

基于网络药理学探讨金钱草治疗肾结石的作用机制

王亚婷¹, 刘 昱¹, 李明权²

(1.成都中医药大学临床医学院, 四川 成都 610075;

2.成都中医药大学附属医院肾病二科, 四川 成都 610075)

摘要: **目的** 基于网络药理学探讨金钱草治疗肾结石的可能分子机制。**方法** 基于 TCMSP、SwissTargetPrediction 数据库及 Uniprot 数据库筛选出金钱草的有效成分及靶点基因, 通过 GeneCards 数据库及 OMIM 数据库筛选出肾结石的疾病靶点基因, 用 Cytoscape 软件构建“药物-活性成分-疾病-靶点”相互作用网络图, 将有效成分靶标与疾病靶标上传到 String 数据库, 构建蛋白互作用网络图(PPI), 并计算其特征值, 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基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。**结果** 共筛选得到金钱草 10 个活性成分, 涉及 82 个作用靶点; 网络分析显示, 靶点主要涉及 NF- κ B 结合、热休克蛋白结合、核受体活性、转录因子活性, 直接的配体调节序列特异性 DNA 结合、类固醇结合、组蛋白激酶活性等生物学过程; 富集分析显示, 相关基因主要通过调节前列腺癌、Apoptosis、MAPK、p5 等信号通路来发挥治疗肾结石的作用。**结论** 金钱草中的槲皮素、山柰酚、金合欢素可能是其治疗肾结石的物质基础, 其作用机制涉及了 NF- κ B 结合、热休克蛋白结合、核受体活性、转录因子活性, 直接的配体调节序列特异性 DNA 结合、类固醇结合、组蛋白激酶活性等。

关键词: 金钱草; 肾结石; 网络药理学

中图分类号: R692.4

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2022.02.017

文章编号: 1006-1959(2022)02-0069-06

Mechanism of Herba Lysimachiae on Renal Calculi Based on Network Pharmacology

WANG Ya-ting¹, LIU Yu¹, LI Ming-quan²

(1.School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan, China;

2.The Second Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan, China)

Abstract: **Objective** To explore the possible molecular mechanism of Lysimachia in the treatment of renal calculi based on network pharmacology. **Methods** The effective components and target genes of Herba Lysimachiae were screened based on TCMSP, SwissTargetPrediction database and Uniprot database. The disease target genes of kidney stones were screened by GeneCards database and OMIM database. The "drug-active components-disease-target" interaction network diagram was constructed by Cytoscape software. The effective components and disease targets were uploaded to the String database. The protein interaction network diagram (PPI) was constructed and the eigenvalues were calculated. R language was used to screen the core genes of PPI, and R language was used to perform gene ontology (GO) enrichment analysis of key targets and Kyoto gene and genome encyclopedia (KEGG) pathway enrichment analysis. **Results** Ten active components of Lysimachia christinae were screened, involving 82 action targets. Network analysis showed that the target mainly involved in NF- κ B binding, heat shock protein binding, nuclear receptor activity, transcription factor activity, direct ligand regulatory sequence specific DNA binding, steroid binding, histone kinase activity and other biological processes; enrichment analysis showed that related genes mainly played a role in the treatment of renal calculi by regulating prostate cancer, apoptosis, MAPK, p5 and other signaling pathways. **Conclusion** Quercetin, kaempferol and acacia in S. mandshurica may be the material basis for its treatment of renal calculi. Its mechanism involves NF- κ B binding, heat shock protein binding, nuclear receptor activity, transcription factor activity, and direct ligand regulation of sequence-specific DNA binding, steroid binding, and histone kinase activity.

Key words: Lysimachia; Nephrolithiasis; Network pharmacology

肾结石(nephrolithiasis)是晶体物质(如钙、草酸、尿酸、胱氨酸等)在肾脏的异常聚集所致,是泌尿系统的常见病、多发病。该病主要临床表现为活动后剧烈腰痛、血尿、尿急、尿痛。有研究表明^[1],我国泌尿系结石的发病率为 1%~5%,南方地区高达 5%~10%。目前,肾结石的主要治疗方式包括:①经皮肾镜碎石取石术;②体外震波碎石术(ESWL);③肾实质切开手术;④服用解痉、抗炎药物^[2]。虽然上述治疗方法效果良好,但患者术后结石残留率及复发率仍居高不下^[3]。近年来,关于中医药治疗肾结石的研究

报道越来越多,证实了金钱草治疗肾结石具有良好的效果^[4]。金钱草,味甘、咸,微寒,归肝、胆、肾、膀胱经,具有利尿通淋、利湿退黄、解毒消肿之功效^[5]。临床上可用于治疗湿热黄疸、胆胀胁痛、石淋、热淋、小便涩痛、痈肿疔疮、蛇虫咬伤等疾病^[6]。现代研究表明^[7],金钱草可发挥利尿、抑制草酸钙形成、降低血尿酸水平、抗炎镇痛、抗氧化、肾脏保护等作用来治疗肾结石,具有很好的临床疗效。虽然金钱草治疗肾结石具有良好的效果,但因中药多成分、多靶点和多途径的特点,金钱草的药效物质基础及作用机制尚未明确。网络药理学是以系统生物学和多向药理学等多学科理论为基础,从多维度视角理解药物干预疾病的分子机制。大量研究表明,通过网络药理学研究中药的作用机制准确可靠。为此,本研究以金钱

作者简介:王亚婷(1995.11-),女,甘肃天水人,硕士研究生,主要从事中西医结合治疗肾病的研究

通讯作者:李明权(1963.8-),男,四川成都人,博士,主任医师,博士生导师,主要从事中西医结合治疗肾病的研究

草10个成分为基础,运用网络药理学方法构建药物-活性成分-疾病-靶点网络,并进行网络拓扑学分析,探讨其多成分、多靶点、多通路的作用机制,旨在为金钱草治疗肾结石作用机制的深入研究奠定基础。

1 资料与方法

1.1 化学成分的收集 利用TCMSP数据库(<http://tcmsp.com/tcmssp.php>),获取金钱草的化学成分。通过口服生物利用度(OB)和类药性(DL),筛选出同时满足 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 的化学成分。

1.2 预测潜在靶点 通过TCMSP(<http://tcmsp.com/tcmssp.php>)和SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库筛选出化学成分的靶标蛋白,使用Perl语言并结合Uniprot数据库,得到金钱草的靶点基因。在OMIM(<http://ci.smu.edu.cn/CoolGen/>)和GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库中输入关键词“kidney stone”搜索已报道与肾结石相关的基因,并去除重复靶点。然后把所得疾病靶点与金钱草靶点基因使用R语言程序进行对比,以此筛选出共同的靶点,绘制韦恩图。

1.3 网络模型的构建 通过将金钱草和肾结石共同作用的靶点导入String数据库(<https://string-db.org/>),限定物种为人,进行蛋白互作用分析(PPI)。为确保数据的可靠性,选取 $high\ score > 0.9$ 的高置信度,保存结果。

1.4 基因本体(GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 首先,对上述所得的靶点进行ID转换,使用R语言将金钱草与肾结石的共作靶点转换成entrezID;其次,在R语言中调用生物类的程序包,如clusterProfiler,bioconductor等进行数据的处理;然后,运行R语言得到GO和KEGG富集分析的条形图、气泡图、通路图及包含P值的结果,如果是图形则设置只显示P值最小的前20个;最后,使用Perl将转换的entrez ID变成原始基因靶点。

2 结果

2.1 活性成分的筛选 在TCMSP数据库中,根据OB、DL值筛选到符合条件的10种化学成分,见表1。

2.2 作用靶点的预测 将TCMSP、Swisstargetprediction数据库得到的所有靶点,删除重复并去除假阳性,整合得到金钱草活性成分作用靶点331个;疾病靶点与金钱草靶点基因对比,筛选出二者共同靶点82个,绘制韦恩图见图1。

2.3 网络药理可视化 通过Cytoscape 3.7.1软件将金钱草10个活性成分与82个金钱草治疗肾结石的靶点相连,绘制出金钱草的“药物-活性成分-疾病-靶点”相互作用的网络图,见图2。

2.4 金钱草与肾结石蛋白质相互作用网络的构建 将筛选到的靶点输入String数据库中,限定物种为人,共涉及82个节点,188条边。其中排名前5的蛋白包括HSP90AA1(20)、EGFR(15)、CCND1(13)、ESR1(13)和RELA(13),见图3、图4。

2.5 GO功能富集分析 将药物和疾病共同作用的82个靶点经R语言进行GO功能富集分析,前20个功能的GO功能富集分析见图5,其涉及NF- κ B结合、热休克蛋白结合、核受体活性、转录因子活性,直接的配体调节序列特异性DNA结合、类固醇结合、组蛋白激酶活性等生物学过程。

2.6 KEGG通路富集分析 将所得的82个共作靶点使用R语言程序进行KEGG通路富集分析,运行后得到119条通路,见图6。结果显示,金钱草治疗肾结石除了涉及Prostate cancer、Fluid shear stress and atherosclerosis等显著性较高的通路,还涉及Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection、Hepatitis B、Apoptosis、Proteoglycans in cancer、TNF signaling pathway、p53 signaling pathway、MicroRNAs in cancer、PI3K-Akt signaling pathway、Bladder cancer、Human cytomegalovirus infection、Colorectal cancer、Measles、small cell lung cancer、Human immunodeficiency virus 1 infection、MAPK signaling pathway、Endocrine resistance、Hepatitis C及Pancreatic cancer等18条具有显著性的通路。

表1 金钱草的10种化学成分

编号	化合物	OB(%)	DL
1	rhamnocitrin-3,4'-diglucoside	32.52	0.64
2	acacetin	34.97	0.24
3	sitosterol	36.91	0.75
4	daucosterol-qt	36.91	0.75
5	Linarin	39.84	0.71
6	kaempferol	41.88	0.24
7	quercetin	46.43	0.28
8	ent-Epicatechin	48.96	0.24
9	isorhamnetin	49.6	0.31
10	Hesperetin	70.31	0.27

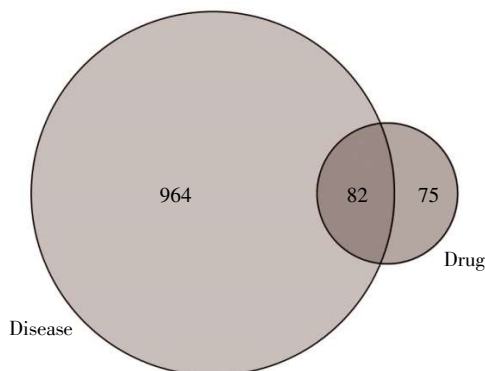


图1 作用靶点

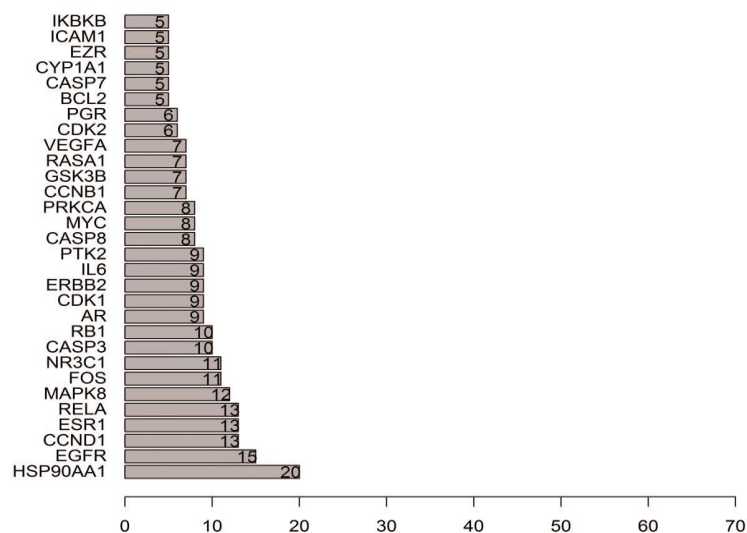


图 4 PPI 中的核心基因

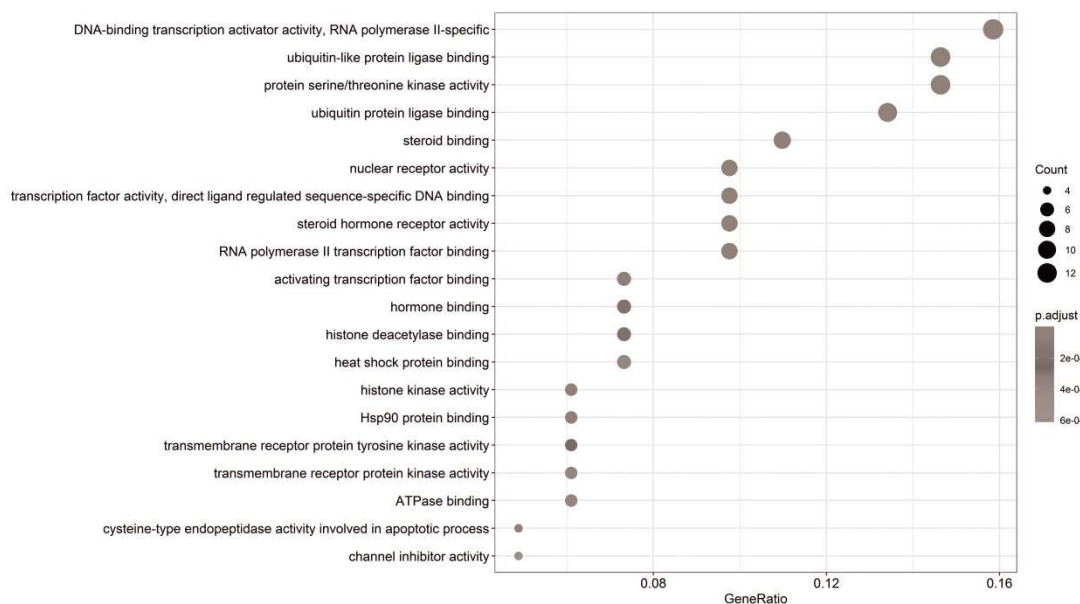


图 5 金钱草治疗肾结石候选靶点的 GO 富集分析

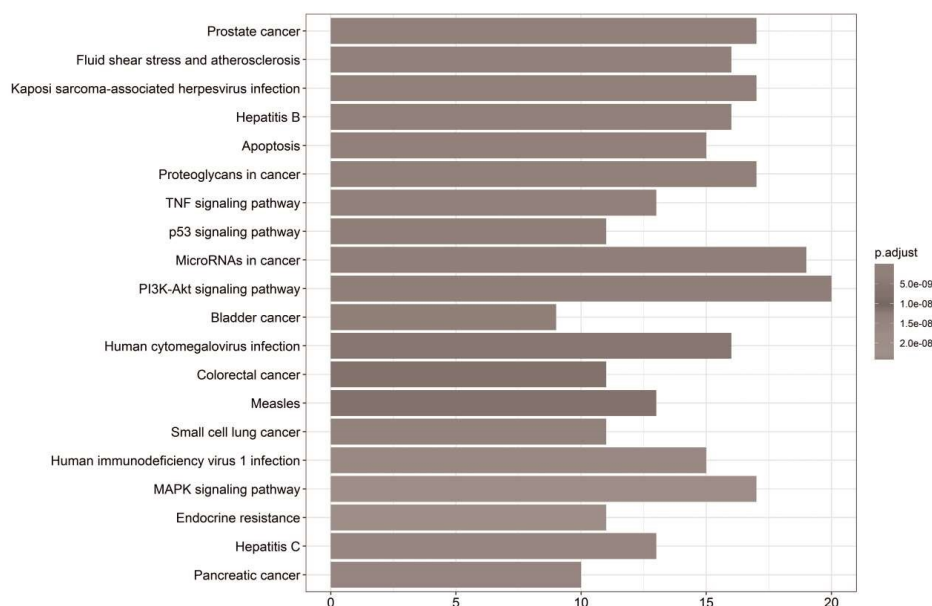


图 6 金钱草-肾结石潜在靶点 KEGG 通路富集分析

3 讨论

本研究结果显示,通过 TCMSP 数据库共筛选出 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 的金钱草候选成分 10 个。将金钱草靶点与肾结石靶点取交集,得到药物-疾病共靶点 82 个。在金钱草的药物-活性成分-疾病-靶点网络图中清晰可见相同成分作用于多靶点,每 1 个靶点也可对应多个成分,充分体现了中药多成分、多靶点的特点。与此同时,活性成分中度值最高的包括槲皮素、山柰酚和金合欢素,这些成分均对肾脏疾病具有治疗作用。槲皮素是一种天然黄酮类化合物,除具有抗氧化和抗肿瘤等作用外,还能够减少细胞凋亡、缓解炎症反应^[8]。有研究显示^[9],槲皮素通过作用于紧密连接蛋白(claudins),导致上皮屏障更紧密,可能会减少钠、钙和水的重吸收,从而防止肾结石的形成。山柰酚存在于多种中药之中,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用。研究发现^[10],山柰酚在糖尿病肾病中能够有效提高 AGE 诱导的肾小球系膜细胞中的超氧化物歧化酶的活性,降低丙二醛含量,抑制活性氧生成并防止氧化应激等,为未来治疗糖尿病肾病提供了新的思路。金合欢素是一种天然树脂衍生物,具有抗炎、抗氧化作用。研究证实^[11],金合欢素对动物和人类的肾脏均具有保护作用。本次研究中靶点中度值最高的为 CYP1B1、ALOX5、ESR2。CYP1B1 属于细胞色素 P450 超家族,参与了多种化合物代谢(包括致癌物)。既往研究表明^[12],CYP1B1 可能通过诱导 CDC20 表达并通过下调 DAPK1 抑制细胞凋亡来促进肾细胞癌的发展,为肾细胞癌的治疗提供了新的方向。ALOX5 是由巨噬细胞产生,能够催化花生四烯酸向白三烯 A4 转化的限速酶,在单侧输尿管梗阻(UUO)、叶酸肾病和直系同源小鼠多囊性肾脏疾病模型中被强烈诱导,而抑制 ALOX5 通路可抑制单侧输尿管梗阻、叶酸肾病患者的肾脏纤维化^[13]。草酸是导致肾结石发病的重要物质。据报道^[14],ESR2 信号可通过乙醛酸氨基转移酶(AGT1)表达的转录上调抑制草酸的生物合成,进而抑制草酸盐诱导的氧化应激。据此,推测槲皮素、山柰酚、金合欢素可能作用于 CYP1B1、ALOX5、ESR2 等关键靶点,在金钱草的药理中发挥重要作用。

基于 STRING 数据库构建靶点交互作用网络,分析得到 HSP90AA1(20)、EGFR(15)、ESR1(13)、RELA(13)等治疗肾结石的核心靶点。它们是参与肾结石的病理过程,也是金钱草治疗肾结石的关键靶点所在。HSP90AA1 是 HSP90 的一种亚型。HSP90 是一种普遍表达,高度保守的应激蛋白,能够与多种蛋白质相互作用并调节其活性。有研究指出^[15],在肾脏内转染 HSP90 α 或 HSP90 β 可以有效防止缺血/再灌注肾损伤。RELA 在调控炎症的细胞信号系统——NF- κ B 信号通路中起着极其重要的作用,而

肾结石的发病又与 NF- κ B 信号通路密切相关^[16]。

GO 富集结果表明,金钱草的活性成分靶点会影响 NF- κ B 结合、热休克蛋白结合。NF- κ B 是转录因子家族通用名称,能够调节涉及免疫、炎症和细胞存活的基因。Lu Y 等^[17]通过对建立的 miRNA 网络进行分析,提出 NF- κ B 可能在尿钙过多的尿路结石症中起关键作用。有研究表明^[18],热休克蛋白 HSP90 能够充当肾小管上皮细胞顶膜上一水草酸钙晶体的潜在受体,参与晶体的内吞/内化作用,从而预防肾结石的形成。此外,金钱草活性成分靶点还可影响核受体活性、转录因子活性,直接的配体调节序列特异性 DNA 结合、类固醇结合、组蛋白激酶活性等生物学过程。KEGG 通路分析显示,前列腺癌信号通路为显著性最高的信号通路。该通路包含了 PI3K-Akt、Apoptosis、MAPK、p53 等主要信号通路,其中 MAPK 信号通路涉及了细胞增殖、分化、迁移等多种细胞功能。研究表明,草酸盐是肾结石形成的重要因素。研究发现^[19],草酸盐和草酸钙晶体均选择性激活了 p38-MAPK 信号转导,因此通过抗氧化剂阻断 NF- κ B 和 p38-MAPK 激活可能是治疗和预防尿酸结石的有效策略。p53 激活是由包括 DNA 损伤、氧化应激和激活的癌基因等应激信号所诱导的。此外,p53 蛋白还可对细胞周期停滞、细胞衰老或凋亡进行调节。既往研究表明,草酸盐诱导的体外细胞凋亡增加可能有助于结石形成。Miyazawa K 等^[20]对结石大鼠进行观察发现,大鼠肾脏中 p53 基因的 mRNA 上调,由此推测,肾结石的发病可能与 p53 上调有关。

本研究不足:本实验的网络药理学研究是基于生物信息学及数据库的计算得出结果,后续将在此基础上进行进一步筛选和体内外实验验证,从而明确金钱草治疗肾结石的主要调控靶点。

综上所述,金钱草中槲皮素、山柰酚、金合欢素等有效成分可能通过影响 NF- κ B 结合、热休克蛋白结合、核受体活性、转录因子活性,直接的配体调节序列特异性 DNA 结合、类固醇结合、组蛋白激酶活性等机制发挥抗肾结石的作用。

参考文献:

- [1]罗冬珍,吴昕,卢利员,等.泌尿系结石与中医体质类型相关性研究[J].内蒙古中医药,2015(6):121.
- [2]陈菊飞,陈红波.B 超评估中药排石汤治疗肾结石的临床疗效分析[J].中华中医药学刊,2015,33(2):373-374.
- [3]杨程.中西医结合治疗泌尿系结石的临床疗效[J].包头医学院学报,2016,32(9):114-115.
- [4]邓律胤,吕纪华,王丽,等.广金钱草总黄酮片对大鼠肾结石的作用[J].世界中西医结合杂志,2019,14(9):1252-1255.
- [5]国家中医药管理局,《中华本草》编委会.中华本草全 10 册[M].上海:上海科学技术出版社,2018.
- [6]李军,蔡泓,王君明,等.金钱草化学成分、药理作用及临床应

- 用[J].中国老年学杂志,2017,37(24):6262-6264.
- [7]蔡华芳.金钱草治疗尿结石的作用和机理研究[J].中国医疗前沿,2010,5(12):7-8.
- [8]叶苗,刘丽仙,梁晓美.槲皮素对大鼠肾缺血再灌注损伤模型的保护作用[J].中国中西医结合肾病杂志,2019,20(12):1041-1043.
- [9]Zhu W,Xu YF,Feng Y,et al.Prophylactic effects of quercetin and hyperoside in a calcium oxalate stone forming rat model[J].Urolithiasis,2014,42(6):519-526.
- [10]Jiang W,Wang R,Liu D,et al.Protective Effects of Kaempferitrin on Advanced Glycation End Products Induce Mesangial Cell Apoptosis and Oxidative Stress [J].Int J Mol Sci, 2018,19(11):3334.
- [11]Ali BH,Za'abi MA,Karaca T,et al.Potassium bromate -induced kidney damage in rats and the effect of gum acacia there-on[J].Am J Transl Res,2018,10(1):126-137.
- [12]Mitsui Y,Chang I,Fukuhara S,et al.CYP1B1 promotes tumorigenesis via altered expression of CDC20 and DAPK1 genes in renal cell carcinoma[J].BMC Cancer,2015(15):942.
- [13]Montford JR,Bauer C,Dobrinskikh E,et al.Inhibition of 5-lipoxygenase decreases renal fibrosis and progression of chronic kidney disease[J].Am J Physiol Renal Physiol,2019,316(4):732-742.
- [14]Zhu W,Zhao Z,Chou FJ,et al.The Protective Roles of Estrogen Receptor β in Renal Calcium Oxalate Crystal Formation via Reducing the Liver Oxalate Biosynthesis and Renal Oxidative Stress-Mediated Cell Injury [J].Oxid Med Cell Longev, 2019:5305014.
- [15]Barrera-Chimal J,Pérez-Villalva R,Ortega JA,et al.Intra-renal transfection of heat shock protein 90 alpha or beta (Hsp90 α or Hsp90 β) protects against ischemia/reperfusion injury [J].Nephrol Dial Transplant,2014,29(2):301-312.
- [16]Jiang H,Gao X,Gong J,et al.Downregulated Expression of Solute Carrier Family 26 Member 6 in NRK-52E Cells Attenuates Oxalate-Induced Intracellular Oxidative Stress [J].Oxid Med Cell Longev,2018:1724648.
- [17]Lu Y,Qin B,Hu H,et al.Integrative microRNA-gene expression network analysis in genetic hypercalciuric stone-forming rat kidney[J].Peer J,2016(4):e1884.
- [18]Fong-Ngern K,Sueksakit K,Thongboonkerd V.Surface heat shock protein 90 serves as a potential receptor for calcium oxalate crystal on apical membrane of renal tubular epithelial cells [J].Biol Inorg Chem,2016,21(4):463-474.
- [19]Ilbey YO,Ozbek E,Simsek A,et al.Effects of pomegranate juice on hyperoxaluria-induced oxidative stress in the rat kidneys[J].Ren Fail,2009,31(6):522-531.
- [20]Miyazawa K,Suzuki K,Ikeda R,et al.Apoptosis and its related genes in renal epithelial cells of the stone-forming rat [J].Urol Res,2005,33(1):31-38.

收稿日期:2021-08-27;修回日期:2021-09-08

编辑/成森