

## 黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经 病变靶点预测与机制探讨

陈国铭<sup>1</sup>, 钟晓莹<sup>1</sup>, 赵金龙<sup>2</sup>, 黄雁<sup>1</sup>, 林洪荣<sup>1</sup>, 梁妙珍<sup>1</sup>, 刘韵韵<sup>1</sup>,  
於菁雯<sup>1</sup>, 黄瑞麟<sup>1</sup>, 刘敏<sup>3\*</sup>

- (1. 广州中医药大学 第一临床医学院, 广州 510405;  
2. 广州中医药大学 针灸康复临床医学院, 广州 510405;  
3. 广州中医药大学 第一附属医院, 广州 510405)

**[摘要]** 目的:通过网络药理学的方法对黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变(DPN)的相关靶点进行预测与机制探讨。方法:利用中药网络药理学分析平台(TCMSP)数据库筛选出黄芪桂枝五物汤中有效成分和相关靶标蛋白;运用网络可视化软件 Cytoscape 3.5.1 构建黄芪桂枝五物汤有效成分-靶标相互作用网络进行拓扑学分析;借助 STRING 在线数据库进行蛋白质与蛋白质相互作用(PPI)网络的构建与分析;从 Uniprot 数据库中获得靶标蛋白的基因名称后,借助 David 数据库进行 KEGG 通路功能富集分析,研究黄芪桂枝五物汤在治疗 DPN 上的作用机制及原理。结果:黄芪桂枝五物汤的核心化合物有槲皮素(querceetin),山柰酚(kaempferol), $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol),7-O-甲基异丙醇胺(7-O-methylisomucronulatol),异鼠李素(isorhamnetin)等,核心靶标有前列腺素 G/H 合酶 2(prostaglandin G/H synthase2),热休克蛋白 HSP90(heat shock protein HSP90),核受体共激活因子 2(nuclear receptor coactivator2)等;PPI 网络图显示黄芪桂枝五物汤有效成分中关键蛋白主要有 C-Jun 氨基端激酶(JUN),肿瘤蛋白 p53(TP53),FOS,丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1),转录因子 P65(RELA),白细胞介素-8(IL-8)等;KEGG 结果表明黄芪桂枝五物汤主要作用与肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway),Toll 样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)等信号通路有关。结论:黄芪桂枝五物汤主要通过多种途径,多种信号通路作用于多种靶点发挥其药物功效,利用网络药理学通过多种数据库与统计分析软件可以有效预测与分析药物的潜在作用与起效机制。

**[关键词]** 黄芪桂枝五物汤;糖尿病周围神经病变;通路;机制;网络药理学

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0214-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20180821

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180125.1458.004.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-26 10:28

### Target Prediction and Mechanism of Huangqi Guizhi Wuwutang in Treatment of Diabetic Peripheral Neuropathy

CHEN Guo-ming<sup>1</sup>, ZHONG Xiao-ying<sup>1</sup>, ZHAO Jin-long<sup>2</sup>, HUANG Yan<sup>1</sup>, LIN Hong-rong<sup>1</sup>,  
LIANG Miao-zhen<sup>1</sup>, LIU Yun-yun<sup>1</sup>, YU Jing-wen<sup>1</sup>, HUANG Rui-lin<sup>1</sup>, LIU Min<sup>3\*</sup>

- (1. The 1<sup>st</sup> Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;  
2. Acupuncture Rehabilitation Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine,  
Guangzhou 510405, China; 3. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of  
Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To predict and explore the target and mechanism of Huangqi Guizhi Wuwutang in

**[收稿日期]** 20171108(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373767)

**[第一作者]** 陈国铭,在读硕士,从事中医学工作,E-mail:1252309411@qq.com

**[通信作者]** \*刘敏,博士,教授,从事内分泌科医师工作,Tel:020-36591368,E-mail:liumery@163.com

the treatment of diabetic peripheral neuropathy (DPN) through systemic pharmacology. **Method:** The active constituents and related target proteins of Huangqi Guizhi Wuwutang were searched through TCMS database. Cytoscape 3.5.1 was used to construct the topology analysis for the active ingredient-target interaction network of Huangqi Guizhi Wuwutang; STRING online database was used for the protein-protein interaction (PPI) network construction and analysis; target protein gene name was obtained from Uniprot database, David database was used for the analysis of KEGG pathway enrichment and the study for the mechanism and targets of Huangqi Guizhi Wuwutang in Treating DPN. **Result:** Quercetin, kaempferol, beta-sitosterol, 7-O-methylisomucronulatol and isorhamnetin were the core compounds of Huangqi Guizhi Wuwutang. The core targets included Prostaglandin G/H synthase 2, Heat shock protein HSP 90, Nuclear receptor coactivator 2; PPI network diagram showed that the key components of the active ingredients of Huangqi Guizhi Wuwutang mainly included JUN, Tumor protein p53 (TP53), c-fos (FOS), mitogenactivated protein kinase 1 (MAPK1), transcription factor p65 (RELA), interleukin-8 (IL-8); KEGG results showed that the main effects of Huangqi Guizhi Wuwutang were correlated with TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway and other signaling pathways. **Conclusion:** Huangqi Guizhi Wuwutang can exert the efficacy through a variety of channels, with multiple signaling pathways acting on a variety of targets. It can be effectively predicted and analyzed by systematic pharmacology through a variety of databases and statistical analysis software, so as to show its potential effect and mechanism of action.

