

# 基于网络药理学和分子对接探索桑白皮治疗糖尿病周围神经病变的潜在机制

张 欢<sup>1</sup>, 丁纪茹<sup>2</sup>, 张效科<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>陕西中医药大学, 咸阳 712046; <sup>2</sup>成都中医药大学附属医院, 成都 610075

**摘要:**本研究运用网络药理学和分子对接方法对中药桑白皮治疗糖尿病周围神经病变(DPN)的活性成分、潜在作用靶点和信号通路进行研究,探索桑白皮治疗DPN的可能作用机制。首先从中药系统药理学数据库(TCMSP)筛选出桑白皮的活性成分及靶点基因。通过GeneCards数据库及OMIM数据库筛选出DPN的疾病靶点基因,并用Cytoscape软件构建“药物-有效成分-靶基因-疾病”中药调控网络图。将有效成分靶标与疾病靶标上传到STRING数据库,构建蛋白互作网络图(PPI),并使用R语言对得到的PPI进行核心基因的筛选。运用R语言对关键靶点进行GO富集分析和KEGG通路富集分析。其次从活性成分及靶点基因中根据degree值筛选出前3个关键成分,并将该网络中的基因靶点以degree值高低进行排序,选择前3个核心靶点,然后从RCSB数据库下载相关蛋白的结构,使用Py-mol软件去除溶剂分子与配体,使用AutoDock软件进行分子对接。最后通过酶联免疫吸附实验和荧光光谱实验证明网络药理学富集分析的结果。最终预测到31个桑白皮活性成分,312个活性成分相关靶点,120个桑白皮-糖尿病周围神经病变共同有效靶点。活性成分中度值最高的为槲皮素,其次为山柰酚。PPI网络核心基因为转录因子AP-1(JUN)、丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、转录因子p65(RELA)、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶1(AKT1)、白介素6(IL-6)等;GO富集分析显示会影响基因的转录、细胞因子表达和蛋白激酶活性等;KEGG通路富集分析显示AGE-RAGE信号通路、流体剪切力和动脉粥样硬化为显著性最高的通路,其次为卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、MAPK信号通路、人巨细胞病毒感染、TNF信号通路。分子对接结果显示关键成分中槲皮素与对应靶点具有较好的结合活性。酶联免疫吸附实验提示桑白皮能够降低IL-6和TNF- $\alpha$ 的表达,荧光光谱实验证实桑白皮能够减少AGES。可见中药桑白皮治疗糖尿病周围神经病变具有多成分、多靶点、多功能、多通路的作用特点,其潜在的作用机制可能与AGE-RAGE信号通路、肿瘤坏死因子信号通路等有关。

**关键词:**桑白皮;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

文章编号:1001-6880(2022)1-0121-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.1.016

## Exploration of the potential mechanism of Mori Cortex on treating diabetic peripheral neuropathy based on network pharmacology and molecular docking

ZHANG Huan<sup>1</sup>, DING Ji-ru<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-ke<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

<sup>2</sup>Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

**Abstract:** To investigate the main active components, the potential targets and molecular pathways of Mori Cortex in the treatment of diabetic peripheral neuropathy (DPN) by using network pharmacology-molecular docking, and to explore the mechanism of Mori Cortex treating on DPN. The main active components and the gene targets of Mori Cortex were screened from the Chinese Medicine System Pharmacology Database (TCMSP). DPN targets genes were screened by searching the following databases of GeneCards database and OMIM database. Using the Cytoscape software to construct the Chinese herbs regulatory network diagram of “Chinese herb-active ingredient-target gene-disease”. The active component targets and disease targets were uploaded into the STRING database to construct PPI. We used R language for screening core genes in PPI. GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed. Finally, 31 active components of Mori Cortex were predicted, 312 active components related targets, 120 common effective targets of Mori Cortex and diabetes peripheral neuropathy were obtained. Quercetin was the most active component with the highest degree value, followed by kaempferol. The core genes of PPI network were transcription factor AP-1 (JUN), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), transcription factor p65 (RELA), serine-threonine protein kinase 1 (AKT1), interleukin-6 (IL-6), etc.; GO enrichment analysis showed that it would affect gene transcription, cytokine expression and protein kinase activity, etc.; KEGG pathway enrichment analysis showed that AGE-RAGE signal pathway, fluid shear stress and arteriosclerosis were the most significant pathways, followed by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection, MAPK signal pathway, human cytomegalovirus infection, TNF signal pathway. Molecular docking results showed that quercetin had better binding activity with corresponding targets. ELISA experiment indicated that Mori Cortex could reduce the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$ . Fluorescence spectrophotometry experiment proved that Mori Cortex could reduce AGEs. It can be seen that Mori Cortex has the characteristics of multi-components, multi-targets, multi-functions and multi-pathways in treating diabetes peripheral neuropathy, and its potential mechanism may be related to AGE-RAGE signal pathway, tumor necrosis factor signal pathway, etc.

ment and KEGG pathway analysis were performed using R language. The three-dimensional structure and chemical structure of targets and components were obtained from RCSB database. Pymol software was used to remove water and phosphate from protein molecules. AutoDock software was used to convert compound and core protein gene pdb format into pdbqt format and search for active pockets, and finally run AutoDockTools for molecular docking. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and fluorescence spectra were used to verify the results of network pharmacology enrichment analysis. Finally, 31 active ingredients and 312 targets were extracted from Mori Cortex, and the highest target counts were quercetin and kaempferol. The core gene in PPI were JUN, MAPK1, RELA, AKT1, IL-6 and so on. GO analysis revealed that it was possibly influenced by the transcriptional activity of corresponding genes, cytokine expression and protein secretion. KEGG pathway analysis also showed enrichment of AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, Fluid shear stress and atherosclerosis, Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection, MAPK signaling pathway, human cytomegalovirus infection, and TNF signaling pathway. The results of molecular docking showed that the key components have good binding activity with corresponding targets, for example, quercetin. The expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  were decreased by ELISA, and the AGEs were decreased by fluorescence spectroscopy. Therefore, Mori Cortex has the characteristics of multi-components, multi-targets, multi-channels and multi-pathways in the treatment of DPN. Its potential mechanism may be related to AGE-RAGE signaling pathway, MAPK signaling pathway, and TNF signaling pathway.

