 DN 的病理改变,减少肾脏细胞凋亡,在延缓 DN 进展中发挥重要作用。

根据 PPI 网络图分析结果显示,润肺益肾饮的有效活性成分可能通过 SRC、STAT3、MAPK3、MAPK1、AKT1、EGFR 等靶点发挥对 DN 的治疗作用。SRC 是细胞蛋白质酪氨酸激酶成员之一,是具有代表性的一种非受体膜结合酪氨酸激酶[22],大量研究表明, SRC 通过多种不同的机制促进 DN 的发病,包括影响系膜细胞增殖、调控肾小管细胞凋亡以及激活肾脏中的多种纤维化信号通路[22] [23] [24]。最新研究表明, SRC 表达下调可以改善与线粒体完整性受损相关的足细胞损伤从而保护肾脏[24]。此外,作为上游靶分子的 SRC 可介导 STAT3、EGFR、PI3K 以及 AKT 活化,导致纤连蛋白表达增加[22] [25] [26]。STAT3 持续激活时,则会导致组织纤维化[26],已有研究表明 STAT3 是治疗 DN 潜在的靶点,可通过减轻肾脏纤维化,延缓 DN 的进展[27]。EGFR 通路在 DN 中被激活,靶向干预 EGFR 通路可以改善糖尿病神经病变的肾脏结局[28]。Rayego 等[29]报道,活化的 EGFR 通过激活纤维化相关过程来加速慢性肾脏疾病的损伤。AKT1 与 DN 的免疫调节和炎症反应密切相关,其在基底膜增厚、系膜增殖和足细胞损伤中起着至关重要的作用[30] [31]。MAPK1、MAPK3 均为丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族的重要成员之一,当受到细胞因子刺激时,MAPK 磷酸化,巨噬细胞浸润, TNF- α 、INF- γ 、IL-6、IL-8 炎症因子表达上调,引发炎症反应[32] [33]。

KEGG 富集分析结果提示, AGE-RAGE 信号通路为润肺益肾饮治疗 DN 的主要调控通路,是 DN 发生发展的重要一环。AGE-RAGE 复合物可以特异性激活 p21 蛋白,刺激细胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun 氨基端激酶(JNK)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路以及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶,其直接或间接产生活性氧(ROS),诱导多种炎症和纤维化基因表达[34] [35] [36]。此外,这些信号通路可以激活 NF- κ B 相关的促炎基因转录,增加了白细胞介素、促炎细胞因子的合成和释放,导致炎症和内皮功能障碍,促进慢性肾脏病的进展[36]。

综上所述,本研究采用网络药理学和分析对接技术研究了润肺益肾饮治疗 DN 的主要靶点和分子机制,发现了润肺益肾饮能够通过多成分、多靶点、多种途径来达到治疗 DN 的目的,为进一步挖掘润肺益肾饮治疗 DN 提供了理论依据。鉴于网络药理学和分析对接存在一定的局限性,需要进一步设计合理严谨的药理实验以及临床试验来验证其作用机制。

基金项目

武汉市卫生计生委科研项目(WZ18D21)。

参考文献

- [1] Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J.D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N.H., Cavan, D., Shaw, J.E. and Makaroff, L.E. (2017) IDF Diabetes Atlas: Global Estimates for the Prevalence of Diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **128**, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024>

