

基于网络药理学研究杨桃根防治糖尿病肾病的作用机制

张宏亮, 蒋霞, 黄天敏, 丘岳, 黄光明, 黄仁彬, 黄振光*

广西医科大学第一附属医院药学部, 南宁 530021

摘要: 基于网络药理学研究杨桃根防治糖尿病肾病 (DKD) 的作用机制。利用 PubChem Search、Chemspider、Swiss Target Prediction 和 GeneCards 数据库获取杨桃根主要药效成分和治疗 DKD 的作用靶点, 活性成分-靶点网络图采用 Cytoscape 进行构建。通过 String 在线数据库构建靶蛋白相互作用网络, 并利用 CytoHubba 插件筛选关键靶点。利用 WebGestalt 在线数据库对关键靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。最后, 通过动物实验对筛选的关键靶点和信号通路进行初步验证。结果共筛选到 24 个活性成分, 成分-疾病的共同靶点 59 个。进一步网络分析显示, 主要活性成分为桃根环己二酮、苦瓜苷 C、樱桃素和胡萝卜甾醇等 14 个, 关键靶点为 MMP9、MMP2、EGFR、FGF2、STAT3、MAPK1、VEGFA 和 CASP3, 主要涉及的信号通路包括 AGE-RAGE 信号通路、Relaxin 信号通路、胰岛素抵抗信号通路和缺氧诱导因子信号通路。胱抑素 C (CysC) 和 HE 染色均提示杨桃根提取物能改善糖尿病小鼠肾功能。Western blot 显示, 杨桃根提取物可以通过降低 AGE-RAGE 信号通路相关的 TGF β 1 和 NF- κ B 蛋白发挥防治 DKD 的作用。综上, 杨桃根发挥防治 DKD 的作用是通过多成分、多靶点、多途径而实现的。

关键词: 杨桃根; 糖尿病肾病; 网络药理学

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)4-0647-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.4.015

Study on the mechanism of the root of *Averrhoa carambola* L. in the treatment of diabetic kidney disease based on network pharmacology

ZHANG Hong-liang, JIANG Xia, HUANG Tian-min,

QIU Yue, HUANG Guang-ming, HUANG Ren-bin, HUANG Zhen-guang*

Pharmacy Department, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: To study the mechanism of the root of *Averrhoa carambola* L. (RAC) in the treatment of diabetic kidney disease (DKD) based on network pharmacology. The active components of the RAC and the targets for treatment of DKD were screened and predicted by utilizing PubChem Search, Chemspider, Swiss target prediction and Genecards database. Cytoscape was used to construct the active components-target network map. The protein interaction network map was constructed by String database and the core targets were screened out by CytoHubba. Next, GO and KEGG analyses were conducted by WebGestalt. Finally, key screening targets and signaling pathways were primary validated by animal experiments. A total of 24 active ingredients were obtained, and 59 common targets for ingredients and diseases were screened. Further network analysis showed that the main active ingredients included 2-dodecyl-6-methoxycyclohexa-2,5-diene-1,4-dione, cuneataside C, prunasin and daucosterol. The key targets were MMP9, MMP2, EGFR, FGF2, STAT3, MAPK1, VEGFA, and CASP3. In addition, regulation key KEGG signal pathways involved AGE-RAGE signaling pathway, Relaxin signaling pathway, insulin resistance signaling pathway and hypoxia-inducible factor signaling pathway. Cystatin C (CysC) and HE staining suggested that the extract of RAC could improve renal function in diabetic mice. Western-blot showed that the extract of RAC played an important role in preventing and treating DKD by reducing TGF β 1 and NF- κ B proteins associated with the AGE-RAGE signaling pathway. In summary, the RAC plays a role in preventing and treatment DKD through multi-component, multi-target, and multi-pathways.

收稿日期: 2020-11-02 接受日期: 2021-01-08

基金项目: 广西自然科学基金(2017GXNSFBA198177); 广西中医药适宜技术开发与推广项目(GZSY20-10); 国家中医药管理局 2018 年全国中药特色技术传承人才培养项目(国中医药人教函[2018]204 号)

* 通信作者 E-mail: 13737143253@163.com

Key words: the root of *Averrhoa carambola* L.; diabetic kidney disease; network pharmacology

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病的主要并发症之一,亦是发达国家和地区终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的首要原因^[1]。目前对于DKD,尚缺乏特异性的治疗药物。临床上主要通过控制血糖、血压、血脂、尿酸以及使用肾素-血管紧张素系统抑制剂、改善肾脏微循环药物等延缓DKD进展^[2]。

中草药由于其多组分、多途径、多靶点的优势,在复杂疾病的防治方面显示了良好的效果。我们前期开展了若干抗DKD中草药及其活性成分的研究,发现酢浆草科属植物杨桃根(the root of *Averrhoa carambola* L., RAC)在防治DKD方面显示了良好的优势^[3],但作用机制不明。网络药理学是基于整体性与系统性的一种研究方法,将药物-靶点与生物信息网络相结合,类似于中医提出的整体、辨证的观点^[4]。基于此,我们将采用网络药理学方法,构建杨桃根主要成分与DKD共有靶点,探讨杨桃根防治DKD的潜在作用机制。

1 研究方法

1.1 杨桃根有效成分筛选

根据我们课题组前期关于杨桃根物质基础的研究结果^[5,6],结合查询关于杨桃根成分的文献,建立成分库。通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>)和ChempSpider数据库(<http://www.chemspider.com/Default.aspx>),查询已鉴定的成分的Canonical SMILES字符串。