[Key words] Huangqi Guizhi Wuwutang; diabetic peripheral neuropathy; systemic pharmacology; pathway; mechanism; network pharmacology

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是糖尿病中最常见的一种并发症, 其主要临床表现为四肢远端感觉、运动障碍等, 属中医“痹症”“血痹”的范畴<sup>[1]</sup>。临床上, 用于对因治疗的西药包括控制血糖的药物 (如胰岛素、磺酰脲类药物等)、扩张血管和改善微循环的药物 (如钙离子拮抗药、血管紧张素 II-1 型受体拮抗药、血管紧张素转换酶抑制剂等)、降低血黏度、抗凝和溶栓药物 (如前列腺素 E 及其类似物、阿司匹林等)、改善代谢紊乱的药物 (如肌醇、醛糖还原酶抑制剂等)、抗氧化的药物 (如  $\alpha$ -硫辛酸、维生素 E 和维生素 C 等) 和增加神经营养与修复神经的药物 (如甲钴胺、神经生长因子等)。而用于对症治疗的西药主要是减轻或缓解疼痛的药物 (如非甾体抗炎药、三环类抗抑郁药、抗惊厥药等), 中医药治疗 DPN 的方法包括内服中药 (如活血化瘀类中药)、中药注射剂 (如丹参注射液、丹红注射液等)、针灸刺络、熏洗足浴<sup>[2]</sup>。

黄芪桂枝五物汤出自《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治》, “血痹阴阳俱微, 寸口关上微, 尺中小紧, 外证身体不仁, 如风痹状, 黄芪桂枝五物汤主之。”其由黄芪、桂枝、生姜、大枣、芍药 5 味中药组成, 近年来, 有不少研究显示黄芪桂枝五物汤对 DPN 具有确切的疗效。张敬一等<sup>[3]</sup>的 Meta 分析通过计算机系统检索多个中英文数据库, 筛选 2013 年 10 月之前报道的黄芪桂枝五物汤治疗 DPN 的随机

对照试验, 纳入 22 个随机对照实验, 包括 1 450 例患者, 证实黄芪桂枝五物汤可更加安全有效的用于治疗 DPN。

目前关于 DPN 的发生机制尚不完全清楚, 现代医学研究认为其发生与微血管病变、脂质代谢紊乱、氧化反应及自身免疫功能等多种因素相互作用有关<sup>[4]</sup>, 关于黄芪桂枝五物汤治疗 DPN 的作用机制, 董红<sup>[5]</sup>通过临床随机对照试验, 推测血液流变学有关, 但其具体作用机制和通路尚未明确。因此借助网络药理学的思路从系统生物整体的角度探究黄芪桂枝五物汤治疗 DPN 的作用机制具有重要意义。

传统的研究方法并不能从系统层面研究黄芪桂枝五物汤治疗的多成分、多靶点、多途径作用机制, 而网络生物学<sup>[6]</sup>、网络药理学<sup>[7]</sup>、网络医学<sup>[8]</sup>等新兴的研究理念和方法则是从整体视角研究中药与机体之间的彼此作用关系, 通过网络分析方法系统解析并可视化多成分与多靶点之间的相互作用, 正好符合中医的“整体观念”<sup>[8]</sup>。由此可见, 这种办法已经在中药治疗复杂性疾病的作用机制研究中得到了中医药研究者的认可和应用<sup>[9]</sup>。因此, 本文以黄芪桂枝五物汤的主要活性成分为研究对象, 运用网络药理学方法通过构建成分-靶点网络, 全面系统预测发现作用靶点, 为深入探讨黄芪桂枝五物汤治疗 DPN 的作用机制提供科学依据。

## 1 资料和方法

**1.1 黄芪桂枝五物汤的化学成分数据库** 本研究依据中药网络药理学分析平台(TCMSP)(<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>),以黄芪、桂枝、白芍、生姜和大枣 5 味中药成分作为 Herb name 检索黄芪桂枝五物汤中组成的所有化学成分。

**1.2 活性化合物的筛选** 口服生物利用度(oral bioavailability, OB)是药物 ADME 特性(即药理学中吸收、分布、代谢、排泄)中最重要的药物代谢动力学的参数之一,它表示口服的药物到达血液循环所占口服剂量的比例,作用比例高的口服生物利用度一般是决定生物活性分子(即有效作用的分子)类药性的关键指标<sup>[10]</sup>。而类药性(druglikeness, DL)化合物分子与已知药物分子的相似性,是药物表现出来的理化性质(如相对分子质量、脂水分配系数、溶解度等)和结构特征(如环结构、可旋转键数目、氢键受体和给体数等)以及药物分子在体内的综合反映(包括口服生物利用度或血脑屏障渗透性等合理的药代动力学性质和毒性)<sup>[11]</sup>。故本研究以  $OB \geq 30\%$  和  $DL \geq 0.18$  作为活性化合物的筛选条件,将 TCMSP 中具有较高活性的化合物进行筛选提取。

**1.3 化合物-靶点网络的构建** 将黄芪桂枝五物汤的化合物和相关靶点输入 Cytoscape3.5.1 软件,并构建化合物-靶点网络,使得化合物与靶点关系达到可视化,以探究黄芪桂枝五物汤的药理学作用机制,并对其进行网络拓扑学分析,其中靶点度值(Degree)和中介中心度(betweenness centrality)是拓扑结构中 2 个重要的参数,可用于评价黄芪桂枝五物汤中的有效化合物、靶标的重要程度。

**1.4 蛋白互作(PPI)网络的构建** 蛋白质很少以独立个体的方式实现其被赋予的功能,因此蛋白质相互作用及其网络的研究、分析是理解生命活动中分子功能、细胞组织、及生物过程等必不可少的基础。为了阐明靶点蛋白在系统水平上的作用,本研究将黄芪桂枝五物汤所涉及的所有靶点上传至在线 STRING 10.5 软件(<https://string-db.org/>),通过参数设置将评分条件设定为  $>0.90$ ,以保证信息的高置信通过相关设置隐藏图中孤立的蛋白质,最后输出 PPI 蛋白互作网络图,并根据分析结果统计靶标蛋白关联频次。获取蛋白互作信息,并导出可视化图形进行研究分析,并根据分析结果统计靶标蛋白关联频次。

