

基于网络药理学探讨昆明山海棠治疗膜性肾病的作用机制[△]

韩佳瑞^{1,2*}, 庞欣欣^{2#}, 郑威¹, 商海涛¹, 彭紫凝¹, 王琳³(1. 河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450046; 2. 河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院肾病科, 郑州 450002; 3. 郑州颐和医院全科医学科, 郑州 450047)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)03-0272-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.03.004

摘要 目的:通过网络药理学探讨中药昆明山海棠治疗膜性肾病的潜在靶点及作用机制。方法:通过 BATMAN-TCM 筛选昆明山海棠的有效成分和靶点,通过 GeneCards、人类孟德尔遗传综合数据库、治疗靶点数据库、DrugBank 和 GAD 等数据库查找膜性肾病的相关靶点。利用 Cytoscape 软件分析昆明山海棠治疗膜性肾病的作用靶点与有效成分之间的关系网络,通过 DAVID 数据库分析昆明山海棠治疗膜性肾病的有效靶点的生物学功能和作用机制。结果:根据口服利用度和药物相似性原则筛选出昆明山海棠有效成分 15 个,筛选出的有效成分作用靶点 78 个,有关膜性肾病靶点 3 191 个。通过基因本体功能富集分析,得到昆明山海棠干预膜性肾病的作用靶点的生物学功能,如类固醇结合性、核受体活性和直接配体调控特异性 DNA 序列结合性等。通过京都基因与基因组百科全书通路富集分析,筛选出昆明山海棠治疗膜性肾病的信号通路,如雷帕霉素靶蛋白信号通路等。结论:昆明山海棠治疗膜性肾病主要涉及类固醇结合性等多重生物学特性,干预雷帕霉素靶蛋白信号通路等多条信号通路。

关键词 昆明山海棠;膜性肾病;作用机制;网络药理学

Mechanism of Tripterygium Hypoglaucom in the Treatment of Membranous Nephropathy Based on Network Pharmacology[△]

HAN Jiarui^{1,2}, PANG Xinxin², ZHENG Wei¹, SHANG Haitao¹, PENG Zining¹, WANG Lin³(1. The Second Clinical Medical College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Dept. of Nephropathy, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine/the Second Hospital Affiliated to Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China; 3. Dept. of General Medicine, Zhengzhou Yihe Hospital, Zhengzhou 450047, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the potential targets and mechanism of tripterygium hypoglaucom in the treatment of membranous nephropathy based on network pharmacology. **METHODS:** Effective components and targets of tripterygium hypoglaucom were screened by using BATMAN-TCM. Related targets of membranous nephropathy were identified by GeneCards, Human Mendelian Genetic Comprehensive database, therapeutic target database, DrugBank and GAD. Cytoscape software was used to analyze the correlation between the target and active components of tripterygium hypoglaucom in the treatment of membranous nephropathy. Biological function and mechanism of effective target of tripterygium hypoglaucom for membranous nephropathy were analyzed by DAVID database. **RESULTS:** According to the principles of oral availability and drug similarity, 15 active components of tripterygium hypoglaucom were screened out, and 78 active targets were screened out, and 3 191 targets for MN were extracted from databases. Through gene enrichment analysis, the biological function of the targets of tripterygium hypoglaucom intervention in membranous nephropathy were obtained, such as steroid binding, nuclear receptor activity and direct ligand-regulated specific DNA sequence binding. Through pathway enrichment analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, the signal pathway of membranous nephropathy treatment by tripterygium hypoglaucom was screened out, such as target rapamycin signaling pathway. **CONCLUSIONS:** The treatment of membranous nephropathy by tripterygium hypoglaucom mainly involves multiple biological properties such as steroid binding properties and intervention with multiple signaling pathways such as rapamycin target protein signaling pathway.

KEYWORDS Tripterygium hypoglaucom; Membranous nephropathy; Mechanism of action; Network pharmacology

△ 基金项目:全国中医药创新骨干人才培养项目;河南省中医药拔尖人才培养项目(No. 2019ZYBJ17);河南省科技攻关项目(No. 202102310171);河南省中医药科学研究专项重点课题(No. 20-21ZY1003)

* 教授,博士,硕士生导师。研究方向:中医药治疗慢性肾脏病的研究。E-mail:hanjr2018@126.com

通信作者:副主任医师,博士,硕士生导师。研究方向:中医药治疗慢性肾脏病的研究。E-mail:doctorpang@aliyun.com

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)为常见的自身免疫性疾病,也是导致肾衰竭的常见原因之一^[1]。MN的病理损伤以肾小球毛细血管壁均匀一致增厚为特征,弥漫性免疫复合物在肾小球上皮堆积,并伴有新的基底膜合成^[2]。目前,尚无有效治疗MN的药物和方法,临床治疗以糖皮质激素、免疫抑制剂,以及减少尿蛋白、降压和抗凝等药物控制和缓解病情为主,以保护肾功能和减少并发症^[3]。然而,MN的临床治疗仍有较大问题,免疫抑制剂的种类、疗程和剂量的不同会影响疗效并增加感染风险,甚至诱发肿瘤,存在易复发、无应答率高等不良事件,仍要尝试探寻新的治疗方法和手段^[4-5]。近年来,随着中医药的临床发展,中医药治疗MN受到更多重视。昆明山海棠为雷公藤属植物,以根茎入药,其临床制剂多用于自身免疫性疾病^[6]。研究结果表明,昆明山海棠可以抑制肾脏免疫反应,降低肾小球滤过膜的通透性,减少微血栓形成,降低蛋白尿水平,改善肾功能^[7]。Meta分析结果显示,以昆明山海棠为主要原材料的中药昆仙胶囊配合常规疗法可提高肾病综合征的临床疗效,且不良事件较少,安全性佳^[8]。研究结果显示,昆仙胶囊治疗肾病综合征疗效确切,不良反应少^[9-10]。但其潜在的机制尚不明确。本研究利用网络药理学,挖掘分析昆明山海棠的有效成分,引入其作用于MN的靶点,进行“疾病-药物-分子-靶点”交互作用可视化分析,以及基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,为昆明山海棠多成分、多靶点、多通路治疗MN的作用机制提供参考。

1 资料与方法

1.1 筛选昆明山海棠的有效成分及靶点

BATMAN-TCM在线分析工具库来源于Drug Bank、治疗靶点数据库(TTD)、KEGG和人类孟德尔遗传综合数据库(OMIM)等多个线上数据库,能够分析预测中药潜在靶标^[11-12]。本研究采用BATMAN-TCM检索昆明山海棠的有效成分和相关靶点。参数设置:分数(Score cutoff)最低为系统推荐分数20,调整后P值(Adjusted P-value)临界值为0.05,以此来筛选昆明山海棠的有效成分即化合物,以及最佳匹配靶点。

1.2 检索MN的相关靶点

公共数据库GeneCards是基因信息最全面的公开性生物信息数据库,包含了以人类基因为中心的约150个网络来源的基因注释和预测^[13];以“Membranous nephropathy”为关键词在GeneCards里筛选与MN有关的所有靶点,并在DisGeNET、TTD、DrugBank和GAD等数据库中筛选补充。

1.3 构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络

PPI关系是中医药使用网络药理学技术挖掘出关键靶点的重要途径^[14]。应用STRING数据库,构建并选出核心靶点,构建PPI网络^[15]。筛选参数设置主要有:选择人类为生物机体,最低要求交互分数设置最高置信度0.4。

1.4 昆明山海棠治疗MN网络调控可视化

基于昆明山海棠和MN的PPI靶点数据,引入昆明山海棠可作用于MN的有效成分,取二者交集的数据,采用软件Cytoscape 3.7.2将其制作成可视化网络图,即得到昆明山海

棠治疗MN的“疾病-药物-分子-靶点”调控网络图。

1.5 GO和KEGG富集分析

DAVID数据库能够挖掘基因和疾病之间的相关性,其中GO功能富集分析包含不同细胞、分子和生物功能。采用GO功能富集分析,并对昆明山海棠和MN交集蛋白靶标基因进行KEGG通路富集分析,得出昆明山海棠治疗MN的相关作用通路。调整后P值在图中按照显著性排序。

2 结果

2.1 昆明山海棠的有效成分及靶点分析

按照分数>20,调整后P值<0.05为筛选条件,检索BATMAN-TCM数据库中昆明山海棠的成分与靶点,得到昆明山海棠有效成分15个,有效靶点123,剔除后得到靶点78,其中预测靶点即基因名称排序按得分下降排序,见表1。

2.2 昆明山海棠作用靶点和MN相关靶点检索结果

在GeneCards、DisGeNET和TTD等数据库中筛选MN与该疾病相关的靶点,去除重复靶点,得到与MN疾病相关的靶点3191个。纳入昆明山海棠的78个预测靶点,取药物(昆明山海棠)和疾病(MN)交集,得到35个共同靶点,见图1。

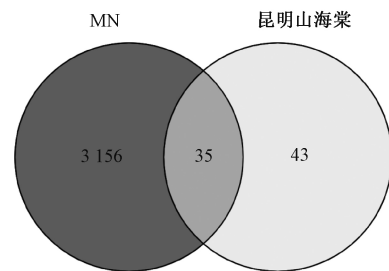


图1 昆明山海棠有效靶点与MN相关靶点

Fig 1 Effective targets of tripterygium hypoglaucum and MN-related targets

2.3 “昆明山海棠-MN”作用靶点的PPI关系分析

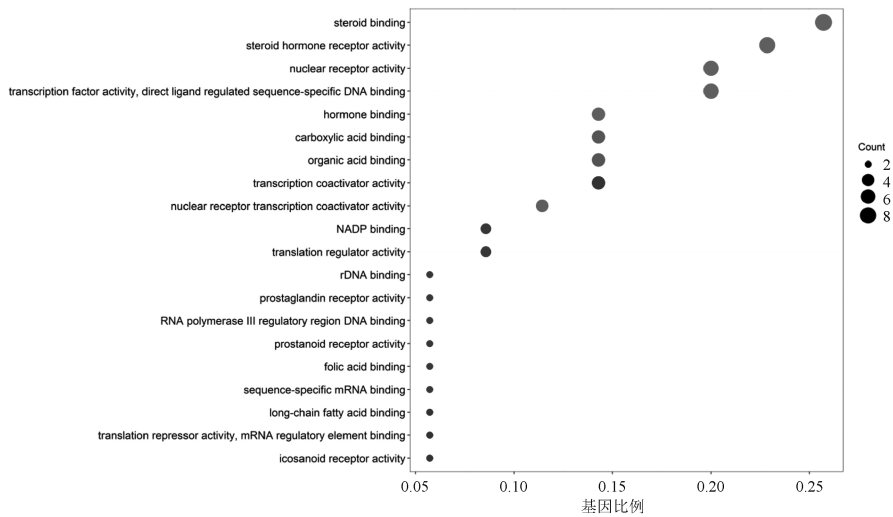
对“昆明山海棠-MN”的35个相互作用靶点进行分析,通过STRING数据库分析得到51条PPI关系,导入Cytoscape软件,度值越大则圆形越大,两个靶点之间连线的越粗表示PPI关系越强,见图2。取其中富集节点数目最多的前30个靶点,做出柱状图,得到前30个“昆明山海棠-MN”核心靶点,横轴显示富集节点数目,纵轴显示靶点基因名称,见图3。

2.4 昆明山海棠治疗MN网络可视化分析

通过Cytoscape软件,纳入PPI网络筛选的“昆明山海棠-MN”的35个相互作用靶点和分析筛选得到15个昆明山海棠可用有效成分,进行昆明山海棠治疗MN的网络的“疾病-药物-分子-靶点”互相作用的可视化分析,同时在网络中加入疾病和药物使网络图更加直观。网络可视化图见图4;图中,六边形代表昆明山海棠,菱形代表MN,三角形代表昆明山海棠15个有效作用成分,圆形代表昆明山海棠作用于MN的35个靶点。

2.5 昆明山海棠治疗MN的机制分析

通过DAVID工具对昆明山海棠和MN交集蛋白靶标基因进行GO功能富集分析,得到昆明山海棠干预MN治疗的作用靶点的生物学功能42种,综合分析后取前20种功能特性,得



“count”值气泡代表与该生物学功能相关的靶点数量,气泡越大,靶点越多,调整后 P 值 <0.05 的“count” value bubble represents the number of targets associated with the biological function, the larger the bubble, the more targets, and the adjusted P -value <0.05

图 5 昆明山海棠治疗 MN 的相关生物学功能

Fig 5 Biological functions of tripterygium hypoglaucum in the treatment of MN

表 2 昆明山海棠治疗 MN 的关键信号通路

Tab 2 Key signaling pathways of tripterygium hypoglaucum in the treatment of MN

ID	信号通路	调整后 P 值	数量
hsa05205	Proteoglycans in cancer	0.004 283 032	6
hsa04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	0.019 556 598	6
hsa04919	Thyroid hormone signaling pathway	0.003 941 977	5
hsa05224	Breast cancer	0.005 325 508	5
hsa05206	MicroRNAs in cancer	0.035 480 479	5
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	0.048 842 943	5
hsa00670	One carbon pool by folate	0.000 157 807	4
hsa04960	Aldosterone-regulated sodium reabsorption	0.001 025 613	4
hsa04961	Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	0.002 898 83	4
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	0.005 325 508	4
hsa04911	Insulin secretion	0.006 389 772	4
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0.009 170 863	4
hsa05146	Amoebiasis	0.009 170 863	4
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	0.010 091 445	4
hsa04725	Cholinergic synapse	0.010 427 278	4
hsa04150	mTOR signaling pathway	0.024 502 835	4
hsa05225	Hepatocellular carcinoma	0.028 736 029	4
hsa04015	Rap1 signaling pathway	0.041 906 886	4
hsa05163	Human cytomegalovirus infection	0.047 761 945	4
hsa01523	Antifolate resistance	0.005 325 508	3

致水肿;中期以湿浊为主,阴阳失和,气滞血阻,秽浊积蓄;日久瘀浊蕴壅或因虚致瘀,终致肾脏衰败^[16]。中药学认为,昆明山海棠有祛风除湿、活血解毒等功效,符合 MN 的中医病机。研究结果表明,昆明山海棠有保护肾脏的功能,通过减轻系膜细胞增生,减少微血栓形成,改善肾小球滤过,减少蛋白滤出,延缓肾病进展^[17]。临床上,昆仙胶囊也被广泛用于 MN 的治疗中,取得了显著的疗效,但目前对昆明山海棠治疗 MN 的机制还不完全清楚。

本研究通过网络药理学方法,得到昆明山海棠治疗 MN 的有效成分有 15 种,其中雷公藤甲素 (Triptolide) 和雷公藤内酯酮 (Triptonide) 不仅可以抗炎、抗氧化,还具有免疫抑制作用;雷公藤乙素 (Triptodioid) 可以改善微循环,在纠正肾脏糖代谢、

调节细胞因子方面有优势^[18];原花青素 C 和原花青素 B4 均可以清除自由基,具有抗氧化、抗炎的作用^[19]。根据“昆明山海棠-MN”的 PPI 关系分析,昆明山海棠治疗 MN 的核心作用靶点主要有雄激素受体 (AR)、雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 和糖皮质激素受体基因 (NR3C1) 等。有研究结果认为,AR 影响细胞免疫,有抗炎作用,可能与 MN 有关^[20];mTOR 影响促炎因子的产生,与 MN 密不可分^[21];FGF2 可调节活性氧,减轻氧化损伤,影响肾小球硬化过程^[22]。通过 GO 功能富集分析,得到昆明山海棠核心作用靶点主要通过类固醇结合性、核受体活性、转录因子活性和激素结合等生物学特性治疗 MN。

本研究通过 DAVID 工具进一步对关键靶点进行 KEGG 信

号通路分析,得到昆明山海棠主要通过 mTOR 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、甲状腺激素信号通路和癌症多糖蛋白信号通路等治疗 MN。其中 mTOR 信号通路为关键通路,参与了肾脏炎症反应和纤维化发生发展^[23]。mTOR 激酶包括 mTORC1 和 mTORC2,mTORC1 过度激活会促进血管内皮生长因子、单核细胞趋化蛋白 1 和血小板源性生长因子等促炎因子的生成,增加肾小管间质炎症,从而推进 MN 病情进展^[24]。磷脂酰肌醇三磷酸 (PIP3) 刺激 Akt 发生磷酸化,激活 mTORC1,促进辅助性 T 淋巴细胞 (Th1、Th17) 发生细胞免疫反应,维持促炎因子的活性,诱发机体发生免疫炎症^[21]。有研究表明,抑制 mTORC1 过度激活可以有效调节免疫,阻断炎症,从而延缓肾间质纤维化,防止 MN 病情恶化^[25]。PI3K-Akt 信号通路是昆明山海棠治疗 MN 的一个重要通路。PI3K-Akt 信号通路主要参与细胞生长、代谢和凋亡过程,并与炎症细胞因子的激活释放有关^[26]。PI3K 作为关键的物质被激活后催化磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP2) 生成 PIP3,通过 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1) 途径使 Akt 磷酸化,引起 PI3K-Akt 信号通路反应,激活调控肾脏细胞自噬,抑制足细胞凋亡,改善肾上皮间充质转化,从而缓解肾脏纤维化^[27-28]。

综上所述,昆明山海棠治疗 MN 主要涉及类固醇结合性等多重生物学特性,干预 mTOR 信号通路等多条信号通路。网络药理学和生物信息学分析作为一种新兴技术,不仅为探索昆明山海棠治疗 MN 的作用机制研究提供了理论支撑,还为进一步设计临床和实验研究等提供相对系统的理论依据,促进了昆明山海棠治疗新方向的形成。

参考文献

[1] XIE J Y, LIU L L, MLADKOVA N, et al. The genetic architecture of membranous nephropathy and its potential to improve non-invasive diagnosis[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1600.

[2] RONCO P, DEBIEC H. Molecular pathogenesis of membranous nephropathy[J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 287-313.

[3] 曲杨. 环磷酸腺苷联合小剂量激素治疗膜性肾病的临床研究[J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(8): 165-166.

[4] 冯杰, 刘茂东. 特发性膜性肾病治疗时机与进展[J]. 临床荟萃, 2019, 34(3): 284-288.

[5] GUO Y L, WU X P, LIU L, et al. Efficacy of leflunomide combined with prednisone for the treatment of PLA2R-associated primary membranous nephropathy[J]. Ren Fail, 2020, 42(1): 122-130.

[6] 李江, 李葵, 穆淑珍, 等. 黔产昆明山海棠化学成分及其抑菌活性研究[J]. 广西植物, 2019, 39(11): 1505-1511.

[7] 方玲娜, 卢冰, 张莉, 等. 火把花根对糖尿病肾病大鼠肾脏 Angpt2 和 NF-κB 表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(25): 2749-2753.

[8] 刘亚飞, 张哲, 涂胜豪, 等. 昆仙胶囊治疗肾病综合征有效性和安全性的系统评价[J]. 中西医结合研究, 2020, 12(2): 73-81.

[9] 吕艳, 于为民, 任小军. 昆仙胶囊联合小剂量激素治疗肾病综合征疗效观察[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(11): 1934-1935.

[10] 曾佳丽, 姜雪, 余瑾, 等. 昆仙胶囊对 IgA 肾病大鼠的肾保护作用及系膜细胞增殖的影响[J]. 中国现代医生, 2019, 57(31): 38-42, 169.

[11] LIU Z Y, GUO F F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinform-

atics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. Sci Rep, 2016, 6: 21146.

[12] 庞欣欣, 邢玉凤, 彭紫凝, 等. 基于网络药理学及 GEO 数据分析探究赤芍治疗 IgAN 的作用机制研究[J]. 转化医学杂志, 2021, 10(2): 70-76.

[13] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.

[14] 庞欣欣, 彭紫凝, 邢玉凤, 等. 基于网络药理学联合 GEO 数据分析探讨银杏叶治疗糖尿病肾病的作用机制[J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(6): 584-593.

[15] 庞欣欣, 张雅歌, 彭紫凝, 等. 基于网络药理学研究冬虫夏草治疗膜性肾病的作用机制[J]. 天津医科大学学报, 2021, 27(1): 55-60.

[16] 李洁, 杨波, 杨洪涛, 等. 中医药治疗膜性肾病的研究综述 [J]. 内蒙古中医药, 2021, 40(2): 165-166.

[17] 王特, 李兆福, 李涛, 等. 昆明山海棠治疗类风湿关节炎作用机制的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(8): 60-63.

[18] 王亚娟. 雷公藤乙素对糖尿病肾病大鼠肾脏中转化生长因子 β1 的影响[J]. 浙江中医杂志, 2013, 48(4): 270-272.

[19] 朱顺义, 钱鑫, 向远江, 等. 原花青素调节 MAPK 信号通路抑制炎症损伤的 Meta 分析[J]. 毒理学杂志, 2019, 33(5): 351-356.

[20] VOM STEEG L G, DHAKAL S, WOLDETSADIK Y A, et al. Androgen receptor signaling in the lungs mitigates inflammation and improves the outcome of influenza in mice[J]. PLoS Pathog, 2020, 16(7): e1008506.

[21] 姚睿原, 魏鸿渊, 雷金叶, 等. mTOR 信号通路在疾病中的作用与调控机制[J]. 生命科学, 2019, 31(2): 135-142.

[22] DONG Q L, ZHAO X H, WANG Q, et al. Anti-aging gene Klotho ameliorates diabetic nephropathy in mice by inhibiting FGF2 signaling pathway[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(4): 1369-1377.

[23] 钟利平, 麻志恒, 余柯娜, 等. mTOR 信号通路及肾纤维化及中医药对该通路影响研究进展[J]. 河北中医, 2016, 38(2): 298-301.

[24] WANG Y, LIU Z W, SHU S Q, et al. AMPK/mTOR signaling in autophagy regulation during cisplatin-induced acute kidney injury [J]. Front Physiol, 2020, 11: 619730.

[25] YANG L Y, WU Y S, LIN S H, et al. sPLA2-IB and PLA2R mediate insufficient autophagy and contribute to podocyte injury in idiopathic membranous nephropathy by activation of the p38MAPK/mTOR/ULK1^{ser757} signaling pathway[J]. FASEB J, 2021, 35(2): e21170.

[26] 于艳, 赵万超, 许烨, 等. 盐酸小檗碱对慢性肾衰大鼠肾间质纤维化改善作用及对 PTEN/PI3K/AKT 信号通路影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(3): 26-30.

[27] DI TU Q, JIN J, HU X, et al. Curcumin improves the renal autophagy in rat experimental membranous nephropathy via regulating the PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 7069052.

[28] 曹响, 谢丽萍, 赵洁, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨水蛭对 IgA 肾病的作用机制[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(2): 181-184.

(收稿日期:2021-01-21 修回日期:2021-12-04)