1.2 靶点筛选

杨桃根成分的靶点预测采用Swiss Target Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)。该数据库通过2D和3D结构相似性的特点,间接预测化合物的作用靶点^[7]。具体操作为,将上一步查询到的Canonical SMILES字符串输入Swiss Target Prediction网站,从而获得每一成分的潜在靶点。

DKD疾病靶点预测采用GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)。分别以“Diabetic Kidney Disease”,“Diabetic nephropathy”作为关键词进行检索,以相关性分数(Relevance score ≥ 30)作为筛选条件,从而得到DKD相关靶点。

进一步,利用网络平台绘制韦恩图(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>),获得杨桃根主要成分与DKD的共有基因靶点信息,即得

到杨桃根防治DKD的潜在作用靶点。

1.3 活性成分-靶点网络构建

参考目前发表的文献,用Cytoscape 3.8.0软件构建活性成分-靶点的可视化网络,然后对该网络进行拓扑分析获得各节点的中心度值(degree)^[8]。

1.4 靶点蛋白PPI网络构建及关键靶点筛选

利用String11.0在线数据库对靶点蛋白相互作用(protein protein interaction, PPI)进行分析。具体操作为,将靶点输入String,物种选择“Homo sapiens”,以得分 >0.4 作为筛选条件,得到PPI网络图。

进一步,将PPI数据导入Cytoscape软件,利用Cytoscape的CytoHubba插件筛选hub gene。

1.5 GO和KEGG通路富集分析

利用WebGestalt在线数据库对关键靶点进行GO和KEGG分析,以 $P \leq 0.05$ 为临界,获取GO及KEGG信号通路结果。

1.6 动物实验验证

1.6.1 实验动物

SPF级KM雄性小鼠60只,体重 20 ± 2 g,购自广西医科大学实验动物中心,动物合格证号SCXK(桂)2015-0001。小鼠饲养条件为:温度 25 ± 2 °C,相对湿度 $50\% \pm 20\%$,光照/黑暗交替12/12 h,且自由进食、饮水。

1.6.2 杨桃根有效成分提取

杨桃根药材粉碎,加8倍量60%乙醇-水浸泡30 min,常压下加热回流提取3次,每次1 h,滤过合并提取液;减压回收乙醇,即得杨桃根提取物。

1.6.3 动物建模及给药干预

所有小鼠适应性喂养1周后,随机地分为两组,空白对照组及模型组。空白对照组给予水和普通饲料,模型组给予高糖高脂饲料。高糖高脂饲料配方见本课题组以前发表的文献^[3]。连续喂养4周后,禁食过夜,单次腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)110 mg/kg;当血糖维持在 $11.2 \sim 16.7$ mmol/L时即为造模成功。

除10只空白对照组小鼠外,其余50只小鼠随机分为5组(模型组、阳性对照组、杨桃根高、中、低剂量组),每组各10只。

杨桃根提取物高、中、低剂量组(RAC-H、RAC-M、RAC-L)分别给予1.2、0.6、0.3 g/kg/d灌胃,并同时给予高糖高脂饲料。阳性对照组(GQ)给予格

列喹酮溶液灌胃 (10 mg/kg/d) 并同时给予高糖高脂饲料。模型组 (DM) 仅给予高糖高脂饲料, 空白对照组 (NC) 仅给予蒸馏水灌胃。

1.6.4 样品的采集和处理

连续干预4周后,小鼠隔夜禁食12 h,测量空腹血糖,取血检测相关指标,并用 Western blot 法检测相关蛋白的表达。

1.6.5 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件对所有的数据进行统计分

析,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用方差分析对多组均数进行比较,两两分析采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活性成分筛选

根据我们课题组前期关于杨桃根物质基础的研究结果,结合查询关于杨桃根成分的文献,目前杨桃根的主要成分有24个,根据结构信息查询得到所有成分的 Canonical SMILES 字符串,结果见表1。