**1.5 KEGG 通路富集分析** 京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,

KEGG)是东京大学和日本京都大学共同研制的数据库,该数据库提供通路查询,并与 David 数据库关联。为了说明中药化合物的靶点蛋白在信号通路中的作用,本课题采用 David v6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对经过 Uniprot 基因代码转换的靶点蛋白进行 KEGG 通路富集分析,探索相关靶标蛋白参与表达的生物学通路,以求达到解释黄芪桂枝五物汤治疗 DPN 的作用机制及原理。

## 2 结果

**2.1 黄芪桂枝五物汤活性化合物的筛选** 通过 TCMSP 数据库共收集到黄芪桂枝五物汤中化合物 1 485 种,其中黄芪含 174 种、白芍含 85 种、桂枝含 440 种、大枣 256 种、生姜 530 种。以  $OB \geq 30\%$  及  $DL \geq 0.18$  作为筛选条件,筛选出活性化合物共 161 种,其中黄芪 40 种、白芍 13 种、桂枝 40 种、大枣 58 种、生姜 10 种,所有活性化合物经去重后共 57 种。各化合物详细信息见表 1。

**2.2 黄芪桂枝五物汤化合物-靶点相互作用网络** 将数据导入 Cytoscape3.5.1 后,构建化合物-靶点网络(图 1)。在网络中,红色节点(56 个)代表黄芪桂枝五物汤活性化合物,黄色代表靶标蛋白,共 240 个节点,1 415 条边,一个节点的 Degree 表示网络中和节点相连的路线的条数,节点的大小与其 Degree 成正比。网络拓扑学分析结果为网络集中度 0.504,网络密度 0.016,网络异质性 2.337,最短路径 80046 (89%)。节点平均 Degree 为 4.764 309 764,大于平均 Degree 的节点有 67 个;节点平均中介中心度为 0.006 856 293,大于平均中介中心度的节点有 47 个。根据网络节点的 Degree 和中介中心度等拓扑学性质筛选核心节点进行分析,这些连接化合物或靶点比较多的节点在整个网络中起到桥梁的作用,很可能就是关键的化合物或者靶点。见表 2。其中,槲皮素(quercetin)是一种具有多种生物活性的化合物,药理作用普遍,具有抗糖尿病并发症等多方面作用<sup>[12]</sup>。王宝江等<sup>[13]</sup>的研究表示,槲皮素能改善四氧嘧啶所致 DPN 大鼠的作用,提高神经传导速度。山柰酚(kaempferol, KA)亦属于黄酮类化合物,研究显示可能是通过降低血糖、改善胰岛素敏感指数,并通过抗氧化、抗炎、降低 AR 等途径对 2 型糖尿病大鼠的慢性并发症起到缓解作用<sup>[14-16]</sup>。儿茶素(catechin)具有延迟糖分消化吸收的功能,可以防止血糖值的快速升高,而且它还能抑制淀粉酶分解淀粉为葡萄糖<sup>[17]</sup>。乙酰胆碱酯酶(AchE)能够在胆碱能突触处快速将神经递质乙酰胆碱水解,从而阻

表 1 黄芪桂枝五物汤活性化合物基本信息

Table1 Basic information sheet of active compound of Huangqi Guizhi Wuwutang

化合物代码	化合物名称	OB	DL	化合物代码	化合物名称	OB	DL
MOL000211	mairin	55.38	0.78	MOL012986	jujubasaponin V_qt	36.99	0.63
MOL000239	jaranol	50.83	0.29	MOL012989	jujuboside C_qt	40.26	0.62
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	MOL012992	mauritian D	89.13	0.45
MOL000033	(3 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>R</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>S</i> , 17 <i>R</i> )-10, 13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> , 5 <i>S</i> )-5-propan-2-yl]octan-2-yl]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[ <i>a</i> ]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	MOL001454	berberine	36.86	0.78
MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31	MOL001522	( <i>S</i> )-coclaurine	42.35	0.24
MOL000371	3,9-di- <i>O</i> -methylnissolin	53.74	0.48	MOL000449	stigmaterol	43.83	0.76
MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2', 5'-di- <i>O</i> -glucoside	41.72	0.69	MOL003410	ziziphin_qt	66.95	0.62
MOL000378	7- <i>O</i> -methylisomucronulatol	74.69	0.3	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL000379	9, 10-dimethoxypterocarpan-3- <i>O</i> - <i>D</i> -glucoside	36.74	0.92	MOL004350	ruvoside_qt	36.12	0.76
MOL000380	(6 <i>aR</i> , 11 <i>aR</i> )-9, 10-dimethoxy-6 <i>a</i> , 11 <i>a</i> -dihydro-6 <i>H</i> -benzofurano [3, 2- <i>c</i> ]chromen-3-ol	64.26	0.42	MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24
MOL000387	bifedate	31.10	0.67	MOL005360	malkangunin	57.71	0.63
MOL000392	formononetin	69.67	0.21	MOL000627	stepholidine	33.11	0.54
MOL000398	isoflavanone	109.99	0.3	MOL007213	nuciferin	34.43	0.40
MOL000417	calycosin	47.75	0.24	MOL001910	11alpha, 12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28, 12beta-olide	64.77	0.38
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	MOL001918	paeoniflogeneone	87.59	0.37
MOL000433	FA	68.96	0.71	MOL001919	(3 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 8 <i>R</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>S</i> , 14 <i>S</i> )-3, 17-dihydroxy-4, 4, 8, 10, 14-pentamethyl-2, 3, 5, 6, 7, 9-hexahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[ <i>a</i> ]phenanthrene-15, 16-dione	43.56	0.53
MOL000438	(3 <i>R</i> )-3-(2-hydroxy-3, 4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.67	0.26	MOL001921	lactiflorin	49.12	0.80
MOL000439	isomucronulatol-7, 2'-di- <i>O</i> -glucosiole	49.28	0.62	MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79
MOL000442	1, 7-dihydroxy-3, 9-dimethoxypterocarpene	39.05	0.48	MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	MOL001928	albiflorin_qt	66.64	0.33
MOL012921	stepharine	31.55	0.33	MOL001930	benzoyl paeoniflorin	31.27	0.75
MOL012940	spiradine A	113.52	0.61	MOL006129	6-methylgingediacetate2	48.73	0.32
MOL012946	zizyphus saponin I_qt	32.69	0.62	MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75
MOL012961	jujuboside A_qt	36.67	0.62	MOL001771	poriferast-5-en-4beta-ol	36.91	0.75
MOL012976	coumestrol	32.49	0.34	MOL008698	dihydrocapsaicin	47.07	0.19
MOL012980	daechuine S6	46.48	0.79	MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27
MOL012981	daechuine S7	44.82	0.83	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
				MOL000073	ent-epicatechin	48.96	0.24
				MOL004576	taxifolin	57.84	0.27
				MOL011169	peroxyergosterol	44.39	0.82

止胆碱能神经信号的传递。同时, AchE 的减少可以阻断细胞内钙离子浓度的升高, 导致糖原合成减低、血糖浓度上升, 同时引起胰岛素抵抗或代偿性高胰岛素血症胰岛素抵抗<sup>[18]</sup>。因此, 研究发现黄芪桂枝五物汤组成中的相关蛋白的功能可能主要体现在直接或间接地发挥降糖作用, 及保护神经纤维等, 以达

到治疗 DPN 的效果。

**2.3 黄芪桂枝五物汤 PPI 网络的构建与分析** 本研究基于蛋白质-蛋白质相互作用的关系, 利用 STRING 构建了黄芪桂枝五物汤靶标的 PPI 网络图(图 2)。设置置信度 > 0.90, 剔除孤立于网络之外的靶标蛋白, 得到的 PPI 网络包含 149 个节点,

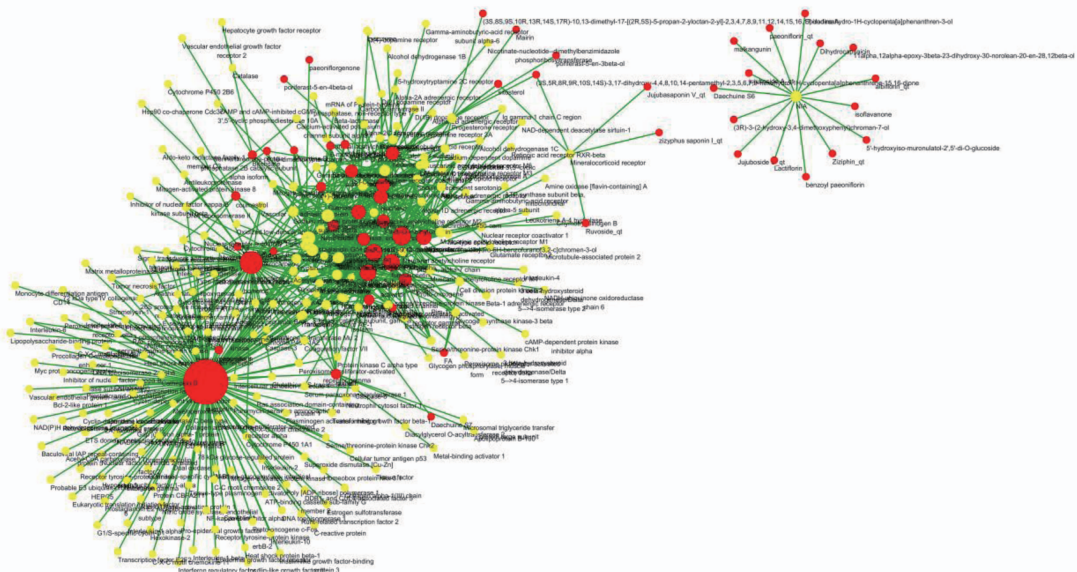


图 1 化合物-靶标网络

Fig.1 Compound-target network diagram

1 329条边,平均 Degree 为 8.91,其中节点表示靶标蛋白,每条边表示靶标蛋白之间的作用关系。根据节点的 Degree 绘制出度值最高的 10 个关键靶标蛋白节点的条形图(图 3)。Degree 排名前 3 位的是 c-Jun 氨基端激酶(JUN),肿瘤蛋白 p53 (TP53),Fos 蛋白(FOS)。其中 JUN 度值(48)高于其他蛋白节点,说明这个蛋白质在 PPI 中发挥着关键的作用,成为连通网络中其他节点的枢纽。JUN,TP53,FOS,丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1),转录因子 p65 (RELA),白细胞介素-8 (IL-8),肿瘤坏死因子(TNF),表皮细胞生长因子(EGF),丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14),白细胞介素-6 (IL-6),丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8),血管内皮生长因子- $\alpha$  (VEGF $\alpha$ )等靶蛋白度值远高于其他。其中 JUN 度值(48)高于其他蛋白节点,说明这个蛋白质在 PPI 中发挥着关键的作用,成为连通网络中其他节点的枢纽。近年来,有研究发现 DPN 与氧化应激反应关系密切,这是因为氧自由基损伤被认为是 DPN 发生直接或间接的最后共同通路,在疾病的发生中扮演着核心的角色<sup>[19]</sup>。JNK,又称之为应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK),其信号通路可被应激刺激、细胞因子、生长因子及某些 G 蛋白偶联的受体激活<sup>[20]</sup>。转录因子 AP-1 是细胞内 JNK/SAPK 的关键靶标,其控制着许多的细胞进程,包括细胞的增殖分化和凋亡。另外,MAPK8 也是 JNK 家族成员之一。大量研究显示 JNK/SAPK 活化与神经病理性疼痛的发生发展有关,其参与到 DPN

的形成过程中<sup>[21]</sup>。MAPK14 是 p38MAPK 家族的原型成员,p38MAPK 是关键的细胞信号传导分子,普遍存在于机体的各种细胞内,是细胞内外信息交流的重要途径。研究显示 p38MAPK 信号通路的激活在 DPN 的形成中有着重要作用<sup>[22]</sup>。因此可以推测黄芪桂枝五物汤通过抑制神经系统中 JNK/SAPK 和 p38MAPK 信号通路的激活,起到延缓 DPN 发生、发展的作用。TNF- $\alpha$  可直接损失胰岛  $\beta$  细胞,并诱发胰岛素抵抗,同时可刺激中性粒细胞产生超氧化物,影响患者脂质代谢<sup>[23]</sup>。另外有研究表明,IL-6 亦可导致 T2DM 特有的脂质代谢紊乱。韦洪江等<sup>[24]</sup>通过临床研究发现,脂代谢紊乱是糖尿病患者并发 DPN 的重要危险因素。脂代谢的紊乱可以直接破坏神经细胞,最终使神经细胞供血减少。EGF 可对角质细胞和纤维母细胞进行诱导增生、使角质层增厚、刺激周围神经再生<sup>[25]</sup>。因此,可以推测黄芪桂枝五物汤是通过抑制炎症反应、减少脂质代谢紊乱和促进表皮生长因子来减少 DPN 的发生发展。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可以促进血管发生、血管形成、内皮细胞增殖、迁移、增强血管通透性,属于生长因子的一种,在正常人组织和血浆渗出液中呈低水平表达<sup>[26]</sup>。因此可以推测黄芪桂枝五物汤可以通过调节 VEGF 的增长,诱导体内血管新生,改善微血管循环,恢复血管功能从而改善神经细胞缺血缺氧状态。另外,TP53,RELA,MYC 与肿瘤表达方面相关,可以为未来黄芪桂枝五物汤的药理学研究和临床应用提供新

表 2 化合物-靶标网络关键节点及其拓扑学特征

Table 2 Key node of compound-target network and its topology feature table

节点名称	节点类型	节点度值	中介中心度	节点名称	节点类型	节点度值	中介中心度
quercetin	化合物	154	0.636 394 05	mRNA of PKA Catalytic SubunitC-alpha	靶标	13	0.024 119 93
kaempferol	化合物	63	0.131 596 28	muscarinicacetylcholinereceptor M <sub>1</sub>	靶标	12	0.008 567 00
7-O-methylisomucronulatol	化合物	45	0.059 814 85	taxifolin	化合物	12	0.029 393 52
beta-sitosterol	化合物	39	0.020 895 88	(+)-catechin	化合物	11	0.010 244 14
formononetin	化合物	39	0.073 100 67	trypsin-1	靶标	11	0.010 244 14
isorhamnetin	化合物	37	0.061 941 42	progesteronereceptor	靶标	9	0.030 585 06
stigmasterol	化合物	31	0.073 723 14	thrombin	靶标	8	0.014 111 02
stepholidine	化合物	29	0.033 477 14	acetylcholinesterase	化合物	7	0.009 059 49
nuciferin	化合物	27	0.022 734 54	bifendate	化合物	7	0.015 892 01
prostaglandinG/hsynthase2	靶标	27	0.074 279 54	coumestrol	化合物	7	0.014 857 84
stepharine	化合物	27	0.033 477 14	dipeptidylpeptidaseIV	靶标	7	0.008 375 45
hederagenin	化合物	24	0.046 025 02	Gamma-aminobutyricacidreceptor-subunitalpha-1	靶标	7	0.029 352 15
(S)-Coclaurine	化合物	23	0.015 298 57	nitric-oxidesynthase, endothelial	靶标	7	0.008 649 24
3,9-di-O-methylmissolin (6aR, 11aR)-9, 10-dimethoxy-6a, 11a-dihydro-6H-benzofurano [3, 2-c] chromen-3-ol	化合物	22	0.012 008 19	peroxisomeproliferatoractivatedre- ceptorgamma	靶标	7	0.010 568 68
calycosin	化合物	22	0.010 000 49	phosphatidylinositol-4,5-bisphospha- te3-kinasecatalyticsubunit, gamma-isoform	靶标	7	0.010 976 40
prostaglandinG/hsynthase1	靶标	22	0.054 683 59	coagulationfactorXa	靶标	6	0.012 743 85
heatshockproteinHSP90	靶标	20	0.041 119 24	mineralocorticoidreceptor	靶标	6	0.016 896 65
berberine	化合物	17	0.010 573 81	amineoxidase[flavin-containing]B	靶标	5	0.008 487 64
nuclearreceptorcoactivator2	靶标	17	0.040 778 53	androgenreceptor	靶标	5	0.011 618 98
retinoicacidreceptorRXR-alpha	靶标	16	0.031 715 00	DNAtopoisomeraseII	靶标	5	0.011 843 95
sodiumchannelproteintype5subunitalpha	靶标	14	0.023 561 86				
beta-2adrenergicreceptor	靶标	13	0.020 895 88				

的方向和思路。

**2.4 KEGG 通路富集分析** 通过 Davidv6.8 数据库对黄芪桂枝五物汤靶蛋白基因进行 KEGG 通路富集,共有 121 富集结果,计算每条富集通路的  $P$  (Bonferroni 法进行校正,  $P < 0.01$  的情况被认定是富集显著),对  $P$  排序后取前 10 名进行分析(表 3),以基因富集个数为横坐标,富集通路为纵坐标绘制富集通路条形图,见图 4。KEGG 富集最显著的 10 条通路分别是癌症 (pathways in cancer),乙型肝炎 (hepatitis B),前列腺癌 (prostate cancer),膀胱癌 (bladder cancer),胰腺癌 (pancreatic cancer),TNF 信号通路 (TNF signaling pathway),美洲锥虫病 (chagas disease),小细胞肺癌 (small cell lung cancer),Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor

signaling pathway),利什曼病 (leishmaniasis)。富集结果表明,黄芪桂枝五物汤可能正是通过上述信号通路发挥治疗作用的。大多数基因显著富集到 TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway 这 2 条信号通路上。其中 Pathways in cancer 富集了 53 个基因, TNF signaling pathway 富集了 24 个基因, Toll-like receptor signaling pathway 富集了 22 个基因。

