

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.24.015

五苓散治疗糖尿病肾病潜在靶点及作用机制的网络药理学研究

申鑫惠, 杨宇峰, 石岩*

辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847

摘要 目的 基于网络药理学方法探讨五苓散治疗糖尿病肾病的可能作用机制。方法 运用 TCMSP 分析平台、GeneCards 数据库和 OMIM 数据库, 分别筛选五苓散中各组成药物的活性成分、靶标及疾病靶标, 将药物靶标与疾病靶标取交集, 得到药物-疾病靶标, 并构建药物-成分-靶点-疾病相互作用网络图及蛋白相互作用网络图 (PPI), 推测其核心靶点, 并对核心靶点进行 GO 功能富集分析、KEGG 通路富集分析。结果 筛选得到五苓散治疗糖尿病肾病的有效靶标 19 个, 在蛋白质相互作用网络分析中, 筛选度值超过平均值的关键靶点 9 个, 分别为 CASP3、RELA、CASP8、ESR1、AR、BCL2、CASP9、NR3C1、ICAM1, 其中 CASP3、CASP8、CASP9 为 Caspases 家族蛋白, CASP3、CASP8、CASP9、BCL2 为细胞凋亡相关蛋白。GO 功能富集分析显示, 五苓散治疗糖尿病肾病效应的发挥主要在细胞质、脂蛋白颗粒、细胞器等细胞组分上; 涉及分子功能包括脂质结合、半胱氨酸型内肽酶活性等酶分子结合过程, RNA、DNA 结合过程以及酶活性参与凋亡过程; 主要参与脂质反应、细胞凋亡调控、激素反应等生物学过程。KEGG 通路富集分析显示, 这些靶标参与了癌症、乙肝、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、弓形虫病、细胞凋亡、结核、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) 信号通路等 142 条信号通路, 且通路上 Caspases 及 BCL2、RELA 等靶点基因重复出现率极高。结论 五苓散可能通过调控 Caspases 家族蛋白、BCL2 蛋白家族等细胞凋亡相关蛋白来减少肾脏细胞损伤, 从而延缓糖尿病肾病的发展进程。

关键词 糖尿病肾病; 五苓散; 细胞凋亡; BCL2; 网络药理学

糖尿病是一种以血糖异常升高为主要特征的代谢性疾病, 当病变累及肾脏微血管时, 可导致弥漫性或结节性肾小球硬化, 最终发展为糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN)。DN 可明显增加糖尿病患者的致残率、致死率, 也是目前引起终末期肾脏疾病的主要原因^[1]。DN 临床上常以持续性白蛋白尿、高血压、水肿、肾病综合征及肾功能异常为主要表现^[2], 发病机制目前虽尚未完全清楚, 但肾近端小管上皮细胞的凋亡在 DN 的发病和发展中起着至关重要的作用^[3]。研究表明, 氧化应激、脂质代谢、细胞因子炎症反应等多种复杂机制相互作用, 参与 DN 的发病过程^[4-6]。中医学认为, DN 为消渴病中后期的变证之一, 多为阴阳俱损、阳虚水泛之征象, 属本虚标实之证。五苓散是治疗

太阳蓄水证的代表方。临床研究表明, 五苓散能有效减轻水肿、改善脂质代谢, 同时能增加尿量、有效减少蛋白尿^[7]; 五苓散加减治疗 DN 能改善肾脏功能, 缓解 DN 引起的水肿^[8-9]。

网络药理学作为一门融合了药理学、生物信息学、系统生物学的新兴学科, 可以通过构建“疾病-靶标-药物”网络从整体角度分析药物与机体的作用机制, 被认为是探索中药复方机制的新视角、新途径^[10-11]。本研究基于网络药理学的相关原理及方法, 分析五苓散及 DN 的有效成分及靶点, 并对筛选出来的主要靶点及通路进行预测分析, 以探讨五苓散治疗 DN 的可能作用机制。

1 材料及方法

1.1 五苓散药物成分筛选及靶点预测

中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP,

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划 (2014BAH10B04)

* 通讯作者: shiyan@lnutem.edu.cn, 13386878333

http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php) 是目前国内较为完善的中药成分靶点数据库, 收录了《中华人民共和国药典》^[2] 500 种药物以及每味中药的成分信息, 且包含每一个化合物的吸收、分布、代谢和排泄等数据^[3]。利用 TCMSP 数据库检索五苓散中白术、泽泻、茯苓、猪苓、桂枝 5 味药的全部化学成分, 并以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 及类药性指数 (DL) ≥ 0.18 ^[4] 作为筛选标准, 确定药物的活性成分; 将从 TCMSP 数据库筛选出的五苓散功能富集的每个活性成分对应的潜在靶点信息放入 UniProt 数据库 (http://www.uniprot.org/) 中检索, 得到所有靶点的基因名。

1.2 DN 相关靶点获取

通过 GeneCards 数据库 (https://www.genecards.org/)、OMIM 数据库 (https://www.omim.org/)、DisGeNET 数据库 (http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home) 以 “diabetic nephropathy” 为关键词检索并收集 DN 相关的基因, 对收集的疾病靶点进行处理, 删除重复的靶点, 即得到 DN 的相关靶点。

1.3 五苓散-DN 交集靶点筛选

利用 Venny 2.1 (http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html) 在线工具对五苓散活性成分靶点与 DN 相关靶点基因进行映射, 并得到交集靶点。

1.4 构建药物-成分-靶点-疾病网络

将以上所得数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 并对其参数进行设置后得到药物-成分-靶点-疾病相互作用网络图。对系统网络进行分析, 以便进一步了解五苓散作用于 DN 的药理机制。

1.5 构建蛋白质相互作用网络 (PPI)

将筛选得到的 “Drug-Disease” 中的靶点蛋白导入 STRING 11.0 数据库 (https://string-db.org/)

进行蛋白与蛋白的相互作用分析, 限定研究物种为 “Homo sapiens”, 最低相互作用评分设置为 “0.400”, 同时显示设置隐藏游离点, 其余参数保持默认设置, 得到 PPI 图。

1.6 GO 分析与 KEGG 通路富集分析

DAVID 6.8 数据库 (https://david.ncifcrf.gov/) 是一个在线基因和通路功能注释的数据库。运用 DAVID 6.8 数据库及 KOBAS 3.0 (http://kobas.cbi.pku.edu.cn/) 将得到的核心靶点进行 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析。GO 功能富集分析主要用于描述基因靶点的功能, 包括细胞组成、分子功能和生物学过程。KEGG 通路富集分析可以得到五苓散与 DN 共同靶点所富集的信号通路。GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析皆以 $P < 0.01$ 为筛选标准。

2 结果

2.1 药物、疾病靶标预测结果

通过 TCMSP 数据库共检索到五苓散 5 味药已报道的成分有 386 个, 其中泽泻 46 个、白术 55 个、茯苓 34 个、猪苓 31 个、桂枝 220 个。以 “OB $\geq 30\%$, DL ≥ 0.18 ” 为参数进行筛选, 去重后共得到有效靶点 46 个, OB 值前 10 位有效靶点见表 1。通过 GeneCards、OMIM 数据库共检索到 2418 个 DN 相关靶点基因。

2.2 药物-成分-靶点-疾病相互作用网络

将 46 个化合物靶点与 DN 相关靶点基因进行映射, 得到 19 个药物-疾病共同靶点基因。利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建药物-成分-靶点-疾病相互作用网络。网络中有 41 个节点 (其中包含 20 个化合物节点, 21 个靶基因节点) 和 79 条边。其中方形节点表示靶基因, 椭圆形节点表示活性化合物, 每条边则表示五苓散与其活性成分、活性成分

表 1 五苓散组成药物化合物的有效靶点基本信息 (OB 值前 10 位)

药物	分子编号	分子名称	OB (%)	DL
白术	MOL000022	14-acetyl-12-senecioid-2E,8Z,10E-atractylentriol	63.37	0.30
白术	MOL000020	12-senecioid-2E,8E,10E-atractylentriol	62.40	0.22
桂枝	MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27
白术	MOL000021	14-acetyl-12-senecioid-2E,8E,10E-atractylentriol	60.31	0.31
桂枝	MOL004576	taxifolin	57.84	0.27
桂枝	MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24
白术	MOL000049	3 β -acetoxyatractylone	54.07	0.22
桂枝	MOL000073	ent-Epicatechin	48.96	0.24
猪苓	MOL000817	ergosta-5,7,22-trien-3-ol	46.18	0.72
猪苓	MOL000820	polyporusterone E	45.71	0.85

注: OB, 口服生物利用度; DL, 类药性指数

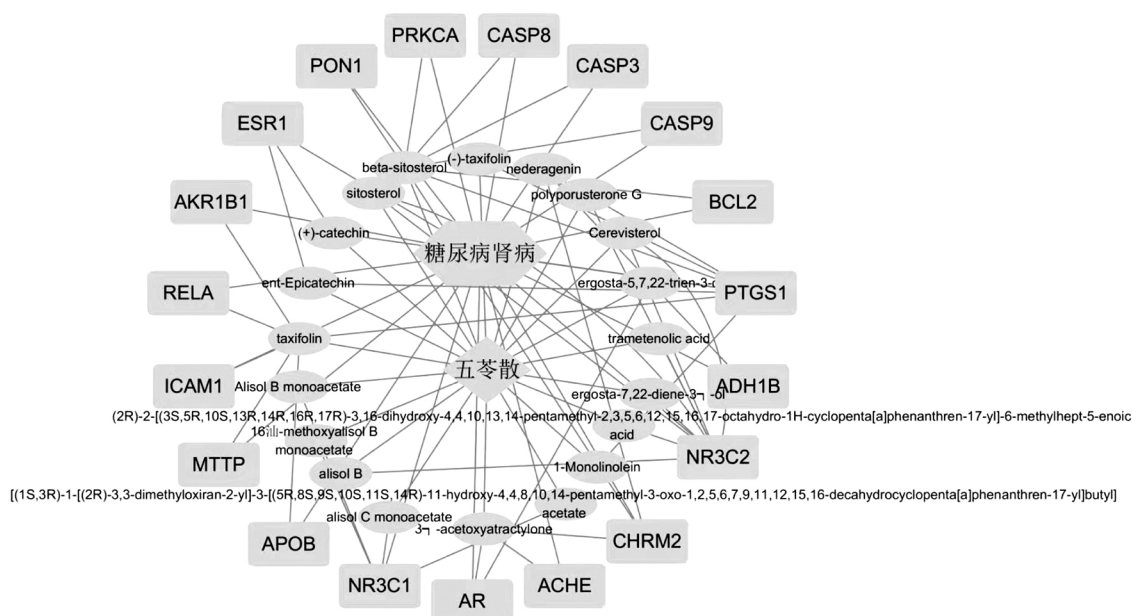


图1 五苓散治疗糖尿病肾病药物-成分-靶点-疾病相互作用网络图

与成分作用靶点、疾病与作用靶点之间的相互作用关系。见图1。

2.3 PPI 网络及其关键靶点

将映射得到的 19 个交集靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 网络分析, 软件分析后保留有意义的节点 18 个, 边共 39 条, 平均节点度值为 4.11, PPI 富集 $P < 0.01$, 见图2。

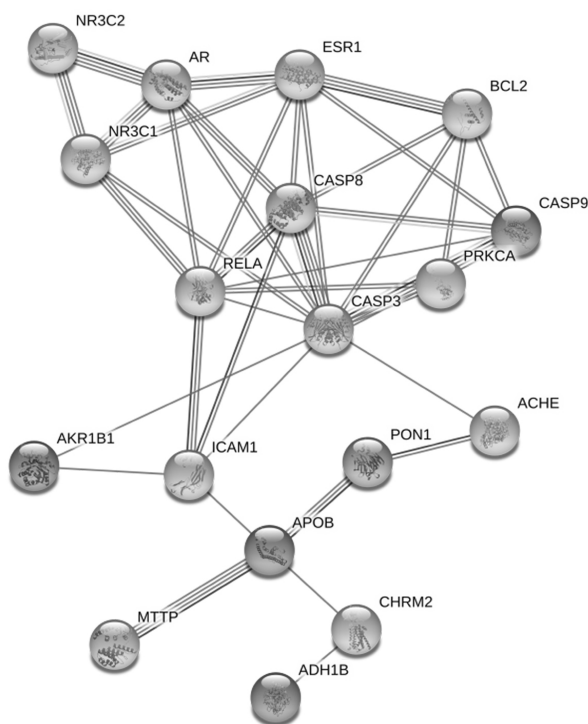


图2 五苓散治疗糖尿病肾病药物-疾病交集作用靶蛋白相互作用网络图

将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件中, 使用 NetworkAnalyzer 插件对网络进行分析, 见图3。图3中的节点大小表示度值的大小, 节点越大对应的度值越大; 边的粗细表示合并分数, 边越粗合并数值越大, 表示该节点蛋白与其他节点作用网络越广泛。

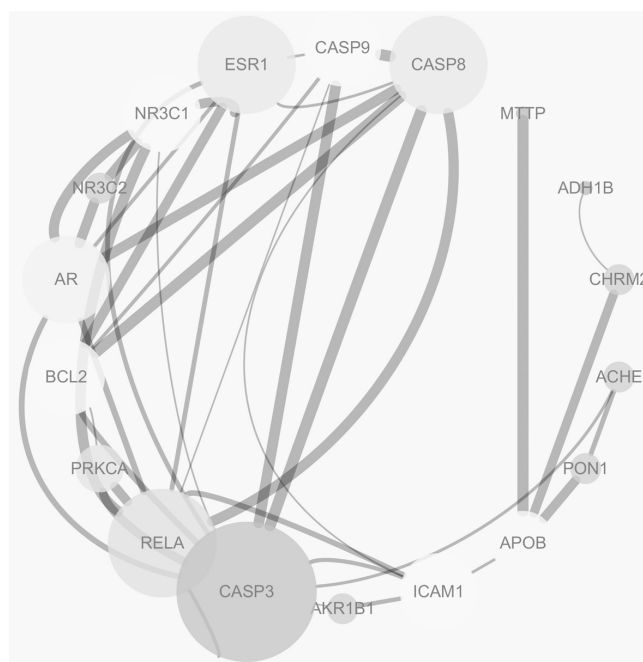


图3 五苓散治疗糖尿病肾病药物-成分-靶点-疾病交集靶点相互关系图

网络中各节点的平均度值为 4.33, 取度值超过平均值的靶点 9 个 (见表2), 推测这些靶点可能是五苓散治疗 DN 的关键靶点。

表 2 五苓散治疗糖尿病肾病关键靶点基本信息

靶点	靶点全称	介数	度值
CASP3	半胱氨酸蛋白酶 3	0.35	11
RELA	转录因子 p65	0.11	8
CASP8	半胱氨酸蛋白酶 8	0.09	7
ESR1	雌激素受体	0.02	7
AR	雄激素受体	0.08	6
BCL2	凋亡调节剂 BCL2	0.01	5
CASP9	半胱氨酸天冬酶 9	0.01	5
NR3C1	糖皮质激素受体	0.05	5
ICAM1	细胞间黏附分子 1	0.34	5

2.4 GO 功能富集分析结果

将作用靶点进行 GO 功能富集分析, 结果表明, 在生物学过程方面, 主要参与了细胞对脂质的反应、脂质反应、细胞对有机环状化合物的反应、细胞对刺激激素的反应、细胞对类固醇激素刺激的反应等生物过程; 在分子功能方面, 主要参与脂质结合、转录激活子活性, RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区域序列特异性结合、类固醇结合、类固醇激素受体活性、半胱氨酸型内肽酶活性等分子功能; 在细胞组成方面, 主要存在于细胞质部分、胞质溶胶、细胞质、脂蛋白颗粒、血浆脂蛋白颗粒等细胞组分中。选取这 3 个过程中排名前 5 者列为表 3。

2.5 KEGG 通路富集分析结果

进行 KEGG 通路富集分析, 得到通路 142 条 ($P < 0.05$), 根据 P 值由小到大进行排列, 选取前 20 条通路进行部分展示, 见表 4。其中涉及细胞凋亡通路、乙肝通路、癌症通路、糖尿病并发症中的

晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体信号通路、凋亡-多种等多种信号通路。

3 讨论

DN 属于中医学“消渴”“肾消”“水肿”等范畴。《圣济总录》记载“消渴病久, 肾气受伤, 肾主水, 肾气虚衰, 气化失常, 开阖不利, 能为水肿”^[3]; 《证治要诀》言“三消久而小便不臭及作甜气, 在尿中滚涌, 更有浮在溺面如猪脂, 此精不禁真元竭矣”, 均提示 DN 是糖尿病的进一步发展。五苓散具有温阳解表、化气行水的作用, 方中泽泻、茯苓、猪苓三者合用以淡渗利水; 桂枝量小力专, 通阳化气以行水, 引诸利湿药直达病所; 白术健脾化湿以利水, 与茯苓、桂枝合用可使气化有常, 精微输布。该方药简力专, 临床广泛用于治疗太阳蓄水证。

本研究基于网络药理学, 将通过数据库筛选的五苓散有效靶点与 DN 的相关靶点进行映射并取交集, 得到药物-疾病共靶点 19 个。将其进行蛋白质相互作用网络分析, 得到关键靶点 9 个, 分别为 CASP3、RELA、CASP8、ESR1、AR、BCL2、CASP9、NR3C1、ICAM1。而在 9 个关键靶点中, CASP3、CASP8、CASP9 皆为天冬氨酸特异酶切的半胱氨酸蛋白酶 (Caspases) 家族蛋白。Caspases 家族是细胞凋亡过程中的关键元件, 其激活与超常表达均可引起细胞凋亡, 故又称死亡蛋白酶, 可通过与众多蛋白因子的相互作用调控细胞凋亡^[14]。CASP8 作为凋亡起始者, 参与细胞凋亡的起始。

表 3 五苓散治疗糖尿病肾病作用靶点的 GO 功能富集分析结果

项目	名称	相关基因	P 值
生物学过程	细胞对脂质的反应	PRKCA, AR, CASP9, RELA, ESR1, NR3C1	<0.001
	脂质反应	PRKCA, AR, CASP9, RELA, ESR1, NR3C1	<0.001
	细胞对有机环状化合物的反应	AR, CASP9, RELA, ESR1, NR3C1	<0.001
	细胞对激素刺激的反应	AR, CASP9, RELA, ESR1, NR3C1	<0.001
	细胞对类固醇激素刺激的反应	AR, CASP9, ESR1, NR3C1	<0.001
分子功能	脂质结合	APOB, AR, ESR1, PON1, NR3C1	0.001
	转录激活子活性, RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区域序列特异性结合	AR, RELA, ESR1, NR3C1	0.001
	类固醇结合	AR, ESR1, NR3C1	0.001
	类固醇激素受体活性	AR, ESR1, NR3C1	0.002
	半胱氨酸型内肽酶活性	CASP3, CASP9, CASP8	0.002
细胞组成	细胞质部分	PRKCA, APOB, ACHE, CASP3, CASP9, RELA, CASP8, PTGS1, ESR1, NR3C1, MTTP	0.003
	胞质溶胶	PRKCA, CASP3, CASP9, RELA, CASP8	0.008
	细胞质	PRKCA, APOB, AR, ACHE, CASP3, CASP9, RELA, CASP8, PTGS1, ESR1, NR3C1, MTTP	0.010
	脂蛋白颗粒	APOB, PON1	0.020
	血浆脂蛋白颗粒	APOB, PON1	0.020

表 4 五苓散治疗糖尿病肾病 KEGG 通路富集潜在靶点信息

通路名称	基因	P 值
细胞凋亡	RELA, CASP3, CASP9, CASP8, BCL2	<0.001
乙肝通路	CASP3, CASP9, CASP8, PRKCA, BCL2, RELA	<0.001
癌症通路	CASP3, CASP9, CASP8, PRKCA, BCL2, AR, RELA	<0.001
糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体信号通路	RELA, PRKCA, CASP3, ICAM1, BCL2	<0.001
凋亡-多种	CASP3, CASP9, CASP8, BCL2	<0.001
弓形虫病	RELA, CASP3, CASP9, CASP8, BCL2	<0.001
军团菌病	RELA, CASP3, CASP9, CASP8	<0.001
结核	RELA, CASP3, CASP9, CASP8, BCL2	<0.001
病毒性心肌炎	CASP3, ICAM1, CASP8, CASP9	<0.001
铂耐药	CASP3, CASP9, CASP8, BCL2	<0.001
前列腺癌	AR, RELA, CASP9, BCL2	<0.001
TNF 信号通路	RELA, CASP3, ICAM1, CASP8	<0.001
胆碱能突触	CHRM2, PRKCA, ACHE, BCL2	<0.001
磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT) 信号通路	CHRM2, RELA, PRKCA, CASP9, BCL2	<0.001
甲型流感	RELA, CASP9, ICAM1, PRKCA	<0.001
肌萎缩性侧索硬化症	CASP3, CASP9, BCL2	<0.001
大肠癌	CASP3, CASP9, BCL2	<0.001
p53 信号通路	CASP3, CASP9, CASP8	<0.001
小细胞肺癌	RELA, CASP9, BCL2	<0.001
核因子-κB 信号通路	RELA, ICAM1, BCL2	<0.001

在外源性激活途径中, CASP8 是关键启动型 Caspase。研究表明, CASP8 几乎能激活所有凋亡级联反应下游的 Caspase 而诱发凋亡^[17-18]。CASP8 的激活亦可启动细胞内途径, 并且细胞外途径可以间接作用于细胞内途径^[19], 共同引起启动型 Caspase 的活化, 活化的 CASP8、CASP9 又可激活 CASP3, 继而启动 Caspase 级联反应, 诱导细胞凋亡。CASP3 位于凋亡有序级联反应的下游, 是细胞凋亡的关键执行者, 是多种凋亡刺激信号传递的汇聚点, 它的活化是细胞凋亡进入不可逆阶段的标志^[20]; 并且大多数触发细胞凋亡的因素, 最终均需通过 CASP3 介导的信号传递途径致使细胞凋亡。傅永锦等^[21]研究显示, CASP3 的激活可启动细胞凋亡, 导致 DN 的发生与发展。孙文等^[22]认为, CASP3 是氧化应激引起足细胞凋亡损伤的重要细胞因子。当足细胞 CASP3 基因表达受到抑制时, 能改善 DN 患者肾功能、减轻肾脏病理损害。综上所述, 五苓散可能通过抑制 CASP8、CASP3 的激活来抑制细胞凋亡相关通路反应的发生, 减轻肾脏损害, 延缓 DN 的发展。

B 淋巴细胞瘤 2 家族蛋白在细胞凋亡中的作用可根据结构和功能^[23]分为两类: 一类是抗凋亡因子 BCL2, 一类是促凋亡因子 Bax, 其中 BCL2 是抑制细胞凋亡的主要基因^[24]。BCL2 与 Bax 可分别以同源二聚体形式存在, 也可互相结合形成异源二聚

体, 阻断细胞色素 C 释放, 抑制 CASP3 蛋白的活化, 进而有效抑制细胞凋亡^[25]。BCL2 是 miR-204 的靶基因, miR-204 可以通过靶向下调抗凋亡蛋白 BCL2 的表达从而促进足细胞凋亡, 加快 DN 的发生发展, 增加 DN 的发病风险^[26]。由此可见, 五苓散可能是通过调节凋亡相关通路上的 Caspase 蛋白家族以及 BCL2 来抑制细胞凋亡, 保护肾脏, 延缓 DN 的发展。

RelA (p65, NF-κB3) 是核因子-κB (NF-κB) 蛋白家族中的一个转录因子^[27]。在糖尿病状态下 NF-κB 可被激活^[28], 而在高血糖情况下 NF-κB 活动显著增强, 导致转化生长因子 β (TGF-β)、趋化因子等细胞因子的释放^[29]。此外, 过度激活的 NF-κB 会进行各种基因异常转录并参与血管并发症。NF-κB 也会导致血小板源生长因子 (PDGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、TGF-β 等基因的表达, 导致血管细胞损伤和血管生成^[30], 加速 DN 的发生。NF-κB 在细胞因子网络调节中发挥转录调控作用, 糖尿病状态下葡萄糖自身氧化、蛋白非酶糖基化终末产物生成、多元醇途径活性增强等均可导致 NF-κB 的激活、堆积, NF-κB 活化后可诱导诸多炎症因子的转录, 诱导蛋白尿增加、肾小球硬化及小管间质纤维化^[31]。王铮等^[32]研究发现, DN 炎症信号传导通路的激活以及各种细胞因子的介导调节着 DN 进展中炎症反应过程。可见五苓散可能

是通过调节 TNF、NF- κ B 信号通路等与炎症密切相关信号通路上的 NF- κ B 因子来抑制炎症因子的产生,从而延缓 DN 进展中的炎症反应过程。

通过 GO 功能富集分析可知,五苓散治疗 DN 效应的发挥主要在细胞质、脂蛋白颗粒、细胞器等细胞组分上;涉及分子功能包括脂质结合、半胱氨酸型内肽酶活性等酶分子结合过程, RNA、DNA 结合过程以及酶活性参与凋亡过程;主要参与脂质反应、细胞凋亡调控、激素反应等生物学过程。可见其效应发挥所在细胞场所与其功能过程相一致,在细胞质中进行脂质结合、酶分子结合,并在细胞器的线粒体中进行 RNA、DNA 结合,进而参与脂质反应、细胞凋亡调控等多种生物学过程。

通过 KEGG 通路富集分析进一步说明,五苓散的靶点成分与 DN 的相关通路关系密切。细胞凋亡通路、乙肝通路、癌症通路的富集基因皆有 CASP3、CASP8、CASP9、BCL2、RELA,且其中的 CASP3、CASP8、CASP9、BCL2 皆为细胞凋亡相关蛋白,并且显著性较高的前 20 条信号通路上出现的靶点也具有极大的相似性,重复率较高。Caspase 蛋白家族出现的频率高达 90%,有 50% 的通路同时出现 CASP3、CASP8、CASP9 基因。BCL2 出现的频率达 75%,有 60% 的通路出现了 RELA,并且前 3 条通路的上述 Caspase 蛋白家族、BCL2、RELA 出现率为 100%。可见 Caspase 蛋白家族、BCL2、NF- κ B 等靶点在治疗 DN 中起到尤为关键的作用。

本研究发现,五苓散可能通过调控 CASP3、CASP8、CASP9 等 Caspase 及 BCL2 家族蛋白等细胞凋亡相关蛋白来抑制肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞、肾小球内皮细胞及足细胞等肾脏细胞的凋亡,从而起到延缓 DN 发生发展的作用;同时可能通过调控细胞凋亡通路,以及糖尿病并发症中的 AGE-RAGE、TN、NF- κ B 信号通路等炎症信号通路与 PI3K-Akt 信号通路等多条通路上的不同靶点来延缓 DN 病程的发展。但是富集通路上细胞凋亡相关基因这一类核心基因出现频次的重复性,可以反映出五苓散在治疗 DN 靶点上的专一性,这也为五苓散治疗 DN 的进一步实验研究与临床应用提供了新方向。

参考文献

[1] KDOQI. KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease [J]. Am J Kidney Dis, 2007, 49 2 (Suppl 2): S12-

S154.

- [2] SAGOO MK, GNUDI L. Diabetic nephropathy: an overview [J]. Methods Mol Biol, 2020, 2067: 3-7. doi: 10.1007/978-1-4939-9841-8_1.
- [3] CAI T, WU XY, ZHANG XQ, et al. Calcium dobesilate prevents diabetic kidney disease by decreasing bim and inhibiting apoptosis of renal proximal tubular epithelial cells [J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(4): 249-255.
- [4] 林子桐, 张超, 沈雪梅. 糖尿病肾病发病机制研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(5): 765-773.
- [5] 李敏州, 高彦彬, 马鸣飞, 等. 糖尿病肾病发病机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 344-349.
- [6] WAKABAYASHI I, MASUDA H. Association of D-dimer with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. J Thromb Thrombolysis, 2009, 27(1): 29-35.
- [7] 咎俊杰. 加减五苓散对成人原发性肾病综合征水肿患者血清醛固酮影响的临床研究 [J]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
- [8] 郝晓博. 五苓散加减治疗糖尿病肾病 49 例 [J]. 河南中医, 2017, 37(10): 1715-1717.
- [9] 李姗姗, 闫镛. 闫镛教授经方论治糖尿病验案举隅 [J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(16): 81-83.
- [10] 陈海彬, 周红光, 李文婷, 等. 网络药理学: 中药复方作用机制研究新视角 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 2873-2876.
- [11] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(2): 110-120.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [13] 汝锦龙. 中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用 [J]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [14] LI J, ZHAO P, LI Y, et al. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufe Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15290. doi: 10.1038/srep15290.
- [15] 赵佳. 圣济总录 [M]. 王振国, 杨金萍, 校注. 上海: 上海科学技术出版社, 2016: 133-139.
- [16] ZHANG Y, GOODYER C, LE BLANC A. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjected with active caspase-3, -6, -7, and -8 [J]. J Neurosci, 2000, 20(22): 8384-8389.
- [17] SCATENA R, BOTTONI P, BOTTA G, et al. The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(1): C12-C21.
- [18] HACKER G, PASCHEN SA. Therapeutic targets in the mitochondrial apoptotic pathway [J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(4): 515-526.

- [9] NAKAMURA K, BOSSY-WETZEL E, BURNS K, et al. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis [J]. J Cell Biol, 2000, 150(4): 731-740.
- [20] CRYNS V, YUAN J. Protease to die for [J]. Genes Dev, 1998, 12(11): 1551-1570.
- [21] 傅永锦, 刘艳波, 潘竞铨, 等. 川芎嗪对 STZ 诱导 2 型糖尿病大鼠肾病 TLR4 表达的影响 [J]. 广州医药, 2017, 48(4): 12-16.
- [22] 孙文, 冯丽园, 赵宗江, 等. 三七总皂苷干预糖尿病肾病大鼠氧化应激及足细胞凋亡机制的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1062-1067.
- [23] ANVEKAR RA, ASCIOLLA JJ, MISSERT DJ, et al. Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment [J]. Front Oncol, 2011, 1(34): 34.
- [24] HARDWICK JM, SOANE L. Multiple functions of BCL-2 family proteins [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(2): a008722.
- [25] LEE Y, GUSTAFSSON AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease [J]. Apoptosis, 2009, 14(4): 536-548.
- [26] 周怡. 葡萄籽原花青素 B2 及 microRNA-204 调节糖尿病肾病的机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [27] HAYDEN MS, GHOSH S. NF- κ B in immunobiology [J]. Cell Res, 2011, 21(2): 223-244.
- [28] PANENI F, BECKMAN JA, CREAGER MA, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I [J]. Eur Heart J, 2013, 34(31): 2436-2443.
- [29] TOBON-VELASCO JC, CUEVAS E, TORRES-RAMOS MA. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF- κ B pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014, 13(9): 1615-1626.
- [30] KITADA M, ZHANG Z, MIMA A, et al. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications [J]. J Diabetes Investig, 2010, 1(3): 77-89.
- [31] XIE X, PENG J, CHANG X, et al. Activation of RhoA/ROCK regulates NF- κ B signaling pathway in experimental diabetic nephropathy [J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 369(1/2): 86-97.
- [32] 王峰, 李建鹏, 张翥, 等. 积芎解毒方对糖尿病肾病大鼠肾组织 NF- κ B、Ang II 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(8): 1056-1058, 1091.

Network Pharmacological Study on the Potential Targets and Mechanisms of *Wuling Powder* (五苓散) for Diabetic Nephropathy

SHEN Xinhui, YANG Yufeng, SHI Yan

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110847

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Wuling Powder* (五苓散) in the treatment of diabetic nephropathy (DN) based on network pharmacology. **Methods** The TCMSP analysis platform, GeneCards database and OMIM database were used to screen the active ingredients, targets and disease targets of the component medicines in *Wuling Powder*. Take the intersection of drug target and disease target to obtain drug disease target, construct drug component target disease interaction network diagram and protein interaction network diagram (PPI), infer its core target, and enrich the core target with GO function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis.

Results A total of 19 effective targets for the treatment of DN were obtained from the screening of *Wuling Powder*. In the analysis of the protein interaction network, 9 key targets with a screening value exceeding the average value were CASP 3, RELA, CASP 8, ESR 1, AR, BCL 2, CASP 9, NR3C1, and ICAM1. Among them, CASP 3, CASP 8, and CASP 9 are Caspases family proteins, and CASP 3, CASP 8, CASP 9, BCL 2 were apoptosis-related protein. GO function enrichment analysis showed that the effect of *Wuling Powder* in the treatment of DN was mainly on cell components such as cytoplasm, lipoprotein particles, and organelles; molecular functions involved include lipid binding, cysteine endopeptidase activity and other enzymes molecular binding process. RNA, DNA binding process and enzyme activity were involved in the apoptosis process; it was mainly involved in biological processes such as lipid response, cell apoptosis regulation, and hormone response. Enrichment analysis of the KEGG pathway showed that these targets were involved in cancer, hepatitis B, and diabetes complications, AGE-RAGE signaling pathway by toxoplasmosis, apoptosis, tuberculosis, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signal pathway and other 142 signal pathways, and the repetition rate of Caspases, BCL2, RELA and other target genes in the pathway was extremely high. **Conclusion** *Wuling Powder* may reduce kidney cell damage by regulating apoptosis-related proteins such as Caspases family proteins and BCL2 protein family, thereby delaying the development of DN.

Keywords diabetic nephropathy; *Wuling Powder* (五苓散); apoptosis; BCL2; network pharmacology

(收稿日期: 2019-11-29; 修回日期: 2020-06-29)

编辑: 王利芬