- [2] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2016) Worldwide Trends in Diabetes since 1980: A Pooled Analysis of 751 Population-Based Studies with 4.4 Million Participants. *The Lancet (London, England)*, **387**, 1513-1530.
- [3] Samsu, N. (2021) Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *BioMed Research International*, **2021**, Article ID: 1497449. <https://doi.org/10.1155/2021/1497449>
- [4] 刘羽飞, 任晋玉, 俞捷, 宋业旭, 宋立群. 从肺论治慢性肾衰竭初探[J]. 中医药学报, 2022, 50(3): 5-8.
- [5] 高向峰, 饶向荣, 李深, 成庭柱, 方吕贵, 王秀娟. 肺肾同治法治疗 IgA 肾病[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(3): 118-121.
- [6] 陈仁慈, 项洁琼, 陈洪宇. 冬虫夏草治疗糖尿病肾病疗效的系统评价[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18(4): 340-344.
- [7] 王悦, 田双双, 刘晓谦, 张永欣, 闫利华, 王智民. 茯苓多糖的提取、结构及药理作用研究进展[J]. 世界中医药, 2021, 16(17): 2548-2555.
- [8] 韩思婕, 潘翔, 朱芊芊, 张丹丹, 张涵瑞, 方敬贤, 魏琼, 刘丹, 叶晓川. 茯苓多糖调节 2 型糖尿病模型大鼠肝脏糖异生的机制研究[J]. 中国药房, 2022, 33(13): 1581-1587.
- [9] 李佳丹, 周迪夷. 茯苓多糖对 db/db 小鼠肾脏保护作用及其对 p38 MAPK/PPAR- γ 信号通路的影响[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(3): 346-350.
- [10] Huang, R., Zhang, M., Tong, Y., Teng, Y., Li, H. and Wu, W. (2022) Studies on Bioactive Components of Red Ginseng by UHPLC-MS and Its Effect on Lipid Metabolism of Type 2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Nutrition*, **9**, Article ID: 865070. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.865070>
- [11] 陈锐, 陈德经, 张建新. 西洋参多糖肽对糖尿病小鼠降血糖血脂及抗氧化作用研究[J]. 西北农业学报, 2013, 22(11): 195-201.
- [12] Wan, F., Ma, F., Wu, J., Qiao, X., Chen, M., Li, W. and Ma, L. (2022) Effect of Lyciumbarbarum Polysaccharide on Decreasing Serum Amyloid A3 Expression through Inhibiting NF- κ B Activation in a Mouse Model of Diabetic Nephropathy. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*, **2022**, Article ID: 7847135. <https://doi.org/10.1155/2022/7847135>
- [13] 刘涛, 王刚, 吕奇, 陈小娟, 张文菲, 熊玮. 润肺益肾饮联用左卡尼汀对尿毒症维持性血液透析患者营养不良、微炎症状态和生活质量的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(4): 364-368.
- [14] 刘涛, 吕奇, 陈小娟, 张文菲, 王刚, 高智. 润肺益肾饮对维持性血液透析脾肾两虚型患者微炎症的影响[J]. 中医药导报, 2020, 26(10): 62-65.
- [15] Zhao, J., Mo, C., Shi, W., Meng, L. and Ai, J. (2021) Network Pharmacology Combined with Bioinformatics to Investigate the Mechanisms and Molecular Targets of Astragalus Radix-Panax notoginseng Herb Pair on Treating Diabetic Nephropathy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, **2021**, Article ID: 9980981. <https://doi.org/10.1155/2021/9980981>
- [16] Hu, T., Yue, J., Tang, Q., Cheng, K.W., Chen, F., Peng, M., Zhou, Q. and Wang, M. (2022) The Effect of Quercetin on Diabetic Nephropathy (DN): A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies. *Food & Function*, **13**, 4789-4803. <https://doi.org/10.1039/D1FO03958J>
- [17] Khan, Z., Nath, N., Rauf, A., Emran, T.B., Mitra, S., Islam, F., Chandran, D., Barua, J., Khandaker, M.U., Idris, A.M., Wilairatana, P. and Thiruvengadam, M. (2022) Multifunctional Roles and Pharmacological Potential of β -Sitosterol: Emerging Evidence toward Clinical Applications. *Chemico-Biological Interactions*, **365**, Article ID: 110117. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110117>
- [18] Alam, M.B., Chowdhury, N.S., Sohrab, M.H., Rana, M.S., Hasan, C.M. and Lee, S.H. (2020) Cerevisterol Alleviates Inflammation via Suppression of MAPK/NF- κ B/AP-1 and Activation of the Nrf2/HO-1 Signaling Cascade. *Biomolecules*, **10**, 199. <https://doi.org/10.3390/biom10020199>
- [19] Jayaraman, S., Devarajan, N., Rajagopal, P., Babu, S., Ganesan, S.K., Veeraraghavan, V.P., Palanisamy, C.P., Cui, B., Periyasamy, V. and Chandrasekar, K. (2021) β -Sitosterol Circumvents Obesity Induced Inflammation and Insulin Resistance by down-Regulating IKK β /NF- κ B and JNK Signaling Pathway in Adipocytes of Type 2 Diabetic Rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **26**, 2101. <https://doi.org/10.3390/molecules26072101>
- [20] 陈光志. sEH 基因敲除治疗 STZ 诱导的小鼠糖尿病肾病的作用及其机制[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [21] Fan, F. and Roman, R.J. (2017) Effect of Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic Acid in Nephrology. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, **28**, 2845-2855. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017030252>
- [22] Wang, J. and Zhuang, S. (2017) Src Family Kinases in Chronic Kidney Disease. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, **313**, F721-F728. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00141.2017>

