

[文章编号] 1003—4684(2023)02-0044-05

牛膝治疗糖尿病周围神经病变的作用机制

童雅琴, 肖文惠, 牟彦竹, 张迎庆

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 为探讨中药牛膝治疗糖尿病周围神经病变的机制,分别采用网络药理学及分子对接,对牛膝治疗糖尿病周围神经病变的活性成分进行预测。研究结果表明:网络药理学分析,筛选得到牛膝对糖尿病周围神经病变治疗有效成分 11 种,关键靶点主要为 AKT1、IL-6、CASP3 和 VEGFA。功能富集分析结果表明,牛膝可能通过协同调节 HIF-1、MAPK、Foxo 等多种生物途径来治疗糖尿病周围神经病变。分子对接结果表明,红厚壳内酯是一种具有良好分子对接性能的先导化合物。本研究阐明了牛膝治疗糖尿病周围神经病变的活性成分和作用机制,为寻找治疗糖尿病周围神经病变的先导化合物和新药研发提供了理论依据。

[关键词] 牛膝; 糖尿病周围神经病变; 网络药理学; 分子对接

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)属于糖尿病的常见慢性并发症之一,致残率高,对患者的睡眠、情绪等产生负面影响,导致其生活质量下降。研究表明,糖尿病病程越长,DPN 的发病率越高,会给整个卫生保健系统和整个社会带来沉重的经济负担^[1]。

DPN 主要分为周围神经病变和自主神经病变。DPN 临床患者多有双侧对称性麻木的症状,疼痛表现为刺痛、灼痛,多于夜间加重,同时伴有四肢发凉和麻木感。若伤及运动神经,患者还会出现不同程度的肌力减退,肌腱反射消失等情况。自主神经病变患者会影响心脏功能、胃肠道功能和泌尿生殖系统功能等方面的生理活动^[2]。DPN 的发病机制比较复杂,即使该病在临床上很常见,但其具体发病机制到目前为止仍不明确,大部分研究人员认为 DPN 与神经营养因子缺乏密切相关^[3]。最近有学者提出 DPN 的发病机制可能与感觉神经元及信使核糖核酸(mRNA)的变化有关^[4]。

目前,国外治疗 DPN 开始专注于改善患者能量代谢的过程,包括提高患者氧化应激反应能力等^[5]。中医药防治 DPN 具有明显优势,且安全性高,已成为临床、科研和新药研发热点^[6]。中医药治疗 DPN 的方法包括中药汤剂治疗、中药注射液、针灸疗法、中医外治疗法等,可有效缓解 DPN 患者的临床症状^[7]。近年来,中药在治疗 DPN 上临床疗效较好,也越来越受到关注^[8]。

中国药典收载牛膝为苋科植物牛膝(*Achyranthes Bidentata* Blume)的干燥根。牛膝具有活血祛瘀、补肝肾、引血下行的功效,临床用于瘀血阻滞的月经不调、下肢无力等症,对心血管系统、免疫系统、血液系统和神经内分泌系统等都有一定的作用^[9]。牛膝在临床上可与黄芪、白术等配伍用于治疗 DPN^[10]。研究表明,牛膝提取物具有明显的降血糖作用,可在一定程度上降低Ⅱ型糖尿病大鼠胰岛素抵抗程度,提高其抗氧化能力,改善糖代谢^[11]。

本研究目的在于通过中药网络药理学和分子对接的方法,探究牛膝对 DPN 的作用机制,并且结合文献,对所得到的化学成分、关键靶点、信号通路等信息进行分析,为以后深入研究提供理论基础。

1 实验材料及方法

1.1 化学成分筛选及化学成分潜在靶点收集

本研究采用 TCMSP 数据库(<https://tcmssp.com/tcmssp.php>)检索牛膝相关的潜在靶点。以口服生物利用度(OB)和类药性(DL)为筛选指标评价所选出来的化合物,DL 值越高,通常表示成分越可能成为药物。过滤条件为生物利用度大于 30%,同时类药性大于 0.18 的化学成分。

1.2 DPN 疾病靶点的筛选

利用 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)数据库,检索 DPN 疾病相关基因。GeneCards 是人类基因的综合数据库,可以提供所有已

知和预测的人类基因。

1.3 蛋白质相互作用(PPI)网络的构建

利用 R 软件,绘制牛膝与疾病靶点的维恩图,得到相关表格数据,利用网络图像化软件 Cytoscape3.7.2 构建药物调控网络,利用 String 软件进行 PPI 网络的构建及分析。

1.4 GO 和 KEGG 富集分析

为了进一步了解上述筛选出的靶标蛋白基因的功能,以及在信号通路中的作用,将筛选得到的靶点,进行 GO(Gene Ontology)生物学过程富集分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)信号通路富集分析。为了使结果具有统计学意义,入选条件为 $P<0.05$,以 GO(BP)结果前 20 位与 KEGG 结果前 20 位进行展示。

1.5 成分-靶点分子对接

在以上结果基础上,选择 PPI 网络中“degree”最大的靶点作为受体,将潜在靶点蛋白名称输入 UniProtKB 数据库(<https://www.uniprot.org/>)和

PDB 数据库(<https://www1.rcsb.org/>),找到相应蛋白的结构,并且利用 PyMol 软件进行去水和去除残基处理。在 TCMSp 数据库(<https://tcmspw.com/tcmsp.php>)和 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索筛选所有对应靶点的化合物 2D 结构。利用 PyMol 软件和 ChemBio3D 软件将所得分子结构进行修饰处理。利用 AutoDockvina 进行蛋白分子加氢处理,找到相应的活性口袋,然后依次进行分子对接,得到分子对接得分数据。

2 实验结果分析

2.1 牛膝主要活性成分筛选

通过分析平台检索到牛膝中化合物成分,根据参考条件筛选出成分 17 个,包括:槲皮素、山柰酚等黄酮类成分;黄连碱、表小檗碱等生物碱类成分;菠甾醇、菠甾醇、B-谷甾醇和豆甾醇等甾醇类成分;蜕皮甾酮等甾酮类成分(表 1)。

表 1 牛膝主要活性成分筛选结果

| Mol ID | 分子名 | 中国名 | MW | OB/% | DL |
|-----------|----------------------|-------|--------|-------|------|
| MOL012537 | Spinoside A | 黄酮苷 | 716.95 | 41.75 | 0.4 |
| MOL012542 | ecdysterone | 蜕皮甾酮 | 480.71 | 44.23 | 0.82 |
| MOL001454 | berberine | 黄连素 | 336.39 | 36.86 | 0.78 |
| MOL001458 | coptisine | 黄连碱 | 320.34 | 30.67 | 0.86 |
| MOL000173 | wogonin | 汉黄芩素 | 284.28 | 30.68 | 0.23 |
| MOL002643 | delta 7-stigmastenol | 豆甾醇 | 414.79 | 37.42 | 0.75 |
| MOL002714 | baicalein | 黄芩素 | 270.25 | 33.52 | 0.21 |
| MOL002776 | Baicalin | 黄芩苷 | 446.39 | 40.12 | 0.75 |
| MOL002897 | epiberberine | 表小檗碱 | 336.39 | 43.09 | 0.78 |
| MOL000358 | beta-sitosterol | β-谷甾醇 | 414.79 | 36.91 | 0.75 |
| MOL003847 | Inophyllum E | 红厚壳内酯 | 402.47 | 38.81 | 0.85 |
| MOL000422 | kaempferol | 山柰酚 | 286.25 | 41.88 | 0.24 |
| MOL004355 | Spinasterol | 菠甾醇 | 412.77 | 42.98 | 0.76 |
| MOL000449 | Stigmasterol | 豆甾醇 | 412.77 | 43.83 | 0.76 |
| MOL000785 | palmatine | 非洲防己碱 | 352.44 | 64.6 | 0.65 |
| MOL000085 | beta-daucosterol_qt | 胡萝卜苷 | 414.79 | 36.91 | 0.75 |
| MOL000098 | quercetin | 槲皮素 | 302.25 | 46.43 | 0.28 |

2.2 牛膝活性成分-DPN 靶点交集图

牛膝治疗 DPN 潜在作用靶点的预测研究共筛选到牛膝有效成分作用靶点 183 个,DPN 疾病靶点 1522 个。药物与疾病靶点的交集图见图 1。由图 1a 可见,两者交集靶点共 92 个。由图 1b 可见,在该网络中,共包含节点 105 个,其中牛膝(drug)、DPN 节点各 1 个,牛膝有效成分节点 11 个(表 1 内 17 个牛膝有效成分中,有 6 个成分无对应的 DPN 靶点)分别是槲皮素、山柰醇、汉黄芩素、黄连素、黄连碱、黄芩素、表小檗碱、β-谷甾醇、海棠果素 E、豆甾醇和大黄藤素。对应靶点较多的成分为槲皮素,对应 83 个靶点,提示牛膝中治疗 DPN 的关键成分可能为槲皮

素。其次为山柰醇和汉黄芩素。与这些成分相连接的靶点数目比较靠前,在牛膝治疗 DPN 的过程中,这些成分比较重要。牛膝治疗 DPN 潜在作用靶点共 92 个。

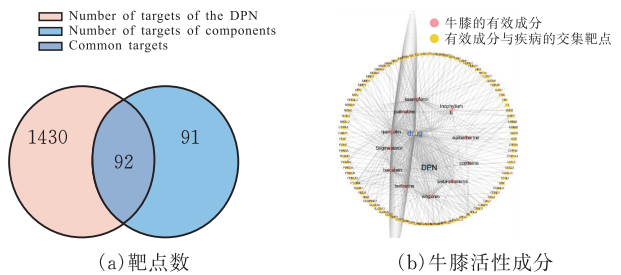
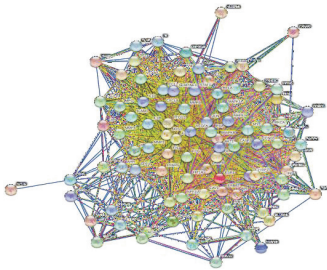


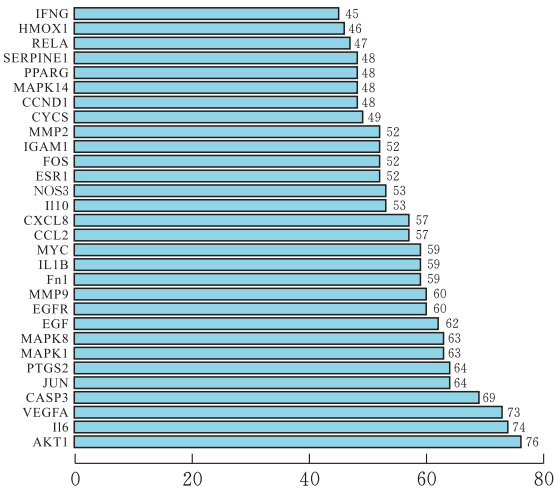
图 1 牛膝活性成分-治疗 DPN 潜在靶点网络

2.3 关键作用靶点的 PPI 网络分析

牛膝治疗 DPN 的 PPI 网络见图 2,由图 2a 可见,该网络中共有节点数为 92,边数为 1616,平均节点度为 35.1,平均局部聚类系数为 0.688。牛膝治疗 DPN 的关键靶点见图 2b,可见节点度值较高的靶点蛋白包括 AKT1、IL6、VEGFA、CASP3 和 JUN 等,它们可能在牛膝治疗 DPN 中发挥关键作用。



(a) 不同靶点之间的相互作用关系(圆圈代表不同的基因靶点)



(b) 牛膝治疗 DPN 的关键靶点(仅显示前 30 位关键靶点)

图 2 牛膝治疗 DPN 的蛋白网络分析

2.4 GO 富集分析结果及 KEGG 富集结果分析

将功能相似的基因进行富集整理,将 P 值从大到小排列。图 3 中,横轴代表基因的数目,颜色代表不同功能之间的显著性差异。通过 GO 共富集到 BP141 个条目,将生物学功能较前的 20 个条目进行排名,结果如图 4 所示。其中,细胞因子结合活性共 14 个靶点,细胞因子活性有 12 个靶点,磷酸酶结合靶点为 11 个,还有核受体的活性和转录因子活性等。通过 KEGG 富集到了多个信号通路,牛膝治疗 DPN 主要集中在 HIF-1、MAPK 信号通路、Fox0 信号通路、内分泌抵抗、NF- κ B 信号通路,表明牛膝治疗 DPN 的过程是多通路协调的过程。这些通路可以作为后期牛膝治疗 DPN 的研究方向,其中 MAPK 信号通路与 DPN 相关靶点数目最多。

2.5 分子对接结果分析

结合前期的分子对接研究基础,选取靶点疾病关键靶点 AKT1(PDBID:3o96),分别与 11 个化合

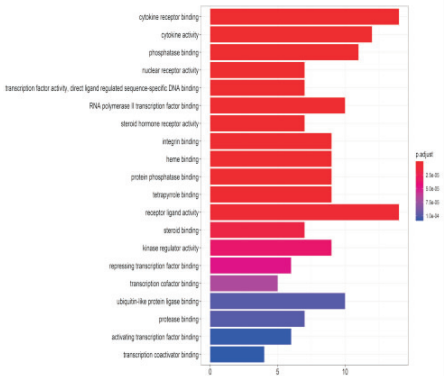


图 3 GO(BP)生物富集分析条形图

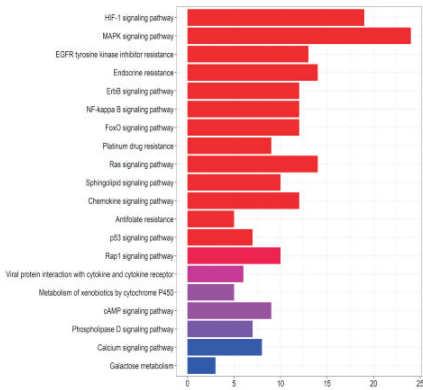


图 4 富集基因数排序前 20 位的信号通路

物进行分子对接,对接结果如表 2 所示。可以看出,虽然槲皮素(Quercetin)是靶点最多的化合物,但其与 AKT1 的结合能力不如红厚壳内酯(Inophyllum E)稳定。虽然目前对红厚壳内酯的研究较为局限,但其是一种具有良好分子对接性能的先导化合物。选择最优的对接结果进行可视化作图(图 5)。图 5 中绿色的是晶体结构里面的原有配体,蓝色部分是化合物分子,可以看出二者结合位置相近,红色标注出来的是有关键作用的残基,说明红厚壳内酯(Inophyllum E)通过与 AKT1 的 ASP-292、LYS-268、SER-205 残基进行对接。

表 2 牛膝主要活性成分与 AKT1 分子对接结果

| 化合物 | CID | 分子名 | kcal/mol |
|----------|-----|-----------------|----------|
| 2353 | | berberine | -11.0 |
| 72322 | | coptisine | -11.9 |
| 5271703 | | wogonin | -9.3 |
| 5281605 | | baicalein | -9.5 |
| 167806 | | epiberberine | -10.6 |
| 222284 | | beta-sitosterol | -10.9 |
| 5254 | | Inophyllum E | -12.2 |
| C5280863 | | kaempferol | -9.6 |
| C5280794 | | Stigmasterol | -11.4 |
| C19009 | | palmatine | -10.1 |
| C5280343 | | quercetin | -9.8 |

图 5 中虚化部分是蛋白晶体结构,红色标注出

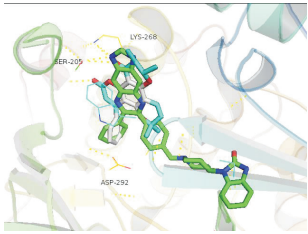


图 5 红厚壳内酯(Inophyllum E)与 AKT1 分子对接结果

来的是有关键作用的残基,绿色的是晶体结构里面的原有配体,蓝色的是红厚壳内酯(Inophyllum E)化合物分子。

3 讨论与结论

牛膝属于活血化瘀类药物,在治疗 DPN 中起着重要的作用^[12]。实验结果共筛选得到了 11 个活性成分,其中已经有文献证实的能够治疗 DPN 且有实验研究的成分有槲皮素、黄连素、黄芩素^[13-14];少量文献表示黄连碱、表小檗碱、β-谷甾醇等有一定的降糖作用,但未研究其与 DPN 的关系^[15];汉黄芩素,红厚壳内酯,山柰醇,豆甾醇,大黄藤素与糖尿病及其并发症的研究暂无报道。结果提示,槲皮素为牛膝治疗 DPN 过程中靶点最多的成分,其次是山柰醇和汉黄芩素,这些成分在牛膝治疗 DPN 的过程中可能有主导作用。

在治疗 DPN 的过程中,起着重要作用的靶点为 AKT1、IL-6、VEGFA 和 CASP3。通过文献查阅,本研究所得的牛膝治疗 DPN 的相关重要靶点和治疗机制已得到部分验证。其中 AKT1 是 AKT 激酶的 3 种紧密相关蛋白激酶之一^[16],研究显示与 AKT1 相关的牛膝成分有槲皮素和 β-谷甾醇等。IL-6 即白细胞间介素-6,在免疫细胞的成熟、活化、增殖和免疫调节等一系列过程中均发挥重要作用^[17],研究显示调节 IL-6 相关的牛膝成分为槲皮素和汉黄芩素等。临床上治疗 DPN 的药物依帕司他,可明显改善患者临床症状,降低血清 IL-6^[18],槲皮素、汉黄芩素与依帕司他作用靶点相同。CASP3 是一种与细胞凋亡信号通路有关的重要的酶。细胞凋亡受到细胞内凋亡调节蛋白的调控,Caspase 家族是细胞凋亡过程中发挥关键作用的一组半胱氨酸蛋白酶,而其中的 CASP3 在凋亡级联反应中是最为关键的凋亡蛋白酶^[19]。本研究中与 CASP3 相关牛膝成分有槲皮素和山柰酚等,其中槲皮素可能会激活 CASP3 信号通路促进细胞的凋亡,通过抑制 CASP3 的活性,可以减少高糖诱导的细胞凋亡,控制血糖平稳。

牛膝治疗 DPN 主要集中在 HIF-1 信号通路、

MAPK 信号通路和 FoxO 信号通路等。与免疫炎症系统 HIF-1 信号通路相关的靶点基因包括 AKT1、BCL2、IL-6、NOS2、RELA、VEGFA 等。HIF-1 信号通路是 KEGG 富集的所有通路中显著性最高的通路,HIF-1 信号通路在调节血管的生成、葡萄糖代谢及细胞的凋亡和自噬方面具有重要作用^[20]。MAPK 信号通路与糖尿病的异常代谢有关。与该通路相关的靶点在本实验中有 24 个,包括 MAPK14、RELA、AKT1、JUN 等,与牛膝中多个成分相关。已有文献报道证实,槲皮素可以增加 MAPK 的表达水平和促进 MAPK 磷酸化来上调葡萄糖转运载体的表达,促进糖的吸收和利用,增加胰岛素受体的敏感性,改善胰岛素抵抗^[21]。FoxO 信号通路是胰岛素转导中一个关键信号通路,FoxO 是 Forkhead box(Fox)大家族中的 0 亚族,在代谢紊乱、人类寿命和肿瘤抑制中发挥重要作用。FoxO 蛋白因子是胰岛素信号通路的最终效应因子,通常通过诱导肝脏中的糖异生、抑制脂肪细胞和心肌细胞分化,或将肌肉中的燃料利用从葡萄糖转移到脂质来应对营养物质的减少^[22]。因此,FoxO 蛋白的失调与胰岛素抵抗、饮食肥胖和 2 型糖尿病的发病机制有关。根据实验结果推测牛膝可以通过调控 AKT1、IL-6 等靶点来上调 FoxO 表达量,起到对 β 细胞氧化应激的保护作用^[23]。

有效预防和控制糖尿病及其并发症疾病发生,一直是国内外生物医学科学领域的国家需求。本研究通过网络药理学、分子对接探讨了牛膝在治疗 DPN 的过程中的作用机制,发现牛膝中的槲皮素、汉黄芩素、红厚壳内酯等活性成分值得进一步深入研究,为临床上牛膝治疗 DPN 及相关药物研发提供了新的理论依据。

[参 考 文 献]

[1] IQBAL Z, AZMI S, YADAV R, et al. Diabetic peripheral neuropathy: epidemiology, diagnosis, and pharmacotherapy[J]. Clinical Therapeutics, 2018, 40(06):828-849.

[2] 谷绍飞,杨叔禹.糖尿病周围神经病变不同临床表现的中医病理分布的相关研究[A]. // 第九届海峡两岸中医药发展与合作研讨会、第十五次全国中医糖尿病大会暨中国针灸学会砭石与刮痧专业委员会年会论文集[C], 2014:469-475.

[3] 郑敏,杜义斌,陈必勤,等.中西医结合抗氧化应激对糖尿病周围神经病变的临床研究[J].云南中医中药杂志, 2016,37(002):30-31.

[4] KOBAYASHI M, ZOCHODNE D W. Diabetic neuropathy and the sensory neuron: new aspects of patho-

genesis and their treatment implications[J]. Journal of Diabetes Investigation, 2018,9(06): 1239-1254.

[5] PANG L, LIAN X, LIU H, et al. Understanding diabetic neuropathy: focus on oxidative stress[J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2020(02): 1-13.

[6] 单留峰. 温经养血活血通络类中药治疗糖尿病周围神经病变的效果研究[J]. 临床研究. 2021, 29(05): 131-132.

[7] 邸维莹, 方朝晖. 中医药对糖尿病周围神经病变防治新进展[J]. 中医药临床杂志. 2018, 30(12): 2312-2315.

[8] 张明珠, 李娜, 虞梅. 中医药治疗糖尿病周围神经病变临床研究进展[J]. 山西中医, 2021, 37(02): 61-62.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2020.

[10] 张伏芝. 基于网络药理学的糖尿病周围神经病变气虚血瘀证组方筛选与优化[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.

[11] 黄娟娟. 有氧运动联合白芷、怀牛膝提取物干预对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及氧化应激的影响[D]. 开封: 河南大学, 2016.

[12] 薛胜霞, 金丽琴, 贾东明等. 牛膝多糖衍生物对糖尿病大鼠血糖及血脂的影响[J]. 中国药理学杂志. 2009, 44(02): 107-110.

[13] 王宝江, 张家英, 李丹, 崔丽. 槲皮素对糖尿病性周围神经病变治疗的实验研究[J]. 中国医药导报, 2008(14): 18-20.

[14] 王英红. 黄连素治疗 2 型糖尿病患者血糖及周围神经病变临床观察[J]. 新中医, 2015, 47(01): 86-88.

[15] 罗懿钊, 欧阳文, 唐代凤, 等. 牛膝中皂苷和甾酮类物质基础及药理活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2020, 22(12): 2122-2136.

[16] XU F, NA L, LI Y, et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours[J]. Cell and Bioscience, 2020, 10(01): 54.

[17] GUBERNATOROVA E O, GORSHKOVA E A, POLINOVA A I, et al. IL-6: relevance for immunopathology of SARS-CoV-2[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2020, 53: 13-24.

[18] 龚小平. 依帕司他治疗糖尿病周围神经病变的疗效及对患者血清 IL-6、IL-8、IL-17 和 IL-23 水平的影响[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(24): 3629-3631.

[19] KUO W T, SHEN L, ZUO L, et al. Inflammation-induced occludin downregulation limits epithelial apoptosis by suppressing caspase-3 expression[J]. Gastroenterology, 2019, 157(05): 1323-1337.

[20] 杨梦思, 周娜, 王志钢, 等. 转录因子 HIF-1 α 及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(08): 8-13.

[21] 葛凌, 蔡亚军, 王章达. 槲皮素对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的改善作用及 FGF21/MAPK 信号通路的影响[J]. 中国药师, 2019, 22(03): 418-421.

[22] 吴瑶, 金银桥, 吴双梅等. FOXO1 在糖代谢和脂代谢及高甘油三酯血症中的作用[J]. 生命的化学, 2021, 41(04): 642-647.

[23] LINK W. Introduction to FOXO biology[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1890: 1-9.

The Mechanisms of Achyranthes Bidentata Blume in Treating Diabetic Peripheral Neuropathy

TONG Yaqin, XIAO Wenhui, MU Yanzhu, ZHANG Yingqing

(School of Biological Engineering and Food, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China)

Abstract: To systematically investigate the mechanisms of Achyranthes Bidentata Blume in treating diabetic peripheral neuropathy. **Methods:** In this study, network pharmacology, molecular docking analysis were used to predict the active components of Achyranthes Bidentata Blume in the treatment of DPN. **Results:** The network analysis showed that there were 17 active components of Achyranthes Bidentata Blume in treating DPN. And the key targets were AKT1 IL 6, CAPSP3 and VEGFA. The functional enrichment analysis indicated that Achyranthes Bidentata Blume may treat DPN by synergistically regulating many biological pathways, such as HIF 1, MAPK and Fox0 signaling pathway, etc. In addition, the results of molecular docking showed that Inophyllum E might be a promising leading compound with good molecular docking performance. **Conclusions:** The active components and mechanism of action of diabetic peripheral neuropathy were fully elucidated in this study, and laid a foundation for finding lead compounds of DPN and developing new drugs for the treatment of DPN.

Keywords: Achyranthes Bidentata Blume; diabetic peripheral neuropathy; network pharmacology; molecular docking

[责任编辑: 张 众]