**Key words:** Mori Cortex; diabetic peripheral neuropathy; network pharmacology; molecular docking

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病慢性并发症中最常见最容易忽视的疾病之一,以慢性高血糖和微血管病变为特点的慢性、同步性、进行性的远端对称性多神经病变<sup>[1]</sup>。流行病学调查发现糖尿病患者中约26%的青少年、46%的成人会并发周围神经病变<sup>[2]</sup>,一定程度上增加了疼痛、足溃疡、截肢的风险;加重了抑郁的发生,降低患者生活质量,增加社会的经济负担。本病的发病机制复杂,可能与慢性高糖状态下多元醇通路激活、晚期糖基化终产物(AGE)的堆积、蛋白激酶C(PKC)的活化、己糖胺生物合成通路的激活、氧化应激过表达,免疫受损,炎症反应中相关因子及通路的激活,神经营养因子的缺乏,血管损伤及聚ADP核糖聚合酶(poly ADP ribose polymerase, PARP)的激活、MAPK通路的激活、刺猬(Hh)通路的抑制和Wnt通路的抑制等因素关系密切<sup>[3]</sup>。目前还没有公认的治疗方法来预防或逆转糖尿病周围神经病变,西医多在改善生活方式、血糖控制的基础上选择甲钴胺(修复神经),维生素B1、B6、B12(营养神经)等针对病因的治疗药物或依帕司他、硫辛酸等针对发病机制的药物治疗来预防糖尿病周围神经病变的发生发展,但效果多不理想。中医药历史悠久,博大精深,治疗糖尿病周围神经病变有着丰富的临床实践经验,桑树资源在预防和治疗2型糖尿病及慢性并发症的作用已得到认可<sup>[4]</sup>。

桑科植物去除栓皮保留根皮的桑白皮始载于《神农本草经》,味甘性寒,主治伤中,能补虚。《名

医别录》认为桑白皮能去肺中水气,利水,去热止渴;《药性论》认为其能治肺气喘满。桑白皮活性成分较多,主要含有槲皮素、山奈酚、谷甾醇、黄酮类化合物等,药理研究证实桑白皮及活性成分有镇咳,祛痰,平喘,利尿,抗炎,降糖,降脂,外周镇痛,神经修复,调节免疫,抗氧化等作用<sup>[5]</sup>,能通过影响神经因子的表达<sup>[6]</sup>、保护坐骨神经结构和功能<sup>[7,8]</sup>治疗糖尿病周围神经病变。

中医药从整体观和辩证分析的视角出发擅长治疗复杂性的疾病,但由于中药成分复杂,作用机制不明晰,导致中医药的现代化发展遇到困难。网络药理学(network pharmacology)是基于系统生物学的理论对生物系统进行网络分析、选取特定信号节点进行多靶点药物分子设计的新学科<sup>[9]</sup>,使得以整体观为特点的中医药和以系统为方向的现代前沿技术有效地衔接起来,为中医药现代化提供新机遇,指明新方向。鉴于糖尿病周围神经病变机制复杂性特点,应用网络药理学-分子对接技术从不同角度揭示中药桑白皮对本病的干预作用,预测桑白皮治疗糖尿病周围神经病变的靶点和通路,为开发和临床应用桑科资源尤其是桑白皮提供科学依据和数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

TCMSP数据库(<http://tcmsp. com/tcmsp. php>) ; GeneCards数据库(<https://www. genecards. org/>) ; OMIM数据库(<https://omim. org/>) ; STRING数据库(<https://string-db. org/cgi/input. pl>) ; Cyto-

scape 3.7.1 软件; R(x64, 3.6.3) 软件; Perl 语言及 Windows10 3.6.3 操作系统。

## 1.2 桑白皮作用靶点的筛选

在 TCMSP 数据库中选择“Herb name”检索 sangbaipi, 点击拉丁名“Mori Cortex”, 筛选条件为生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$  和类药性(drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$ , 将过滤到的桑白皮成分和相关靶点复制到文本框中, 使用 Perl 语言并结合 Uniprot 数据库, 得到桑白皮有效成分的基因靶点。

## 1.3 桑白皮与 DPN 相关靶点的收集

使用 Genecards 数据库和 OMIM 数据库分别检索“diabetic peripheral neuropathy”, 将检索结果合并, 剔除重复靶点, 获得糖尿病周围神经病变的全部基因靶点。将桑白皮的基因靶点和疾病基因靶点使用 R 语言程序取交集, 以筛选出共同的靶点, 绘制韦恩图。

## 1.4 中药调控网络的构建和分析

在 STRING 数据库中检索桑白皮和糖尿病周围神经病变的共同靶点, 设置隐藏游离点(hide disconnected nodes in the network), 最低互动得分要求(minimum required interaction score) 中选择 highest confidence(0.900), 更新, 获取蛋白互作网络(PPI), 下载高清 PPI 图片、导出 TSV 格式。使用 Perl 语言对节点数据进行属性标识。将所有数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 并进行相关参数设置, 最终得到“桑白皮-有效成分-糖尿病周围神经病变靶基因”的中药调控网络图。

## 1.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

使用 R 语言将桑白皮和糖尿病周围神经病变共同靶点的 symbol 转换为基因 ID。在 R 语言中下载“colorspace”“stringi”“DOSE”“clusterProfiler”“pathview”安装包, 运行 R 语言得到 GO 和 KEGG 的柱状图、气泡图、通路图及包含校正后 P 值的结果。图形设置只显示校正后 P 值最小的前 20 个。使用 Perl 将基因的 ID 转换为原始的基因靶点。

## 1.6 成分-靶点分子对接验证

从 RCSB 数据库(<https://www.rcsb.org/>) 下载相关蛋白的结构, 使用 PyMol 软件去除溶剂分子与配体, 使用 AutoDock 软件进行加氢、加电子等操作。从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载化合物结构, 并使用 AutoDock 软件进行加氢、加电子、加 ROOT 等操作。完成后对进行分子对接的蛋白结构设置为刚性大分子, 算法为

Local Search Parameters, 利用 PyMol 软件对每个靶点与药效成分结合能最低的结果进行绘图。

## 1.7 实验验证

### 1.7.1 实验动物

清洁级健康雌性 SD 大鼠 24 只, 体重 200 g ~ 220 g, 购自北京科宇动物养殖中心, 合格证号: SCXK(京)2018-0010。大鼠饲养在清洁、通风、自然光线、温度(25  $\pm$  2)℃、湿度(60  $\pm$  5)% 的常规环境下, 给予自由饮水及普通饲料喂养。

