

文章编号 1006-8147(2023)01-0027-04

论著

基于生物信息技术探究骨碎补-金银花治疗糖尿病足的作用机制

霍磊

(天津中医药大学第二附属医院中医外科,天津 300250)

摘要 目的:通过网络药理学及动物实验研究骨碎补-金银花治疗糖尿病足的作用机制。方法:通过 TCMSp 网站获取骨碎补-金银花的药物成分及作用靶点,将靶点通过 uniprot 统一基因名称;通过 GeneCards 查询糖尿病足的疾病靶点,利用 venny 2.1 获取交集靶点。将交集靶点导入 STRING 进行分析并使用 Cytoscape 构建 PPI 网络图。将交集靶点导入 Metascape 分析 GO 富集和 KEGG 富集。并通过 Cytoscape 软件构建"成分-靶点-通路"网络图。依据 Degree 分别筛选 PPI 中前 4 位基因靶点,并通过动物实验验证骨碎补-金银花干预糖尿病足大鼠动物模型后血清中靶蛋白表达差异。结果:骨碎补-金银花 32 个有效成分调节 148 个疾病靶点治疗糖尿病足,其中甾醇、豆甾醇、木樨草素、山奈酚等是核心成分,JUN、TP53、蛋白激酶 B(Akt1)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)3 是至关重要的靶点。基因功能注释分析结果显示,与氧化应激、膜筏、膜微区、质膜筏、激酶结合、蛋白激酶结合等相关。KEGG 分析结果提示骨碎补-金银花主要参与 MAPK、PI3K/Akt 等信号通路。动物实验证实糖尿病足大鼠血清 JUN、TP53、Akt1、MAPK3 表达增加。结论:骨碎补-金银花主要通过调节 MAPK、PI3K/Akt 等信号通路的 JUN、TP53、Akt1、MAPK3 等疾病靶点,干预酶的活性、炎症反应等生物学过程进而治疗糖尿病足。

关键词 骨碎补-金银花;糖尿病足;网络药理学

中图分类号 R781.4

文献标志码 A

Research on the mechanism of Rhizoma Drynariae-Lonicera japonica in treating diabetic foot based on bioinformatics technology

HUO Lei

(Surgery Department of Traditional Chinese Medicine, the Second Affiliated Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China)

Abstract Objective: To study the mechanism of Rhizoma Drynariae-Lonicera japonica on diabetic foot through network pharmacology and animal experiment. **Methods:** The drug components and targets of Rhizoma Drynariae-Lonicera japonica were obtained from TCMSp website and the targets were converted into gene names through UniPROT database. GeneCards was used to query disease targets of diabetic foot, and venny 2.1 was used to obtain intersection targets. The intersection targets were imported into STRING for protein interaction analysis and PPI network graph was constructed using Cytoscape. The intersection targets were imported into Metascape to analyze GO enrichment and KEGG enrichment. The "component-target-pathway" network was constructed by Cytoscape software. The first four PPI gene targets were screened according to Degree, and the difference of target protein expression in serum after Rhizoma Drynariae-Lonicera japonica intervention in diabetic foot rat animal model was verified by animal experiments. **Results:** The screening of 32 active components of beta-sitosterol, stigmasterol, luteolin and kaempferol could regulate multiple pathways and 148 disease targets in the treatment of diabetic foot, of which beta-sitosterol, stigmasterol, luteolin and kaempferol were the core components, and JUN, TP53, Akt1 and MAPK3 were the most important targets. Gene function annotation analysis showed that it was related to, oxidative stress, membrane rafts, membrane microregions, plasma membrane rafts, kinase binding, protein kinase binding, etc. The results of KEGG analysis suggested that Rhizoma Drynariae-Lonicera japonica were mainly involved in MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. Animal experiments confirmed that the expressions of JUN, TP53, Akt1 and MAPK3 in serum of diabetic foot rats were increased. **Conclusion:** The treatment of Rhizoma Drynariae-Lonicera japonica for diabetic foot is mainly through regulating JUN, TP53, Akt1, MAPK3 and other disease targets of MAPK, PI3K/Akt signaling pathways, and intervening the biological processes of enzyme activity and inflammatory response.

