

# 基于网络药理学和细胞生物学研究黄芪治疗糖尿病肾病的作用机制

田崇梅<sup>1</sup>, 傅利萍<sup>1</sup>, 夏道宗<sup>2\*</sup> (1. 浙江中医药大学附属绍兴中医院, 浙江 绍兴 312000; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310053)

**摘要:**目的 运用网络药理学和细胞生物学验证探讨黄芪治疗糖尿病肾病的分子作用机制。方法 通过中药系统药理学数据库(TCMSP)筛选出黄芪有效成分;利用 Drugbank 数据库、GeneCards 和 OMIM 数据库筛选黄芪有效成分和糖尿病肾病的相关靶点;应用 String 数据库绘制 PPI 网络;通过 Cytoscape 软件绘制黄芪-成分-靶点-疾病网络;借助 DAVID 数据库对靶点进行 GO 和 KEGG 通路分析;利用 KEGG 数据库构建黄芪治疗糖尿病肾病的通路图;细胞生物学验证分析黄芪中的有效成分对糖尿病肾病的保护作用。结果 筛选得到黄芪 12 个有效成分,涉及 56 个作用靶点,主要涉及氧化应激、炎症和细胞凋亡等生物过程,主要调节有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)、缺氧诱导因子(HIF)、ErbB、p53 和核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)等信号通路,其作用机制包含抗氧化、抗炎和抑制细胞凋亡等。细胞生物学验证分析表明槲皮素和山柰酚能够降低高糖引起的细胞凋亡,降低活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平( $P < 0.05$ )、提高过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性( $P < 0.05$ )。槲皮素能够显著降低高糖引起的 HK-2 细胞磷酸化 P38 MAPK 和 JNK 蛋白表达水平( $P < 0.01$ )。结论 本研究通过网络药理学层面探讨了黄芪治疗糖尿病肾病的作用机制,发现可能是通过多成分、多靶点、多通路等途径发挥其治疗作用,黄芪中的活性成分槲皮素和山柰酚可能是其治疗糖尿病肾病的物质基础。体外水平验证了黄芪中的主要活性成分槲皮素和山柰酚能够降低高糖引起的细胞损伤,降低氧化应激反应,提高抗氧化性,为黄芪治疗糖尿病肾病提供新思路。

**关键词:**黄芪;糖尿病肾病;网络药理学;MAPK 信号通路

doi:10.11669/cpj.2022.01.008 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2022)01-0052-10

## Exploration into the Mechanism of Effective Components and Potential Targets of Astragali Radix in Treatment of Diabetic Nephropathy Based on Network Pharmacology and Cell Biology Verification

TIAN Chong-mei<sup>1</sup>, FU Li-ping<sup>1</sup>, XIA Dao-zong<sup>2\*</sup> (1. Shaoxing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Shaoxing 312000, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the molecular mechanism of Astragali Radix in the treatment of diabetic nephropathy (DN) by the network pharmacology and cell biology verification. **METHODS** The main active ingredients of Astragali Radix were obtained through TCMSP. Drugbank, Gene Cards and OMIM were used to predict and screen the targets of Astragali Radix and DN. The PPI network was constructed using the String database. The GO and KEGG pathways involved in the targets were analyzed by DAVID. The ingredients-targets-diseases network was constructed by Cytoscape software. Cell biology verification analyzes the protective effect of active ingredients in Astragali Radix on DN. **RESULTS** The results showed that 12 active components and 56 targets of Astragali Radix were involved. The network results showed that the process of oxidative stress, inflammation, apoptosis were mainly involved, which played a role in the treatment of DN by adjusting the MAPK, HIF, ErbB, p53, NF- $\kappa$ B and other signal pathways. Its mechanism of action involved antioxidation, anti-inflammatory and anti-apoptosis. Cell biology verification analysis showed that quercetin and kaempferol could reduce cell apoptosis caused by high glucose, reduce ROS level ( $P < 0.05$ ), and improve CAT and SOD capacity ( $P < 0.05$ ). Quercetin could significantly reduce the protein expression levels of phosphorylated P38 MAPK and JNK in HK-2 cells caused by high glucose ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** In the current study, the mechanism of Astragali Radix in the treatment of DN by network pharmacology was explored. Results showed that Astragali Radix could act on multi-ingredient, multi-target and multi-pathway played a potential therapeutic role on DN. The prediction results of network pharmacology suggest that the quercetin and kaempferol in Astragali Radix might be the material basis for treatment of DN. The analysis proved the quercetin and kaempferol in Astragali Radix can reduce cell damage caused by high glucose, reduce oxidative stress, and improve antioxidant capacity by *in vitro* experiment,

**基金项目:**国家自然科学基金项目资助(81673656);浙江省自然科学基金项目资助(LGF20H300003);浙江省医药卫生厅项目资助(2019RC085);绍兴市科技局医卫类项目资助(2018C30115)

**作者简介:**田崇梅,女,硕士,药师 研究方向:中药药理学研究 \* **通讯作者:**夏道宗,男,博士,教授,博士生导师 研究方向:中药代谢、抗炎与免疫药理研究 Tel: (0571)86633367

providing a new idea for Astragali Radix in the treatment of DN.

**KEY WORDS:** Astragali Radix; diabetic nephropathy; network pharmacology; MAPK signal pathway

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的1种并发症,是个极其复杂的病理生理过程,涉及多个生物学和病理过程<sup>[1]</sup>,也是糖尿病死亡率显著升高的主要原因<sup>[2]</sup>。治疗DN存在耗时间长、治疗费用高等特点,给患者及家属带来严重的心理负担和生活压力<sup>[3]</sup>。急、慢性的高糖状态可抑制肾脏相关细胞的生长,如肾小管上皮细胞(HK-2)、人胚肾细胞(HEK-293细胞),诱导活性氧(ROS)的大量产生,出现一系列氧化应激反应<sup>[4]</sup>。因此,开发有效的治疗方法,进一步了解DN的发病机制势在必行。

黄芪(Astragali Radix)属于豆科多年生植物,是蒙古黄芪(*Astragalus mongholicus* Bunge)的干燥根,始载于《神农本草经》,其味甘、性温,归脾肺经,有益气健脾,利尿消肿,升阳举陷,益卫固表等功效,具有抗炎、抗氧化应激、抗肿瘤、延缓衰老、治疗哮喘、免疫调节等药理活性<sup>[5-6]</sup>,是1味重要的传统中药。中医论证分析DN患者多为气阴两虚,且血瘀于脉,黄芪具有较好的益气活血作用,对治疗糖尿病有一定的作用。黄芪能够消除DN患者的尿蛋白情况,长期服用也可以降低血糖、血脂,改善肾脏功能,并且胰岛素与黄芪注射液联用对胰岛功能的保护作用显著增强<sup>[7]</sup>。有研究发现,黄芪可通过扩张血管,改善微循环,增加血流量对肾小球基膜机械屏障起到保护作用<sup>[8]</sup>,同时通过与西医结合积极控制血糖,可显著降低肾小球的滤过率,这对DN患者的肾脏有更好的保护作用<sup>[9]</sup>。黄芪能够改善DN小鼠的炎症指标,干预T细胞群及一些炎症因子的变化,可延缓肾功能进展<sup>[10]</sup>。虽然黄芪治疗DN的报道有很多,但黄芪多成分、多靶点的调控作用,使黄芪治疗糖尿病肾病的作用机制仍需探讨。因此借助网络药理学的方法从系统生物学的角度来挖掘黄芪治疗DN的可能作用机制,为黄芪治疗DN提供新靶点。网络药理学通过选择潜在信号靶点,应用系统的方法研究药物在生物学中的功能特性,为药物研究提出一种新的有效方法<sup>[11]</sup>。网络药理学能够解释药物与疾病之间的复杂关系,为研究者提供思路<sup>[12]</sup>。

本研究运用网络药理学研究方法,通过黄芪化学物质成分入手,通过口服生物利用度(oral bio-availability, OB)和类药性(drug-likeness, DL)值筛选

黄芪中的潜在有效成分,构建黄芪-成分-靶点-疾病网络。通过网络药理学方法阐释黄芪多成分、多靶点、多途径的作用机制,并且通过生物验证实验分析黄芪中潜在物质对DN的治疗作用,为开发治疗DN的新药提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

HK-2细胞株(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。

### 1.2 主要试剂和仪器

槲皮素和山柰酚(纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司);DMEM/F12培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);CCK-8试剂(Biosharp Life Sciences生物试剂公司);ROS、CAT、SOD试剂盒(南京建成生物试剂公司);p38 MAPK、JNK、phosph-p38 MAPK、phosph-JNK、 $\beta$ -actin和荧光二抗(美国Cell Signaling Technology试剂公司)。

多功能酶标仪(瑞士Te-can公司);荧光影像分析仪(美国LI-COR公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 黄芪有效成分收集与筛选

通过TCMSP数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),以“黄芪”输入关键词获取黄芪潜在成分,筛选条件:OB $\geq$ 30%和DL $\geq$ 0.18,预测黄芪中的活性成分信息。

### 2.2 黄芪有效成分和糖尿病肾病相关靶点收集

通过Drugbank数据库(<https://www.drugbank.ca/>),统计黄芪有效成分相关靶点,然后在Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)查找蛋白相关靶点所对应的基因,即黄芪作用靶点。通过GeneCards(<http://www.genecards.org/>)与OMIM(<http://www.omim.org/>)数据库输入关键词“diabetic nephropathy”,查找人类相关基因,筛选与DN相关的作用靶点,即疾病靶点。

### 2.3 靶点相互作用网络构建与分析

将黄芪有效成分靶点与DN靶点取交集,得到黄芪有效成分治疗DN的潜在作用靶点。通过String数据库(<https://string-db.org/>)得到各靶点间相互作用网络,即PPI网络。

## 2.4 黄芪-成分-靶点-疾病网络构建

将 12 个黄芪有效成分的预测靶点结果和疾病靶点进行分析,在 Excel 表中分别构建“药材-有效成分”“有效成分-靶点”和“靶点-疾病”之间的相互关系,图中以药材、有效成分、靶点蛋白和疾病为 4 类节点,它们之间有相互关系的分别用边相连,采用 Cytoscape 3.6.1 软件的关联(Merge)功能构建黄芪-成分-靶点-疾病网络模型。

## 2.5 生物过程与通路分析

通过生物学信息注释数据库,将黄芪潜在作用靶点导入其中 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),限定物种为人,进行 GO(Gene Ontology)和 KEGG 通路富集分析,最终设定阈值  $P < 0.05$ 。

## 2.6 靶点通路分析

在 KEGG mapping 中的 Search Pathway(<https://www.kegg.jp/>)输入药物与疾病相关的靶点蛋白,得到黄芪治疗糖尿病肾病的通路图,筛选出前 13 条通路,并整合绘制最终的通路图。

## 2.7 细胞培养及分组

HK-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 细胞培养液中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞分为 6 组:正常组(5.5 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖)、模型组(30 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖)、槲皮素+高糖组(30 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖+50 μmol·L<sup>-1</sup> 槲皮素)、山柰酚+高糖组(30 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖+50 μmol·L<sup>-1</sup> 山柰酚)、槲皮素组(5.5 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖+50 μmol·L<sup>-1</sup> 槲皮素)和山柰酚组(5.5 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖+50 μmol·L<sup>-1</sup> 山柰酚)。

## 2.8 CCK-8 试验

将 HK-2 细胞培养在 96 孔板中(每孔 5×10<sup>4</sup> 个细胞),按“2.7”项分组给药 24 h 后,吸弃培养液,按照试剂盒说明书加入 CCK-8 试剂,37℃ 培养 1 h,在 450 nm 处通过多功能酶标仪测定吸光度,计算细胞存活率。

## 2.9 ROS 水平、CAT 和 SOD 活性测定

将对数期生长的 HK-2 细胞,按照每毫升 5×10<sup>4</sup> 个细胞接种在 96 孔培养板内,HK-2 细胞于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,当细胞长至约 80% 时,吸弃孔中培养基,加入不同受试药物至 96 孔中,每个组别设 6 个复孔,在培养箱中继续培养 24 h 后,吸弃孔中液体,并加入 20 μL DCFH-DA 荧光液,测定 ROS 水平,并按照试剂盒说明书测定 CAT 和 SOD 活性。

## 2.10 Western blot 分析

将对数期生长的 HK-2 细胞接种到 6 孔板中,按照分组给药,根据 BCA 法测蛋白浓度,然后进行蛋白电泳,蛋白样品上样量为 40 μg,用 50 V 电压将样品从浓缩胶跑至分离胶,跑成一条直线后,换成 100 V 电压,待样品跑至距玻璃板底部 1 cm 左右停止电泳,然后进行湿转膜,将不同分子量的 PVDF 膜进行封闭,放在 1×TBS-T 稀释的 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h,加入 1 抗(P38 MAPK, JNK, phosph-P38 MAPK, phosph-JNK 和 β-actin)4℃ 过夜,然后加入对应荧光 2 抗,洗膜后使用荧光影像分析仪显影和扫描,ImageJ 1.41 软件(美国 Bethesda 公司)进行数据分析。

## 2.11 统计学分析

所有数据均使用 SPSS17.0 统计软件进行处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间的差异按照方差分析方法进行检验分析,并且用最小显著法检验进行两两比较, $P < 0.05$  时有统计学意义。

# 3 结果

## 3.1 黄芪潜在有效成分的筛选

在 TCMSP 数据库搜索黄芪,共得到 87 个化学成分,同时满足 OB≥30% 和 DL≥0.18 条件,并且去掉无靶点成分,共得到 12 种化学成分,结果见表 1。

## 3.2 作用靶点预测

将 Drugbank 数据库得到的所有靶点进行整理,其中槲皮素靶点有 156 个;槲子醇靶点有 13 个;常春藤皂苷元靶点有 24 个;异鼠李素靶点有 37 个;3,9-di-O-methylisossolin 靶点有 23 个;7-O-methylisomucronulatol 靶点有 45 个;A1 靶点有 22 个;联苯双酯靶点有 7 个;刺芒柄花素靶点有 39 个;毛蕊异黄酮靶点有 22 个;山柰酚靶点有 63 个;1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene 靶点有 4 个;删除重复靶点,得到黄芪有效成分作用靶点 95 个。这说明黄芪有效成分均具有多靶点,即相同的靶点对应于不同的有效成分,不同的靶点也可作用于同种成分,体现了黄芪具有多成分、多靶点的特点。由 GeneCards 和 OMIM 数据库得到 DN 靶点 2 418 个,将药物靶点与疾病靶点进行比对,筛选出 56 个可能与治疗 DN 相关的作用靶点,其具体信息见图 1 和表 2。

## 3.3 蛋白相互作用网络分析

将得到的 56 个靶点制成靶点间相互作用网络图,结果见图 2(其中节点代表蛋白质,线代表蛋白质间相互联系,亮蓝色线表示数据源于蛋白数据

库,紫色线表示数据源于高通量实验,绿色和黑色线表示基因邻域及共表达预测,黄色线表示数据源于文本挖掘)。从图2中可看出这56个靶点间相互作用,相互关联,由此表明这些靶点是相互联系的,并且通过多途径、多方面的协调起到治疗DN的作用。

3.4 黄芪-成分-靶点-疾病网络构建

采用 Cytoscape 软件构建黄芪-成分-靶点-疾病网络,这个网络包含70个节点(1个药材、12个有效成分、56个靶点和1个疾病),其中药材和疾病使用V字形节点,成分使用椭圆形节点,靶点使用长方形节点,相互关系用边表示(图3)。椭圆形节点代表成分,与成分节点连线越多,代表其可能是发挥药效的成分,其中槲皮素和山柰酚作为黄芪中的有效成分具有治疗DN的潜力,所以后续生物学验证选取槲皮素和山柰酚进行体外细胞实验

研究。图3中长方形节点代表靶点,与其连线越多代表在治疗DN中发挥作用越大,其中PPARG、PRSSI、PTGSI、ACHE、AR、ESR1靶点可能是发挥治疗作用的潜在靶点。黄芪治疗DN的靶点有56个,其中与氧化应激相关的基因有GSTP1、NQO1、NOS3等;与炎症反应相关基因有IL-6等;与细胞凋亡相关基因有CASP3、CASP8、CASP9、BCL-2等。因此,由靶点分布状态与其自身状态推测,黄芪发挥药效主要是通过抑制体内氧化应激反应、炎症反应及细胞凋亡。

3.5 GO和KEGG通路分析

将黄芪有效成分预测出的56个作用靶点通过DAVID数据库进行GO分析。黄芪治疗DN的靶点在生物过程中,主要涉及细胞对化学应激的反应(celluler response to chemical stress)、酮反应(response to ketone)以及凋亡信号通路(apoptotic signaling

表1 黄芪潜在有效成分

Tab. 1 Potential effective ingredients of Astragali Radix

| No. | Composition                              | Mr     | OB/%  | DL   | AlogP | Caco-2 |
|-----|--|--------|-------|------|-------|--------|
| 1   | Quercetin                                | 302.25 | 46.43 | 0.28 | 0.05  | 1.5    |
| 2   | Jaranol                                  | 314.31 | 50.83 | 0.29 | 0.61  | 2.09   |
| 3   | Hederagenin                              | 414.79 | 36.91 | 0.75 | 1.32  | 8.08   |
| 4   | Isorhamnetin                             | 316.28 | 49.6  | 0.31 | 0.31  | 1.76   |
| 5   | 3,9-di-O-methylisolin                    | 314.36 | 53.74 | 0.48 | 1.18  | 2.89   |
| 6   | 7-O-methylisomucronulatol                | 316.38 | 74.69 | 0.3  | 1.08  | 3.38   |
| 7   | A1                                       | 300.33 | 64.26 | 0.42 | 0.93  | 2.64   |
| 8   | Bifendate                                | 418.38 | 31.1  | 0.67 | 0.15  | 2.56   |
| 9   | Formononetin                             | 268.28 | 69.67 | 0.21 | 0.78  | 2.58   |
| 10  | Calycosin                                | 284.28 | 47.75 | 0.24 | 0.52  | 2.32   |
| 11  | Kaempferol                               | 286.25 | 41.88 | 0.24 | 1.77  | 0.26   |
| 12  | 1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene | 314.31 | 39.05 | 0.48 | 3.11  | 0.89   |

注:A1-黄芪紫檀烷,黄芪中的化学成分通过TCMSP数据库筛选,其活性成分筛选条件为OB≥30%且DL≥0.18

Note:A1-(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol, The chemical constituents of Astragali Radix were screened by TCMSP database. The information of the active ingredient of Astragali Radix was obtained by screening OB≥30% and DL≥0.18

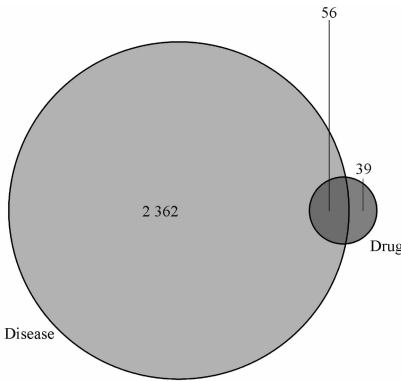


图1 黄芪有效成分治疗糖尿病肾病潜在靶点的Venn图

Fig. 1 Venn diagram of Astragali Radix and DN targets

pathway)等(图4);从细胞组分结果可以看出,黄芪治疗DN过程中主要通过细胞中脂筏(membrane raft)、细胞质核周区(perinuclear region of cytoplasm)、转录调节复合物(transcription regulator complex)、质膜蛋白复合物(plasma membrane protein complex)等细胞部位进行;从分子功能结果看,主要与DNA结合转录因子结合(DNA-binding transcription factor binding)、激酶结合(kinase binding)和氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)关系较为密切。

表 2 黄芪有效成分治疗糖尿病肾病潜在靶点

Tab.2 Potential targets of Astragali Radix for treatment of DN

| No. | Gene   | Protein name                                | UniProt ID | No. | Gene   | Protein name  | UniProt ID |
|-----|--------|---|------------|-----|--------|---|------------|
| 1   | PTGS1  | Prostaglandin G/H synthase 1                | P23219     | 29  | GSTM1  | Glutathione S-transferase Mu 1                                    | P09488     |
| 2   | AR     | Androgen receptor                           | Q13771     | 30  | EGFR   | Epidermal growth factor receptor                                  | P00533     |
| 3   | ESR2   | Estrogen receptor beta                      | Q92731     | 31  | VEGFA  | Vascular endothelial growth factor A                              | P15692     |
| 4   | PRSS1  | Trypsin-1                                   | P07477     | 32  | CCND1  | G1/S-specific cyclin-D1   | P24385     |
| 5   | CHRM2  | Muscarinic acetylcholine receptor M2        | P08172     | 33  | PPARG  | Peroxisome proliferator activated receptor gamma                  | P37231     |
| 6   | ADH1B  | Alcohol dehydrogenase 1B                    | P00325     | 34  | CASP9  | Caspase-9   | P55211     |
| 7   | ESR1   | Estrogen receptor                           | Q5T5H8     | 35  | PLAU   | Urokinase-type plasminogen activator                              | P00749     |
| 8   | FOS    | Proto-oncogene c-Fos                        | P01100     | 36  | RB1    | Retinoblastoma-associated protein                                 | P06400     |
| 9   | AKR1B1 | Aldose reductase                            | P15121     | 37  | IL6    | Interleukin-6   | P05231     |
| 10  | F7     | Coagulation factor VII                      | P08709     | 38  | ELK1   | ETS domain-containing protein Elk-1                               | P19419     |
| 11  | ACHE   | Acetylcholinesterase                        | P22303     | 39  | CASP8  | Caspase-8   | Q14790     |
| 12  | RELA   | Transcription factor p65                    | Q04206     | 40  | RAF1   | RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase                | P04049     |
| 13  | OLR1   | Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 | P78380     | 41  | SLC2A4 | Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4 | P14672     |
| 14  | BCL2   | Apoptosis regulator Bcl-2                   | P10415     | 42  | HIF1A  | Hypoxia-inducible factor 1-alpha                                  | Q16665     |
| 15  | CASP3  | Caspase-3                                   | P42574     | 43  | ERBB2  | Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2                           | P04626     |
| 16  | MAPK8  | Mitogen-activated protein kinase 8          | P45983     | 44  | CAV1   | Caveolin-1  | Q03135     |
| 17  | CYP3A4 | Cytochrome P450 3A4                         | P08684     | 45  | MYC    | Myc proto-oncogene protein  | P01106     |
| 18  | CYP1A1 | Cytochrome P450 1A1                         | P04798     | 46  | DUOX2  | Dual oxidase 2  | Q9NRD8     |
| 19  | ICAM1  | Intercellular adhesion molecule 1           | P05362     | 47  | NOS3   | Nitric oxide synthase, endothelial                                | P29474     |
| 20  | SELE   | E-selectin                                  | P16581     | 48  | HSPB1  | Heat shock protein beta-1   | P04792     |
| 21  | VCAM1  | Vascular cell adhesion protein 1            | P19320     | 49  | MGAM   | Maltase-glucoamylase, intestinal                                  | O43451     |
| 22  | CYP1B1 | Cytochrome P450 1B1                         | Q16678     | 50  | CCNB1  | G2/mitotic-specific cyclin-B1                                     | P14635     |
| 23  | ALOX5  | Arachidonate 5-lipoxygenase                 | P09917     | 51  | NFE2L2 | Nuclear factor erythroid 2-related factor 2                       | Q16236     |
| 24  | GSTP1  | Glutathione S-transferase P                 | P09211     | 52  | NQO1   | NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1                                 | P15559     |
| 25  | AHR    | Aryl hydrocarbon receptor                   | P35869     | 53  | PARP1  | Poly [ADP-ribose] polymerase 1                                    | Q5VX85     |
| 26  | PRKCA  | Protein kinase C alpha type                 | P17252     | 54  | COL3A1 | Collagen alpha-1 (III) chain                                      | P02461     |
| 27  | CRP    | C-reactive protein                          | P02741     | 55  | IGFBP3 | Insulin-like growth factor-binding protein 3                      | P17936     |
| 28  | IGF2   | Insulin-like growth factor II               | P01344     | 56  | PON1   | Serum paraoxonase/arylesterase 1                                  | P27169     |

注:黄芪的靶点通过 TCMSP 数据库筛选,DN 的靶点通过 Gene Cards 和 OMIM 数据库预测并筛选

Note:The targets of Astragali Radix were screened using TCMSP database. Gene Cards and OMIM database were utilized to predict and screen the targets of DN

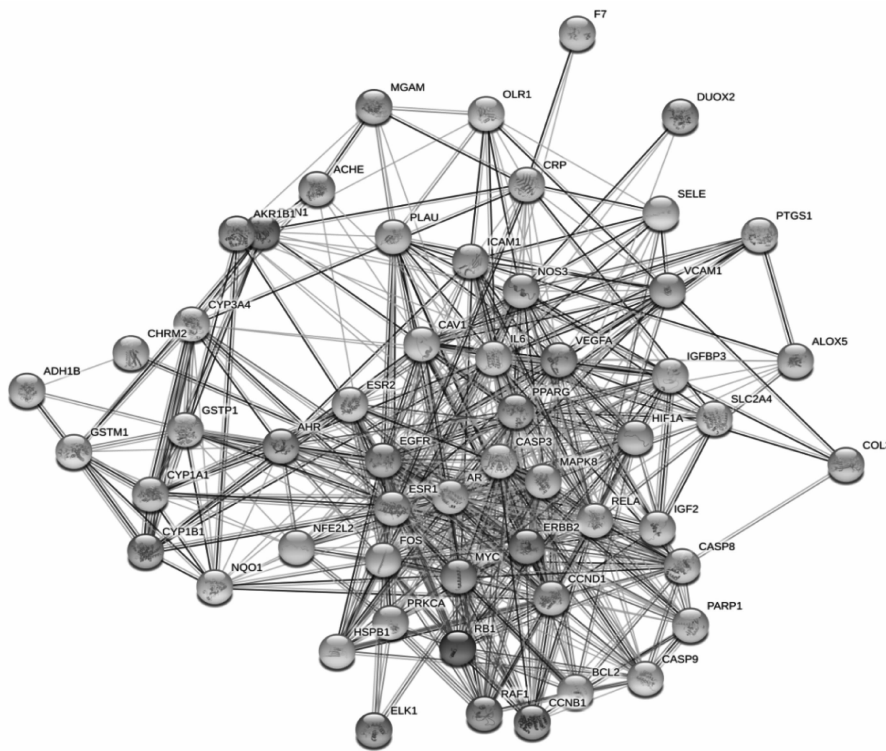


图 2 黄芪治疗糖尿病肾病潜在作用靶点之间的相互作用网络

蛋白相互作用网络通过 String 数据库构建

Fig.2 Interaction network of potential targets of Astragali Radix for treatment of DN

Protein interaction network was constructed via the String database

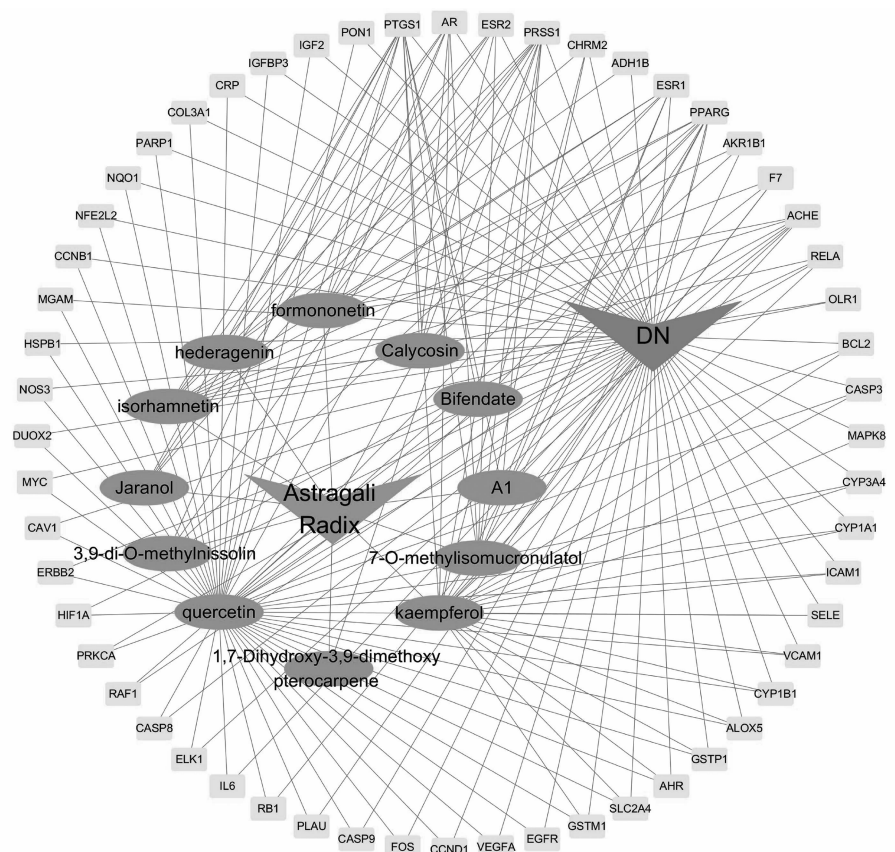


图3 黄芪-成分-靶点-疾病网络

黄芪-成分-靶点-疾病网络通过 Cytoscape 3. 6. 1 绘制, 药物和疾病用 V 形节点表示, 成分用椭圆节点表示, 靶点用长方形节点表示, 相互作用关系通过线连接

Fig. 3 Ingredients-targets-diseases network of Astragali Radix

Cytoscape 3. 6. 1 was chosen to draw the drug-ingredients-target-disease network. The drug, diseases, ingredients and targets respectively used V-shaped, V-shaped, elliptical and rectangular nodes, and the relationship was represented by edges

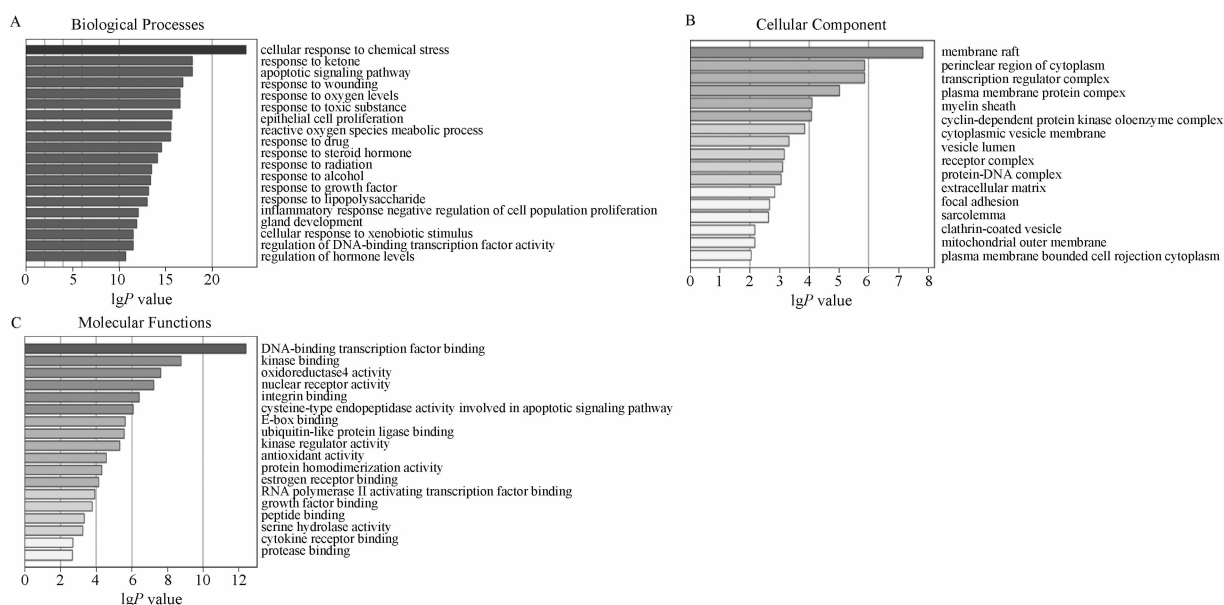


图4 黄芪有效成分潜在治疗 DN 靶点的 GO 分析

A - 黄芪治疗 DN 靶点的生物过程分析; B - 黄芪治疗 DN 靶点的细胞组分分析; C - 黄芪治疗 DN 靶点的分子功能分析

Fig. 4 GO analysis of potential targets of Astragali Radix for treatment of DN

A - Biological Processes analysis of potential targets of Astragali Radix for treatment of DN; B - Cellular component analysis of potential targets of Astragali Radix for treatment of DN; C - Molecular Functions analysis of potential targets of Astragali Radix for treatment of DN

通过 GO 分析对生物过程、细胞组分和分子功能 3 部分进行全面分析,结果涉及氧化应激、炎症和细胞凋亡,这与 KEGG 富集分析结果是吻合的。KEGG 通路富集分析结果见图 5,黄芪治疗 DN 主要涉及 MAPK 信号通路、HIF 信号通路、ErbB 信号通路、p53 信号通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路等,其中关系最为密切的是 MAPK 信号通路。这表明黄芪有效成分的作用靶点分布于不同代谢通路中,多成分、多靶点相互调节可能是治疗 DN 的作用机制。

### 3.6 靶点途径分析

利用 KEGG Mapper 工具得到黄芪治疗 DN 作用的通路图,将 KEGG 得出的前 13 条信号通路整合绘制最终的通路图,见图 6。图中黄芪治疗 DN 的靶点标记为红色,显示出 MAPK 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、JNK 信号通路、p53 信号通路、TNF 信号通路以及 CASP 凋亡相关通路等,涉及 13 个黄芪治疗 DN 的靶

点(占黄芪治疗 DN 靶点的 23.21%)。提示黄芪治疗 DN 的靶点主要分散于这几条通路中,可能是通过调节其中的几个环节来发挥治疗 DN 的作用,并且生物学验证中对 MAPK 信号通路和 JNK 信号通路进行分析。

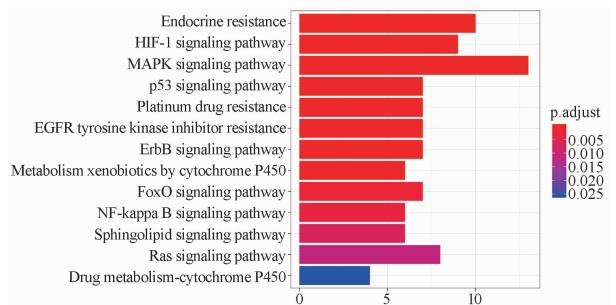


图 5 黄芪有效成分潜在治疗 DN 靶点的 KEGG 通路分析  
Fig. 5 Enrich KEGG pathways analysis of potential targets of Astragali Radix for treatment of DN

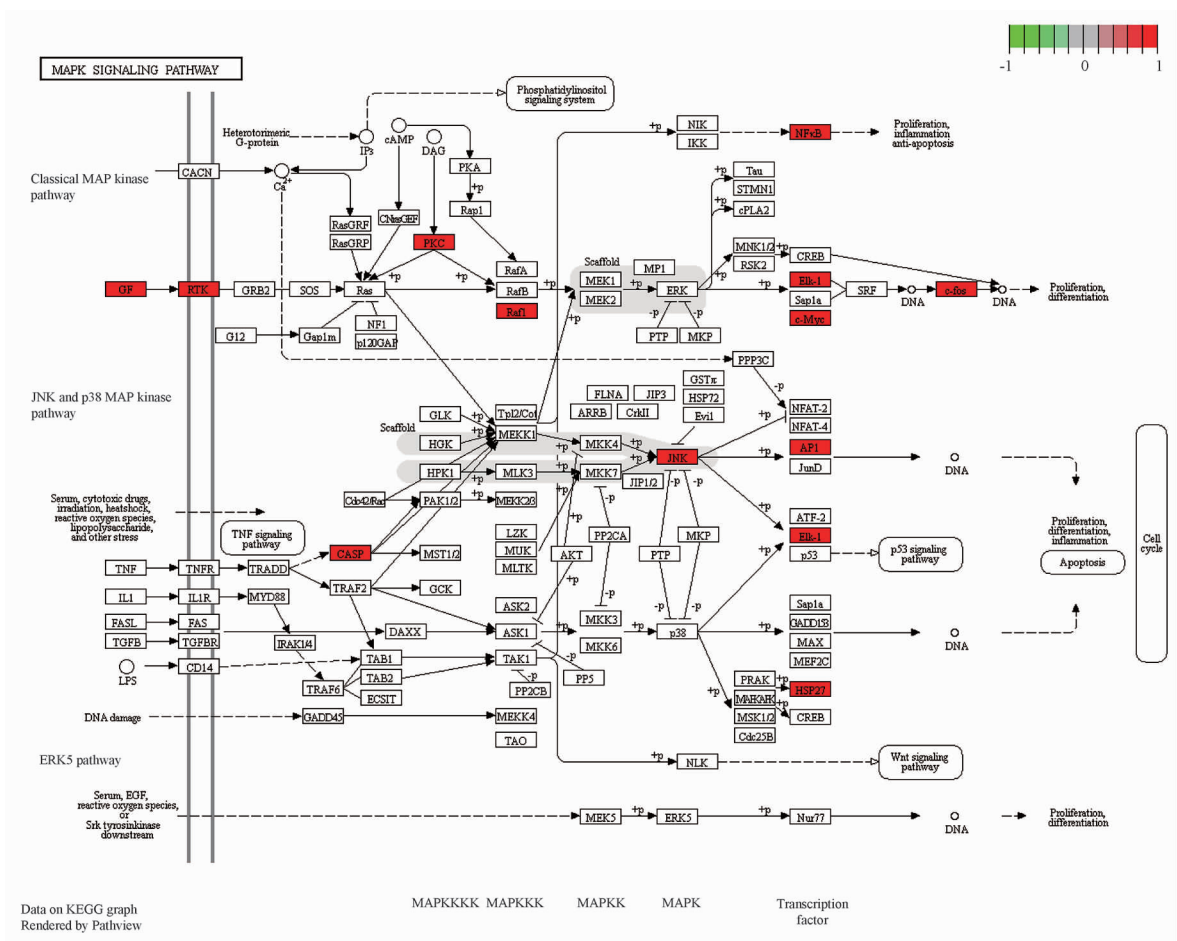


图 6 黄芪在 DN 相关通路中的作用靶点

黄芪治疗 DN 的通路图通过 KEGG Mapper 绘制,通过 KEGG 分析得到排名靠前的信号通路并整合绘制最终的通路图,红色方块代表靶点在通路中

Fig. 6 Target of Astragali Radix in DN pathway

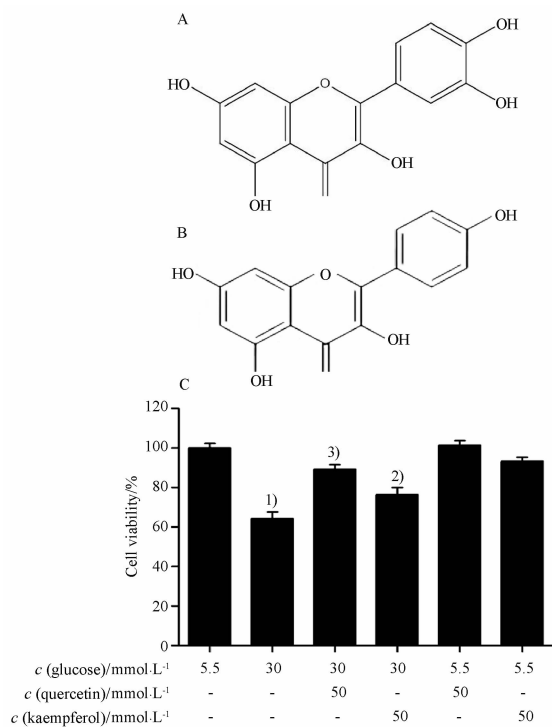
The pathway map of Astragali Radix for treatment of DN using KEGG Mapper. Those top-ranking signaling pathways from KEGG analysis were integrated and mapped to obtain the final path map. The red square represent targets in pathway



### 3.7 生物学验证分析

**3.7.1 槲皮素和山柰酚对细胞存活率的影响** 由网络药理学分析结果得出,槲皮素和山柰酚作为黄芪中治疗 DN 的潜在物质,分子结构见图 7A、B。细胞存活率分析结果表明,与模型组相比,槲皮素和山柰酚能够显著升高 HK-2 细胞的存活率( $P < 0.05$ ),具有保护 DN 细胞模型的作用,值得注意的是,槲皮素的作用效果优于山柰酚,2 者均能抵抗高糖引起的细胞损伤(图 7C)。

**3.7.2 槲皮素和山柰酚对 ROS 水平的影响** 与正常组相比,高糖引起 ROS 水平显著升高,说明高糖引起氧化应激的发生;与模型组相比,槲皮素组能够降低高糖引起的 ROS 蓄积( $P < 0.01$ ),山柰酚组的 ROS 水平也显著下降( $P < 0.05$ ),这说明槲皮素和山柰酚能够显著缓解高糖引起的氧化损伤,对 HK-2 细胞具有保护作用(图 8)。



**图 7** 槲皮素和山柰酚对高糖引起的 HK-2 细胞细胞毒性的影响.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

A - 槲皮素, 相对分子质量为 302.25; B - 山柰酚, 相对分子质量为 286.23; C - 槲皮素和山柰酚对高糖引起的 HK-2 细胞细胞毒性的影响, 细胞活力通过 CCK-8 方法测定; 与正常组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$

**Fig. 7** Effects of quercetin and kaempferol on the cytotoxicity in high glucose-induced HK-2 cells.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

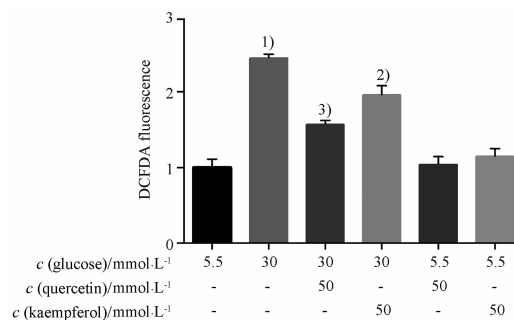
A - quercetin, its molecular weight is 302.25; B - kaempferol, its molecular weight is 286.23; C - Effects of quercetin and kaempferol on the cytotoxicity in high glucose-induced HK-2 cells, Cell viability was measured by a CCK-8 assay.

<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs model group

### 3.7.3 槲皮素和山柰酚对 CAT 和 SOD 活性的影响

与正常组相比,高糖 CAT 和 SOD 活性显著降低;与模型组相比,槲皮素组和山柰酚组显著升高 CAT 和 SOD 活性( $P < 0.05$ ),并且槲皮素的作用效果优于山柰酚,说明槲皮素和山柰酚作为黄芪中的主要活性成分,能够显著抑制高糖引起的氧化损伤,具有较强的抗氧化能力,起到保护肾脏的作用(图 9)。

**3.7.4 槲皮素对 MAPK 信号通路的影响** 通过 Western blot 进一步分析槲皮素治疗 DN 的分子

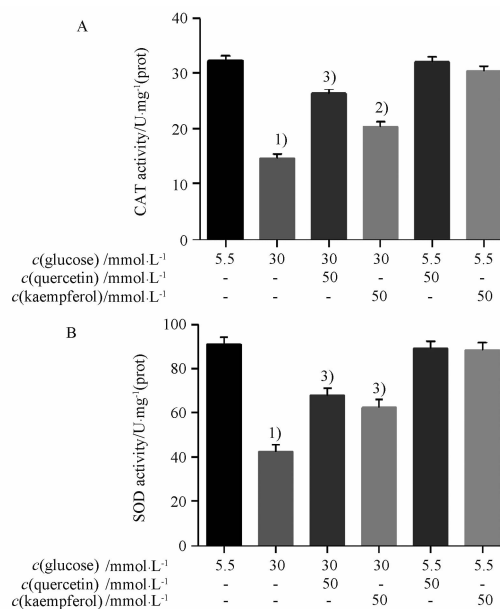


**图 8** 槲皮素和山柰酚对高糖引起的 HK-2 细胞 ROS 水平的影响.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

与正常组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$

**Fig. 8** Effects of quercetin and kaempferol on ROS level in high glucose-induced HK-2 cells.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs model group



**图 9** 槲皮素和山柰酚对高糖引起的 HK-2 细胞 CAT(A) 和 SOD(B) 活性的影响.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

与正常组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$

**Fig. 9** Effects of quercetin and kaempferol on CAT (A) and SOD (B) activities in high glucose-induced HK-2 cells.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$  and <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs model group



机制,并且结合网络药理学富集分析结果进行 MAPK 信号通路分析,结果见图 10,高糖能够显著升高磷酸化 P38 MAPK 和 JNK 蛋白水平( $P < 0.01$ )与模型组相比,槲皮素能够显著降低磷酸化 P38 MAPK 和 JNK 蛋白水平( $P < 0.01$ ),这说明黄芪中主要成分槲皮素可能是通过调控 MAPK 信号通路治疗 DN。

## 4 讨论

DN 主要发病特点为肾小球硬化,临床表现为蛋白尿,可引起水肿、高血压和一系列代谢性疾病。DN 晚期出现严重的肾衰竭,这是引起糖尿病患者死亡的主要原因之一<sup>[13]</sup>。目前 DN 的治疗多以胰岛素注射为主,但皮下给药常常使患者依从性较差,一些西药如糖适平、克糖利、二甲双胍、格列喹酮等,虽然可以维持血糖正常水平,但会引起严重的毒副作用,不能广泛应用。因此,寻找高效低毒的治疗 DN 的天然新药是目前 DN 研究面临的主要问题。黄芪具有利尿消肿、补气固表等功效,中医用于治疗

“肾病水肿”,在 DN 的治疗中黄芪具有较高的应用价值<sup>[14]</sup>,因此,针对黄芪治疗 DN 的研究具有重要意义。黄芪中的主要活性成分的作用靶点作用于不同的代谢通路,多成分、多靶点、多通路的相互调节是黄芪治疗 DN 的可能作用机制。

本研究通过网络药理学的方法筛选黄芪中的有效成分,共得到 12 个治疗 DN 的潜在活性物质,通过 Drugbank、GeneCards 和 OMIM 数据库分别搜索药物靶点及疾病相关靶点,最终得到 56 个黄芪治疗 DN 潜在作用靶点,其中 NQO1、PTGS1、VCAM1、GSTM1 等涉及氧化应激反应<sup>[15]</sup>, IL6、RELA、MAPK8、HIF1A 等涉及炎症反应, CASP3、CASP8、CASP9、BCL2 等涉及细胞凋亡<sup>[16]</sup>。有研究报道,炎症在 DN 的发展过程中扮演着非常重要的角色<sup>[17]</sup>,原因是高血糖可引起晚期糖基化终末产物的积累,导致人肾细胞氧化损伤,增加细胞凋亡,引发炎症,加速 DN 恶化进程<sup>[18]</sup>。有研究表明,药物可通过降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  炎性细胞因子的表达水平、抑制高糖介导的氧化应激反应治疗 DN 大鼠<sup>[19]</sup>。本研究中通过 String 数据库构建蛋白相互作用网络发现,黄芪治疗 DN 涉及的氧化应激、炎症和凋亡,通过多途径、多方面的协调起作用。KEGG 富集分析结果表明,黄芪治疗 DN 主要涉及 MAPK 信号通路、HIF 信号通路、ErbB 信号通路、p53 信号通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路,这些通路可能成为研究黄芪治疗 DN 的新靶点,此外,研究结果表明,MAPK 信号通路富集程度最强,与黄芪治疗 DN 关系最为密切,所以在分子生物学验证研究中,我们选取黄芪中的主要活性成分对 MAPK 信号通路中的蛋白表达情况进行分析。p53 是一种肿瘤抑制因子,它能刺激 caspase-9 和 BCL-2 的表达,加速细胞凋亡<sup>[20]</sup>。MAPK 信号通路包括 P38 和 JNK,通过与 p53 结合成复合体调节细胞凋亡,并且与氧化应激密切相关<sup>[21]</sup>。

通过生物验证结果分析表明,黄芪中的主要活性成分槲皮素和山柰酚,对高糖引起的细胞损伤具有保护作用,能够显著降低高糖引起的细胞凋亡。DN 是由肾脏组织中晚期糖基化终末代谢物的持续积累引起的,氧化应激反应是 DN 发生发展的诱因之一<sup>[22]</sup>。当机体发生氧化应激反应时,大量的 ROS 产生,抗氧化酶通过抑制 ROS 的积累保护肾脏<sup>[23]</sup>。CAT 和 SOD 是人体中重要的抗氧化酶,在氧化/抗氧化平衡中形成了对抗 ROS 的防御系统<sup>[24]</sup>。此外,ROS 的大量积累能够激活 MAPK、p53、HIF 等一系列信号通路,导致蛋白质、DNA、脂类等细胞大分

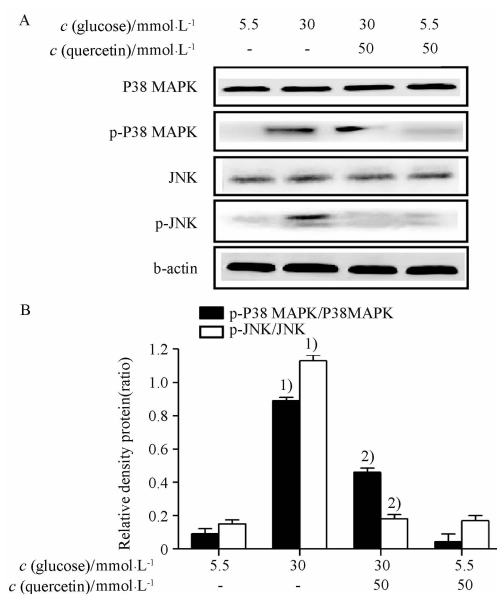


图 10 槲皮素对高糖引起的 HK-2 细胞 MAPK 信号通路的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

A - 通过蛋白免疫印迹法测定 P38 MAPK、JNK、磷酸化-P38 MAPK、磷酸化-JNK 蛋白的表达情况; B - MAPK 激活的定量和数据分析; 与正常组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.01$

Fig. 10 Effects of quercetin on MAPK signaling pathway in high glucose-induced HK-2 cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

A - The protein expressions of P38 MAPK, JNK, phospho-P38 MAPK and phospho-JNK were measured by Western blotting; B - Quantification and statistical analysis of MAPK activation. <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , vs model group

子的损伤<sup>[25-26]</sup>。在本研究中,黄芪中的主要活性成分槲皮素和山柰酚能显著抑制高糖引起的 ROS 积累,提高 CAT 和 SOD 抗氧化酶的活性,保护肾脏相关细胞,且槲皮素的作用效果优于山柰酚。在进一步分析中我们选择槲皮素为研究对象,通过蛋白免疫印迹法研究槲皮素对 MAPK 信号通路的影响,结果表明槲皮素能够调控 MAPK 信号通路,这可能是黄芪中的主要活性成分槲皮素治疗 DN 的潜在靶点。

综上所述,本研究运用网络药理学的方法对黄芪治疗 DN 的药理机制进行系统分析,阐明黄芪是通过多成分、多靶点与多通路相互作用治疗 DN 的。通过生物学验证分析得出,黄芪中活性成分槲皮素和山柰酚具有保护 DN 的作用,其作用机制可能是通过提高抗氧化性、调控 MAPK 信号通路来实现的,为深入研究黄芪治疗 DN 的作用机制提供新视角。

## REFERENCES

- [1] WANG G W, LI Q Y, CHEN D F, *et al.* Kidney-targeted rhoin-loaded liponanoparticles for diabetic nephropathy therapy via size control and enhancement of renal cellular uptake[J]. *Theranostics*, 2019, 9(21):6191-6208.
- [2] GILBERT R E. Proximal tubulopathy: prime mover and key therapeutic target in diabetic kidney disease[J]. *Diabetes*, 2017, 66(4):791-800.
- [3] BARUTTA F, BERNARDI S, GARGIULO G, *et al.* SGLT2 inhibition to address the unmet needs in diabetic nephropathy[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2019, 35(7):e3171-3183.
- [4] AJIBOYE O, SEGAL J B. National trends in the treatment of diabetic nephropathy in the United States[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2017, 42(3):311-317.
- [5] LOU Y M, GUO Z Z, ZHU Y F, *et al.* Astragali radix and its main bioactive compounds activate the Nrf2-mediated signaling pathway to induce P-glycoprotein and breast cancer resistance protein[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 228: 82-91.
- [6] CHEN Z J, LIU L J, GAO C F, *et al.* Astragali Radix (Huangqi): A promising edible immunomodulatory herbal medicine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112895.
- [7] ZHANG Y Y, TAN R Z, ZHANG X Q, *et al.* Calycosin ameliorates diabetes-induced renal inflammation via the NF- $\kappa$ B pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 4(25):1671-1678.
- [8] LU Z M, YU Y R, TANG H, *et al.* The protective effects of *Radix Astragali* and *Rhizoma Ligustici* chuanxiong on endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients with microalbuminuria[J]. *J Sichuan Univ(Med Sci Ed)* (四川大学学报医学版), 2005, 36(4):529-32.
- [9] GUO J, CHEN H, ZHAO X, *et al.* Diabetic kidney disease treated with a modified Shenzhuo formula derived from Traditional Chinese Medicine: a case report[J]. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2017, 37(6):854-861.
- [10] YANG F, QU Q, ZHAO C, *et al.* Paecilomyces cicadae-fermented *Radix astragali* activates podocyte autophagy by attenuating PI3K/AKT/mTOR pathways to protect against diabetic nephropathy in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129:110479.
- [11] GUNEY E, MENCHE J, VIDAL M, *et al.* Network-based in silico drug efficacy screening[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10331.
- [12] REN J, ZHANG N, WANG M, *et al.* Exploration of mechanism of the analgesic effect of amomi fructus based on network pharmacology[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2021, 56(9): 723-730.
- [13] CHEN H Y, PAN H C, CHEN Y C, *et al.* Traditional Chinese Medicine use is associated with lower end-stage renal disease and mortality rates among patients with diabetic nephropathy: a population-based cohort study[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1):81.
- [14] GUO Z Z, LOU Y M, KONG M Y, *et al.* A systematic review of phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics on Astragali Radix: implications for Astragali Radix as a personalized medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6):1463.
- [15] MANSOUR D F, SALEH D O, MOSTAFA R E, *et al.* Genistein ameliorates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulation of oxidative stress and inflammatory mediators[J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 5(7):836-843.
- [16] BAAR M P, BRANDT R M C, PUTAVET D A, *et al.* Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging[J]. *Cell*, 2017, 169(1):132-147.
- [17] DUGBARTEY G J. Diabetic nephropathy: a potential savior with 'rotten-egg'smell[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(2):331-339.
- [18] MA X, JIAO Z, LIU Y, *et al.* Probuloc protects against contrast-induced acute kidney injury via the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2)/JNK-caspase 3 pathway in diabetic rats[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1038-1045.
- [19] NAIR V, KOMOROWSKY C V, WEIL E J, *et al.* A molecular morphometric approach to diabetic kidney disease can link structure to function and outcome[J]. *Kidney Int*, 2018, 93(2): 439-449.
- [20] LAZO P A. Reverting p53 activation after recovery of cellular stress to resume with cell cycle progression[J]. *Cell Signal*, 2017, 33: 49-58.
- [21] FISCHER N W, PRODEUS A, MALKIN D, *et al.* p53 oligomerization status modulates cell fate decisions between growth, arrest and apoptosis[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(23):3210-3219.
- [22] PRADEEP S R, SRINIVASAN K. Alleviation of oxidative stress-mediated nephropathy by dietary fenugreek (*trigonella foenum-graecum*) seeds and onion (*allium cepa*) in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Food Funct*, 2018, 9(1):134-148.
- [23] LIU D, WU M, LI L, *et al.* Low-protein diet supplemented with ketoacids delays the progression of diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress in the KKAY mice model[J]. *Br J Nutr*, 2018, 119(1):22-29.
- [24] KARIMI Z, GHAFARI M, DOLATABADI JN, *et al.* The protective effect of thymoquinone on tert-butylhydroquinone induced cytotoxicity in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Toxicol Res(Camb)*, 2019, 8(6):1050-1056.
- [25] DASARI S, TCHOUNWOUAND P B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 364-378.
- [26] XU F, XU J, XIONG X, *et al.* Salidroside inhibits MAPK, NF- $\kappa$ B, and STAT3 pathways in psoriasis-associated oxidative stress via SIRT1 activation[J]. *Redox Rep*, 2019, 24(1):70-74.

(收稿日期:2021-05-13)