### 1.7.2 实验药物

桑白皮中药饮片购自陕西中医药大学附属医院中药房, 经陕西中医药大学药学院中药教研室鉴定符合《中华人民共和国药典》2020 版规定。

### 1.7.3 主要试剂和仪器

链脲佐菌素(STZ) 购自美国 Sigma 公司; 0.1% mmol/L 枸橼酸缓冲液来自陕西中医药大学生化实验室; 大鼠白介素 6(IL-6)(批号: 20190325) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )(批号: 20190325) ELISA 试剂盒购自北京普尔伟业生物科技有限公司。血糖仪及配套试纸条购自德国拜耳公司; AL204 精密分析天平购自上海精科天平有限公司; Eppendorf 5810R 离心机购自德国 Eppendorf 公司; 0.22  $\mu$ m 注射滤器购自美国 Millipore 公司; 石蜡切片机购自德国 Leica 公司。

### 1.7.4 实验方法

#### 1.7.4.1 糖尿病下肢缺血模型建立

将适应性喂养 1 周的 SD 大鼠分出 8 只给予普通饲料喂养(对照组), 其余给予高脂饲料(77.5% 普通饲料 + 10% 蔗糖 + 2.5% 胆固醇 + 10% 猪油) 喂养 4 周进行造模。用枸橼酸缓冲液(pH 4.5, 0.1% mmol/L) 现配 1% STZ 浓度并一次性注射到高糖高脂饲料喂养大鼠左下腹腔(按 60 mg/kg 体重计算剂量), 普通饲料喂养的大鼠注射枸橼酸缓冲液, 72 h 后尾静脉取血, 用拜耳血糖仪测血糖水平, 凡空腹血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 的大鼠纳入本次实验研究。

所有血糖达标的大鼠均以 10% 水合氯醛 4 mL/kg 腹腔注射麻醉, 切开左股内侧皮肤, 分离股动静脉, 在坐骨神经分三叉处, 用丝线永久结扎股动静脉, 缝合切口, 制成单侧肢体缺血模型, 术后常规注射抗生素预防感染。

#### 1.7.4.2 实验分组及给药

将造模成功的大鼠随机分为模型组 7 只和桑白

皮组 7 只,另从普通饲料喂养的大鼠中选择鼠龄、体重相当的 7 只组成正常对照组。糖尿病下肢缺血模型稳定 3 天后进行药物干预。正常对照组和模型组给予 10 mL/kg 生理盐水灌胃;桑白皮组给予 1.25 g/kg 桑白皮浓缩液(按成人公斤体重用药量换算)进行灌胃,每日一次,每 2 周根据体重调整一次,持续 4 周。

#### 1.7.4.3 治疗前后空腹血糖检测

小鼠治疗前后分别尾静脉取血,用拜耳血糖仪测空腹血糖水平并记录。

#### 1.7.4.4 ELISA 检测血清炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的水平

实验结束后,每组随机选取 3 只大鼠,用 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,无菌采集心脏血并分装,常温下 2 000 rpm 离心 10 min,分离血清。按酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒说明书采用放免法对血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 浓度进行检测。

#### 1.7.4.5 荧光光谱法检测坐骨神经 AGEs 表达

实验结束后,每组随机选取 3 只大鼠,用 10%

的水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,充分暴露左侧坐骨神经,将坐骨神经从胫腓神经分叉处、坐骨切迹处剪断,将坐骨神经组织剪碎,PBS 洗涤,震荡,离心取上清液,用荧光光度计在 370/440 nm 处测定荧光强度,测定值用空白胶原酶校正,AGEs 含量用 AU/mg HYP 表示。

#### 1.7.4.6 统计学分析

用 SPSS23.0 软件进行统计学分析,实验数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较用 *t* 检验,当数据非正态/方差不齐时用 *H* 检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 桑白皮活性成分及相关靶点预测

通过 TCMSP 数据库,以 OB  $\geq 30\%$ 、DL  $\geq 0.18$  为筛选条件,筛选出桑白皮活性化合物 32 个,经去重后得到 31 个桑白皮活性成分(见表 1)。在 TCMSP 数据库中根据桑白皮活性成分提取相关的靶点,结合 Uniprot 数据库,得到桑白皮活性成分相关靶点共 312 个。

表 1 桑白皮的活性成分群  
Table 1 Active components of Mori Cortex

分子号 MOL ID	分子名称 MOL name	生物利用度 OB (%)	类药性 DL	靶点数 Target count
MOL012681	二甲基(甲基 4,1 苯)二氨基甲酸酯 Dimethyl (methylene-4,1-phenylene) bis carbamate	50.84	0.26	5
MOL012686	7-甲氧基-5,4'-二羟基黄烷醇 7-Methoxy-5',4'-dihydroxyflavanonol	51.72	0.26	3
MOL012689	环桑皮烯黄素 Cyclomulberrochromene	36.79	0.87	3
MOL012692	桑皮酮 D Kuwanon D	31.09	0.8	1
MOL012714	桑辛素 A Moracin A	64.39	0.23	1
MOL012717	桑辛素 M-6,3'-di-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 Moracin M-6,3'-di-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	37.81	0.74	-
MOL012719	桑辛素 O Moracin O	62.33	0.44	2
MOL012726	马尔伯罗夫兰 G Mulberrofuran G	92.19	0.24	-
MOL012735	马尔伯罗赛德 C Mulberroside C_qt	71.39	0.46	3
MOL012743	白藜芦醇-3,4'-di-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 Resveratrol-3,4'-di-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	35.08	0.76	-
MOL012749	血根酮 B Sanggenone B	115.44	0.3	-
MOL012753	血根酮 F Sanggenone F	62.42	0.54	9
MOL012755	血根酮 H Sanggenone H	37.5	0.53	6
MOL012760	血根酮 M Sanggenone M	68.29	0.85	2
MOL001474	血根碱 Sanguinarine	37.81	0.86	3
MOL000211	丁子香萜 Mairin	55.38	0.78	1
MOL000358	谷甾醇 Beta-sitosterol	36.91	0.75	26
MOL003758	鸢尾甲黄素 Iristerogenin (9CI)	71.55	0.34	13
MOL003856	桑辛素 B Moracin B	55.85	0.23	5

续表 1(Continued Tab. 1)

分子号 MOL ID	分子名称 MOL name	生物利用度 OB (%)	类药性 DL	靶点数 Target count
MOL003857	桑辛素 C Moracin C	82.13	0.29	4
MOL003858	桑辛素 D Moracin D	60.93	0.38	9
MOL003860	桑辛素 F Moracin F	53.81	0.23	-
MOL004912	光甘草酮 Glabrone	52.51	0.5	14
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28	133
MOL001004	天竺葵苷元 Pelargonidin	37.99	0.21	11
MOL012800	3,5,7-三羟基-2-(3-羟苯基)色酮 3,5,7-Trihydroxy-2-(3-hydroxyphenyl) chromone	59.71	0.24	4
MOL002514	性角拉丁 Sexangularetin	62.86	0.3	4
MOL000422	堪非醇 Kaempferol	41.88	0.24	49
MOL005043	Campestan-5-en-3beta-ol	37.58	0.71	1
MOL000554	没食子酸 3-O-(6'-O-四聚基)-葡萄糖苷 Gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	30.25	0.67	-
MOL009653	环桉烯醇 Cycloeucalenol	39.73	0.79	-

注:“-”表示靶点在 Uniprot 数据库中没有找到。

Note: “-” indicates targets not found in the Uniprot database.