- [23] Zhou, D. and Liu, Y. (2016) Therapy for Kidney Fibrosis: Is the Src Kinase a Potential Target? *Kidney International*, **89**, 12-14. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.10.007>
- [24] Hu, Y., Liu, S., Liu, W., Zhang, Z., Liu, Y., Li, S., Sun, D., Zhang, G. and Fang, J. (2022) Potential Molecular Mechanism of Yishen Capsule in the Treatment of Diabetic Nephropathy Based on Network Pharmacology and Molecular Docking. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, **15**, 943-962. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S350062>
- [25] Chen, H.M., Dai, J.J., Zhu, R., Peng, F.F., Wu, S.Z., Yu, H., Krepinsky, J.C. and Zhang, B.F. (2019) Parathyroid Hormone-Related Protein Induces Fibronectin Up-Regulation in Rat Mesangial Cells through Reactive Oxygen Species/Src/EGFR Signaling. *Bioscience Reports*, **39**, BSR20182293. <https://doi.org/10.1042/BSR20182293>
- [26] Yan, Y., Ma, L., Zhou, X., Ponnusamy, M., Tang, J., Zhuang, M.A., Tolbert, E., Bayliss, G., Bai, J. and Zhuang, S. (2016) Src Inhibition Blocks Renal Interstitial Fibroblast Activation and Ameliorates Renal Fibrosis. *Kidney International*, **89**, 68-81. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.293>
- [27] 项昌培, 周瑞, 张晶晶, 杨洪军. 三七对糖尿病肾病、糖尿病脑病和糖尿病心肌病“异病同治”的网络药理学作用机制分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(10): 2424-2433.
- [28] Sun, Y., Deng, M., Ke, X., Lei, X., Ju, H., Liu, Z. and Bai, X. (2021) Epidermal Growth Factor Protects against High Glucose-Induced Podocyte Injury Possibly via Modulation of Autophagy and PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway Through DNA Methylation. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, **14**, 2255-2268. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S299562>
- [29] Harskamp, L.R., Gansevoort, R.T., van Goor, H. and Meijer, E. (2016) The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway in Chronic Kidney Diseases. *Nature Reviews. Nephrology*, **12**, 496-506. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.91>
- [30] Li, S. and Xu, G. (2022) QishenYiqi Dripping Pill Protects Diabetic Nephropathy by Inhibiting the PI3K-AKT Signaling Pathways in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, **2022**, Article ID: 6239829. <https://doi.org/10.1155/2022/6239829>
- [31] Qian, Y., Sun, X., Wang, X., Yang, X., Fan, M., Zhong, J., Pei, Z. and Guo, J. (2021) Mechanism of Cordyceps Cica-dae in Treating Diabetic Nephropathy Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Analysis. *Journal of Diabetes Research*, **2021**, Article ID: 5477941. <https://doi.org/10.1155/2021/5477941>
- [32] Yuan, L., Zhang, F., Shen, M., Jia, S. and Xie, J. (2019) Phytosterols Suppress Phagocytosis and Inhibit Inflammatory Mediators via ERK Pathway on LPS-Triggered Inflammatory Responses in RAW264.7 Macrophages and the Correlation with Their Structure. *Foods (Basel, Switzerland)*, **8**, 582. <https://doi.org/10.3390/foods8110582>
- [33] Sifuentes-Franco, S., Padilla-Tejeda, D.E., Carrillo-Ibarra, S. and Miranda-Díaz, A.G. (2018) Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Function in Diabetic Nephropathy. *International Journal of Endocrinology*, **2018**, Article ID: 1875870. <https://doi.org/10.1155/2018/1875870>
- [34] Steenbeke, M., Speeckaert, R., Desmedt, S., Glorieux, G., Delanghe, J.R. and Speeckaert, M.M. (2022) The Role of Advanced Glycation End Products and Its Soluble Receptor in Kidney Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 3439. <https://doi.org/10.3390/ijms23073439>
- [35] 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.
- [36] Pathomthongtaweetchai, N. and Chutipongtanate, S. (2020) AGE/RAGE Signaling-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Future Prospects in Non-Coding RNA Therapeutics for Diabetic Nephropathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **131**, Article ID: 110655. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110655>