目前现代研究表明<sup>[27]</sup>, TNF- $\alpha$  能够引起微血管内皮细胞凋亡,具体机制为 NF- $\kappa$ B 有抗内皮细胞凋亡的作用。TNF- $\alpha$  可上调内皮细胞 Fas 表达,并参与内皮细胞凋亡。TNF- $\alpha$  所引起的微血管内皮细胞的凋亡与 Caspase-8, Caspase-3 的作用有关。邓小鹿等<sup>[28]</sup>、梅志刚等<sup>[29]</sup> 研究发现, TNF- $\alpha$  是介导炎

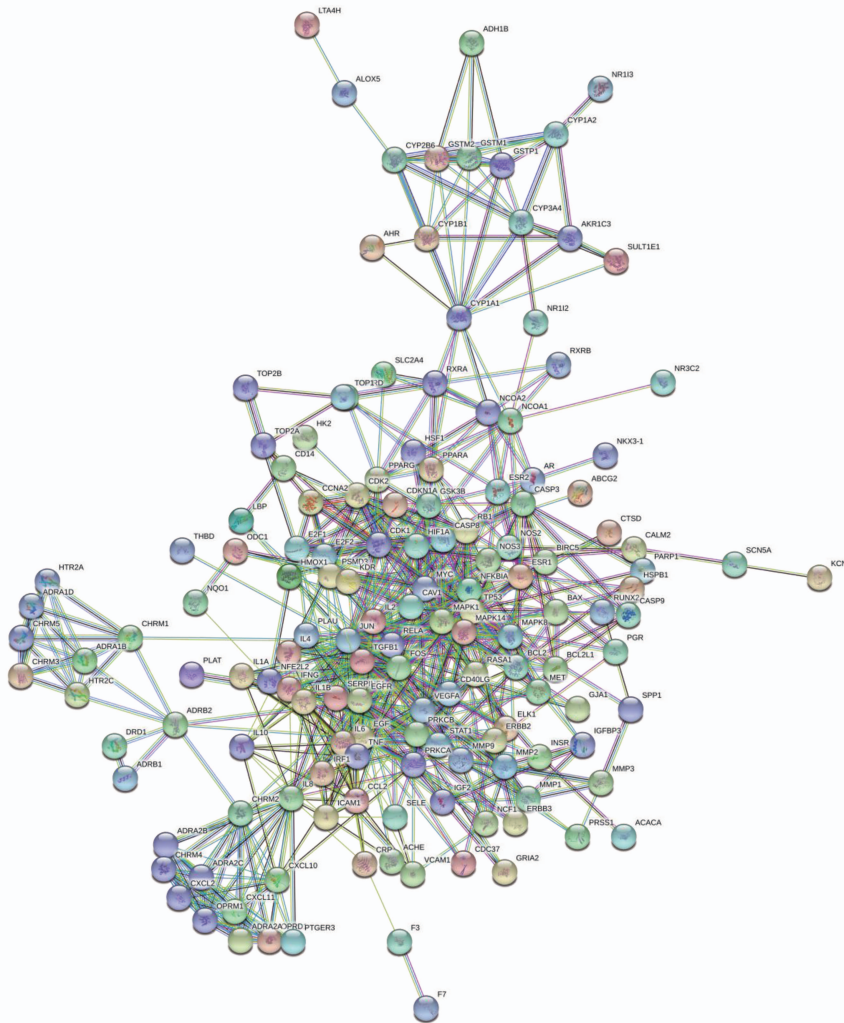


图 2 黄芪桂枝五物汤靶蛋白 PPI 网络  
Fig. 2 Target protein PPI network of Huangqi Guizhi Wuwutang

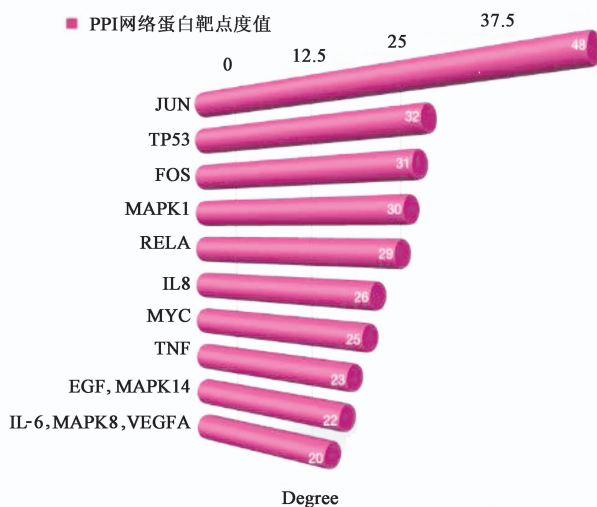


图 3 各蛋白信息  
Fig. 3 Protein information bar chart

症、感染和其他内环境改变的重要起始因子,可直接损伤微血管内皮细胞。因此,在治疗 DPN 疾病层面

上,黄芪桂枝五物汤可能是通过对 TNF- $\alpha$  的调控,从而抑制对微血管病变,达到改善或治疗 DPN 的目的。NF- $\kappa$ B 能介导 TNF- $\alpha$  触发的氧化应激和过度炎症反应,导致细胞的生存率明显降低;沉默 NF- $\kappa$ B/p65 基因能够降低炎症反应水平及其诱发的氧化应激<sup>[30]</sup>,黄芪桂枝五物汤在治疗 DPN 过程中,可能也同时有参与抑制氧化反应等生理学活动。此外,也有不少机制研究或临床试验表明,黄芪桂枝五物汤有通过 TNF signaling pathway 通道参与调控自身免疫或纠正脂质代谢紊乱等病理生理活动,从而治疗或改善 DPN。另有相关基础实验表明<sup>[31]</sup>,糖尿病小鼠血清 TNF- $\alpha$  升高可能会使其肾脏脂质积聚,基于此笔者有依据推测,黄芪桂枝五物汤可能是通过调控 TNF- $\alpha$  等进行体内脂质代谢紊乱等的调控,从而达到治疗 DPN 的目的。

Toll-like receptors 是 I 型跨膜蛋白受体,TLRs

广泛分布于免疫细胞以及上皮细胞表面,TLRs 介导免疫的信号转导途径中的 TLRs/NF- $\kappa$ B 信号通路在免疫调节中发挥着极其重要的作用<sup>[32]</sup>。该通路激活的 NF- $\kappa$ B 抵达细胞核内,与对应的启动子结合,调控各种基因的表达,最终激活特异性免疫系统,发挥调节免疫以及细胞增殖等重要的生物学作用<sup>[33]</sup>。基于此,笔者认为黄芪桂枝五物汤很可能是通过调节机体免疫系统,从而与 DPN 相关发病机制进行针对性的调控,从而发挥着其治疗作用。

另外,虽富集结果显示 pathways in cancer,前列腺癌 (prostate cancer),膀胱癌 (bladder cancer),胰腺癌 (pancreatic cancer) 信号通路与肿瘤相关,但目前关于黄芪桂枝汤治疗肿瘤的相关研究并不多见,相信可以为未来黄芪桂枝五物汤治疗肿瘤的药理学研究和临床应用提供新的方向和思路。

表 3 KEGG 通路富集信息 (Top10)

Table 3 KEGG pathway enrichment table (Top 10)

名称	计数	P
pathways in cancer	53	$9.0 \times 10^{-23}$
hepatitis B	34	$6.1 \times 10^{-22}$
prostate cancer	25	$3.9 \times 10^{-18}$
bladder cancer	18	$1.2 \times 10^{-16}$
pancreatic cancer	21	$2.0 \times 10^{-16}$
chagas disease (ameri-cantrypanosomiasis)	23	$3.7 \times 10^{-14}$
TNF-signaling pathway	23	$5.7 \times 10^{-14}$
smallcelllung cancer	21	$6.6 \times 10^{-14}$
Toll-like receptorsi-gnaling pathway	22	$5.8 \times 10^{-13}$
leishmaniasis	18	$4.1 \times 10^{-12}$

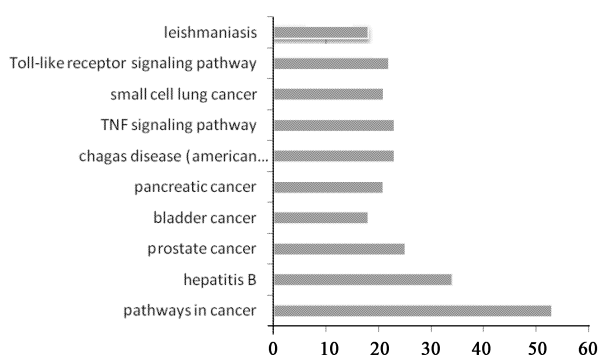


图 4 黄芪桂枝五物汤靶蛋白基因 KEGG 富集信息

Fig.4 KEGG enrichment bar chart of target protein of Huangqi Guizhi Wuwutang

### 3 讨论

黄芪桂枝五物汤出自张仲景的《金匱要略》,近年来,有较多研究均显示黄芪桂枝五物汤对 DPN 具有确切的疗效。目前国内外有关 DPN 发病机制主

要归纳为以下 4 个途径的激活<sup>[34]</sup>:多元醇途径途径 (关键靶点为葡萄糖经醛糖还原酶 (aldose reductase, AR), 山梨醇脱氢酶途径 (sorbitol dehydrogenas, SDH) 和还原型辅酶 II (NADPH)), 受体介导途径 (关键靶点为 p44/p42 MAPKs, 核转录因子 NF- $\kappa$ B, p21Ras), 蛋白激酶 C 途径 (关键靶标为 MAPK, NF- $\kappa$ B), 氨基己糖途径 (关键靶标为果糖-6-磷酸氨基转移酶 (glutamine: fructose-6 phosphateamidotransferase, GFAT)), 而 Brownlee 则提出线粒体生成过量 ROS 并通过抑制磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的活性激发,这 4 条途径可能是导致糖尿病并发症发病的共同机制。

本研究进行了有效成分-靶标相互作用网络进行拓扑学分析,蛋白质与蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建与分析 and KEGG 通路功能富集分析。以上结果表明,黄芪桂枝五物汤的核心化合物有 quercetin, kaempferol, beta-sitosterol, 7-O-methylisomucronulatol, isorhamnetin 等,核心靶标有 prostaglandin G/hsynthase2, heat shock protein HSP90, nuclear receptor coactivator2 等; PPI 网络图显示黄芪桂枝五物汤有效成分中关键蛋白主要有 JUN, TP53, FOS, MAPK1, RELA, IL-8 等; KEGG 结果表明黄芪桂枝五物汤主要作用与 TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway 等信号通路有关。通过以上分析,本研究预测黄芪桂枝五物汤很可能是通过直接或间接地发挥降糖作用,及保护神经纤维,减少糖尿病神经病理性疼痛的形成和维持,以及诱导体内血管新生,改善微血管循环,恢复血管功能从而改善神经细胞缺血缺氧状态,并进行机体免疫系统、体内脂质代谢紊乱的调控等机制达到治疗 DPN 的目的。

网络药理学作为中药研究的一种新思路,仍存在很多需要解决的难题,如由于数据库和已有实验数据构成的网络模型存在不同程度的局限性,不能揭示完整的药理作用,但其利用网络和软件分析预测和分析中药基于信号通路模式的作用机制,也从新的层面为中药复方赋予了新的科学内涵。但同时需要更多的临床试验与动物试验去进一步验证。

#### [参考文献]

- [1] 缪黎黎, 葛静. 中西医治疗糖尿病周围神经病变研究进展[J]. 河南中医, 2017, 37(4): 742-744.
- [2] 率红莉, 汪津洋. 糖尿病周围神经病变治疗药物研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(4): 377-382.

- [ 3 ] 张敬一, 史国兵, 徐博, 等. 黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变的 Meta 分析[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(8): 643-648.
- [ 4 ] 胡智, 朱哲宇, 李勇, 等. 糖尿病周围神经病变发病机制及治疗研究进展[J]. 人民军医, 2017, 60(4): 409-411.
- [ 5 ] 董红. 黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变疗效初探[J]. 中医临床研究, 2012, 4(4): 65-66.
- [ 6 ] 向铮, 王贤亲, 刘婷, 等. 基于网络生物学方法的中药药理作用机制研究思考与探索[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 146-151.
- [ 7 ] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇[J]. 药学学报, 2012, 47(6): 696-703.
- [ 8 ] 黎英, 黄文聪. 网络医学的架构及其研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(12): 1959-1968.
- [ 9 ] 虞希冲, 杨伟, 吴波拉, 等. 网络药理学技术预测延胡索抗糖尿病作用及初步验证研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(11): 913-918.
- [ 10 ] 李明玥, 倪健, 尹兴斌. 改善中药口服生物利用度的制剂技术研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(2): 307-311.
- [ 11 ] 田盛. 中草药化合物类药性的理论研究[C]//中国化学会. 中国化学会第 28 届学术年会第 14 分会场摘要集. 2012: 23.
- [ 12 ] 卢贞, 翟光喜. 槲皮素纳米结晶混悬剂灌胃给药大鼠体内药物动力学研究[J]. 泰山医学院学报, 2012, 33(3): 202-203.
- [ 13 ] 王宝江, 张家英, 李丹, 等. 槲皮素对糖尿病性周围神经病变治疗的实验研究[J]. 中国医药导报, 2008, 5(14): 18-20.
- [ 14 ] 吴巧敏, 卢笑, 倪海洋. 山柰酚防治 2 型糖尿病研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(4): 344-349.
- [ 15 ] 贺栋业, 李晓宇, 王丽丽, 等. 金花茶化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 231-234.
- [ 16 ] 梁光荣, 唐静, 李国娟, 等. 山柰酚对非肥胖型糖尿病小鼠的治疗作用[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(11): 907-909.
- [ 17 ] 李芳. EGCC 减脂作用及其机理研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [ 18 ] 张菁菁, 张会娟. 血清胆碱酯酶与 2 型糖尿病并发症关系的研究[J]. 河南医学研究, 2014, 23(2): 103-104.
- [ 19 ] 施丽丽, 任明山, 吴元洁. 糖尿病周围神经病变与氧化应激研究现状[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(1): 94-96.
- [ 20 ] 李佳殷, 林丽珠. JNK 信号通路在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(18): 10-11.
- [ 21 ] 旷昕. HMGB1/TLR4 信号传导途径对神经病理性疼痛的影响及其机制探讨[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [ 22 ] 郑小兰, 陈陵, 罗振中, 等. p38MAPK 信号通路在糖尿病神经病变大鼠脊髓神经元凋亡中的作用[J]. 广东医学, 2015, 36(4): 509-511.
- [ 23 ] 杨琼玉, 李波. 2 型糖尿病患者血浆肿瘤坏死因子  $\alpha$  测定及意义[J]. 中国老年保健医学, 2007, 5(6): 21-22.
- [ 24 ] 韦洪江, 黄耀宁. 高脂血症与糖尿病周围神经病变的关系及其干预研究[J]. 中国医药导报, 2013, 10(18): 63-65.
- [ 25 ] 刘如俊. EGF 在糖尿病足溃疡创面愈合过程中的作用及其机制[D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
- [ 26 ] 员许民. 血浆血管内皮生长因子与 2 型糖尿病微血管病变的关系研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(34): 4327-4328.
- [ 27 ] 吉圣珺, 温业良, 赖其廷, 等. 低氧联合 TNF- $\alpha$  通过激活 STAT3 而非 ERK1/2 途径介导人肺微血管内皮细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(7): 896-900.
- [ 28 ] 邓小鹿, 彭镜, 何芳, 等. TNF- $\alpha$  对小鼠脑微血管内皮细胞 RhoA 活性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(6): 1210-1212.
- [ 29 ] 梅志刚, 曾永保, 王明智, 等. 电针耳甲区对糖尿病大鼠脑微血管内皮细胞肿瘤坏死因子- $\alpha$  mRNA、细胞黏附因子-1 和血管间黏附分子-1 蛋白表达的影响[J]. 针刺研究, 2012, 37(6): 440-446.
- [ 30 ] 吴炜景, 李理, 袁伟锋, 等. NF- $\kappa$ B p65 基因在 TNF- $\alpha$  诱导的肺泡上皮细胞氧化损伤中的作用[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2012, 11(1): 46-51.
- [ 31 ] 李璐, 王永香, 王秀海, 等. 地龙及其复方治疗糖尿病肾病的机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 227-234.
- [ 32 ] FANG H, WU Y, HUANG X, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response [J]. J Biol Chem, 2011, 286(35): 30393-30400.
- [ 33 ] 周红光, 陈海彬, 吴勉华. 从 Toll 样受体/核因子- $\kappa$ B 信号通路探讨中药免疫调节作用机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(8): 884-888.
- [ 34 ] 施君, 张文川. 糖尿病周围神经病变发病机制的研究进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2012, 32(1): 116-119.

[责任编辑 周冰冰]