表1 杨桃根主要活性成分及 Canonical SMILES 字符串

Table 1 Main active components of the RAC and Canonical SMILES string

序号 No.	化学名 Name	简化分子线性输入规范 SMILES
1	2-Methoxy-6-nonylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione	CCCCCCCCC1=CC(=O)C=C(C1=O)OC
2	2-Dodecyl-6-methoxycyclohexa-2,5-diene-1,4-dione	CCCCCCCCCCCC1=CC(=O)C=C(C1=O)OC
3	Daucosterol	CCC(CCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)OC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)C)C)C(C)C
4	4-hydroxy-3-methoxypheno-1- β -D-[6-O-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate)]-1-glucopyranoside	C1=C(OC)C(O)=CC=C1OC1C(O)C(O)C(O)C(COC(=O)C2=CC(OC)=C(O)C(OC)=C2)O1
5	Methylcyclohexane	CC1CCCC1
6	Prunasin	C1=CC=C(C=C1)C(CN)OC2C(C(C(C(O2)CO)O)O)O
7	Benzyl-1-O- β -D-glucopyranoside	C1=CC=CC=C1COC1C(O)C(O)C(O)C(CO)O1
8	3,4,5-Trimethoxyphenol-1-O- β -D-glucopyranoside	C1=C(OC)C(OC)=C(OC)C=C1OC1C(O)C(O)C(O)C(CO)O1
9	(+)-5'-Methoxyisolariciresinol 3 α -O- β -D-glucopyranoside	C(OCC1=C(CO)C=C2C(=C1C1=CC(OC)=C(O)C(OC)=C1)C=C(O)C(OC)=C2)1OC(CO)C(O)C(O)C1O
10	(+)-Isolariciresinol 3 α -O- β -D-glucopyranoside	C(OCC1=C(CO)C=C2C(=C1C1=CC=C(O)C(OC)=C1)C=C(O)C(OC)=C2)1OC(CO)C(O)C(O)C1O
11	Koaburaside	COC1=CC(=CC(=C1O)OC)OC2C(C(C(C(O2)CO)O)O)O
12	(3,4-dihydroxy-5-((3,4,5-trihydroxy-6-(3-hydroxy-4-methoxyphenoxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-3-yl)methyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate	C1=C(O)C(OC)=CC=C1OC1C(O)C(O)C(O)C(OCC2C(O)C(COC(=O)C3=CC(OC)=C(O)C(OC)=C3)(O)C2)O1
13	3,4,5-trimethoxyphenyl 1-O- β -apiofuranosyl (1'' \rightarrow 6')- β -glucopyranoside	C1=C(OC)C(OC)=C(OC)C=C1OC1C(O)C(O)C(O)C(COC2C(O)C(CO)(O)CO2)O1
14	Cuneataside C	C1C(C(C(O1)OCC2C(C(C(C(O2)OCCC3=CC(=C(C=C3)O)O)O)O)O)O)O(CO)O
15	(+)-Lyoniresinol 3 α -O- β -D-glucopyranoside	C(OCC1=C(CO)C=C2C(=C1C1=CC(OC)=C(O)C(OC)=C1)C(OC)=C(O)C(OC)=C2)1OC(CO)C(O)C(O)C1O
16	(-)-Lyoniresinol 3 α -O- β -D-glucopyranoside	C1=C(OC)C(O)=C(OC)C2C(C3=CC(OC)=C(O)C(OC)=C3)C(COC3C(O)C(O)C(O)C(CO)O3)C(CO)CC1=2
17	(-)-5'-Methoxyisolariciresinol 3 α -O- β -D-glucopyranoside	C1=C(OC)C(O)=CC2C(C3=CC(OC)=C(O)C(OC)=C3)C(COC3C(O)C(O)C(O)C(CO)O3)C(CO)CC1=2
18	(-)-Isolariciresinol 3 α -O- β -D-glucopyranoside	C1=C(OC)C(O)=CC2C(C3=CC=C(O)C(OC)=C3)C(COC3C(O)C(O)C(O)C(CO)O3)C(CO)CC1=2
19	Methoxyhydroquinone-4- β -D-glucopyranoside	C1=C(OC)C(O)=CC=C1OC1C(O)C(O)C(O)C(CO)O1

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	化学名 Name	简化分子线性输入规范 SMILES
20	2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenoxy)-6-(hydroxymethyl) tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol	<chem>C1=C(O)C(OC)=CC=C1OC1C(O)C(O)C(O)C(CO)O1</chem>
21	(2S)-2-O-β-D-glucopyranosyl-2-hydroxyphenyl-acetic acid	<chem>C1=CC=CC=C1C(C(=O)O)OC1C(O)C(O)C(O)C(CO)O1</chem>
22	3-Hydroxy-4-methoxyphenol 1-O-β-D-apiofuranosyl-(1''→6')-O-β-D-glucopyranoside	<chem>C1=C(O)C(OC)=CC=C1OC1C(O)C(O)C(O)C(COC2C(O)C(CO)(O)CO2)O1</chem>
23	4-Hydroxy-3-methoxyphenol 1-O-β-D apiofuranosyl-(1''→6')-O-β-D-glucopyranoside	<chem>C1=C(OC)C(O)=CC=C1OC1C(O)C(O)C(O)C(COC2C(O)C(CO)(O)CO2)O1</chem>
24	3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl 1-O-β-apiofuranosyl (1''→6')-O-β-D-glucopyranoside	<chem>C1=C(OC)C(O)=C(OC)C=C1OC1C(O)C(O)C(O)C(COC2C(O)C(CO)(O)CO2)O1</chem>

2.2 活性成分治疗疾病相关靶点的筛选

根据 Swiss Target Prediction 网站对 24 个活性成份进行靶基因预测,共得到 2 331 个相关靶点,进一步排除重复靶点,共得到潜在靶点 281 个。整理“成分-靶点”对,然后导入 Cytoscape 3.8.0,建立“成

分-靶点”网络(如图 1)。由图可知,该网络共有 663 条边,305 个节点。305 个节点中,24 个红色节点代表杨桃根的每一个成分,281 个蓝色节点代表与成分对应的靶点,即潜在相关靶点。

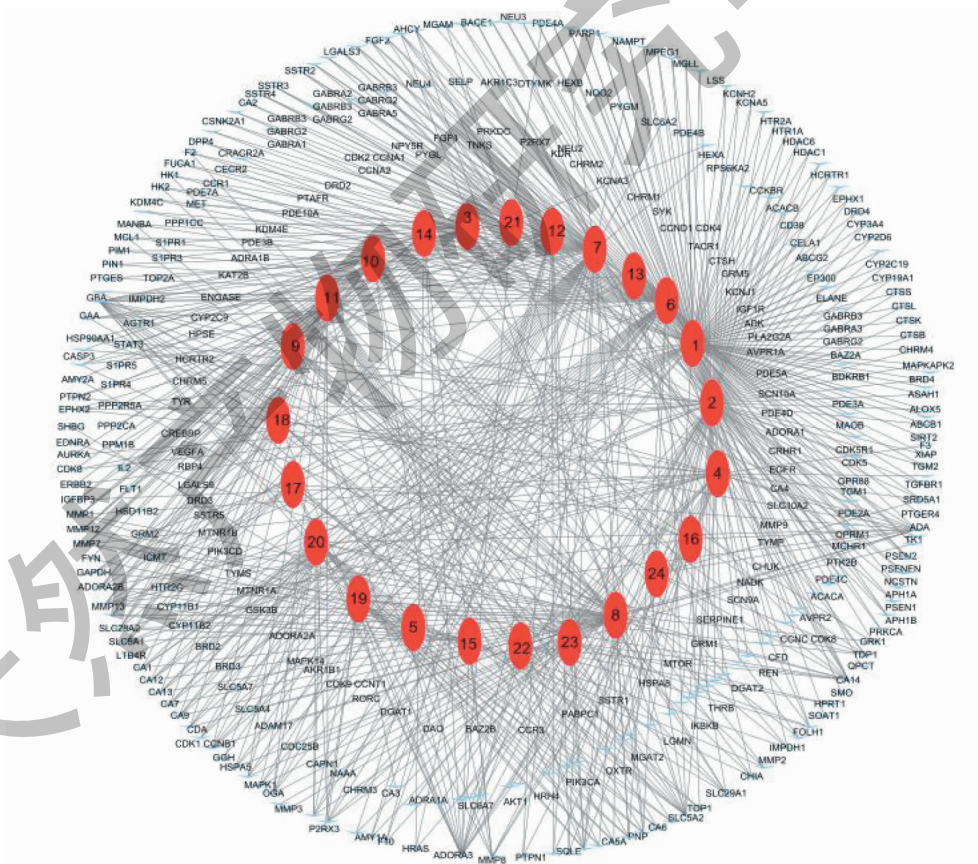


图 1 成分-潜在相关靶点网络图

Fig. 1 Components-targets network diagram

注:编号代表表 1 中的化合物。Note: The number represents the compound in Table 1.

2.3 DKD 靶点预测结果

从 Genecards 数据库中筛选得到 14 329 个 DKD

相关靶点,去除重复后得到 662 个潜在靶点。然后根据 281 个成分靶点与 662 个疾病靶点绘制韦恩图

(见图 2),从而获得 DKD 共性靶点基因 59 个。

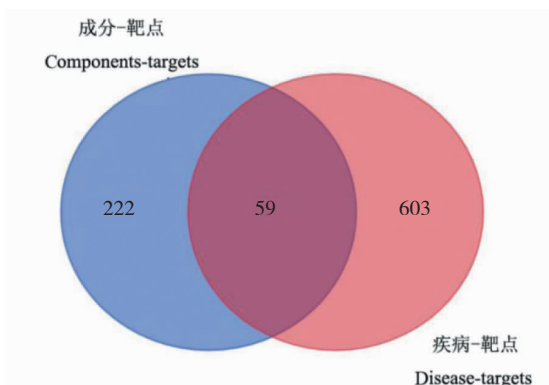


图 2 杨桃根提取物成分与 DKD 靶点韦恩图
Fig. 2 Venn diagram of targets for RAC and DKD

2.4 疾病靶蛋白相互作用网络构建

将 DKD 共性靶点基因导入 STRING 在线数据库,查询 59 个共性靶点的相互作用关系,进行可视

化分析后获得疾病靶蛋白相互作用(PPI)网络(见图 3),其节点数为 59,边数为 461,平均节点度为 15.6。

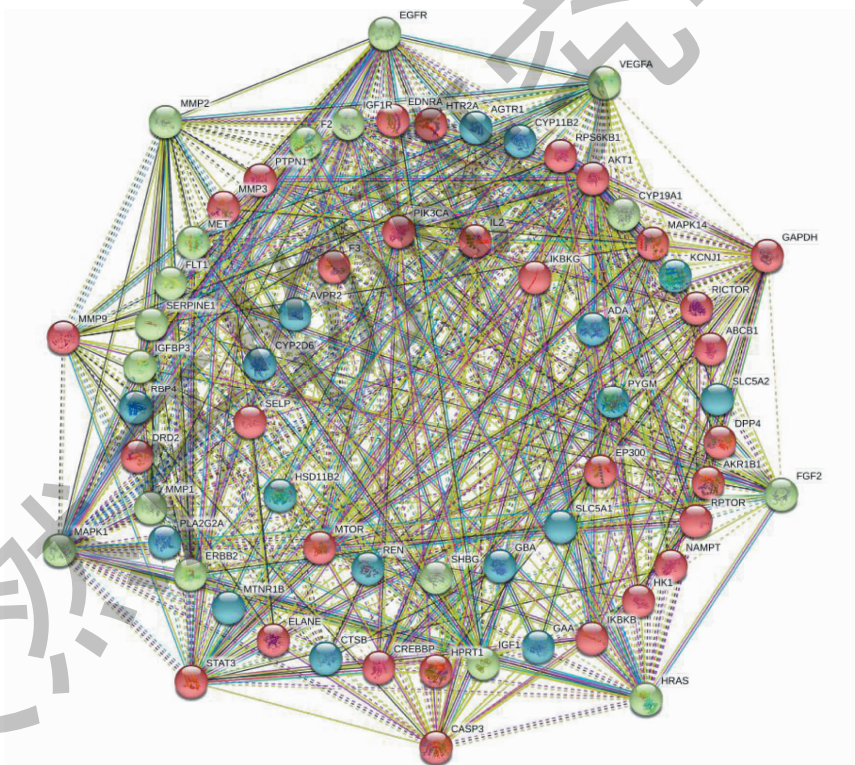


图 3 杨桃根治 DKD 潜在靶点的 PPI 网络图
Fig. 3 PPI network diagram of potential targets of the RAC for DKD