Key words Rhizoma Drynariae-Lonicera japonica; diabetic foot; network pharmacology

糖尿病足是糖尿病患者较为严重的并发症之一,严重影响患者健康和生活质量^[1]。该病主要是因

作者简介 霍磊(1985-),男,主治医师,博士,研究方向:糖尿病足及下肢周围血管病诊治;E-mail: tjzydxhulei@126.com。

肢体血管、神经病变,导致肢体缺血坏死,或外伤感染微生物所致,伴有不同程度的足部疼痛、破溃、坏疽症状。糖尿病足多见于糖尿病病程较长的患者,约40%病程超过10年的糖尿病患者伴有糖尿病足^[2]。中

医外治法治疗糖尿病足的历史悠久、疗效突出、特色鲜明,有其独到优势^[3]。现代研究发现骨碎补、金银花抗炎、抗氧化、抗病毒和免疫调节等作用^[4-5]。笔者在临床治疗糖尿病足时常用到骨碎补-金银花外敷治疗,并且疗效明显。但是骨碎补-金银花治疗糖尿病足机制尚不清楚,故本研究利用网络药理学探索骨碎补-金银花治疗糖尿病足可能的作用机制,并通过动物实验验证核心靶蛋白的表达,以期骨碎补-金银花治疗糖尿病足提供理论依据,并为后续治疗糖尿病足中成药的研究与开发拓宽思路。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析药物成分和作用靶点 通过 TCMS 查询骨碎补、金银花的药物成分及相应靶点,采用 uniprot 进行名称统一。将“diabetic foot”输入 GeneCards 网站,检索并获取糖尿病足疾病靶点。将药物成分靶点和疾病靶点导入 venny2.1,分析药物和疾病交集靶点。交集靶点通过 STRING 进行蛋白质-蛋白质相互作用分析,Cytoscape3.7.2 软件构建 PPI 网络图。Metascape 对共同靶点进行 GO 富集分析及 KEGG 通路分析。Cytoscape 构建“药物-靶点-通路”网络图,并分析核心成分和靶点。

1.2 动物实验验证 试验材料:清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 20 只,体重 350~450 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司合格证号 SCXK (京)-2016-0011,骨碎补-金银花药物(天津中医药大学第二附属医院提供),链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司);JUN、TP53、蛋白激酶 B (Akt)1、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)3 酶联免疫吸附试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),其余实验试剂、耗材均由中国医学科学院放射研究所实验室提供。所有实验均按照动物伦理规范进行。

实验方法:将 SD 大鼠饲养 7 d 后,采用 STZ 腹腔注射方法及足部打孔方法构建糖尿病足大鼠模型^[6-7],然后随机分为两组,即治疗组和对照组(模型对照),各 10 只,治疗予以骨碎补-金银花外敷治疗 14 d,对照组予以油性敷料外敷,采取大鼠血清,酶联免疫法检测血清 JUN、TP53、Akt1、MAPK3 蛋白表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0 处理分析。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。检验水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 则认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物有效成分、成分和疾病靶点以及交集靶点 检索出骨碎补-金银花成分 41 个,其中骨碎补 18 个、金银花 23 个。靶点检索后得到药物成分

31 个。药物成分作用靶点 564 个,去重后得 194 个。疾病数据库汇总去重后得到靶点 4 626 个。药物与疾病靶点交集得骨碎补金银花治疗糖尿病足作用靶点 148 个(图 1)。

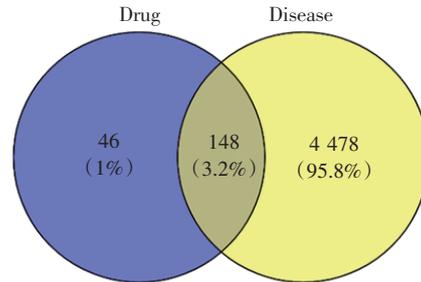


图 1 交集靶点韦恩图

Fig 1 Venn diagram of intersection targets

2.2 靶点蛋白间网络图 (PPI) 交集靶点分析 得 124 个节点和 597 条边的 PPI 网络(图 2)。

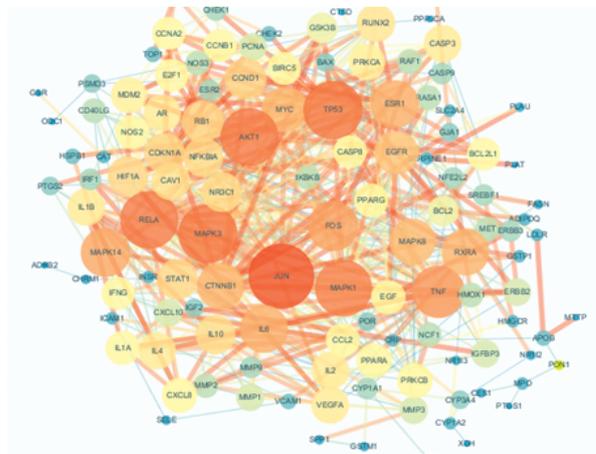


图 2 交集靶点 PPI 网络图

Fig 2 Protein-protein interaction network diagram

2.3 GO 富集分析 交集靶点 GO 分析得 BP 188 个、CC 99 个、MF 98 个。依据 Log q 取前 10 作图(图 3)。

2.4 KEGG 富集分析 交集靶点 KEGG 通路分析得信号通路 190 条,依据 Log q 取前 15 条最相关通路作图(图 4)。

2.5 构建药物-靶点-通路网络图 结果提示骨碎补-金银花 31 个有效成分通过多条信号通路作用于 148 个疾病靶点治疗糖尿病足。有效成分包括甾醇、甾醇、木犀草素、山奈酚等,提示这些成分是骨碎补-金银花治疗糖尿病足的核心成分。核心靶点包括 JUN、TP53、Akt1、MAPK3 等,提示这些靶点是骨碎补-金银花治疗糖尿病足的核心靶点(图 5)。

2.6 动物实验验证 酶联免疫吸附检测显示,与对照组相比,治疗组大鼠血清 JUN、TP53、Akt1、MAPK3 表达增加,差异有统计学意义(表 1)。

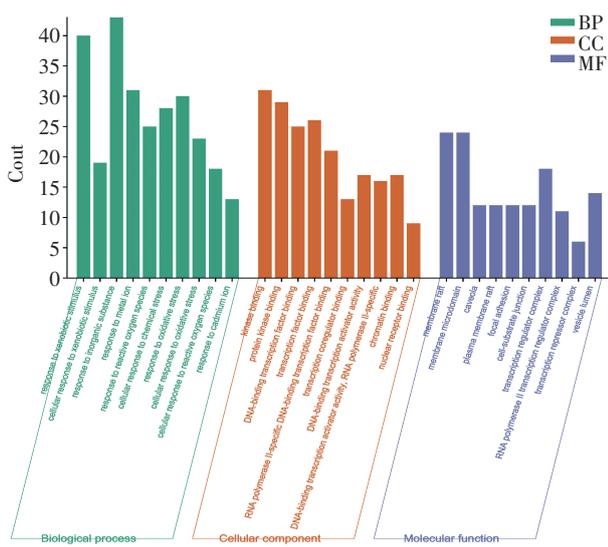


图 3 GO 分析柱状图
Fig 3 GO enrichment histogram

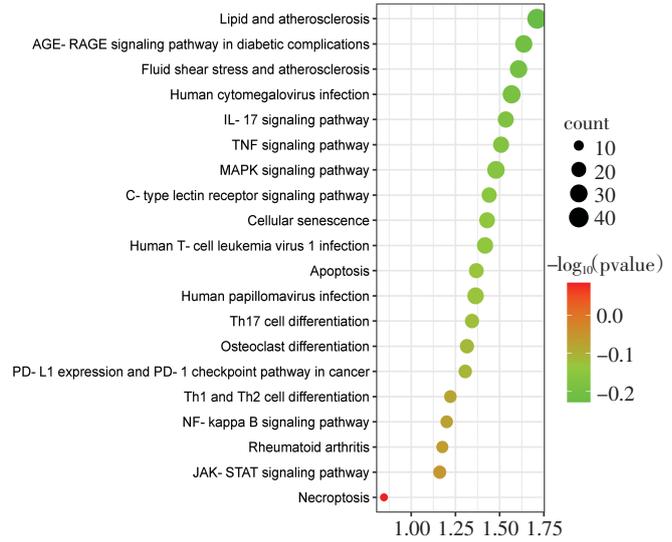


图 4 KEGG 气泡图
Fig 4 KEGG bubble diagram

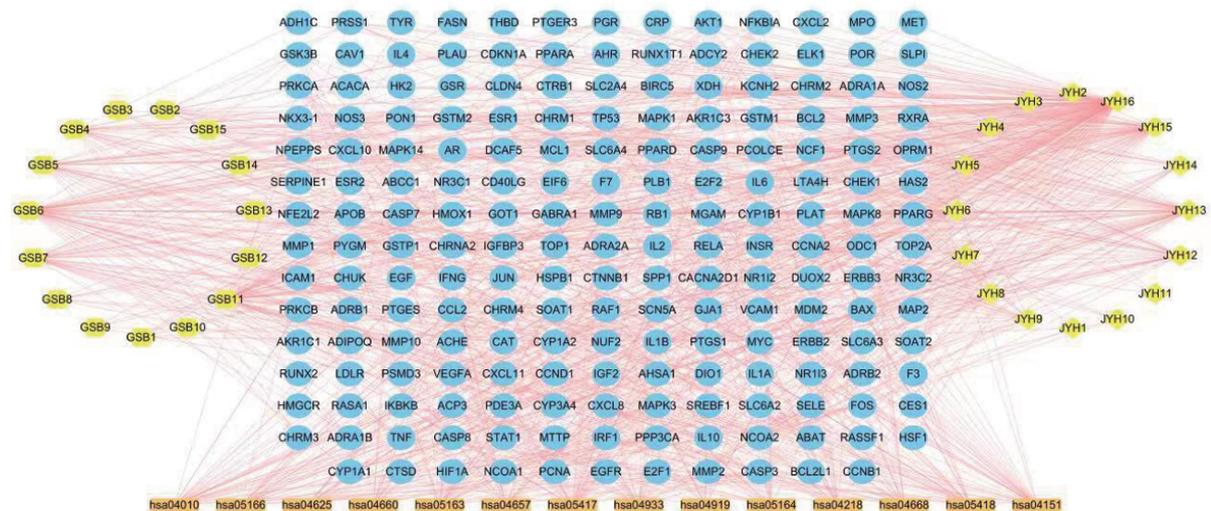


图 5 药物-靶点-通路网络图
Fig 5 Drug-target-pathway network diagram

表 1 两组大鼠血清 JUN,TP53,Akt1,MAPK3 蛋白表达(ng/mL)
Tab 1 Protein expressions of JUN, TP53, Akt1, MAPK3 in serum of rats in the two groups (ng/mL)

组别	例数	JUN	TP53	Akt1	MAPK3
对照组	10	40.71±1.58	30.61±0.58	35.71±1.04	28.01±0.48
治疗组	10	52.21±0.61	39.8±0.73	50.2±0.67	32.±0.52
t		-6.77	-9.906	-11.68	-6.55
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:Akt:蛋白激酶 B;MAPK3:丝裂原活化蛋白激酶 3

3 讨论

在治疗糖尿病足方面中医药彰显出明显优势,治疗手段多见辨证治疗、分期治疗、验方加减治疗、中药外治及中西医综合治疗等,疗效显著。近些年中药药理学研究不断深入,中医药的治疗有了依据可循,中医外治法更是发挥了显著的“生肌、消炎、祛腐”作用^[8-11]。临床应用外治法治疗糖尿病足,首先应明确辨临床分期,在此基础上,选择针对性的治疗。同

时,还应强调中西医结合,充分发挥外治技术优势,尽可能降低糖尿病足致残率^[12]。研究者在治疗糖尿病足过程中,常用中药方剂口服治疗,亦使用中药外敷治疗足部溃疡。骨碎补具有疗伤止痛、补肾强骨等功效,能够抗炎、免疫功能调节、骨损伤修复、抗骨质疏松症^[13]。金银花味甘、性寒,归肺、胃、大肠经,主要含有黄酮类、有机酸类、挥发油类、环烯醚萜类等,用于治疗外感热病、风热表证、疮疡肿痛以及热毒泻痢^[14]。骨碎补-金银花外用治疗糖尿病足,符合中医药外敷治疗清热解毒、祛腐生肌的治疗原则。

本研究筛出骨碎补-金银花 32 个有效成分能够调节多条通路作用 148 个疾病靶点治疗糖尿病足,其中甾醇、豆甾醇、木犀草素、山奈酚等是核心成分, JUN、TP53、Akt1、MAPK3 是至关重要的靶点。基因功能注释分析结果显示,交集基因最可能相关的生物

过程主要涉及细胞对异质、无机物、氧化应激、化学刺激、金属离子的反应等,细胞组分主要涉及膜筏、膜微区、质膜筏、转录调节复合体等,分子功能主要涉及激酶结合、蛋白激酶结合、DNA 结合转录因子结合等。通路富集分析结果提示骨碎补-金银花主要参与 MAPK、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/Akt 等信号通路。将筛选出的靶基因,通过建立动物实验模型,并采用骨碎补-金银花治疗,结果证实治疗后糖尿病足大鼠血清 JUN、TP53、Akt1、MAPK3 表达增加。

研究显示骨碎补调节细胞外调节激酶(ERK)/MAPK、p38MAPK,促进成骨细胞分化及骨损伤修复^[15]。研究也显示金银花类黄酮木犀草素能抑制肿瘤坏死因子(TNF)- α 诱导的 p38 MAPK 磷酸化和 ERK 的活性,木犀草素通过阻断 MAPK 的磷酸化发挥对肠上皮细胞中 TNF- α 诱导的白细胞介素(IL)-8 的抑制作用,从而发挥抗炎抗菌作用^[16]。骨碎补提取物能通过抑制细胞凋亡及调节炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1)水平治疗骨关节炎,也能够修复骨组织^[17-18]。Sung 等^[19]研究显示,骨碎补能够抑制 IL-4、IL-6、TNF- α 等表达,并且减少炎症细胞浸润及播散,对炎症有一定的抑制作用。金连峰^[18]研究显示,骨碎补能够增加细胞因子表达,抑制细胞凋亡,从而促进关节软骨细胞增殖及关节软骨损伤修复。宋亚玲等^[20]通过研究金银花对小鼠巨噬细胞炎症的作用,发现酚酸类物质主要发挥抑制炎症的作用。此外,金银花中酚酸类成分也能够通过抑制 IL-6、TNF- α 、一氧化氮等氧化及炎症细胞因子释放,抑制炎症的发生和发展。雷玲等^[21]研究显示,醋酸所引起的小鼠腹腔毛细血管通透性变化能够被金银花提取物逆转,表明金银花提取物具有抗炎作用,此外金银花提取物对内毒素也有一定的抑制作用,从而抑制小鼠的组织炎症病变。缪艳燕等^[22]研究显示,金银花能够明显减轻鼠耳廓炎症肿胀(二甲苯所致),并且小鼠足肿胀实验也显示金银花能够明显抑制小鼠足炎症。董华燕^[23]应用金银花治疗糖尿病小鼠,发现超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶的活性明显增加,而丙二醛活性明显降低,并且金银花可清除氧自由基,抑制氧化应激减少组织损伤。叶清华^[24]研究金银花多糖提取物治疗 2 型糖尿病大鼠,发现多糖能够显著降低血糖,然而对于脂类却反之增加。总之,骨碎补-金银花可以通过抗炎、调节免疫、增加骨损伤修复、控制血糖等方面治疗糖尿病足。

综上所述,骨碎补-金银花主要通过调节 MAPK、PI3K/Akt 等信号通路的 JUN、TP53、Akt1、MAPK3 等疾病靶点,干预酶的活性、炎症等生物学过程进而治疗糖尿病足。

参考文献:

- [1] 谷涌泉.中国糖尿病足诊治指南[J].中国临床医生杂志,2020,48(1):19-27.
- [2] 陈春君,苏永雄,林宝举,等.糖尿病足的临床治疗进展[J].当代医学,2020,26(31):193-194.
- [3] 白先,宋宗良,段玉红,等.糖尿病足中医特色治疗研究进展[J].海南医学院学报,2022,28(3):235-240.
- [4] 檀龙颜,马洪娜.骨碎补药理作用的研究进展[J].中国民族民间医药,2017,26(11):66-70.
- [5] 马丽.金银花的药理作用研究[J].光明中医,2020,35(20):3308-3310.
- [6] 陈壮丽,卢维,李杰辉.糖尿病性溃疡动物模型的制备及评价[J].广西医学,2021,43(23):2867-2870.
- [7] 李洁花,廖晨希,杨盾,等.谢明霞.基于古汉愈疡方的不同剂型对糖尿病大鼠溃疡创面愈合疗效的比较研究[J].湖南中医药大学学报,2022,42(4):548-556.
- [8] 卢维,陈壮丽,李杰辉.糖尿病足中医外治法应用现状及研究进展[J].中国烧伤创疡杂志,2021,33(4):233-236+250.
- [9] 吴玉泉.中医祛腐清创法治疗糖尿病足坏疽初探[J].中医药信息,2014,31(4):70-72.
- [10] 郭兴蕊,胡爱飞,何春红.拔毒生肌散治疗糖尿病足病溃疡的临床疗效观察[J].世界中医药,2018,13(6):1376-1379.
- [11] 黄仁燕,杨晓,胡啸明,等.中药油膏治疗糖尿病足溃疡概述[J].山东中医杂志,2020,39(6):635-639.
- [12] 徐旭英,杨博华,赵进喜,等.论糖尿病足中医外治法及其实践[J].北京中医药,2021,40(12):1336-1339.
- [13] 周群,曾弦,黄丹,等.骨碎补化学成分和生物活性研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(8):2727-2741.
- [14] 刘晓龙,李春燕,薛金涛.金银花主要活性成分及药理作用研究进展[J].新乡医学院学报,2021,38(10):992-995.
- [15] 朱晓峰,王廷春,张荣华,等.骨碎补总黄酮对高糖作用下成骨细胞分化及 ERK_{1/2} 和 p38 蛋白激酶表达的影响[J].中药材,2012,35(3):424-429.
- [16] KIM J A, KIM D K, KANG O H, et al. Inhibitory effect of luteolin on TNF- α -induced IL-8 production in human colon epithelial cells[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(1):209-217.
- [17] 金连峰.骨碎补对膝骨性关节炎模型兔滑膜细胞凋亡机制的实验研究[J].中华中医药学刊,2016,34(7):1679-1682.
- [18] 金连峰.骨碎补对骨性关节炎兔作用的实验研究[J].中华中医药学刊,2016,34(8):1953-1957.
- [19] SUNG Y Y, KIM D S, YANG W K, et al. Inhibitory effects of *Drynaria fortunei* extract on house dust mite antigen-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(1):94-100.
- [20] 宋亚玲,王红梅,倪付勇,等.金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J].中草药,2015,46(4):490-495.
- [21] 雷玲,李兴平,白筱璐,等.金银花抗内毒素、解热、抗炎作用研究[J].中药药理与临床,2012,28(1):115-117.
- [22] 缪艳燕,徐帮会,徐剑,等.金银花的 HPLC 指纹图谱建立及其抗炎作用谱-效关系研究[J].中国药房,2020,31(20):2497-2502.
- [23] 董华燕.蜂胶金银花复方对四氧嘧啶致糖尿病小鼠的作用研究[D].福建农林大学,2014.
- [24] 叶清华.中药金银花提取物降糖作用实验研究[J].中医临床研究,2018,10(19):4-7.