## 2.2 糖尿病周围神经病变相关基因的预测及药物-疾病靶标的预测结果

检索 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中与糖尿病周围神经病变相关疾病基因靶点,经去重后得到 4 661 个疾病相关基因。使用 R 语言将药物靶点与疾病相关基因取交集,得到药物-疾病共同靶点 120 个。并绘制韦恩图,如图 1 所示。

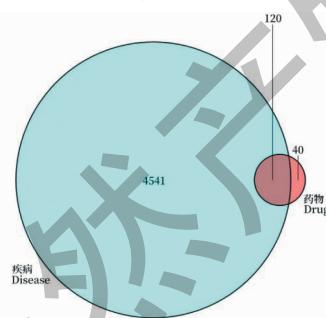


图 1 韦恩图

Fig. 1 Veen diagram

## 2.3 桑白皮-成分-疾病靶点调控网络

通过 Cytoscape 3.7.1 软件将药物的靶基因 312 个与药物-疾病的共同靶点 120 个运用 Perl 命令符取交集,得到桑白皮治疗糖尿病周围神经病变的有效成分 23 个,构建“中药-有效成分-疾病靶基因”中药调控网络图(见图 2)。图中红色椭圆形代表药物,绿色三角形代表基因,蓝色长方形代表中药有效成分。

## 2.4 桑白皮与糖尿病周围神经病变蛋白互作网络(PPI)的构建及核心基因

将韦恩图得到的 120 个潜在基因录入 STRING 数据库中进行分析得到 PPI,其包含 120 个节点,379 条边,平均节点度为 6.32,PPI 富集  $P$  值  $< 1.0 \times 10^{-16}$ ,其中节点代表蛋白,每条边代表蛋白与蛋白之间的关联,线条越多表示关联度越大,如图 3 所示。将 STRING 中下载的 TSV 格式文件用 R 语言进行处理,得到 PPI 核心基因转录因子 AP-1 (JUN)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、转录因子 p65 (RELA)、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、白介素 6 (IL-6) 等,如图 4 所示。

## 2.5 GO 功能富集分析

经 R 语言运行后总共得到 131 个功能,前 20 个功能的 GO 功能富集的气泡图见图 5,校正后的  $P$  值代表富集的程度,  $P$  值越小,富集度越高、越显著,颜色越红;横坐标是关联基因数与总基因数的比值,纵坐标是 GO 的名称。由图可知富集最多的是 DNA 结合转录激活活性, RNA 聚合酶 II 特异性 (DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific), 其次是细胞因子受体结合 (cytokine receptor binding)、受体配体活性 (receptor ligand activity)、细胞因子活性 (cytokine activity)、泛素样蛋白连接酶结合 (ubiquitin-like protein ligase binding)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (protein serine/threonine kinase activity)。

kinase activity)等。

## 2.6 KEGG 通路富集分析

将所得的 120 个共同靶点使用 R 语言进行

KEGG 通路富集分析运行后得到 155 条通路, 表中为显著性最大的 20 条通路, 并做成柱形图(见图 6)。横坐标表示靶点数, 纵坐标标注通路名称, 颜

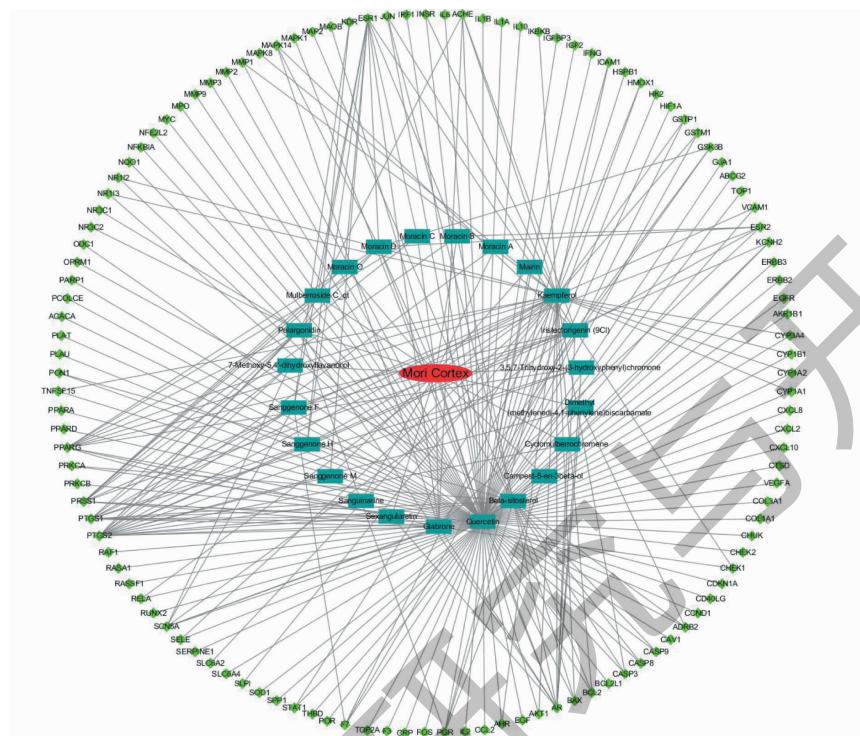


图 2 “桑白皮-成分-DPN 靶点”调控网络图

Fig. 2 “Mori Cortex-active components-targets of DPN” regulatory network

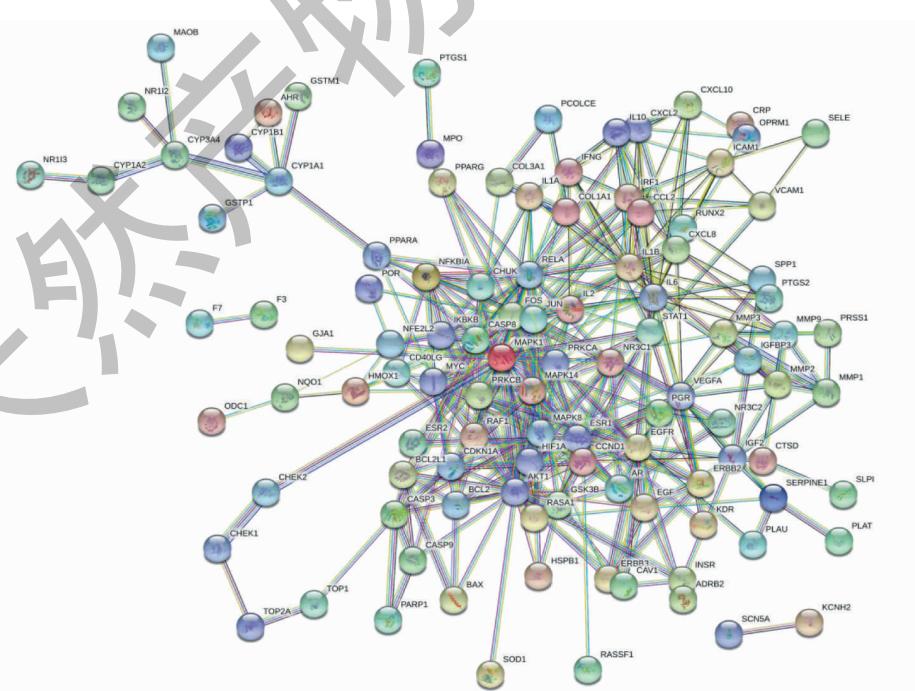


图 3 STRING 数据库分析蛋白的相互作用

Fig. 3 Protein interactions were analyzed by STRING database

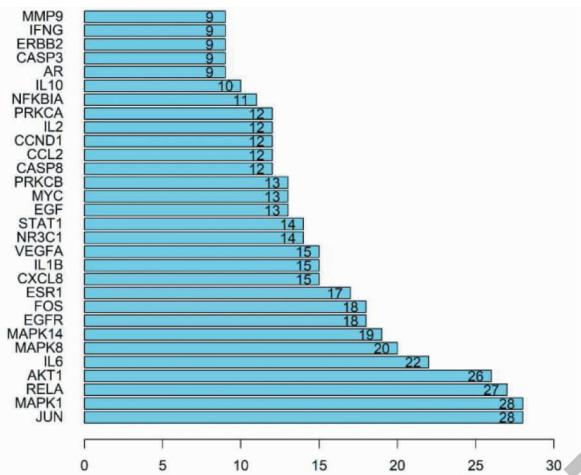


图 4 PPI 核心基因

Fig. 4 PPI network core genes

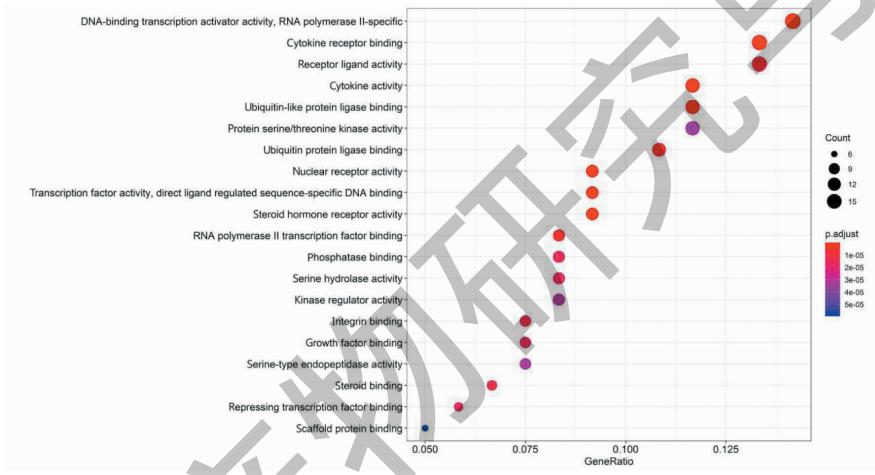


图 5 GO 富集分析气泡图(前 20 条)

Fig. 5 The GO enrichment analysis bubble diagram (Top 20)

色代表富集的程度,颜色越红,富集度越高越显著,校正后的  $P$  值越小。结果显示,富集度最高的信号通路是糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物及其受体信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、流体剪切力和动脉粥样硬化(fluid shear stress and atherosclerosis),其次是卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、MAPK 信号通路(MAPK signalling pathway)、人巨细胞病毒感染(human cytomegalovirus infection)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、乙型肝炎(hepatitis B)、白介素 17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、甲型流感(influenza A)、癌症中蛋白聚糖(proteoglycans in cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、麻疹(measles)、丙型肝

炎(hepatitis C)、再者有南美锥虫病(Chagas disease(American trypanosomiasis))、C 型凝集素受体信号通路(C-type lectin receptor signaling pathway)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、胰腺癌(pancreatic cancer)、内分泌耐药(endocrine resistance)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)和膀胱癌(bladder cancer)共 20 条显著性较高的通路。

## 2.7 桑白皮核心成分与关键靶点的分子对接

从成分-核心靶点网络中将基因靶点以 degree 值高低进行排序,选取前 3 个关键靶点(JUN、MAPK1、RELA)分别与桑白皮治疗糖尿病周围神经病变的 3 个关键药效成分(槲皮素、谷甾醇、山奈酚)进行分子对接,对接最低结合能如表 2 所示。3

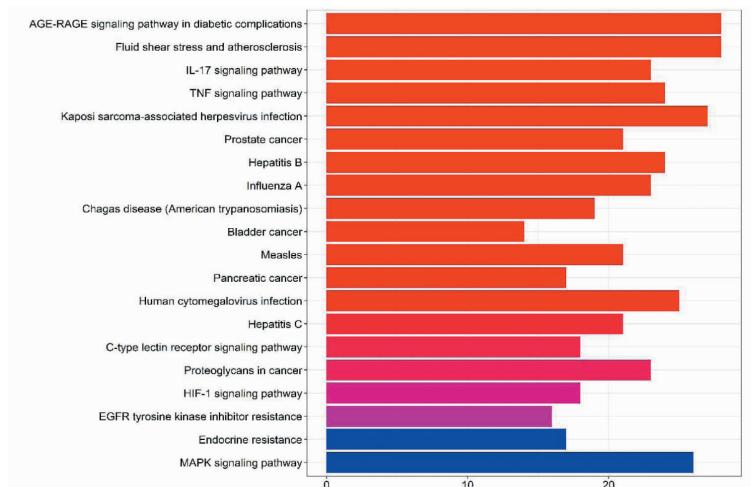


图 6 KEGG 通路分析的柱状图(前 20 条)

Fig. 6 KEGG enrichment analysis histogram (Top 20)

个关键药效成分与 3 个靶标蛋白的最低结合能都小于 0, 最低结合能越小说明分子与靶点蛋白结合越好。此外, 3 个关键药效成分与 MAPK1 最低结合能均小于 -5.0 kJ/mol, 且均小于与 RELA、JUN 的最低对接结合能, 说明 3 个关键药效成分与靶点 MAPK1 结合能力优于 RELA、JUN。由表 2 可知, quercetin 与靶点 MAPK1、RELA 的结合能力优于其他 2 个关键药效成分, 对其对接结果进行可视化如图 7 所示, 其中化合物的结构用棍棒表示, 蛋白质的不同分支用不同的颜色表示, 黄色虚线表示其氢键, 标记了化合物中该氢键与化合物的位置, quercetin 与靶点

MAPK1、RELA 的氢键数目均为 3 个。

表 2 桑白皮主要核心成分与靶点蛋白分子对接结果

Table 2 The docking score of Mori Cortex active component and target protein

成分 Active component	结合能 Binding energy (kJ/mol)		
	MAPK1	JUN	RELA
槲皮素 Quercetin	-8.5	-5.1	-9.1
谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	-8.2	-2.4	-4.5
山奈酚 Kaempferol	-8.3	-4.7	-8.8

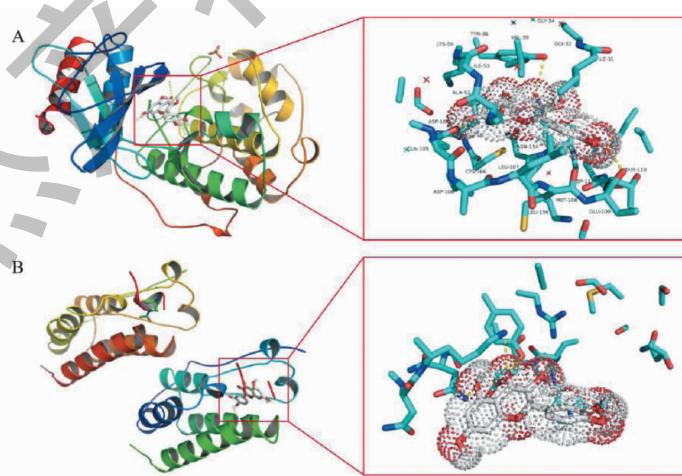


图 7 分子对接模式图

Fig. 7 Molecular docking pattern diagram

注: A;Quercetin 与靶点 MAPK1 蛋白相互作用;B;Quercetin 与靶点 RELA 蛋白相互作用。其中蛋白质的不同分支用不同的颜色表示, 小分子使用 Stick 和 dot 表示, 黄色虚线表示其氢键, 标记了化合物中该氢键与化合物的位置。Note: A; Quercetin interacts with the target MAPK1 protein; B; Quercetin interacts with the target RELA protein. Different branches of the protein are indicated in different colors, the small molecules using Stick and dot, and the yellow dashed lines indicate their hydrogen bond, marking the position of the hydrogen bond to the compound in the compound.

## 2.8 各组大鼠治疗前后空腹血糖的变化情况

各组大鼠治疗前后空腹血糖的变化情况详情见表3。治疗前与正常对照组相比,模型组和桑白皮组空腹血糖值均有明显差异( $P < 0.05$ )。治疗后与正常对照组相比,模型组和桑白皮组空腹血糖值均

有明显差异( $P < 0.05$ );与模型组相比,桑白皮组空腹血糖值有明显差异( $P < 0.05$ ),与治疗前相比,差异显著( $P < 0.05$ )。说明桑白皮有一定的降血糖功效。

表3 各组大鼠治疗前后空腹血糖的变化情况( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 3 Changes in fasting blood glucose before and after treatment in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别 Group	样本数 <i>n</i>	治疗前 Before treatment	治疗后 After treatment
正常对照组 Normal control	7	$5.51 \pm 0.11$	$5.57 \pm 0.08$
模型组 Model group	7	$19.78 \pm 1.23^*$	$20.15 \pm 1.21^*$
桑白皮组 Mori Cortex group	7	$20.19 \pm 1.20^*$	$15.47 \pm 0.99^{*\triangle\#}$

注:与正常对照组相比, $^*P < 0.05$ ;与模型组相比, $^{\triangle}P < 0.05$ ;与治疗前相比, $^{\#}P < 0.05$ 。下同。

Note: Compared with normal control,  $^*P < 0.05$ ; Compared with model group,  $^{\triangle}P < 0.05$ ; Compared with before treatment,  $^{\#}P < 0.05$ . The same below.

## 2.9 ELISA 检测大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 的水平

如表4所示,与正常对照组相比,模型组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.05$ );与模型组相

比,桑白皮组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义。

表4 各组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  的变化情况( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Changes in IL-6 and TNF- $\alpha$  of serum in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	样本数 <i>n</i>	IL-6 (ng/mL)	TNF- $\alpha$ (ng/mL)
正常对照组 Normal control	3	$0.215 \pm 0.011$	$0.667 \pm 0.0311$
模型组 Model group	3	$0.365 \pm 0.013^*$	$1.214 \pm 0.079^*$
桑白皮组 Mori Cortex group	3	$0.301 \pm 0.012^{*\triangle}$	$0.690 \pm 0.060^{\triangle}$

## 2.10 荧光光谱法检测坐骨神经 AGEs 表达

如表5所示,与正常对照组相比,模型组、桑白皮组大鼠坐骨神经 AGEs 增多( $P < 0.05$ );与模型

组相比,桑白皮组坐骨神经 AGEs 明显减少( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义,说明桑白皮能减少 AGEs 表达。

表5 各组大鼠坐骨神经 AGEs 表达情况( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 AGEs expression of the rat sciatic nerve in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	样本数 <i>n</i>	AGEs (AU/mg HYP)
正常对照组 Normal control	3	$12.41 \pm 0.59$
模型组 Model group	3	$42.41 \pm 1.53^*$
桑白皮组 Mori Cortex group	3	$23.27 \pm 1.20^{*\triangle}$

## 3 讨论与结论

糖尿病周围神经病变在中医古籍中无对应病名,根据症状相似性原理,将糖尿病周围神经病变归属于中医“消渴痹证”范畴更为合适,病机与消渴日久,气阴两虚,脉络瘀阻有关。中药桑白皮是桑科资源桑树的干燥根皮,能清肺胃之热,功效堪比“小白虎汤”<sup>[10]</sup>;又能补虚益气(《神农本草经》《本草经

疏》)、活血化瘀(《本草纲目》《得配本草》)、生津止渴(《名医别录》《本草新编》)、止痛(《药性论》《食疗本草》)。药理研究证实桑白皮能增强免疫调节作用,减少 B 细胞抗体的产生<sup>[11]</sup>;能降低血脂,调节糖脂代谢紊乱<sup>[12]</sup>;能舒张血管,增加毛细血管数目,改善血流状态<sup>[13]</sup>;对高糖诱导的 PC12 细胞氧化损伤的神经有保护作用<sup>[14]</sup>。马松涛通过系列实验研

究证实了桑白皮提取物能够增加糖尿病大鼠坐骨神经中 cGMP、cAMP 的含量, 提高红细胞  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATP 酶活性, 改善神经传导速度; 增加血清超氧化物歧化酶的活性, 增加髓鞘蛋白的表达, 促进神经生长因子的表达, 降低神经组织中 AGE 的含量, 使糖尿病周围神经损伤得到一定程度的减轻和修复。我们发现目前的研究缺乏对桑白皮中有效成分作用于机体治疗糖尿病周围神经病变的多靶点、多途径的复杂性研究, 恰恰网络药理学弥补了这一缺陷。

本研究运用网络药理学方法从中药桑白皮中筛选出 31 个活性成分, 312 个活性成分相关靶点; 利用 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库查找到 4 661 个糖尿病周围神经病变相关基因; 将中药桑白皮和疾病糖尿病周围神经病变相关基因取交集, 得到桑白皮-糖尿病周围神经病变的共同靶点 120 个。将桑白皮的活性成分相关靶点与桑白皮-糖尿病周围神经病变的共同靶点取交集, 得到桑白皮治疗糖尿病周围神经病变的有效成分 23 个, 并构建了“中药-有效成分-靶基因-疾病”中药调控网络图。将桑白皮-糖尿病周围神经病变的共同靶点录入 STRING 数据库中进行分析得到 PPI 网络图, 发现 PPI 核心基因转录因子 AP-1 (JUN)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、转录因子 p65 (RELA)、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、白介素 6 (IL-6) 等。有研究证实外周神经系统的神经胶质细胞雪旺细胞, 能够通过衰减转录因子 AP-1 (JUN) 促进周围神经的再髓鞘化, 改善糖尿病周围神经病变脱髓鞘的病理<sup>[15]</sup>; MAPK1 通过抑制神经系统应激活化蛋白激酶的激活延缓糖尿病周围神经病变的发生发展<sup>[16]</sup>; RELA、IL-6 与炎症调节反应相关<sup>[17]</sup>; AKT1 影响到胰岛  $\beta$  细胞和神经细胞的增殖、凋亡和再生<sup>[18]</sup>。

GO 富集分析结果表明中药桑白皮治疗糖尿病周围神经病变富集度最多的是 DNA 结合转录激活活性, RNA 聚合酶 II 特异性 (DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific), 其次是细胞因子受体结合 (cytokine receptor binding)、受体配体活性 (receptor ligand activity)、细胞因子活性 (cytokine activity)、泛素样蛋白连接酶结合 (ubiquitin-like protein ligase binding)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (protein serine/threonine kinase activity) 等。涉及基因转录、细胞因子活性、蛋白激酶等生物学过程, 表明中药桑白皮通过参与多种生物学过程发挥干预治疗糖尿病周围神经病变的作用。KEGG

通路富集分析显示中药桑白皮治疗糖尿病周围神经病变通路中显著性最高的是糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物及其受体信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、流体剪切力和动脉粥样硬化 (fluid shear stress and atherosclerosis), 其次是卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染 (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、人巨细胞病毒感染 (human cytomegalovirus infection) 和肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway) 等。糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物及其受体信号通路与氧化应激的关系非常密切, AGE 的积累和 RAGE 的激活可持续地诱导氧化应激<sup>[19]</sup>, 也可以引起糖尿病患者的免疫失衡<sup>[20]</sup>, 是糖尿病周围神经病变发生的重要环节。研究发现 AGEs 的积累可以激活 p38 MAPK, 导致神经元凋亡<sup>[21]</sup>。活性成分山奈酚已被证实通过减少 AGE 的形成和积累, 减轻 STZ 诱导糖尿病大鼠神经炎症反应, 降低糖尿病神经病变疼痛敏感性<sup>[22]</sup>。MAPK 信号通路由 p38 MAPK、胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2)、c-Jun 氨基 (N)-末端激酶 1/2/3 (JNK1/2/3) 和 ERK5 四条途径组成。MAPK 信号通路与炎症、氧化应激、基因工程等密切相关, Ren<sup>[23]</sup> 等通过研究发现 MAPK 信号通路中的长的非编码 RNAs (lncRNAs) 通过增强嘌呤受体介导的神经性疼痛、释放炎症因子的表达介导糖尿病神经病变的发生。因此, 可以通过干预 MAPK 信号通路保护糖尿病周围神经病变。在 KEGG 分析中, MAPK 信号通路是富集基因较多的信号通路, 我们可以推测 MAPK 通路可能是中药桑白皮治疗糖尿病周围神经病变的关键通路之一。肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway) 中具有代表性的因子当属 TNF- $\alpha$ , 其是一个很重要的炎症因子, 由活化的巨噬细胞、淋巴细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞产生, 对神经元和神经胶质细胞产生毒性作用, 导致神经细胞的损伤和神经纤维脱髓鞘; 也刺激血管内皮细胞和单核细胞分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6, 加重内皮细胞的炎症反应, 对血管内皮细胞造成损伤<sup>[24]</sup>。研究发现糖尿病和糖尿病周围神经病变患者体内 TNF- $\alpha$  水平升高, 神经组织中髓鞘碱性蛋白表达降低; 用重组人 TNF- $\alpha$  受体抗体融合蛋白 (rhTNFR: Fc) 抑制 TNF- $\alpha$  的表达后, 神经传导速度、纤维脱髓鞘及轴突结构紊乱的现象得到改善, 髓鞘碱性蛋白表达有所提升, 说明 TNF- $\alpha$  在糖尿病周

围神经病变的发病机制中有重要的作用<sup>[25]</sup>。本研究将桑白皮筛选出的核心成分与关键靶点全部成功对接,其中3个关键药效成分与靶点MAPK1结合能最优,3个关键药效分子中槲皮素与靶点MAPK1、RELA的结合能优于其他2个关键药效成分,均小于-8.0 kJ/mol,提示桑白皮中的核心成分与关键靶点有着较好的结合活性,说明它们可能是治疗糖尿病周围神经病变的潜在活性成分。说明通过网络药理学-分子对接技术推测出桑白皮治疗糖尿病周围神经病变的潜在活性成分和关键靶点具有一定的科学依据和理论支撑。酶联免疫吸附实验和荧光光谱实验结果显示,模型组中IL-6、TNF- $\alpha$ 、AGEs水平均升高,桑白皮能够降低IL-6、TNF- $\alpha$ 水平,减少AGEs表达,说明其能够抑制IL-6、TNF- $\alpha$ 、AGEs的表达进而保护糖尿病周围神经免受损害。

综上所述,本研究从网络药理学和分子对接的角度展示了桑白皮防治糖尿病周围神经病变是通过槲皮素、谷甾醇、山柰酚等有效成分作用于MAPK1、JUN、RELA等多种基因靶点,从而影响AGE-RAGE信号通路、流体剪切力和动脉粥样硬化、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、MAPK信号通路、人巨细胞病毒感染、肿瘤坏死因子信号通路等多种通路发挥作用,从实验方面也验证了部分网络药理学的结果,证实桑白皮治疗糖尿病周围神经病变具有多成分、多靶点、多通路的特点。为中医药尤其是桑科资源防治糖尿病周围病变提供数据支撑,为桑科资源的传承与创新贡献绵薄力量,为临床应用提供理论基础。

## 参考文献

- Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, et al. Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association[J]. Diabetes Care, 2017, 40(1): 136-154.
- Jaiswal M, Lauer A, Martin CL, et al. Peripheral neuropathy in adolescents and young adults with type 1 and type 2 diabetes from the SEARCH for Diabetes in Youth follow-up cohort: a pilot study[J]. Diabetes Care, 2013, 36: 3903-3908.
- Dewanjee S, Das S, Das AK, et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 833: 472-523.
- Ma LL, Zou XR, Liu Q, et al. Role of mulberry resources in the prevention and treatment of type 2 diabetes [J]. Chin Tradit Herb Drug (中草药), 2014, 45: 3337-3342.
- Liu HM, Li YL, Huang ZY. Progress in the pharmacological effects of Mori Cortex[J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2019, 25(20): 229-234.
- Ma ST, Zhang XK. Effect of mulberry white skin extract on the expression of nerve growth factor and basic myelin protein in diabetic rats[J]. J Basic Chin Med (中国中医基础医学杂志), 2007; 760.
- Ma ST, Zhang XK, Wang QL. Experimental study on the effect of mulberry white skin extract on sciatic nerve structure in diabetic rats[J]. Chin J Appl Physiol (中国应用生理学杂志), 2008(2): 201-204.
- Ma ST, Wang QL, Zhang XK. Protective effect of mulberry white skin extract on experimental diabetic neuropathy[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2006: 776-777.
- Casas AI, Hassan AA, Larsen SJ, et al. From single drug targets to synergistic network pharmacology in ischemic stroke [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116: 7129-7136.
- Wang Han, Gu CJ, Tong XL. Mulberry leaf, mulberry branch, Mori Cortex treatment of diabetes experience-Tong XL small extract[J]. Jilin J Tradit Chin Med (吉林中医药), 2019, 39: 1463-1465.
- Kim HM, Han SB, Lee KH, et al. Immunomodulating activity of a polysaccharide isolated from Mori Cortex Radicis [J]. Arch Pharm Res, 2000, 23(3): 240-242.
- Hou XD, Ge GB, Weng ZM, et al. Natural constituents from Cortex Mori Radicis as new pancreatic lipase inhibitors[J]. Bioorg Chem, 2018, 80: 577-584.
- Lian JF, Chen JY, Yuan YY, et al. Cortex Mori Radicis extract attenuates myocardial damages in diabetic rats by regulating ERS[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 777-785.
- You S, Kim GH. Protective effect of Mori Cortex Radicis extract against high glucose-induced oxidative stress in PC12 cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83: 1893-1900.
- Kim S, Maynard JC, Strickland A, et al. Schwann cell O-GlcNAcylation promotes peripheral nerve remyelination via attenuation of the AP-1 transcription factor JUN[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115: 8019-8024.
- Zhou CL, Li F, Wu XW, et al. Overexpression of miRNA-433-5p protects acute spinal cord injury through activating MAPK1[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24: 2829-2835.
- Heyne K, Winter C, Gerten F, et al. A novel mechanism of crosstalk between the p53 and NF- $\kappa$ B pathways: MDM2 binds and inhibits p65RelA[J]. Cell Cycle, 2013, 12: 2479-2492.
- Chen L, Gong HY, Xu L. PVT1 protects diabetic peripheral neuropathy via PI3K/AKT pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22: 6905-6911.

- 19 Wang JB, Tian GQ. Current status of PI3K/Akt signaling to regulate cognitive dysfunction in diabetes [J]. Beijing J Tradit Chin Med(北京中医药), 2016, 35:823-827.
- 20 Hu H, Jiang HF, Ren HT, et al. AGEs and chronic subclinical inflammation in diabetes: disorders of immune system [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2015, 31(2):127-137.
- 21 Shi L, Yu XM, Yang HL, et al. Advanced glycation end products induce human corneal epithelial cells apoptosis through generation of reactive oxygen species and activation of JNK and p38 MAPK pathways [J]. PLoS One, 2013, 8 (6):67-81.
- 22 Kishore L, Kaur N, Singh R. Effect of kaempferol isolated from seeds of *Eruca sativa* on changes of pain sensitivity in Streptozotocin-induced diabetic neuropathy [J]. Inflammopharmacology, 2018, 26:993-1003.
- 23 Ren XL, Yang RN, Li L, et al. Long non coding RNAs involved in MAPK pathway mechanism mediates diabetic neuropathic pain [J]. Cell Biol Int, 2020, 8 (26):114-157.
- 24 Li DL, He T, Chen BT, et al. Study on the mechanism of different parts of *Morus alba* L. in preventing and treating diabetes based on the network pharmacology-molecular docking [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:291-303.
- 25 Shi X, Chen Y, Nadeem L, et al. Beneficial effect of TNF- $\alpha$  inhibition on diabetic [J]. J Neuroinflamm, 2013, 10 (1):1-9.

## 《天然产物研究与开发》青年编委会

### 青年编委(以姓氏笔划为序)

#### Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊	欧阳杰
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun	OUYANG Jie
易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚
YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang
高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武
GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu
蓝蔚青	廖晨钟	薛永波			
LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo			