

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学探讨加味桃核承气汤防治 糖尿病肾病的作用机制

周海¹, 吴晓玲², 林明欣³, 朱章志^{1*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 2. 深圳市宝安区中医院, 广东深圳 518000;
3. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 运用计算机网络药理学技术预测加味桃核承气汤治疗糖尿病肾病的作用靶点和信号通路, 进一步分析其防治糖尿病肾病的基础和作用机制。**方法:** 运用中药系统药理学成分分析平台 Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechANism of TCM (BATMAN-TCM) 数据库获取加味桃核承气汤的有效成分及作用靶标基因, 从 Comparative Toxicogenomics Database (CTD) 数据库收集糖尿病肾病的靶标基因, 将两者取交集后得到疾病-药物蛋白靶基因, 运用 STRING 构建蛋白质间相互作用网络, 并通过 Cytoscape 软件将结果进行网络可视化展示, 通过网络结构和节点间加权重联系的计算分析算法筛选出作用的关键基因。借助 DAVID 在线工具进行疾病-药物交集靶基因的基因本体论 (GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并采用 Cytoscape 软件 BiNGO 插件和 ClueGO 插件对靶点进行基因功能 (GO) 分析和基于 KEGG 通路富集分析的可视化展示。最后利用 CTD 数据库并结合文献学习, 获取关键基因于糖尿病肾病的疾病治疗作用。**结果:** 加味桃核承气汤的 621 个化合物中有 581 个靶点与糖尿病肾病相互关联。其中 NOS3, OAT, NT5C2, ACACB, AGXT, PDE3B 等关键基因主要通过调控神经组织的传递、胆碱能突触通路、钙离子通道、代谢通路、嘌呤代谢通路、血管紧张素-神经突触通路、环磷酸腺苷信号通路以及环磷酸鸟苷/环磷酸鸟苷酸依赖的蛋白激酶 (cGMP/PKG) 信号通路等路径, 在质膜、突触后膜、线粒体等分子反应中发挥作用。**结论:** 网络药理学方法科学预测加味桃核承气汤防治糖尿病肾病的关键靶标及其参与的相关通路, 提示该方剂对糖尿病肾病的防治作用为多靶点、多通路、多选择的复杂机制, 并且多与抗炎、氧化磷酸化及介导嘌呤代谢等机制相关。

[关键词] 桃核承气汤; 糖尿病肾病; 网络药理学; 关键基因; 降糖三黄片

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0176-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191528

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190417.1351.029.html>

[网络出版时间] 2019-04-19 11:28

Mechanism of Modified Taohe Chengqitang in Treating Diabetic Nephropathy Based on Network Pharmacology

ZHOU Hai¹, WU Xiao-ling², LIN Ming-xin³, ZHU Zhang-zhi^{1*}

(1. *The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;*
2. *Shenzhen Bao'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China;*
3. *Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of modified Taohe Chengqitang in preventing and treating diabetic nephropathy by means of network pharmacology. **Method:** Target genes of modified Taohe Chengqitang

[收稿日期] 20190117(002)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2014CB542903);国家自然科学基金面上项目(81873190);广东省中医药局建设中医药强省建设专项中医优势病种突破项目(粤中医函[2015]19号)

[第一作者] 周海, 博士, 从事中医药治疗内分泌疾病研究, E-mail: zhouhaitcm@outlook.com

[通信作者] *朱章志, 博士生导师, 主任医师, 从事中医药治疗内分泌疾病研究, E-mail: zhuangzi@vip.sina.com

were obtained from BAT-MAN database, while target genes of diabetic nephropathy were obtained from CTD database. The target genes of disease-drug protein were obtained by crossing two groups of genes. STRING was used to build the protein-protein interaction network and visualize the results. The key genes were screened out through the computational analysis algorithm of network structure and weighted relatedness between nodes. With DAVID online tools, gene ontology (GO) analysis of Disease-Drug Intersection Target Genes and enrichment analysis of kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway were conducted. Finally, CTD database and literature study were used to obtain the key genes in the treatment of diabetic nephropathy. **Result:** Among 621 compounds in modified Taohe Chengqitang, 581 of them were related to diabetic nephropathy. NOS3, OAT, NT5C2, ACACB, AGXT, PDE3B and other key genes mainly regulated nerve tissue transmission, cholinergic synaptic pathway, calcium channel, metabolic pathway, purine metabolic pathway, angiotensin-neurosynaptic pathway, cyclic guanosine monophosphate/cGMP-dependent protein kinase G (cGMP/PKG) signaling pathway and cyclic adenosine phosphate signaling pathway, with effect in molecular reactions, such as plasma membrane, postsynaptic membrane and mitochondria. **Conclusion:** The network pharmacology predicts the key targets of modified Taohe Chengqitang in the prevention and treatment of diabetic nephropathy and the related pathways involved, suggesting a multi-target, multi-channel and multi-choice complex mechanism, and which is mostly related to anti-inflammation, oxidative phosphorylation and purine metabolism.

[Key words] modified Taohe Chengqitang; diabetic nephropathy; network pharmacology; key gene; Jiangtang Sanhuang tablet

糖尿病肾病(DN)是糖尿病常见的慢性微血管并发症之一。随着糖尿病发病率的升高,DN的发病率也逐年上升,严重威胁糖尿病患者的预后及生存质量。据统计,20%~30%糖尿病患者将会发展为DN。DN发病机制极其复杂,可能是多种因素综合作用所致,包括肾小球超滤、氧化应激、遗传因子、晚期糖基化终末产物蓄积、多元醇通路的激活、蛋白激酶C(PKC)的活化、转化生长因子- β (TGF- β)高表达、细胞外基质增多等多个通路介导^[1]。因此,探究DN的发病机制,寻找有效的靶点进行早期干预,延缓疾病的进展,是医学研究的重要课题。而在整体观念、辨证论治等思想指导下,中药复方具有多途径、多靶点的治疗特点,在防治糖尿病及其并发症方面有独特的优势及较大的潜力。

加味桃核承气汤是广州中医药大学伤寒伤寒教研室(内分泌科)熊曼琪教授及其团队自20世纪80年代起对2型糖尿病的中医防治研究的成果,基于糖尿病气阴不足、瘀血阻络的病机,在经方桃核承气汤基础上加味而成的,并以此方剂成分开发生产了本院院内制剂降糖三黄片,具有多年临床使用经验,对防治糖尿病及其并发症起到了显著的临床疗效。《伤寒论》106条曰:“太阳病不解,热结膀胱,其人如狂,血自下,下者愈。其外不解者,尚未可攻,当先解其外,外解已,但少腹急结者,乃可攻之,宜桃核承气汤”,主治血热互结于下焦之证。加味桃核承气汤

以桃核承气汤为主方,加上黄芪片、玄参、生地黄、麦冬组成。其中黄芪片大补中气,玄参滋阴泻火,生津润燥,生地黄清热养阴生津,补肾水真阴不足,麦冬养阴润肺,益胃生津。全方共奏益气养阴,泻热逐瘀之功。多年的临床实践及动物实验研究表明,加味桃核承气汤对2型糖尿病及其并发症具有较好的效果,能够有效延缓肾脏病理进展^[2-3]。

前期临床实践及部分实验研究表明,加味桃核承气汤对DN具有良好的疗效,但缺乏系统的研究。由于中药成分的多样性和与人体相互作用的复杂性,目前发掘复方的潜在分子机制仍然相当困难。近年来系统生物学的研究能比较直观地揭示药物发挥的网络结构^[4],生物信息学的蓬勃发展也为明确中药复方的机制提供了可能性。因此,本研究选用近年来发展迅速的网络药理学方法,初次基于系统生物学的角度挖掘加味桃核承气汤防治DN的作用机制,以求更为全面了解加味桃核承气汤的机制,为进一步实验验证提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 加味桃核承气汤作用靶标预测 加味桃核承气汤组成包括桃仁、桂枝、大黄、芒硝、黄芪片、生地黄、麦冬、玄参、炙甘草9味中药。使用Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of TCM (BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsh.org/batman-tcm/index.php>)平台来预测复方作用靶标。

BATMAN-TCM 平台是以“药物-靶点相似性”模型筛选靶点。该平台的“药物-靶点相似性”模型是基于 Perlman 等的 SITAR 概念(similarity based inference of drug-targets),利用药物之间的结构,副作用,ACT(anatomical,therapeutic and chemical)分类系统、药物诱导基因表达、化合物相互作用分数的相似性,以及靶点之间氨基酸序列,蛋白互作网络接近中心性,GO 功能富集的相似性等,利用逻辑回归集成各项相似分数,并采用“弃-法交叉验证”后构建的寻找药物靶点的模型。基于 SITAR 概念的“药物-靶点相似性”模型,不仅从数据分析上优于 KRM,BLMs 等“药物-靶点相似性”模型,而且预测的中药靶点经实验验证,准确、可靠,目前预测中药靶点单方研究多以 Score cutoff = 20,复方多以 Score cutoff = 40 为基准筛选^[5]。故本研究中将加味桃核承气汤按君、臣、佐、使的顺序输入每味中药的完整拼音,寻找加味桃核承气汤的有效成分。并以 $P < 0.05$, Score cutoff = 40,预测此方的相关靶标。

1.2 DN 疾病靶点预测 应用 CTD (<http://ctdbase.org>) 数据库,以“diabetic nephropathy”获取 DN 靶标。

1.3 药物-靶点-疾病靶点数据库构建 通过预测加味桃核承气汤的所有潜在靶点,以及通过获取的 DN 的疾病靶标,将此二项靶点数据导入 Excel 表格中,映射得到加味桃核承气汤治疗 DN 的疾病靶点,构建化合物治疗疾病的靶点数据库。剔除掉与 DN 疾病靶点不匹配的成分和与加味桃核承气汤成分不相关的疾病靶点,最终得到药物-疾病靶点数据库。

1.4 药物-靶点-疾病相互作用网络构建 基于“药物-靶点-疾病”的靶点数据库,采用 STRING 在线 (<http://string-db.org>) 构建蛋白相互作用网络 (PPI),并使用 Cytoscape 3.7.0 (<http://www.cytoscape.org>) 软件进行蛋白网络结构可视化处理。

1.5 基因本体论 (gene ontology, GO) 分析 GO 分析是生物学领域中广泛用于基因功能分类的系统,主要用于描述基因产物细胞功能、分子功能和生物功能。使用 DAVID 工具 (<https://david.ncifcrf.gov>) 进行 GO 富集分析,统计学超几何分布定量 (P) 来评估存在于各 GO 注释中的蛋白质群及蛋白生物学功能的显著性。DAVID 采用独特的“no-cutout off”策略从微阵列试验中选择基因,输入列表中的基因与生物学注释相关联,然后从统计的层面,从数千个相关联的注释中找出最显著富集的生物学注释。采用模糊聚类算法,基于注释共同度进

行聚类分析,对被注释上的 Terms 进行聚类并给出聚类分值。分值越高,则代表基因在基因列表中越重要。

1.6 KEGG 通路富集分析 应用 DAVID 工具对药物-疾病交集蛋白靶标基因进行 KEGG 通路富集分析,得到加味桃核承气汤治疗 DN 的主要作用通路,此工具算法同 GO 分析算法。富集分析采用超几何分布设计的算法,针对富集分析显著性 P 的多重检验校正使用 Benjamin-Hochberg 校正方法。靶标分析功能基于功能条目的富集分析,考察中药的潜在靶标可能具有的生物学功能及参与的生物学通路。

1.7 关键基因筛选 关键基因是在生物学过程中发挥至关重要作用的基因,在相关通路中,其他基因的调控往往要受到该基因的影响,因此关键基因往往是重要的作用靶点和研究热点。通过共表达或蛋白相互作用构建互作网络,然后根据网络拓扑结构筛选关键基因。通过 Cytoscape 3.7.0 软件构建蛋白-基因的互作网络后,较多的基因-蛋白等分子节点和节点之间的相关连线往往会掩盖真正的关键基因,影响筛选过程。通过 MCC, DMNC, Degree, EPC, BottleNeck 等 11 种网络结构和节点间加权重联系的计算分析算法,算出加味桃核承气汤的关键基因,再取交集后筛选出重要的关键基因。

1.8 关键基因于 DN 的疾病治疗预测 使用药物相似度搜索工具在 CTD 数据库 (<http://ctdbase.org>) 获取 DN 的疾病靶标,并结合文献学习,搜索关键基因于 DN 的相关治疗作用。

2 结果

2.1 药物-疾病靶点预测结果 经过数据库搜索,共获取加味桃核承气汤的靶标基因 621 个, DN 的靶标基因共 18 259 个。交集后显示,加味桃核承气汤与 DN 的药物-疾病交集靶基因共 581 个。基于加味桃核承气汤在多年临床防治 DN 临床有效,以及相关基础研究的进一步证实,本研究通过药物-疾病靶标预测,进一步量化、可视化该方对 DN 的防治作用。通过韦恩图分析发现,加味桃核承气汤对 DN 的靶基因映射率为 3.2%,提示该方存在确切防治 DN 的作用靶点,该方对 DN 具有一定特异性的防治作用。见图 1。

2.2 药物-疾病交集靶基因 GO 分析结果 使用 DAVID 工具 (<https://david.Ncifcrf.gov>) 对获得的共同靶标基因进行 GO 富集分析,以 $FDR < 0.05$ 为基准筛选,共获得 198 个功能富集,选取 GO 富集的前 10 位,并以 $FDR < 0.01$ 为基准,运用 Cytoscape

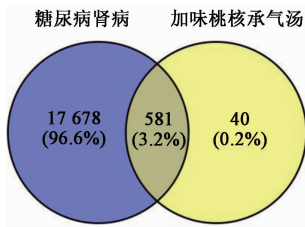
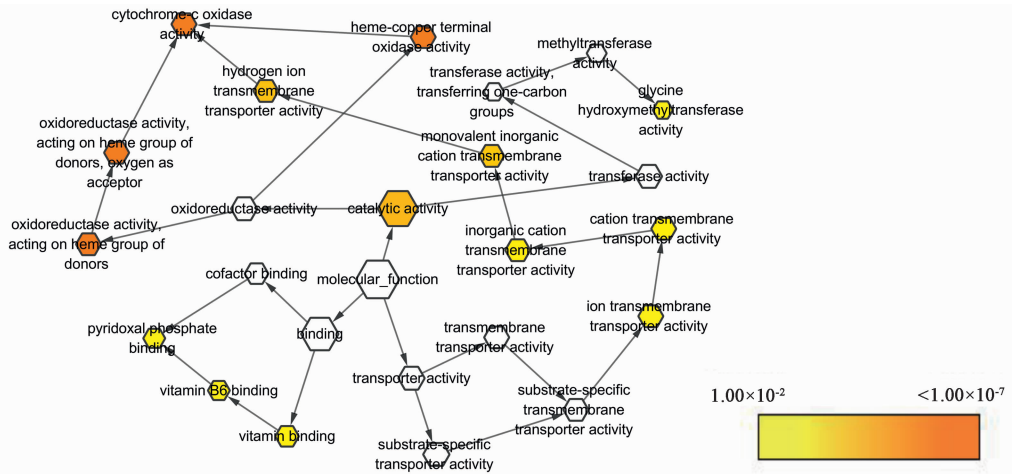


图 1 加味桃核承气汤与 DN 的药物-疾病交集靶基因
Fig. 1 Modified Taohe Chengqitang and diabetic nephropathy target genes

表 1 加味桃核承气汤-DN 交集靶基因本体论分析

Table 1 Modified Taohe Chengqitang and diabetic nephropathy genes ontology analysis

富集的 GO 项目	名称	数目/个	P	统计 FDR
GO:0008144	drugbinding	37	1.06×10^{-32}	1.70×10^{-29}
GO:0005886	plasmamembrane	253	5.14×10^{-30}	7.16×10^{-27}
GO:0005887	integralcomponentofplasmamembrane	131	2.01×10^{-29}	2.79×10^{-26}
GO:0042493	responsetodrug	59	4.02×10^{-27}	7.36×10^{-24}
GO:0007268	chemicalsynaptictransmission	46	6.05×10^{-21}	1.11×10^{-17}
GO:0045211	postsynapticmembrane	40	3.18×10^{-19}	4.42×10^{-16}
GO:0001518	voltage-gatedsodiumchannelcomplex	14	4.09×10^{-19}	5.69×10^{-16}
GO:0001975	responsetoamphetamine	19	4.71×10^{-19}	8.62×10^{-16}
GO:0005739	mitochondrion	104	1.05×10^{-17}	1.46×10^{-14}
GO:0055114	oxidation-reductionprocess	67	1.56×10^{-17}	2.86×10^{-14}



节点表示一个富集的 GO,节点颜色是根据富集度即“corr-p-value”进行着色,颜色越深表示富集度越显著,箭头的方向表示层级关系(图 3,4 同)

图 2 加味桃核承气汤-DN 交集靶基因 GO-Molecular Function 富集

Fig. 2 Modified Taohe Chengqitang and diabetic nephropathy target genes GO-Molecular Function pathway analysis

2.3 KEGG 通路富集分析结果 使用 DAVID 工具 (<https://david.ncifcrf.gov>) 对获得的共同靶标基进行 KEGG 富集分析, $FDR < 0.05$, 共获得 71 个通路富集, 并运用 Cytoscape (3.7.0) ClueGO 作可视化处理。加味桃核承气汤-DN 交集靶基因的网络主要涉及炎症因子调节, cGMP/PKG 信号通路, 心肌功能,

(3.7.0) BiNGO 插件行 GO 富集结果的可视化展示, 结果展示包括 GO 的 3 个分类, 即 Molecular function, Biological process 和 Cellular component 的富集结果。药物-疾病交集靶基因 GO 分析提示, 加味桃核承气汤-DN 交集靶基因的细胞功能主要在于质膜、突触后膜、线粒体, 分子功能主要是药物结合、药物效应、化学突触传递、电压门控钠通道复合体及氧化还原反应。见表 1, 图 2~4。

丝氨酸及苏氨酸代谢, 胰岛素信号通路传导, 脂肪酸代谢, 嘌呤代谢, 神经组织传导, 钙离子信号通道等。见图 5。

2.4 关键基因的筛选 本研究使用 STRING 在线 (<http://string-db.org>) 构建蛋白相互作用网络 (PPI), minimum required interaction score > 0.9 ,

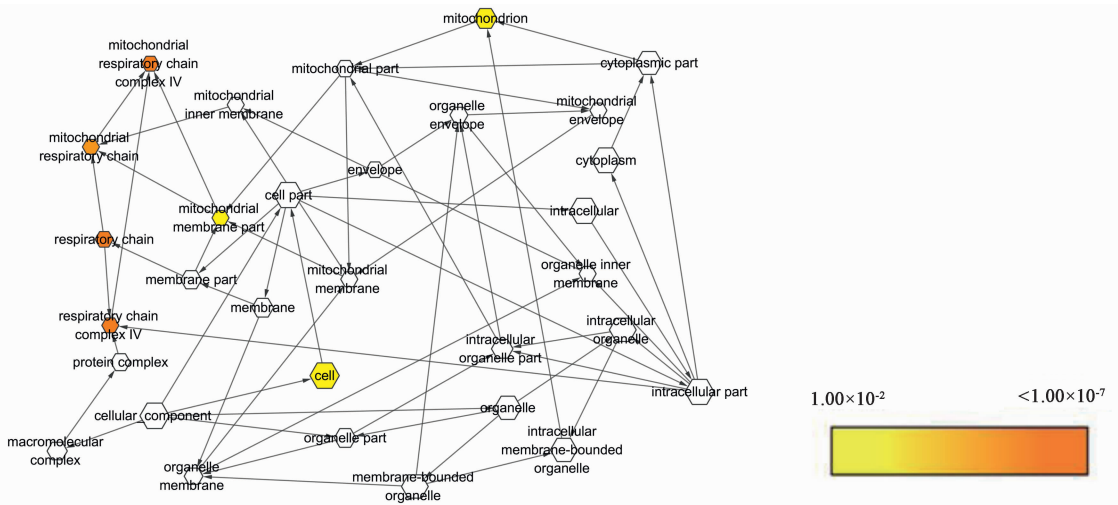


图 3 加味桃核承气汤-DN 交集靶基因 GO-Cellular component 富集

Fig. 3 Modified Taohe Chengqitang and diabetic nephropathy target genes GO-Cellular component pathway analysis

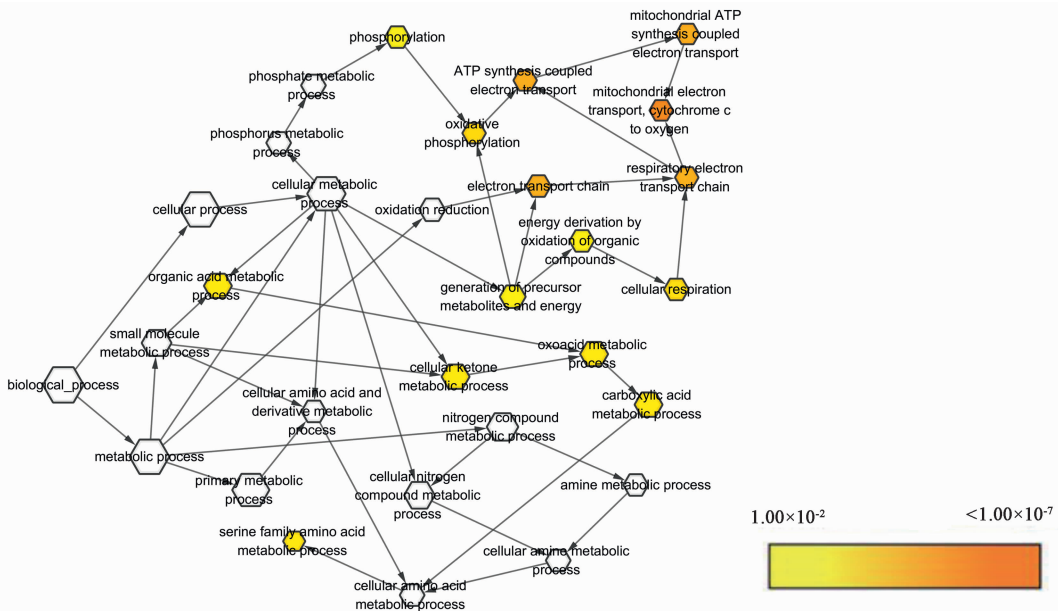


图 4 加味桃核承气汤-DN 交集靶基因 GO-Biological process 富集

Fig. 4 Modified Taohe Chengqitang and diabetic nephropathy target genes GO-Biological process pathway analysis

获得蛋白基因互作关系,见图 6。再使用 Cytoscape 软件构建蛋白基因的互作网络,通过 MCC, DMNC, Degree, EPC, BottleNeck 等 12 种网络结构和节点间加权重联系的计算分析算法,取综合得分 >0.13 ,算出加味桃核承气汤的关键基因 48 个, NOS3, CPT1A, CREB1, ESR1, OAT, NOS2, HSP90AB1, ESR2, Akt1, ARG2, NT5C2, NT5E, ARG1, GOT1, GOT2, CAD, HPRT1, ACACB, ACACA, OTC, ASS1, APRT, PDE9A, ASL, SHMT1, SHMT2, AMPD3, ADK, DCK, PRKCD, TH, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, PDE1A, PDE1C, DLG4, AGXT, CALM1, CALM3, CALM2, GLDC, PDE3B, GRIN2C, GRIN2D, PDE3A,

GATM, MT-CO2, 见图 7。

3 讨论

糖尿病晚期并发症——DN 是受多因素共同影响的系统性疾病,疾病的发生与高血糖、炎症、血管内皮功能受损、氧化应激、糖基化产物、血液流变学改变等多因素有关^[6]。现代分子学研究表明,不同的信号通路及相关蛋白、基因调控参与该病的发生与发展,产生复杂的相互作用机制,使西药治疗 DN 时,单纯通过使用降糖、降压、改善血液循环等“点对点”的药物干预方式,难以多方面改善 DN 进展,从而不能获得满意的临床疗效。作为广州中医药大学第一附属医院院内制剂,加味桃核承气汤以

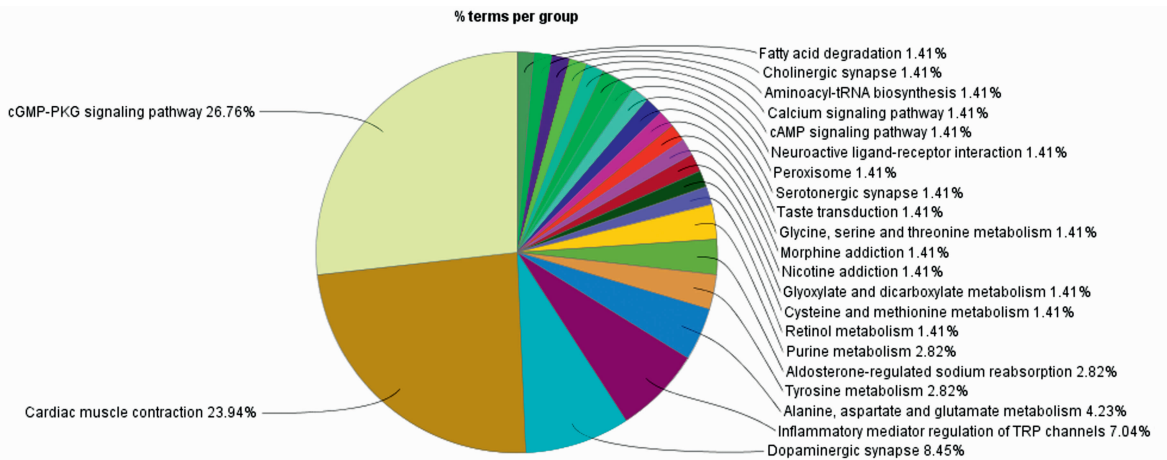


图 5 加味桃核承气汤-DN 潜在靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 Modified Taohe Chengqitang and diabetic nephropathy target genes KEGG pathway analysis

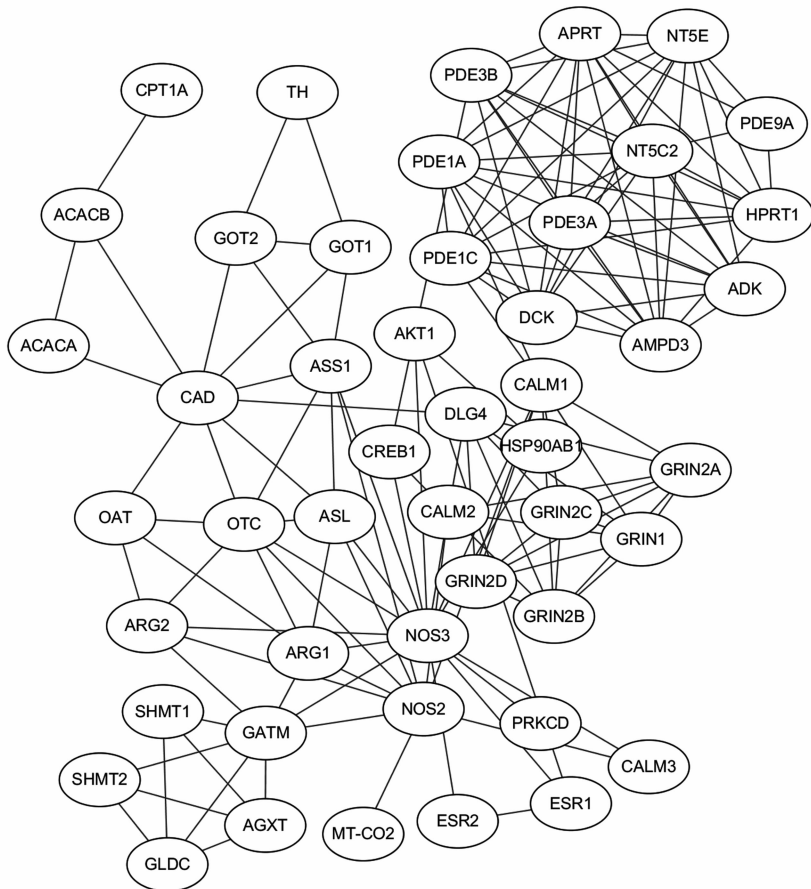


图 6 加味桃核承气汤-DN 关键基因网络互作

Fig. 6 Modified Taohe Chengqitang and diabetic nephropathy key genes interaction network

《伤寒论》经方桃核承气汤合养阴之品化裁而成,基于糖尿病“气阴不足、瘀血阻络”的病机辨证使用。在 30 余年的临床实践与科学研究中表明,加味桃核承气汤在改善糖尿病进展及 DN 方面,有多靶点的防治作用,为本病的临床治疗提供了有益补充。网络药理学是在系统生物学和多向药理学快速发展的

基础上提出的药物设计新方法和新策略,内容涉及系统生物学、网络生物学分析、基因的连接性和冗余度以及基因的多效性。网络药理学超越了单靶点思想的束缚,从多靶点的研究策略出发,提供了研究中药复方的新思路。本研究基于网络药理学研究方法,初步挖掘、分析加味桃核承气汤多靶点防治 DN

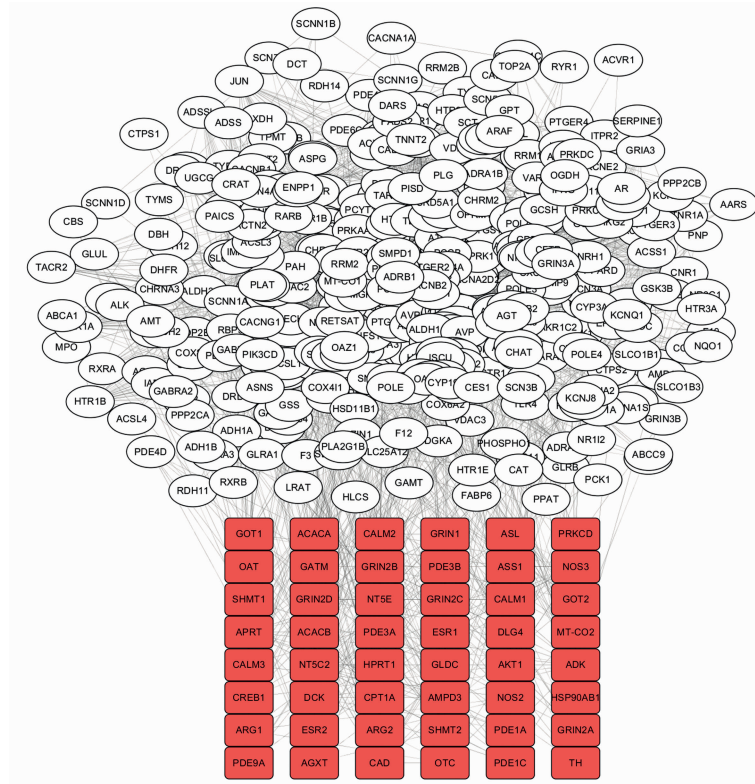


图 7 加味桃核承气汤-DN 交集基因网络作

Fig. 7 Modified Taohe Chengqitang and diabetic nephropathy intersection genes interaction network

可能的作用机制。

本文研究结果显示,经 BATMAN 所预测加味桃核承气汤作用靶标共有 621 个,其中与 CTD 所获取的 DN 的 18 259 个疾病靶标交集有 581 个,提示加味桃核承气汤靶标匹配率为 93.56%,但加味桃核承气汤到 DN 的靶基因映射率仅为 3.2%。研究表明,目前 DN 发病机制不明确,可能为多种发病因素综合作用所致,因此,CTD 数据库可搜索的 DN 疾病靶标多达 18 259 个,导致加味桃核承气汤药物靶标映射到 DN 疾病靶标映射率仅为 3.2%。但 DN 现代医学治疗较为棘手,缺乏对 DN 的精准靶向及有效治疗。在整体观念、辨证论治等思想指导下,中医药在防治 DN 具有独特的疗效。基于“气阴两虚、瘀热互结”病机,以加味桃核承气汤为组方所制成的降糖三黄片,对糖尿病的治疗,以及对其并发症 DN 的防治经过多年的临床时间证明,确有成效,因此本研究认为,在 DN 发病机制尚不明确的疾病背景下,即使药物-疾病靶标映射率较低,但加味桃核承气汤靶标匹配率为 93.56%,可能提示加味桃核承气汤是基于多靶点、多通路的机制,对 DN 的发生及进展起一定的防治作用,具有一定的研究意义。

通过对 581 个靶标基因进一步提炼筛选,发现 NOS3, CPT1A, CREB1, ESR1, OAT, NOS2,

HSP90AB1, ESR2, Akt1, ARG2, NT5C2, NT5E, ARG1, GOT1, GOT2, CAD, HPRT1, ACACB, ACACA, OTC, ASS1, APRT, PDE9A, ASL, SHMT1, SHMT2, AMPD3, ADK, DCK, PRKCD, TH, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, PDE1A, PDE1C, DLG4, AGXT, CALM1, CALM3, CALM2, GLDC, PDE3B, GRIN2C, GRIN2D, PDE3A, GATM, MT-CO2 共 48 个为药物-疾病关键靶标,结合加味桃核承气汤-DN 靶标基因 GO 与 KEGG 通路富集分析预测,提示加味桃核承气汤防治 DN 的作用机制主要包括调控炎症反应、氧化磷酸化及嘌呤代谢等复杂生理病理反应。

通过对关键基因的进一步研究发现, NOS3, NOS2, PDE1A, PDE1C 参与调控 NO 介导的肾脏炎症反应。生物利用度降低或一氧化氮(NO)解耦导致 NO 通路效应分子 cGMP 在肾脏细胞内水平下降,是驱动 DN 的关键因素^[7-9]。人体内 NO 由 L-精氨酸在 NO 合酶(NOS)的催化下生成。当 NOS 活性受到抑制时,NO 的生成减少。糖尿病患者皮质和髓质肾血管的实验研究显示,NO 依赖于肾内血流动力学的改变,清除活性氧导致 NO 与肾功能衰竭的发病机制有关。临床前的体内研究表明,通过抑制 cGMP-水解酶磷酸二酯酶(PDE),提高细胞内 cGMP 池来调控 NOS,恢复 NO 通路可减少炎症

表达,进而减轻蛋白尿,肌酐水平,发挥肾保护作用。同时,cGMP 参与调控 C 反应蛋白介导的糖尿病兔下肢动脉硬化程度^[10]。C 反应蛋白可激活人体肿瘤坏死因子- α (TNF- α),进而介导多种炎症因子的表达及炎症反应的发生。该研究显示,cGMP,PKG 表达的升高伴随 C 反应蛋白表达的降低,提示 cGMP/PKG 信号通路参与调控炎症反应,与本研究加味桃核承气汤-DN 作用通路预测结果一致。

分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)通路的激活与 DN 发病关系密切^[11],MAPK 通路广泛参与炎症、应激、凋亡、血管收缩等病理反应。CREB1 作为 p38 MAPK 通路的下游转录因子,其丝氨酸和苏氨酸位点被磷酸化导致转录因子活化,并调控 DN 肾脏细胞外基质重构,加快肾脏纤维化进展^[12]。也有研究表明,CREB 作为环磷酸腺苷(cAMP)信号通路的关键转录因子,可在 cAMP 通路激活后,通过调节细胞功能,诱导炎症因子 TGF- β_1 的表达,从而促进炎症损伤的肾小球硬化^[13]。不仅如此,CREB1 还参与 p38 MAPK 激活诱导的糖尿病大鼠血管内皮损伤^[14],ESR2 参与炎症损伤所致的糖尿病大鼠主动脉平滑肌功能失常^[15]。加味桃核承气汤在改善糖尿病肾脏细胞外基质、糖尿病大血管病变方面均具有一定作用。前期研究结果显示,该方可通过抑制炎症、氧化应激反应通路,降低晚期糖基化终末产物水平^[16];通过降低肾组织血管紧张素酶表达,减少血管紧张素 II 的生成^[17],从而减轻肾小球血流动力学负荷,改善血管内皮功能,延缓肾小球硬化及糖尿病大血管病变进展。其中晚期糖基化终末产物与 DN,视网膜病变,神经病变,大血管病变关系密切,具有高度异质性,广泛分布在人体的不同组织中,其中包括肾脏。结合本研究 KEGG,GO 通路富集分析提示,CREB1,ESR2 与糖尿病环境下的炎症损伤联系密切,加味桃核承气汤可能通过对炎症因子,cGMP/PKG 信号通路,心肌功能,丝氨酸及苏氨酸代谢的影响,通过细胞功能、药物结合与效应等途径,参与炎症、氧化应激等反应的调控作用,符合本研究加味桃核承气汤-DN 关键靶标基因及相关通路的预测结果。

血糖、血脂代谢紊乱伴随糖尿病病程始终,主要表现为高血糖、高血脂,产生糖脂毒性,破坏胰腺组织及胰岛细胞功能,阻碍胰岛素信号通路传递,进而加重糖尿病病情的进展。一项较新的研究表明,抑制 HSP90AB1 已被证实可以改善糖尿病小鼠胰岛素敏感性,改善高血糖状态^[18],提示 HSP90AB1 可能

成为治疗包括糖尿病在内的代谢性疾病的新靶点。AMP 激活的蛋白激酶(AMPK)是细胞能量代谢功能的重要传感器,参与糖脂代谢的调节。CPT1A 通过 AMPK/ACC/CPT1 通路的激活,参与脂肪酸代谢,降脂肪酸转运到线粒体中进行氧化^[19],从而改善高脂血症。加味桃核承气汤前期研究证明,该方在糖尿病大鼠血糖、血脂、胰岛素敏感性方面具有改善作用^[20-21]。以上研究提示,加味桃核承气汤可能通过调节 HSP90AB1 及 CPT1A 表达,参与调控血糖水平、脂肪酸代谢、胰岛素信号通路,进而改善糖尿病病情进展,防治糖尿病并发症——DN,符合本研究关键基因及其相关通路富集分析的预测结果。

本研究尚发现,关键基因显示加味桃核承气汤可能在细胞凋亡、肾小管重吸收及肾纤维化蛋白表达方面具有潜在影响,为今后加味桃核承气汤的进一步临床、基础实验研究提供参考方向。Akt 家族的丝氨酸苏氨酸激酶参与多种细胞过程,包括促进细胞存活,葡萄糖代谢,和细胞蛋白质合成,与糖尿病肾脏中炎症、细胞死亡和重构密切相关;Akt1 通过抑制凋亡过程参与细胞的生存途径,还能够诱导蛋白质合成^[22-23],使其成为细胞通路中的关键信号蛋白。基于加味桃核承气汤干预 Akt 参与的 DN 炎症信号通路研究,已由我团队展开动物实验工作。研究认为,OAT 为 DN 患者体内代谢产物的调控蛋白,Oat1 和 Oat3 是肾近端小管摄取大量药物、毒素和代谢物的限速步骤,在能量代谢中起着关键作用^[24-25],通过抑制 OAT 使得 OAT1/OAT3 的减少能够导致代谢产物尿液水平的下降,延缓 DN 的进展。肾纤维连接蛋白表达的增加主要依赖精氨酸酶 2(ARG2)的活化。有研究表明,ARG2 的药理阻滞或遗传缺陷介导肾组织保护作用,表现为糖尿病患者蛋白尿、BUN 和组织病理学的改善。研究推测通过抑制精氨酸酶-2,介导精氨酸酶在肾脏中的抑制作用,可延缓肾病的进展^[26]。

基于以上分析结果,结合文献学习,推测加味桃核承气汤防治 DN 的效应,与方中单味或多味中药的有效成分相关。加味桃核承气汤方中黄芪大补中气,其性味甘温,仲景善于用其补气,戴元礼在论述三消时指道,“三消……久不知气尽虚则无以治”,说明在糖尿病的慢性并发症的防治中,补气之法十分重要。现代药理研究表明,黄芪能起到增强机体免疫功能,改善血液流变学及胰岛素抵抗,对肾脏具有保护功能^[27]。相关动物实验研究表明,黄芪能够基于干预抑制肾脏氧化应激反应,减少炎症因子

水平,改善糖代谢,从而防止或减缓 DN 的进展。黄芪中含有黄芪多糖、黄酮类化合物、黄芪甲苷等主要成分。经黄芪干预的糖尿病大鼠,其 MCP-1、TGF- β 和 TNF- α 表达量下降,提示黄芪能够下调糖尿病大鼠炎症反应,减少肾脏炎症损伤及组织纤维化^[28];其内有效成分黄酮类化合物能够抗炎,抗氧化,清除 DN 中氧自由基,改善糖代谢紊乱,改善肾脏损伤。桃核承气汤中桃仁、桂枝通行经脉化瘀滞,桃仁辛苦滑利,通经活血,擅长于润下燥结,因 DN 病程日长,迁延难愈,瘀血贯穿病程始终,故使用桂枝、桃仁化瘀通滞。有前期实验表明,以桃仁为主药的桃核承气汤能抑制 Toll 样受体通路表达,从而降低糖尿病纤维化^[29],桃仁能够干预糖尿病大鼠 Akt mRNA 的表达,通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活,下调糖尿病大鼠组织中 Akt 及 p-Akt 的表达抑制或延缓组织纤维化^[30]。此作用机制与前文所得出的加味桃核承气汤调控关键基因 Akt 的发现相符合。现代药理研究表明,桃仁的主要成分苦杏仁苷,能够有效抑制组织纤维化^[31],从而延缓 DN 的进展。有实验通过比较桂枝-桃仁两药配伍使用与各单味药给药小鼠后,检查药物对消除凝时间及凝血酶的影响,对小鼠出、凝血时间和凝血酶时间影响,结果证实桂枝-桃仁配伍后较各单药抗凝血作用更强,因此临床上用来治疗各种血瘀证^[32]。同时,对单味桂枝有效成分的提取研究发现,桂枝中有效成分桂皮醛可以通过上调小鼠骨骼肌 GLUT4 基因水平的表达来下调血糖^[33],也可增强对高血糖条件下生成的活性氧的抗氧化防御,起到保护胰岛 β 细胞,从而起到控制血糖的作用^[34]。此外,桂枝有效成分中挥发油能够抑制炎症介质组织胺和前列腺素 E 的释放,而且能够清除过多的自由基,从而保护细胞不受氧化作用的损害。从而基于抗凝作用、抗氧化反应及调控炎症反应起到延缓糖尿病及 DN 的发生、发展,与桃仁协同在桃核承气汤中起作用。

芒硝、大黄泻下其中郁热而下积血。大黄记载于《神农本草经》,其功效为“主下淤血,血闭,寒热,破癥瘕积聚、留饮宿食,荡涤肠胃,推陈致新,通利水谷,调中化食,安和五脏”。在桃核承气汤中芒硝、大黄合用,泻下郁热而下积血。现代药理分析发现大黄中含有大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、等多种有效成分,已广泛用于治疗 DN 并取得了显著疗效。网络药理研究发现,MAPK 是加味桃核承气汤防治 DN 的关键基因之一,提示加味桃核承气汤可能通过调节 p38 MAPK 的信号分子 CREB1 以及

抑制 cAMP 通路减少 DN 中炎症损伤及肾脏纤维化进展。李学娟等^[35]观察大黄素对高糖培养的肾小球系膜细胞(UMC)增殖、纤维连接蛋白(FN)表达及 p38 MAPK 信号转导通路的影响,发现大黄素能够抑制高糖诱导的大鼠肾小球系膜增殖, FN 表达与 p38 MAPK 活化。表明大黄素抗糖尿病肾脏纤维化的作用与大黄素抑制 p38 MAPK 信号通路密切相关,与本研究发现的加味桃核承气汤复方调控的关键基因及作用机制相符。

在桃核承气汤基础上,合用增液汤,以起益气养阴清热之用。增液汤由生地黄、麦冬、玄参。在糖尿病小鼠的实验中发现,增液汤能够促进胰岛素的分泌,降低糖尿病小鼠的血糖,改善正常小鼠和糖尿病小鼠的糖耐量^[36]。有针对增液汤的网络药理学研究、聚类分析提示^[37],增液汤参与了糖醇、糖蛋白、核苷酸代谢以及氧化应激,能够起到防治 DN 的作用,其作用的靶蛋白与本研究的关键基因存在重叠,证实基于“气阴不足、瘀血阻络”病机,在桃核承气汤中增加增液汤合方,能够起到协同治疗作用。综上所述,加味桃核承气汤中单味药或药物协同作用,均能在 DN 的发生发展中起作用,并主要与调控炎症因子及胰岛素代谢、脂肪代谢相关。

综上所述总结出,加味桃核承气汤防治 DN 的作用机制,主要通过影响关键基因表达,调控炎症因子,cGMP/PKG 信号通路,丝氨酸及苏氨酸代谢,胰岛素信号通路传导,脂肪酸代谢,嘌呤代谢,神经组织传导等细胞,分子信号传导通路,主要参与炎症反应、糖脂代谢、胰岛素效应、氧化磷酸化及嘌呤代谢等生物学功能,从而达到缓解 DN 进展的目的。本研究基于网络药理学方法,对加味桃核承气汤与 DN 的靶标基因及其相关通路进行了探索性研究,结果显示与目前本团队已获得关于加味桃核承气汤对 DN 的防治机制的实验研究结论基本相符。本研究结果为该方进一步在细胞凋亡、肾小管重吸收及肾纤连蛋白方面的研究提供了参考方向。药有个性之特长,方有合群之妙用,加味桃核承气汤作用于 DN 是多靶点、多通路、多功能的复杂网络结构机制,为中医药多靶点防治疾病提供一定的参考价值。但由于网络药理学的局限性,基于系统生物学的研究方法虽能够较为直观地系统地预测化学成分与作用靶点结合,但未能明确化学成分对关键基因表达的上调与下调关系,未考虑存在药物、靶点、疾病之间相互作用强度差别,尚不能完全揭示药物在生物体内状况,因此分析所得的结果还需相应的

药效及机制实验进一步探索验证,希望在今后的研究中,以网络药理学研究方法为基点,进一步开展实验工作以阐明中医药在防治疾病的多靶点、多通路、整合调节的复杂网络结构机制。

[参考文献]

[1] 李娜,孙汇,王拓,等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 北华大学学报:自然科学版,2012,13(1):68-72.

[2] 江丹,吴伟,林明欣,等. 降糖三黄片对早期糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF- β_1 /Smad1 信号通路的影响[J]. 世界中医药,2014,9(8):1067-1072.

[3] 陈云,李赛美,王保华. 降糖三黄片对糖尿病肾病大鼠肾组织蛋白激酶 C 和转化生长因子 β_1 的影响[J]. 中医杂志,2012,53(8):689-692.

[4] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11):682-690.

[5] WANG Y, LIU Z, LI C, et al. Drug target prediction based on the herbs components: the study on the multitargets pharmacological mechanism of Qishenkeli acting on the coronary heart disease[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, doi: 10.1155/2012/698531.

[6] 赵娟,戴助. 糖尿病肾病的药物治疗进展[J]. 医药导报,2017,36(1):60-64.

[7] Prabhakar S S. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy [J]. Semin Nephrol, 2004, 24(4):333-344.

[8] Tessari P, Cecchet D, Cosma A, et al. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy[J]. Diabetes, 2010, 59(9):2152-2159.

[9] ZENG Z, LI L, ZHANG Z, et al. A Meta-analysis of three polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) and their effect on the risk of diabetic nephropathy[J]. Hum Genet, 2010, 127(4):373-381.

[10] 罗荔,张丽,靳瑾,等. C 型钠尿肽对糖尿病兔下肢动脉硬化影响及机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2016,16(14):2624-2627,2691.

[11] Fujita H, Omori S, Ishikura K, et al. ERK and p38 mediate high-glucose induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(1):120.

[12] 王丽晖,段惠军,史永红,等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在糖尿病大鼠肾组织细胞外基质重构中的作用[J]. 解放军医学杂志,2005(4):310-313.

[13] 黄倩,张素萍,施子禄. 人參多糖通过 cAMP/PKA/CREB 信号通路抗糖尿病肾病肾纤维化作用机制研

究[J]. 中国药理学通报,2018,34(5):695-701.

[14] 鲍陶陶,杨晓春,储全根,等. 益气活血方对糖尿病大鼠 p38MAPK 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016,22(8):148-152.

[15] Sartoretto S M, Santos F F, Costa B P, et al. Involvement of inducible nitric oxide synthase and estrogen receptor ESR2 (ER β) in the vascular dysfunction in female type 1 diabetic rats[J]. Life Sci, 2018, 15(7):133-142.

[16] 许帅. 基于 AGEs-RAGE 加味桃核承气汤防治 T2DM 大血管病变大鼠的实验研究[D]. 广州:广州中医药大学,2017.

[17] 陈云. 降糖三黄片对糖尿病大鼠肾脏保护作用及机理研究[D]. 广州:广州中医药大学,2011.

[18] Jing E, Sundararajan P, Majumdar I, et al. Hsp90 β knockdown in DIO mice reverses insulin resistance and improves glucose tolerance[J]. Nutr Metab, 2018, doi: 10.1186/s12986-018-0242-6.

[19] 郝梦娇,党院霞,周欣欣,等. 黄芪散对高脂血症大鼠 AMPK/ACC/CPT1 通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2018,43(12):2586-2592.

[20] 古玉梅,朱章志,许帅,等. 加味桃核承气汤对糖尿病大鼠血糖、血脂及大血管病变的影响[J]. 中药新药与临床药理,2017,28(5):583-587.

[21] 熊曼琪,林安钟,朱章志,等. 加味桃核承气汤对 II 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1997(3):165-168.

[22] Rane M J, SONG Y, JIN S, et al. Interplay between Akt and p38 MAPK pathways in the regulation of renal tubular cell apoptosis associated with diabetic nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(1):F49-F61.

[23] Tschoop O, YANG Z Z, Brodbeck D, et al. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis [J]. Development, 2005, 132(13):2943-2954.

[24] Ahn S Y, Nigam S K. Toward a systems level understanding of organic anion and other multispecific drug transporters: a remote sensing and signaling hypothesis [J]. Mol Pharmacol, 2009, 76(3):481-490.

[25] WU W, Dnyanmote A V, Nigam S K. Remote communication through Slc and Abc drug transporter pathways: an update on the remote sensing and signaling hypothesis [J]. Mol Pharmacol, 2011, 79(5):795-805.

[26] Morris S M, YOU H, GAO T, et al. Distinct roles of

- arginases 1 and 2 in diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(4):899-905.
- [27] 杨金泉,何海波. 黄芪的药理作用研究发展[J]. *医学理论与实践*, 2010, 23(2):1-3.
- [28] 邓海鸥,林凯,黎映兰,等. 黄芪多糖对老年早期糖尿病肾病者 TNF- α 、IL-6 和免疫功能的影响[J]. *中药材*, 2014, 37(4):713-716.
- [29] 徐阳,王军. 桃核承气汤对大鼠糖尿病大血管 Toll 样受体表达的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2017, 23(1):60-64.
- [30] 周玉,刘国涛,卢增珍等. 桃仁对糖尿病大血管纤维化大鼠蛋白激酶 B 信号通路的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2019, 25(2):61-67.
- [31] 李雪梅,冯琴,彭景华,等. 苦杏仁苷对二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化的防治作用[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2011, 21(4):221-223, 259.
- [32] 周蓓. 桂枝桃仁及其配伍对抗凝血作用影响的研究[J]. *云南中医中药杂志*, 2014, 35(1):62-63.
- [33] Nikzamir A, Palangi A, Kheirollaha A, et al. Expression of glucose transporter 4 (GLUT4) is increased by cinnamaldehyde in C2C12 mouse muscle cells [J]. *Iranian Red Crescent Med J*, 2014, 15(2):13426.
- [34] Subash-Babu P, Alshatwi A A, Ignacimuthu S. Beneficial antioxidative and antiperoxidative effect of cinnamaldehyde protect streptozotocin-induced pancreatic beta cells damage in Wistar rats [J]. *Biomol Therap*, 2014, 22(1):47.
- [35] 李学娟,陈泽彬,魏红,等. 大黄素对高糖培养的 GMC 增殖、FN 表达及 p38MAPK 的影响[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(2):233-238.
- [36] 葛宝林. 增液汤对干眼模型大鼠的干预作用及对 Th1/Th2 平衡的影响 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2017.
- [37] 李跃文,刘志强,王博龙. 增液汤的网络靶标预测及作用机制研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(12):1842-1848.

[责任编辑 张丰丰]