2.5 关键靶点的筛选

将 PPI 数据导入 Cytoscape 软件中,利用 Cyto-Hubba 插件中的 MCC 算法筛选最重要的 10 个关键基因(见图 4)。这些关键基因包括:基质金属蛋白酶 9(MMP9)、表皮生长因子受体(EGFR)、成纤维

细胞生长因子 2(FGF2)、信号转导和转录激活子 3(STAT3)、丝裂原激活的蛋白激酶 1(MAPK1)、基质金属蛋白酶 2(MMP2)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、半胱天冬酶 3(CASP3)、原癌基因 Hras(HRAS)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。

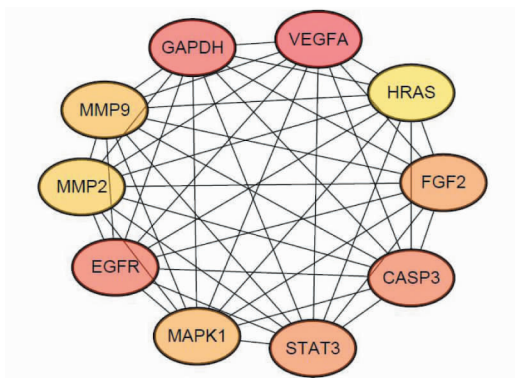


图4 CytoHubba 筛选关键靶点的网络图

Fig. 4 Network diagram of key targets screened by CytoHubba

2.6 活性成分-关键靶点网络分析

根据筛选得到的活性成分和 10 个关键靶点,利用 Cytoscape 软件构建活性成分-靶点网络图(见图

5)。由图可知,该网络共有节点 24 个,边 32 条,其中 14 个节点代表杨桃根成分,用红色标示,10 个节点代表潜在关键靶点,用蓝色标示。

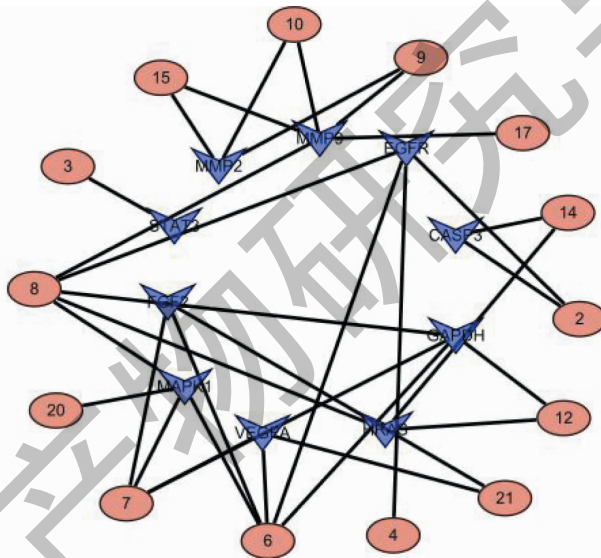


图5 杨桃根防治 DKD 活性成分-关键靶点网络图

Fig. 5 Network diagram of active components- key targets of the RAC for DKD

注:编号代表表 1 中的化合物。Note: The number represents the compound in Table 1.

2.7 靶点的 GO 生物功能注释

GO 富集分析主要包括生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 三部分。利用 WebGestalt 对 10 个关键靶点进行 GO 生物功能注释,并分别对前 10 个条目进行可视化分析(见图 6)。图中横坐标为标准化富集分数,纵坐标表示富集条目。

在生物过程(BP)中,主要富集条目为:调控细胞迁移(positive regulation of cell migration)、调控细

胞运动(positive regulation of cell motility)、调控细胞成分的运动(positive regulation of cellular component movement)、运动调控(positive regulation of locomotion)、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路(transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway)、酶联受体蛋白信号通路(enzyme linked receptor protein signaling pathway)、细胞增殖调控(positive regulation of cell proliferation)等。

在细胞组成(CC)中,富集条目主要分布于:富含纤维胶凝蛋白的颗粒内腔(ficolin-1-rich granule

lumen)、膜筏(membrane raft)、膜微区(membrane microdomain)、膜区(membrane region)、囊泡腔(vesicle lumen)等。

在分子功能(MF)中,富集条目主要分布于:趋化活性(chemoattractant activity)、磷脂酰肌醇-4,5-双磷酸 3-激酶活性(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity)、磷脂酰肌醇二磷酸激酶活性

(phosphatidylinositol bisphosphate kinase activity)、磷脂酰肌醇 3-激酶活性(phosphatidylinositol 3-kinase activity)、金属内肽酶活性(metalloendopeptidase activity)、磷酸酶结合(phosphatase binding)、细胞因子受体结合(cytokine receptor binding)、内肽酶活性(endopeptidase activity)等。

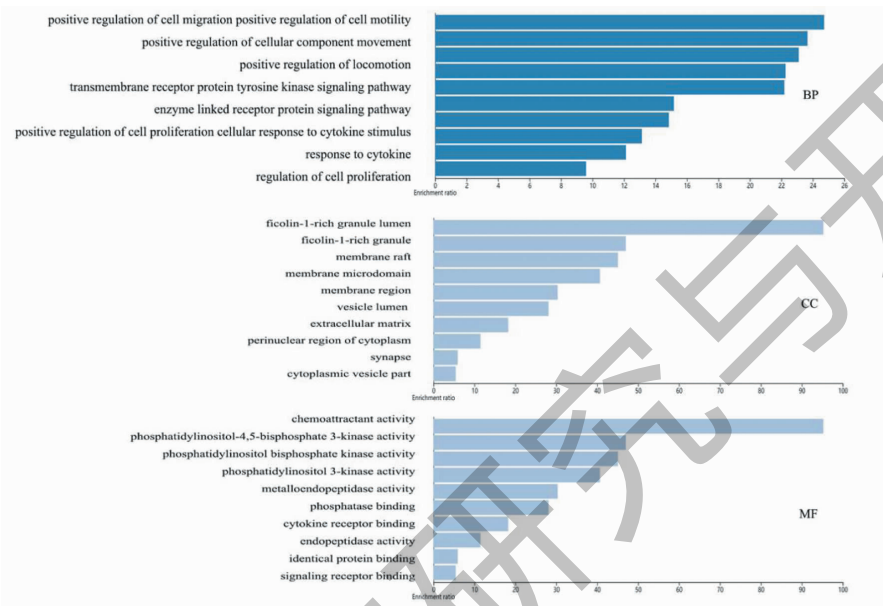


图6 杨桃根防治 DKD 关键靶点 GO 富集柱状图

Fig. 6 GO enrichment histogram of the key targets of the RAC for DKD

2.8 KEGG 通路富集分析

利用 WebGestalt 在线数据库对 10 个关键靶点进行 KEGG 富集分析,结果进行可视化分析,得到 KEGG 富集分析结果(见表 2)。由表 2 可知,关键靶点主要富集通路如下:蛋白聚糖与肿瘤(proteoglycans in cancer)、膀胱癌(bladder cancer)、肿瘤相关 microRNA(microRNAs in cancer)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药(EGFR tyrosine kinase inhibitor re-

sistance)、癌症通路(pathways in cancer)、糖尿病并发症 AGE-RAGE 通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、松弛素信号通路(relaxin signaling pathway)、卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染(kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、内分泌抵抗(endocrine resistance)、缺氧诱导因子信号通路(HIF-1 signaling pathway)。

表 2 杨桃根防治 DKD 关键靶点的 KEGG 富集分析结果

Table 2 KEGG enrichment analysis of the key targets of the RAC for DKD

基因集 Gene set	名称 Description	数量 Size	P 值 P value	伪发现率 FDR
hsa05205	Proteoglycans in cancer	198	6.73E-14	2.19E-11
hsa05219	Bladder cancer	41	4.53E-12	7.39E-10
hsa05206	MicroRNAs in cancer	150	1.58E-10	1.71E-08
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	79	2.75E-10	2.24E-08
hsa05200	Pathways in cancer	524	4.60E-10	3.00E-08
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	99	1.10E-09	5.97E-08

续表 2(Continued Tab. 2)

基因集 Gene set	名称 Description	数量 Size	P 值 P value	伪发现率 FDR
hsa04926	Relaxin signaling pathway	130	5.76E-09	2.68E-07
hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	186	4.99E-08	2.03E-06
hsa01522	Endocrine resistance	98	9.59E-08	3.46E-06
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	100	1.06E-07	3.46E-06

2.9 动物实验验证结果

2.9.1 小鼠肾功能变化

胱抑素 C(CysC)作为一种敏感性高、特异性高的标志物,可以在肾损伤早期做出准确的预测。在本研究中,模型组的 CysC 水平明显增加($P < 0.05$);当给予不同剂量的杨桃根提取物干预后,各组的 CysC 水平明显下降,且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。尤其是中、高剂量组,结果见图 7。

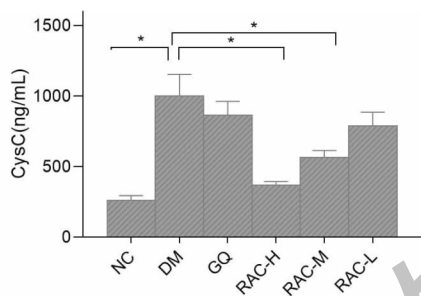


图 7 杨桃根对糖尿病小鼠肾功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 7 Effect of the RAC on renal function of diabetic mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注: * $P < 0.05$,下同。Note: * $P < 0.05$, the same below.

2.9.2 Western blot 检测结果

Western blot 结果如图 9 所示,模型组的 TGF β 1 蛋白表达明显上调,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);当给予杨桃根提取物干预后,其表达水平平均下调,且有剂量依赖趋势。而 TGF β 1 与 AGE-RAGE 信号通路相关,提示 AGE-RAGE 信号通路在杨桃根提取物防治 DKD 的过程中发挥重要作用。

3 讨论

DKD 患病率高,心脑血管并发症风险大,是糖尿病患者死亡的重要风险因素^[9]。然而,由于 DKD 发生机制复杂,目前关于 DKD 的治疗尚未取得突破性进展^[10]。关于杨桃根治疗 DKD,我们课题组前期进行了大量的研究。发现杨桃根及其主要成分改善糖尿病及肾损害相关并发症可能与调节糖代谢和脂代谢紊乱、胰岛素抵抗以及氧化应激等有关^[11]。

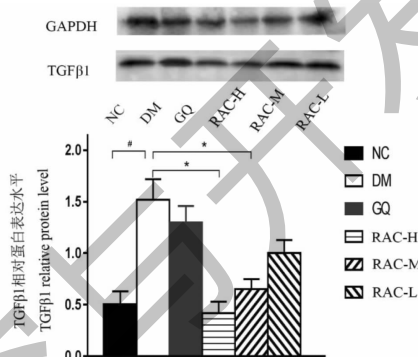


图 8 小鼠肾组织 TGF β 1 蛋白表达水平

Fig. 8 Protein expression levels of TGF β 1 in mice kidney tissue

进一步发现,其发生机制可能与 TLR4/NF- κ B、TGF β /Smad2/3 等多条信号通路相关^[12]。然而,具体的作用机制尚待进一步阐明。

中药具有成分复杂,药理作用广泛的特点。杨桃根发挥防治 DKD 作用取决于哪些活性成分以及其对应的靶点是什么是我们关注的重点。我们课题组前期对杨桃根的有效成分进行了提取分离纯化分析,共得到 24 个活性化合物。在这些化合物中,我们发现化合物 2(杨桃根环己二酮)在 DKD 的防治过程中发挥了重要的作用,是潜在的主要活性成分^[13]。然而其他成分是否在 DKD 的防治过程中发挥重要作用,还需进一步研究。通过网络药理学筛选,我们发现,除了杨桃根环己二酮之外,苦瓜苷 C、樱桃素、胡萝卜甾醇等成分亦与多个 DKD 关键靶点相关。提示我们,这些成分在 DKD 的防治过程也发挥了重要的作用,有待我们后续的进一步验证。

关键靶点筛选方面,我们筛选出了 10 个关键靶标,分别为:基质金属蛋白酶 9(MMP9)、基质金属蛋白酶 2(MMP2)、表皮生长因子受体(EGFR)、成纤维细胞生长因子 2(FGF2)、信号转导和转录激活子 3(STAT3)、丝裂原激活的蛋白激酶 1(MAPK1)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、半胱天冬酶 3(CASP3)、

原癌基因 Hras (HRAS) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)。在这 10 个关键靶标中, MMP2 和 MMP9 为基质金属蛋白酶的重要成员, 作用底物主要为细胞外基质 (ECM) 的 IV 型胶原, 其功能与降解和重构细胞外基质 (ECM) 动态平衡密切相关^[14]。DKD 患者早期有肾小球基底膜和肾小球系膜区 ECM 累积的临床表现, MMP9 和 MMP2 及其组织抑制因子 (TIMPs) 在 ECM 降解过程中发挥非常重要的作用^[15]。此外, MMP9 结合 CD44 可释放储存的 TGF- β 1^[16], MMP9 亦可通过释放血管内皮生长因子 (VEGF) 以参与血管生成^[17]。

KEGG 富集分析显示关键靶点主要富集于蛋白聚糖与肿瘤、膀胱癌、肿瘤相关 MicroRNA、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、癌症通路、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路、松弛素 (属于胰岛素家族) 信号通路、卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒感染、内分泌抵抗、缺氧诱导因子相关信号通路上。在这些信号通路中, AGE-RAGE 信号通路、松弛素信号通路、内分泌抵抗、缺氧诱导因子等均与糖尿病的发生和发展密切相关。

晚期糖基化终末产物 (AGEs)-糖基化终末产物受体 (RAGEs) 信号通路是糖尿病肾病发生发展的重要环节。在 DKD 的发生和发展过程中, AGE-RAGE 主要通过激活 NF- κ B, 引起大量黏附分子、生长因子、促炎细胞因子等的表达和释放, 最终引起慢性细胞活化和组织损伤。我们前期研究也发现, 杨桃根提取物 DMDD 可以通过抑制 NF- κ B 的激活, 从而减轻一系列的炎症损伤来达到防治糖尿病的相关并发症的作用^[12]。AGE-RAGE 还可刺激 VEGF 的表达, 从而增加血管的通透性, 导致蛋白尿的发生。另 AGE-RAGE 还可刺激 TGF- β 1 的产生, 诱导单核细胞趋化蛋白 MCP-1 表达的增强来引起 DKD 的发生和发展^[18]。我们通过动物实验验证了该信号通路, TGF β 1 和 NF- κ B 在糖尿病模型组的蛋白表达均明显上调, 当给予杨桃根提取物干预后, 它们的表达水平均下调, 且有剂量依赖趋势, 提示 AGE-RAGE 信号通路在杨桃根提取物防治 DKD 的过程中发挥重要作用。

综上, 本研究运用网络药理学的方法, 筛选出了杨桃根发挥药理作用的主要活性成分包括杨桃根环己二酮、苦瓜苷 C、樱桃素和胡萝卜甾醇等。这些活性成分主要通过 MMP9、MMP2、EGFR、FGF2、STAT3、MAPK1、VEGFA 和 CASP3 等关键靶点, 参与

AGE-RAGE 信号通路、Relaxin 信号通路、胰岛素抵抗信号通路和缺氧诱导因子信号通路发挥防治 DKD 的作用。通过本研究, 初步阐明了杨桃根的主要药效成分及其作用靶点和相关通路在 DKD 防治中的作用。这些研究不仅与我们课题组的前期研究相互验证, 还为更多后续的研究提供了思路 and 方向。

参考文献

- 1 de Boer IH, Rue TC, Hall YN, et al. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States [J]. JAMA, 2011, 305:2532-2539.
- 2 Jiang SM, Fang JY. Expert consensus on multidisciplinary diagnosis, treatment and management of diabetic nephropathy [J]. Clin Edu Gen Pract (全科医学临床与教育), 2020, 18:484-487.
- 3 Zhang HL. Study on the mechanism of DMDD, isolated from the root of *Averrhoa carambola* L., in improving diabetic nephropathy through TLR4/TGF β signaling pathway [D]. Nanning: Guangxi Medical University (广西医科大学), 2019.
- 4 Zhang HL, Huang ZG, Jiang X, et al. Study on the mechanism of add or subtract Maxing Shigan decoction in the treatment of the severe novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2020, 43:1777-1783.
- 5 Wen QW. Study on the chemical constituents from *Averrhoa carambola* L. root and its hypoglycemic activities [D]. Nanning: Guangxi Medical University (广西医科大学), 2013.
- 6 Wen QW, Lin X, Liu YQ, et al. Phenolic and lignan glycosides from the butanol extract of *Averrhoa carambola* L. Root [J]. Molecules, 2012, 17:12330-12340.
- 7 Wang LQ, Li BB, Wang Q, et al. Study on the mechanism of Shenqi Jiangtang granules in treating diabetic microcirculation disorders through multi-level interaction network [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51:4861-4872.
- 8 Ma Y, Wang WJ, Huang SJ, et al. Study on the mechanism of Danshen-Gegen in treating coronary heart disease based on network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32:209-223.
- 9 Duan J, Wang C, Liu D, et al. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease and diabetic kidney disease in Chinese rural residents: a cross-sectional survey [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):10408.
- 10 Zheng W, Pan SK, Liu DW, et al. Progress in the treatment of diabetic nephropathy [J]. Chin J Nephrol (中华肾脏病杂志), 2020, 36:476-480.
- 11 Lu S, Zhang H, Wei X, et al. 2-Dodecyl-6-methoxycyclohexa-

- 2,5-diene-1,4-dione isolated from *Averrhoa carambola* L. root ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway[J]. *Diabet Metab Syndr Ob*, 2019, 12:1355-1363.
- 12 Zhang HL, Wei XJ, Lu SY, et al. Protective effect of DMDD, isolated from the root of *Averrhoa carambola* L. on high glucose induced EMT in HK-2 cells by inhibiting the TLR4-BAMBI-Smad2/3 signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113:108705.
- 13 Li JM, Wen QW, Xu XH, et al. Effects of carambola root and cyclohexanedione on high-fat-induced obese insulin resistance mice[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2016, 27:2325-2327.
- 14 Wei Q, Cao J, Jiang WL. The relationship between serum MMP-2 and MMP-9 levels and vascular calcification in patients with diabetic nephropathy[J]. *Hebei Med J (河北医药)*, 2020, 42:340-343.
- 15 Zhao YG, Orbit A, Zhu C. Extracellular matrix and matrix metalloproteinases[J]. *Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展)*, 1999, 26:223-227.
- 16 Li ZN, Liang B, Liu MJ, et al. Hydrogen sulfide improves renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic rats by regulating transforming growth factor- β and matrix metalloproteinase-9/matrix metalloproteinase inhibitor-1[J]. *Chin J Gerontol (中国老年学杂志)*, 2017, 37:544-546.
- 17 Huang XZ, Liu ZY. The effect of losartan on the expression of serum VEGF and MMP-9 in patients with diabetic nephropathy[J]. *Pract Pharm Clin Remed (实用药物与临床)*, 2016, 19:1257-1260.
- 18 Yang CM, Yang ZX, Ma XL. The mechanism of AGEs-RAGE signaling pathway in diabetic nephropathy and research progress of traditional Chinese medicine[J]. *Acta Chine Med (中医学报)*, 2019, 34:1864-1868.

食淀粉乳杆菌可促进酵母乙醇产量

微生物生长在复杂的菌群环境中,人工合成菌群进行蔗糖乙醇发酵就是模拟真实的菌群环境。蔗糖乙醇发酵过程容易被乳酸菌污染,长时间发酵便形成稳定的菌群,一般认为乳酸菌可能与酵母竞争营养物质,其代谢产物对酵母细胞有抑制作用,因此对生产过程不利。

2021年3月8日 Nature Communications 报道,丹麦技术大学的研究人员使用了复合微生物培养法和通量平衡法来评价蔗糖乙醇发酵过程中的微生物组成及相互影响作用。研究者将酿酒酵母与易污染细菌(食淀粉乳杆菌、发酵乳杆菌、瑞士乳杆菌、克氏片球菌、运动发酵单胞菌及其组合)以 100:1 的比例接种,重复工业发酵过程,24 小时后采集细胞和培养基,用流式细胞术分析群落结构,高效液相色谱法分析乙醇产量。结果表明,酵母和细菌的数量都随着多样性的增加而减少,而酵母的相对丰度则随着多样性的增加而增加,高阶交互作用抵消了两两相互作用对乙醇产量的不利影响。

研究者还通过对菌落组成和乙醇产量的相关性分析,发现食淀粉乳杆菌能够增加酵母的生长速度和乙醇产量。食淀粉乳杆菌分泌的乙醛能促进酵母的生长与乙醇的生成,是因为酵母将细菌产生的乙醛还原为乙醇,从而平衡其胞质氧化还原电位,最终使甘油产量降低乙醇产量增加。食淀粉乳杆菌可以将甘蔗乙醇发酵产量提高 3% 左右。

吴晓燕编译自:<https://www.sciencedaily.com/releases/2021/03/210310122442.htm>

原文链接:<https://www.nature.com/articles/s41467-021-21844-7>

原文标题:Complex yeast - bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation