

基于网络药理学的“柴胡-黄芩”药对干预足细胞病变作用机制探索[△]

窦一田^{1*}, 尚懿纯^{2#}, 刘春柳³(1.天津中医药大学第一附属医院肾病科,天津 300381;2.天津中医药大学中医学
院,天津 301617;3.天津中医药大学研究生院,天津 301617)

中图分类号 R256.5;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)04-0425-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.04.07

摘要 目的:预测辛通络法载体——复方肾苏Ⅱ之君药“柴胡-黄芩”药对干预足细胞病变的可能作用靶点与机制,为辛通络法防治足细胞病变序贯临床和基础研究的开展提供参考。方法:基于中药系统药理学技术平台(TCMSP)数据库,检索柴胡、黄芩化学成分及其对应靶点蛋白,借助 Cytoscape 3.2.1 软件绘制“中药-成分-靶点”网络图。在 OMIM 数据库、DrugBank 数据库及 DigSee 在线文本中检索足细胞病变相关靶点,利用 Venny 2.1.0 在线作图工具获取其与“柴胡-黄芩”作用靶点的交集基因。分别应用 STRING 数据库及 Cytoscape 3.2.1 软件的“CytoNCA”插件构建交集基因蛋白质-蛋白质相互作用关系(PPI)网络图并进行拓扑学分析,获取核心预测靶点。借助 DAVID 数据库对交集基因进行基因本体(GO)功能注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集,并通过 OmicShare Tools 在线作图平台实现富集结果的可视化。结果:基于 TCMSP 数据库检索结果,获得有对应靶点的活性成分 44 种,其中柴胡 13 种、黄芩 32 种,豆甾醇为两者共有成分;潜在作用靶点较多的化合物为槲皮素、山柰酚、汉黄芩素等;节点度值较高靶点蛋白为前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)、PTGS1、核受体共激活因子 2、热休克蛋白 90 α 等,分别与 37、30、25、25 个活性成分相关联。获取“柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因 20 个,包括 *PTGS2*、*VEGFA*、*MMP9*、*TNF*、*IL6* 等。上述交集基因的 PPI 网络图共包含节点 20 个、连线 110 条,*MMP9*、*VEGFA*、*IL6* 等基因处于核心位置。GO 分析结果显示,共获得生物信息条目 154 个($P < 0.05$),包括生物过程条目 139 个、细胞组成条目 8 个、分子功能条目 7 个。其中,生物过程主要涉及一氧化氮生物合成过程的正调控、炎症反应、免疫反应等,细胞组成主要涉及细胞外间隙、胞外区、质膜外侧等,分子功能主要涉及蛋白质结合、细胞因子活性、生长因子活性等。同时,获得 KEGG 通路富集条目 47 个($P < 0.05$),主要涉及细胞因子-细胞因子受体相互作用、类风湿关节炎、疟疾、癌症信号通路等相关信号转导途径。结论:复方肾苏Ⅱ之“柴胡-黄芩”药对活性成分可能通过细胞因子-细胞因子受体相互作用、类风湿关节炎、疟疾、癌症信号通路等相关信号转导途径作用于 *MMP9*、*VEGFA*、*IL6*、*TNF* 等靶点,从而发挥对足细胞病变的干预作用。

关键词 网络药理学;“柴胡-黄芩”药对;足细胞病变;靶点;机制

Exploration of the Mechanism about Couplet Medicine of *Bupleurum falcatum*-*Scutellaria baicalensis* Intervening in Podocyte Lesion Based on Network Pharmacology

DOU Yitian¹, SHANG Yichun², LIU Chunliu³(1. Dept. of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Tianjin Medical University of TCM, Tianjin 300381, China; 2. College of TCM, Tianjin Medical University of TCM, Tianjin 301617, China; 3. Graduate School, Tianjin University of TCM, Tianjin 301617, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To predict the potential target and mechanism of Xintong Changluo Method carrier-Compound Shensu II couplet medicine of *Bupleurum falcatum*-*Scutellaria baicalensis* intervening in podocyte lesion, and to provide reference for the development of sequential clinical and basic research of Xintong Changluo Method in the prevention and treatment of podocyte lesion. METHODS: Based on TCMSP database, chemical components and target protein of *B. falcatum* and *S. baicalensis* were retrieved, and Cytoscape 3.2.1 software was used to draw a “TCM-component-target” network. The targets related to podocyte lesion were searched from OMIM database, DrugBank database and Digsee online text, and the intersection genes of above targets and “*B. falcatum*-*S. baicalensis*” target were obtained by Venny 2.1.0 online mapping tool. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING database, and the core targets were obtained by topology analysis of the network by using CytoNCA plug-in Cytoscape 3.2.1 software. With the help of DAVID database, the function of Gene Ontology (GO) was annotated and KEGG pathway was enriched; and the enrichment results were visualized through OmicShare Tools online mapping platform. RESULTS: Based on retrieval results of TCMSP database, 44 active components were obtained, involving 13 of *B. falcatum* and 32 of *S. baicalensis*; stigmasterol is common component of *B. falcatum* and *S. baicalensis*. Quercetin, kaempferol and wogonin were the compounds with

[△] 基金项目:国家自然科学基金青年项目(No.81703968, No.81403333);天津市教委科研计划项目(No.2017KJ154)

* 副主任医师,硕士生导师,博士。研究方向:慢性肾脏病中医、中西医临床与基础。电话:022-27987020。E-mail:hczar1745@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:温病、中医内科学。电话:022-59596195。E-mail:x_meshang@126.com

main potential targets. The target proteins with high node degree were prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2), PTGS1, nuclear receptor coactivator 2 and heat shock protein 90 α , which were associated with 37, 30, 25 and 25 active components respectively. Twenty genes were obtained from the interaction between “*B. falcatum-S. baicalensis*” and podocyte lesion related targets, including *PTGS2*, *VEGFA*, *MMP9*, *TNF* and *IL6*. PPI network diagram of the above intersection genes contained 20 nodes and 110 lines, with *MMP9*, *VEGFA*, *IL6* and other genes at the core. The results of GO analysis showed that a total of 154 biological information items were obtained ($P < 0.05$), including 139 biological process items, 8 cell composition items and 7 molecular function items. Among them, biological processes mainly involved in the positive regulation of NO biosynthesis process, inflammatory response, immune response. Cell composition mainly involved in extracellular space, extracellular region, external side of plasma membrane, etc., and molecular function mainly involved in protein binding, cytokine activity, growth factor activity, etc. At the same time, 47 KEGG pathways were obtained ($P < 0.05$), mainly including cytokine-cytokine receptor interaction, rheumatoid arthritis, malaria, cancer signaling pathways. CONCLUSIONS: The active components of Compound Shensu II couplet medicine of “*B. falcatum-S. baicalensis*” may act on *MMP9*, *VEGFA*, *IL6*, *TNF* and other targets through cytokine-cytokine receptor interaction, rheumatoid arthritis, malaria, cancer signal pathway, so as to play its intervention effect on podocyte lesion.

KEYWORDS Network pharmacology; Couplet medicine of “*Bupleurum falcatum-Scutellaria baicalensis*”; Podocyte lesion; Target; Mechanism

生理状态下,足细胞附着于肾小球基底膜(GBM)外侧,是肾小球滤过屏障的重要组成部分;同时,作为高度特异性终末分化细胞,足细胞一旦损伤脱落就很难再生^[1]。目前学者普遍认为,足细胞病变广泛存在,是微小病变肾病、膜性肾病、局灶节段性肾小球硬化、狼疮性肾炎以及糖尿病肾病等常见原发、继发性肾小球疾病的共同病理改变^[2]。进入21世纪后,伴随足细胞病变概念的提出及全球足细胞病变发生率的显著上升^[3],该病的防治日益被肾脏病专业领域的学者所关注。近年来,中医药对足细胞病变的防治介入广泛,其疗效确切、卫生经济学效益较好,逐渐成为慢性肾脏病(CKD)足细胞病变综合防治的重要组成部分^[4]。但由于中医学独特的理论体系,其物质基础阐释与作用机制分析仍属“短板”,而网络药理学技术的发展使特定疾病的中医药干预靶点与机制途径预测成为可能^[5]。鉴于此,本研究以既往证实可有效延缓足细胞病变进程的辛通畅络法载体——复方肾苏Ⅱ之君药“柴胡-黄芩”药对为例^[6-7],基于网络药理学技术初步探索中医药干预足细胞病变的针对性靶点与潜在机制,为辛通畅络法干预足细胞病变序贯临床与基础研究的开展提供参考。

1 材料与方法

1.1 “柴胡-黄芩”活性成分及潜在靶点收集

研究基于中药系统药理学技术平台(TCMSP)数据库(<https://tcmssp.com/tcmssp.php>)进行,设置口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性指数(DL) ≥ 0.18 ^[8],分别以“柴胡”“黄芩”为关键词,检索两味药材的化学成分及其对应靶点蛋白,并剔除无对应靶点的成分。将检索条件设置为“Organism:Homo sapiens”,在UniProt KB数据库(<http://www.uniprot.org/>)中查询活性成分潜在靶点蛋白的对应基因。

1.2 “中药-成分-靶点”网络图构建

将“1.1”项下检索所得的柴胡、黄芩包含的活性成分

及其对应的靶点基因导入Cytoscape 3.2.1软件中,构建“柴胡-黄芩”药对的“中药-成分-靶点”网络图,以可视化图形直观展示药物成分与潜在靶点间的作用关系,并借助该软件的“Cyto NCA”插件进行拓扑学分析。

1.3 疾病靶点基因的筛选

以“Minimal change nephropathy”“Focal segmental glomerular sclerosis”“Membranous nephropathy”“Diabetic nephropathy”等足细胞病变的相关疾病为关键词,在OMIM数据库(<http://omim.org/>)、DrugBank数据库(<https://www.drugbank.ca/>)和DigSee在线文本(<http://210.107.182.61/geneSearch/>)中检索与足细胞病变相关基因。

1.4 蛋白质相互作用网络构建

将柴胡、黄芩活性成分潜在靶点蛋白的对应基因与足细胞病变相关基因分别上传至Venny 2.1.0在线作图工具(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)中,绘制韦恩图以获取交集基因。将“柴胡-黄芩”与足细胞病变的交集基因导入STRING数据库(<https://string-db.org>)中,获取交集基因蛋白质-蛋白质相互作用关系(PPI)网络图,并通过Cytoscape 3.2.1软件的“CytoNCA”插件对PPI网络进行拓扑学分析,获取节点的节点度、介度性和中心紧密度等网络拓扑特征值。其中,节点度指和该节点相关联的边的条数,介度性指经过网络中某一点的最短路径数目在所有节点的最短路径数目中所占的比例,中心紧密度指该节点到网络中其他所有节点的平均距离的倒数;三者的值越高表示该节点在网络中越重要^[9]。

1.5 基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集

基于DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对“柴胡-黄芩”与足细胞病变的交集基因进行GO功能注释和KEGG通路富集分析。设置物种为“Homo sapiens

(人)”,标识符(Identifier)为“Official gene symbol(官方名称)”,保留 $P < 0.05$ 的富集条目,并按照 P 值从小到大进行排序。选择排名前20位的条目导入OmicShare Tools在线作图平台(<http://www.omicshare.com/tools/index.php/>),实现富集分析结果的可视化。

2 结果

2.1 “柴胡-黄芩”药对化学成分筛选结果

基于TCMSP数据库,在 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 的筛选条件下共检索到52种化学成分,剔出无对应靶点的化学成分后,最终共筛选得到活性化学成分44种。共有13种成分来自柴胡、32种化学成分来自黄芩,其中甾醇为柴胡、黄芩相同成分。“柴胡-黄芩”活性化学成分基本信息详见表1。

2.2 “中药-成分-靶点”网络图分析结果

“柴胡-黄芩”药对的“中药-成分-靶点”网络图详见图1[图中,节点代表中药及其对应的活性成分(活性成分标签由M+TCMSP编号最后4/5位数字表示)、靶点蛋白,连线代表中药与活性成分、活性成分与潜在靶点间的关系]。由图1所知,该图共包含节点267个、连线834条。其中,中药节点2个、活性成分节点44个、靶点蛋白节点221个。拓扑学分析结果显示,该网络中潜在作用靶点较多的化合物为槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素、 β -谷甾醇等,节点度值依次为149、51、45、37、37;节点度值较高靶点蛋白依次为前列腺素内过氧化物合酶2(PGGS2,又称COX-2)、PTGS1、核受体共激活因子2(NCOA2)、热休克蛋白90 α (HSP90 α)、雄激素受体(AR)等,分别与37、30、25、25、22个活性成分相关联。

2.3 “柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因筛选结果

经检索获取足细胞病变相关基因140个、柴胡作用靶点186个、黄芩作用靶点119个。将其导入Venny2.1.0在线作图工具制作韦恩图(见图2)后,获取“柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变交集基因20个,其中9个为柴胡与黄芩共同作用靶点[PTGS2、VEGFA、MMP9、TNF、IL6、MCP1(又称CCL2)、TGFB1、IL8(又称CXCL8)、CDKN1A]。

2.4 PPI网络的构建与分析结果

“柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的PPI网络图见图3(图中,节点表示交集基因对应蛋白,每条边表示PPI关系)。拓扑学分析结果显示,该网络图包含节点20个、连线110条;根据中心度、介度性、中心紧密度等参数判定,MMP9、VEGFA、IL6、TNF、PTGS2等基因处于核心位置,其拓扑学参数详见表2(由于RUNX1T1未与其他蛋白相连,故表中无其参数)。

2.5 GO基因注释与KEGG通路富集结果

通过GO基因注释分析得到154个条目($P < 0.05$),包括生物过程条目139个、细胞组成条目8个、分子功能条目7个。生物过程主要以一氧化氮生物合成过程的正调控、炎症反应、免疫反应等为主要富集条目;细胞组成

主要涉及细胞外间隙、胞外区、质膜外侧等;分子功能主要涉及蛋白质结合、细胞因子活性、生长因子活性等,详见表3、表4、表5。

表1 “柴胡-黄芩”药对活性成分基本信息

Tab 1 Basic information of active components of couplet medicine of “*B. falcatum*-*S. baicalensis*”

药物	TCMSP编号	化学成分(英文名称)	OB, %	DL
柴胡	MOL001645	乙酸芳樟酯(Linoleyl acetate)	42.10	0.20
	MOL002776	黄芩苷(Baicalin)	40.12	0.75
	MOL000354	异鼠李素(Isorhamnetin)	49.60	0.31
	MOL000422	山柰酚(Kaempferol)	41.88	0.24
	MOL004598	3,5,6,7-四甲基化-2-(3,4,5-三甲氧基)[3,5,6,7-tetramethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone]	31.97	0.59
	MOL004609	茵陈黄酮(Areapillin)	48.96	0.41
	MOL013187	过氧蒽素(Cubebin)	57.13	0.64
	MOL004624	长贝壳杉素A(Longikauren A)	47.72	0.53
	MOL004653	(+)-川白芷内酯[(+)-anomalin]	46.06	0.66
	MOL004718	α -菠菜甾醇(α -spinasterol)	42.98	0.76
	MOL000490	牵牛花色素(Petunidin)	30.05	0.31
	MOL000098	槲皮素(Quercetin)	46.43	0.28
黄芩	MOL001689	刺槐素(Acacetin)	34.97	0.24
	MOL000173	汉黄芩素(Wogonin)	30.68	0.23
	MOL000228	(2R)-7-羟基-5-甲氧基-2-苯并吡喃-4-酮[(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one]	55.23	0.20
	MOL002714	黄芩素(Baicalin)	33.52	0.21
	MOL002909	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮(5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone)	33.82	0.45
	MOL002910	红花素(Carthamidin)	41.15	0.24
	MOL002913	二氢黄芩苷(Dihydrobaicalin)	40.04	0.21
	MOL002914	黄烷酮(Eriodyctiol)	41.35	0.24
	MOL002915	鼠尾草素(Salvigenin)	49.07	0.33
	MOL002917	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮(5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone)	45.05	0.33
	MOL002925	5,7,2',6'-四羟基黄酮(5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone)	37.01	0.24
	MOL002927	黄芩酮II(Skullcapflavone II)	69.51	0.44
MOL002928	木蝴蝶A(Oroxilin A)	41.37	0.23	
MOL002932	榄核莲黄酮(Panicolin)	76.26	0.29	
MOL002933	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮(5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone)	36.56	0.27	
MOL002934	黄芩新素(Neobaicalin)	104.34	0.44	
MOL002937	二氢曲霉素(Dihydrooroxilin)	66.06	0.23	
MOL000358	β -谷甾醇(β -sitosterol)	36.91	0.75	
MOL000359	谷甾醇(Sitosterol)	36.91	0.75	
MOL000525	去甲汉黄芩素(Norwogonin)	39.40	0.21	
MOL000552	5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮(5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone)	31.71	0.35	
MOL000073	表儿茶素(enti-epicatechin)	48.96	0.24	
MOL001458	小檗碱(Coptisine)	30.67	0.86	
MOL001490	双[(2S)-2-乙基基]苯-1,2-二羧酸盐{bis[(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate}	43.59	0.35	
MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯(Diisooctyl phthalate)	43.59	0.39	
MOL002897	表小檗碱(Epiberberine)	43.09	0.78	
MOL008206	芥苾黄酮(Moslosooflavone)	44.09	0.25	
MOL010415	11,13-二十碳二烯酸甲酯(11,13-eicosadienoic acid methyl ester)	39.28	0.23	
MOL012245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮(5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone)	36.63	0.27	
MOL012246	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮(5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone)	74.24	0.26	
MOL012266	三甲氧基黄酮(Rivularin)	37.94	0.37	
共有成分	MOL000449	豆甾醇(Stigmasterol)	43.83	0.76

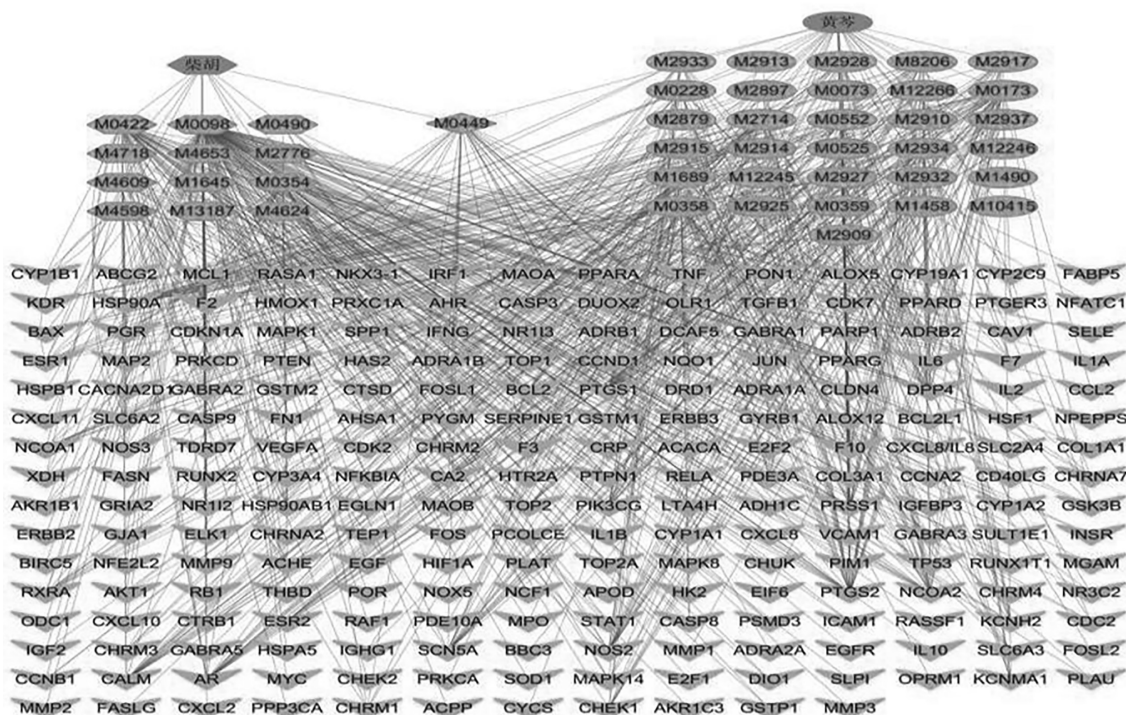


图1 “柴胡-黄芩”药对的“中药-成分-靶点”网络图

Fig 1 “TCM-component-target” network diagram of couplet medicine of “*B. falcatum-S. baicalensis*”

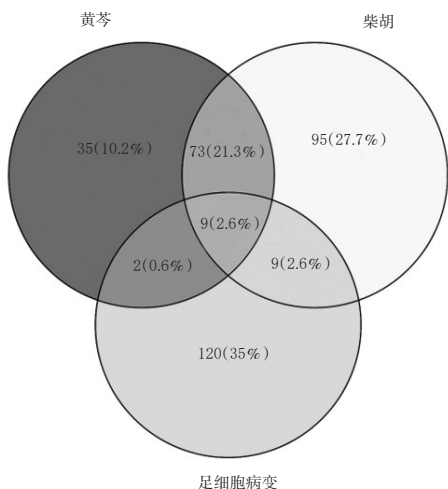


图2 “柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的韦恩图

Fig 2 Wayne map of intersection genes of “*B. falcatum-S. baicalensis*” target and podocyte lesion related target

KEGG 通路富集获得条目 47 个 ($P < 0.05$)。其中, 主要富集条目为细胞因子-细胞因子受体相互作用、类风湿关节炎、疟疾、癌症信号通路等。“柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的 KEGG 通路富集分析结果(前 20 位)见图 4(图中, 纵坐标为通路名称, 横坐标为富集因子, 气泡大小表示富集于该条目上的基因个数, 气泡越大, 表示该条目富集个数越多; 气泡颜色表示 P 值), KEGG 通路富集信息表(前 20 条)见表 6。

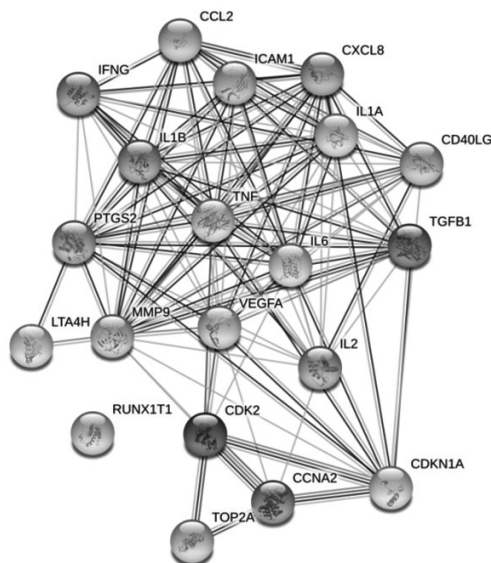


图3 “柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的 PPI 网络图

Fig 3 PPI network of intersection genes of “*B. falcatum-S. baicalensis*” target and podocyte lesion related target

3 讨论

辛通畅络法系天津市名中医曹式丽教授的特色中医肾病学学术观点。在前期临床与基础研究过程中, 本课题组以具有典型足细胞病变特征的局灶节段性肾小球硬化(FSGS)模型大鼠为研究对象, 以辛通畅络法之载体——复方肾苏 II 的相关作用机制阐释为切入点, 开展

表2 “柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的拓扑学参数

Tab 2 Topological parameters of intersection genes of “*B. falcatum-S. baicalensis*” target and podocyte lesion related target

靶点基因	中心度	介度性	中心紧密度	靶点基因	中心度	介度性	中心紧密度
MMP9	17	37.15	0.95	IL1B	13	0.35	0.75
VEGFA	16	18.15	0.90	TGFB1	13	1.51	0.75
IL6	15	9.58	0.86	IL1A	12	0.00	0.72
TNF	15	9.58	0.86	CD40LG	12	1.22	0.72
PTGS2	15	14.86	0.82	CDKN1A	9	3.97	0.67
CXCL8	14	1.86	0.78	CDK2	6	17.51	0.60
IL2	14	8.91	0.82	CCNA2	6	16.31	0.60
ICAM1	13	0.35	0.75	LTA4H	2	0.00	0.51
IFNG	13	0.35	0.75	TOP2A	2	0.00	0.41
CCL2	13	0.35	0.75				

表3 “柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的GO分析结果(生物过程,前20条)

Tab 3 GO analysis results of intersection genes of “*B. falcatum-S. baicalensis*” target and podocyte lesion related target (biological process, top 20)

GO ID	GO功能注释(英文名称)	基因数	P
0045429	一氧化氮生物合成过程的正调控(Positive regulation of nitric oxide biosynthetic process)	6	9.80×10^{-10}
0006954	炎症反应(Inflammatory response)	9	3.81×10^{-9}
0006955	免疫反应(Immune response)	9	8.67×10^{-9}
0071222	细胞对脂多糖的反应(Cellular response to lipopolysaccharide)	6	1.36×10^{-7}
0051092	核因子κB(NF-κB)的正调控(Positive regulation of NF-kappaB transcription factor act)	6	3.07×10^{-7}
0010628	基因表达的正调控(Positive regulation of gene expression)	7	3.12×10^{-7}
0070374	细胞外调节蛋白激酶1(ERK1)和ERK2级联的正调控(Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade)	6	1.20×10^{-6}
0008285	细胞增殖的负调控(Negative regulation of cell proliferation)	7	3.46×10^{-6}
0010575	血管内皮生长因子(VEGF)的正调控(Positive regulation of VEGF)	4	3.53×10^{-6}
0060559	钙二醇1-单加氧酶活性的正调控(Positive regulation of calcidiol 1-monoxygenase activity)	3	3.64×10^{-6}
0045944	RNA聚合酶转录的正调控(Positive regulation of transcription from RNA polymerase)	9	5.59×10^{-6}
0031663	脂多糖介导的信号通路(Lipopolysaccharide-mediated signaling pathway)	4	5.97×10^{-6}
0043491	蛋白激酶B信号(Protein kinase B signaling)	4	6.56×10^{-6}
0001934	蛋白质磷酸化的正调控(Positive regulation of protein phosphorylation)	5	1.11×10^{-5}
0031622	发热发生的正调控(Positive regulation of fever generation)	3	1.21×10^{-5}
0045599	脂肪细胞分化的负调控(Negative regulation of fat cell differentiation)	4	1.37×10^{-5}
0032755	IL6产生的正调控(Positive regulation of interleukin-6 production)	4	1.69×10^{-5}
0042493	对药物的反应(Response to drug)	6	1.78×10^{-5}
0051781	细胞分裂的正调控(Positive regulation of cell division)	4	1.93×10^{-5}
0006959	体液免疫反应(Humoral immune response)	4	3.46×10^{-5}

了系列研究,证实了复方肾苏Ⅱ可有效减少FSGS模型大鼠尿蛋白排泄,有效延缓足细胞形态变化及凋亡进程^[6,10-11]。同时,本课题组基于系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)大鼠模型的研究结果表明,复方肾苏Ⅱ可有效调控IL6介导的肾组织免疫损伤^[12]。尽管辛通畅络法系列研究的前期结果已提示复方肾苏Ⅱ具有多相调控足细胞病变的可能性,但现有研究内容往往是根据跟踪现代医学、分子生物学相关机制新发现而确定的,难免存

表4 “柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的GO分析结果(细胞组成)

Tab 4 GO analysis results of intersection genes of “*B. falcatum-S. baicalensis*” target and podocyte lesion related target (cellular composition)

GO ID	GO功能注释(英文名称)	基因数	P
0005615	细胞外间隙(Extracellular space)	13	7.84×10^{-10}
0005576	胞外区(Extracellular region)	11	1.24×10^{-6}
0009897	质膜外侧(External side of plasma membrane)	5	6.13×10^{-5}
0097124	细胞周期蛋白A2-周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)复合物(Cyclin A2-CDK2 complex)	2	2.08×10^{-3}
0009986	细胞表面(Cell surface)	5	2.10×10^{-3}
0000307	细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物(Cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex)	2	1.55×10^{-3}
0000793	浓缩染色体(Condensed chromosome)	2	2.57×10^{-3}
0005578	蛋白细胞外基质(Proteinaceous extracellular matrix)	3	3.13×10^{-3}

表5 “柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的GO分析结果(分子功能)

Tab 5 GO analysis results of intersection genes of “*B. falcatum-S. baicalensis*” target and podocyte lesion related target (molecular function)

GO ID	GO功能注释(英文名称)	基因数	P
0005125	细胞因子活性(Cytokine activity)	9	8.16×10^{-12}
0008083	生长因子活性(Growth factor activity)	4	7.51×10^{-4}
0005149	白介素1(IL1)受体结合(Interleukin-1 receptor binding)	2	1.45×10^{-3}
0005515	蛋白质结合(Protein binding)	16	1.51×10^{-3}
0030332	细胞周期蛋白结合(Cyclin binding)	2	2.22×10^{-3}
0005164	肿瘤坏死因子(TNF)受体结合(Tumor necrosis factor receptor binding)	2	3.22×10^{-3}
0042803	蛋白质同源化活性(Protein homodimerization activity)	4	4.66×10^{-3}

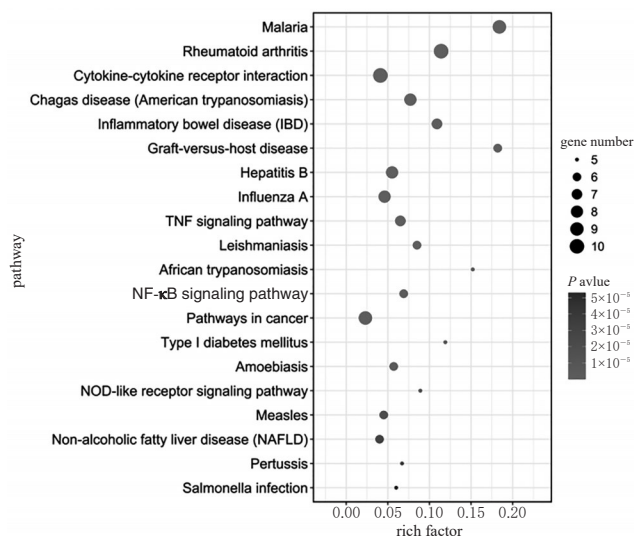


图4 “柴胡-黄芩”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的KEGG通路富集分析结果(前20位)

Fig 4 KEGG pathway enrichment analysis results of intersection genes of “*B. falcatum-S. baicalensis*” target and podocyte lesion related target (Top 20)

在“散、浅、杂”的局限性,科研思路与研究内容亟待创新、优化。复方肾苏Ⅱ之君药“柴胡-黄芩”系曹式丽教授蛋白尿中医临证治疗之“辛通畅络”常用药对,且其单

表6 “柴胡-黄芪”作用靶点与足细胞病变相关靶点交集基因的KEGG通路富集信息表(前20条)

Tab 6 KEGG pathway enrichment information of intersection genes of “*B. falcatum*-*S. baicalensis*” target and podocyte lesion related target (Top 20)

KEGG ID	富集通路(英文名称)	基因数	P
hsa05144	疟疾(Malaria)	9	1.51×10^{-12}
hsa05323	类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis)	10	2.67×10^{-12}
hsa04060	细胞因子-细胞因子受体相互作用(Cytokine-cytokine receptor interaction)	10	2.72×10^{-9}
hsa05142	恰加斯病(美国锥虫病)(Chagas disease(American trypanosomiasis))	8	4.09×10^{-9}
hsa05321	炎症性肠病[Inflammatory bowel disease]	7	8.69×10^{-9}
hsa05332	移植抗宿主病(Graft-versus-host disease)	6	1.52×10^{-8}
hsa05161	乙型肝炎(Hepatitis B)	8	4.19×10^{-8}
hsa05164	甲型流感(Influenza A)	8	1.48×10^{-7}
hsa04668	TNF信号通路(TNF signaling pathway)	7	1.96×10^{-7}
hsa05140	利什曼病(Leishmaniasis)	6	7.84×10^{-7}
hsa05143	非洲锥虫病(African trypanosomiasis)	5	1.28×10^{-6}
hsa04064	NF- κ B信号通路(NF- κ B signaling pathway)	6	2.17×10^{-6}
hsa05200	癌症通路(Pathways in cancer)	9	2.79×10^{-6}
hsa04940	I型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus)	5	3.45×10^{-6}
hsa05146	阿米巴病(Amoebiasis)	6	5.77×10^{-6}
hsa04621	NOD样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)	5	1.11×10^{-5}
hsa05162	麻疹(Measles)	6	1.75×10^{-5}
hsa04932	非酒精性脂肪肝[Non-alcoholic fatty liver disease]	6	3.24×10^{-5}
hsa05133	百日咳(Pertussis)	5	3.55×10^{-5}
hsa05132	沙门氏菌感染(Salmonella infection)	5	5.30×10^{-5}

体成分亦是复方肾苏 II 的重要药效成分^[13];加之柴胡、黄芪所具有的广泛生物活性,涵盖抗氧化、抑制环氧合酶、抗炎等多种药理作用,且二味药材配伍后应用,可增加柴胡皂苷、黄芪苷等有效成分的溶出,增强抗炎、抗氧化等药理效应^[14]。因此,笔者认为,通过网络药理学技术进行复方肾苏 II 之君药“柴胡-黄芪”药对于干预足细胞病变潜在靶点的预测,存在提升科研创新能力、进而拓展该方整体科研思路与内容的可能性。

一般认为,正常足细胞由胞体、主突及足突构成。其中,相邻足突交错锚定于GBM,并形成裂孔隔膜(SD)。SD由基因、细胞活性因子及信号通路等多层次调控,以防止大分子蛋白漏出^[15]。病理状态下,以细胞骨架重构、黏附性降低、迁移性升高以及凋亡发生为主要表现的足细胞病变将最终导致足细胞自GBM脱落^[16];与此同时,残存的足细胞由于胞体的代偿性肥大、足突的增宽融合、肾小球滤过屏障通透性的异常增加,从而导致蛋白尿的产生^[17]。上述足细胞病变特点是阐释“柴胡-黄芪”乃至复方肾苏 II 足细胞病变防治机制的重要切入点。

本研究结果表明,槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素、 β -谷甾醇等作用靶点较多,为“柴胡-黄芪”主要活性成分。PPI拓扑学分析结果显示,*MMP9*、*VEGFA*、*IL6*、*TNF*、*PTGS2*(又称*COX-2*)等靶点处于网络核心位置。目前认为,肾脏基质金属蛋白酶9(MMP9)多源于足细

胞,*MMP9*基因启动子位点的特异性去甲基化参与并调节了高糖培养基中足细胞上皮细胞向间充质细胞转化(EMT)的发生^[18];IL6作为重要炎症因子,可通过信号转导及转录激活因子3/肌球蛋白轻链阻断局部黏着斑动态,破坏细胞骨架组织,导致足细胞迁移运动增加^[19];VEGFA与足细胞损伤密切相关,其可通过调控足细胞标志蛋白Nephrin的表达而诱导足突融合^[20];TNF与足细胞功能障碍和凋亡密切相关,其功能丧失可显著逆转足细胞凋亡^[21]。此外,*COX-2*为肾血流动力学及炎症反应的关键调节因子,在足细胞损伤时异常激活,故抑制*COX-2*的表达可使足细胞免受损伤^[22]。以上内容提示,柴胡、黄芪活性成分可能主要通过调控上述靶点来实现对足细胞骨架损伤、迁移、凋亡及炎症反应等病理进程的多相调控。

信号通路作为细胞外分子信号经细胞膜传入细胞内发挥效应的一系列酶促反应,在诸多生理、病理过程中发挥重要作用^[23]。KEGG通路富集结果显示,癌症、细胞因子-细胞因子受体相互作用、类风湿关节炎、疟疾、乙型肝炎等相关信号通路可能是“柴胡-黄芪”药对于干预足细胞病变的主要调节通路。Toll样受体(TLR)信号通路作为炎症反应的经典信号通路之一,是疟疾、类风湿关节炎等疾病的重要调节机制,亦与NF- κ B信号通路共同参与足细胞损伤过程^[24-25]。嘌呤霉素氨基核苷可致体外培养的足细胞中TLR4表达量增多,进而导致NF- κ B活化,诱发炎症反应^[26];反之,NF- κ B的活化亦可促进足细胞TLR4高表达,导致炎性损伤^[27]。既往研究显示,TGF信号通路参与细胞生长、分化、凋亡等多个细胞过程^[28],从属于癌症、细胞因子-细胞因子受体相互作用等信号通路^[29-30]。有研究指出,在高糖刺激下,TGF- β /Smad信号通路激活,可诱导足细胞凋亡^[31]。磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)作为细胞生长、代谢、凋亡重要通路,是常见的癌症信号通路^[32]。在足细胞病变中,由CD2相关蛋白(CD2AP)介导PI3K募集于质膜,并刺激足细胞中PI3K依赖的Akt信号转导,诱导足细胞结构、功能完整性损伤,甚至凋亡^[33]。前期辛通络法系列研究结果表明,复方肾苏 II 可通过抑制Notch-PI3K/Akt通路异常激活,逆转足细胞EMT进程,修复足细胞损伤^[11],这在一定程度上提升了其他KEGG富集通路预测结果的可靠性。

综上所述,本研究运用网络药理学方法,通过对冗繁数据信息的整合分析,初步实现了对“柴胡-黄芪”干预足细胞病变可能靶点、机制途径与生物过程的预测。然而,网络药理学尚处于探索阶段,数据来源仅限于在线开源数据库,其数据涵盖范围与可靠性仍有待提高,靶点蛋白及其与信号通路间的作用机制尚处于生物信息分析层面,仍需基础与临床研究予以进一步验证。

参考文献

[1] CHENG H, HARRIS RC. The glomerulus: a view from

- the outside-the podocyte[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(9):1380-1387.
- [2] HANAMURA K, TOJO A, FUJITA T. Urinary and glomerular podocytes in patients with chronic kidney diseases[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2014, 18(1):95-103.
- [3] 孙柯,梅长林.全球慢性肾脏病患病率评估的局限性[J]. *中国临床医学*, 2017, 24(6):958-963.
- [4] 窦一田,杨洪涛,林燕,等.名老中医曹式丽辛通络法治特发性足细胞病学术经验摘要[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(8):1604-1606.
- [5] 解静,高杉,李琳,等.网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. *中草药*, 2019, 50(10):2257-2265.
- [6] 窦一田,高先楼,支勇.肾苏Ⅱ对局灶节段性肾小球硬化病理形态学的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2010, 37(3):551-553.
- [7] 梁栋.肾苏Ⅱ对局灶节段性肾小球硬化患者氧化低密度脂蛋白、血脂及血肌酐的影响[J]. *山西中医学院学报*, 2014, 15(2):38-40.
- [8] 颜学玲,时政,张云.金荞麦中优效组分的网络药理学研究[J]. *中国药房*, 2020, 31(5):558-563.
- [9] 任晓龙,吕琳度.网络重要节点排序方法综述[J]. *科学通报*, 2014, 59(13):1175-1197.
- [10] 窦一田,高先楼,支勇.肾苏Ⅱ对局灶节段性肾小球硬化的保护作用[J]. *辽宁中医杂志*, 2010, 37(7):1376-1377.
- [11] 尚懿纯,曹式丽,杨洪涛,等.肾苏Ⅱ方对局灶节段性肾小球硬化大鼠 Notch-PI3K/PKB 通路串话及足细胞 EMT 的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(12):5271-5276.
- [12] 窦一田,高先楼,曹式丽.肾苏Ⅱ对系膜增生性肾炎模型大鼠肾病变及白细胞介素-6的影响[J]. *中医杂志*, 2011, 52(13):1131-1134.
- [13] 窦一田,瞿晶田,王玉明,等.复方肾苏Ⅱ的 HPLC 指纹图谱及化学成分鉴定[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20):68-74.
- [14] 张程亮,兰露露,任秀华,等.柴胡黄芩药对的基础研究探析[J]. *世界科学技术(中医药现代化)*, 2019, 21(1):33-37.
- [15] SU Y, XIA W, LI J, et al. Relating conformation to function in integrin $\alpha 5\beta 1$ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(27):3872-3881.
- [16] MICHIO N. Podocyte injury and its consequences[J]. *Kidney Int*, 2016, 89(6):1221-1230.
- [17] 石格,毛志敏,万毅刚,等.糖尿病肾病足细胞损伤的病理机制及中药的干预作用[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(13):2416-2421.
- [18] LING L, CHEN LB, ZHANG CN, et al. High glucose induces podocyte epithelial to mesenchymal transition by demethylation mediated enhancement of MMP9 expression[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4):5642-5651.
- [19] HE FF, BAO D, SU H, et al. IL-6 increases podocyte motility via MLC-mediated focal adhesion impairment and cytoskeleton disassembly[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9):7173-7181.
- [20] 朱晓娜,王玉环,吴娟娟,等.奥美沙坦酯对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及对肾组织 Neph rin、VEGF 表达的影响[J]. *山东医药*, 2019, 59(14):15-18.
- [21] CHRISTOPHER EP, GLORIA MD, FARAH L, et al. Local TNF causes NFATc1-dependent cholesterol-mediated podocyte injury[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(9):3336-3350.
- [22] SHIPRA A, ADAM JG, MELINDA AC, et al. Albumin-induced podocyte injury and protection are associated with regulation of COX-2[J]. *Kidney Int*, 2014, 86(6):1150-1160.
- [23] 廖建钊,章晓云,张璇.骨性关节炎发生发展中的分子信号通路[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(21):3394-3400.
- [24] LEORATTI FM, FARIAS L, ALVES FP, et al. Variants in the Toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria[J]. *J Infect Dis*, 2008, 198(5):772-780.
- [25] Li XF, XUT, WANGYR, et al. Toll-like receptor-4 signaling: a new potential therapeutic pathway for rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatol Int*, 2014, 34(11):1613-1614.
- [26] 柳云,任红旗,王增慧,等.甘西鼠尾草总酚酸提取物对嘌呤霉素氨基核苷诱导损伤的足细胞中 Toll 样受体 4 表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2017, 18(8):672-675.
- [27] WEI M, LI Z, XIAO L, et al. Effects of ROS-relative NF- κ B signaling on high glucose-induced TLR4 and MCP-1 expression in podocyte injury[J]. *Mol Immunol*, 2015, 68(2):261-271.
- [28] ITATANI Y, KAWADA K, SAKAI Y. Transforming growth factor- β signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment[J]. *Int J Mol Sci*, 2019. DOI:10.3390/ijms20235822.
- [29] 韩晓春,赵海军,王媛,等.基于 KEGG 通路富集分析的薏苡仁不同成分对 Cytokine-cytokine receptor interaction 靶基因作用[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(9):4029-4032.
- [30] 李文娜,李庆伟,王浩.TGF- β 对肿瘤微环境中免疫监视及细胞外基质的调控作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(3):267-274.
- [31] 曹璐璐,杨宇航,谢美雯,等.疏利三焦法通过转化生长因子- β 途径调节糖尿病肾病足细胞凋亡机制的研究[J]. *河北中医*, 2019, 41(3):424-428.
- [32] 郭威,张冲,钟先荣. PI3K/AKT 信号传导通路在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *河北医科大学学报*, 2018, 39(6):734-738.
- [33] QI R, SHENG YY. CD2-associated protein participates in podocyte apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2016, 36(3):288-291.

(收稿日期:2020-10-15 修回日期:2021-01-08)

(编辑:林 静)