

基于网络药理学与分子对接方法研究菟丝子对  
2型糖尿病的作用研究Effect of Cuscutae Semen on the type - 2 diabetes mellitus based on network  
pharmacology and molecule docking method于莹<sup>1a</sup>, 张功<sup>1a</sup>, 韩涛<sup>1a</sup>,  
黄海量<sup>1b</sup>(1. 山东中医药大学, a. 中医学学院; b. 康复学  
院, 济南 250355)YU Ying<sup>1a</sup>, ZHANG Gong<sup>1a</sup>,  
HAN Tao<sup>1a</sup>, HUANG Hai-liang<sup>1b</sup>(1. a. College of Traditional Chinese  
Medicine; b. College of Rehabilitation  
Medicine, Shandong University of  
Traditional Chinese Medicine, Jinan  
250355, Shandong Province China)

收稿日期: 2020-02-04

定稿日期: 2020-03-10

基金项目: 山东省中医药科技发展计划基金资  
助项目(2017-018; 2015-030); 山  
东省名老中医药专家刘昭纯传承工  
作室建设基金资助项目(鲁卫中发展  
字(2018)1号); 山东省高等学校科  
研发展计划基金资助项目  
(J18KB130); 山东中医药大学首批经  
方治疗重大疾病作用机理与疗效评  
价科研创新团队基金资助项目  
(220316)作者简介: 于莹(1991-), 女, 博士研究生, 主  
要从事方剂临床应用及疗效客观化  
研究

通信作者: 黄海量, 副教授

Tel: (0531) 89628839

E-mail: huanghl\_yh@163.com

**摘要:**目的 用网络药理学与分子对接的方法探析菟丝子治疗 2 型糖尿病 (T2DM) 的潜在分子作用机制。方法 通过检索中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 及相关文献, 筛选及预测出菟丝子的活性成分及潜在作用靶标。同时, 从基因疾病关联数据库 (DisGeNET)、人类孟德尔遗传综合数据库 (OMIM)、药物靶标数据库 (DrugBank)、比较毒物基因组数据库 (CTD)、遗传药理学与药物基因组学数据库 (PharmGKB) 疾病数据库收集糖尿病的相关靶标, 取两者的交集得到药物-疾病蛋白靶基因, 筛选出共同的 T2DM 靶标, 然后导入到 STRING 数据库进行 PPI 网络构建, 通过 Cytoscape 软件将结果进行网络化展示, 通过网络拓扑算法筛选出关键作用靶标, 再用 SystemsDock Web Site 对其进行分子对接验证; 用基因本体富集分析软件工具包 (GOEAST) 与注释、可视化和集成发现数据库 (DAVID) 在线工具对关键靶基因进行基因本体 (GO) 分析; 通过京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析并结合相关文献, 分析菟丝子治疗 T2DM 的作用机制。结果 从口服生物利用度 (OB) 与类药性 (DL) 数值筛选出菟丝子 10 个候选活性成分和 193 个预测靶标; 通过疾病数据库检索到与 T2DM 发生发展相关的已知疾病靶标 1671 个; 菟丝子主要作用于 T2DM 的前列腺癌通路、雌激素信号通路、癌症途径和癌症中的蛋白多糖、膀胱癌、胰岛素抵抗、胰腺癌、胶质、丙型肝炎和磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) / 丝苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 信号通路等。结论 菟丝子主要通过多种作用途径和多种信号通路作用于多种靶点, 从而发挥其药物功效。用网络药理学并通过多种数据库与统计分析软件可以有效预测与分析药物的潜在作用与起效机制。

**关键词:** 网络药理学; 分子对接; 菟丝子; 2 型糖尿病; 通路分析

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2020.07.025

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2020)07-0813-05

**Abstract: Objective** To explore the potential molecular mechanism of Cuscutae Semen on the type - 2 diabetes mellitus (T2DM) based on network pharmacology and molecular docking. **Methods** The active ingredients and predictive targets of Cuscutae Semen were collected in the traditional Chinese medicine (TCM) systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP). Diabetes mellitus target genes were collected from the Database of Gene - disease Associations (DisGeNET), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Drug - target Database (DrugBank), the Comparative Toxicogenomics Database (CTD) and Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB) disease database. The common targets of disease - drug

were selected based on STRING database for protein-protein interaction (PPI) network construction. And the results were displayed by Cytoscape software. The key target genes were screened out through the algorithm of network topology. To verify its molecular docking Systems Dock Web Site was used. Key target genes were analyzed on Gene Ontology (GO) using Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit (GOEAST) and The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) online tools. The mechanism of Cuscutae Semen in the treatment of T2DM was analyzed through Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis combined with relevant literature. **Results** Ten active ingredients and 193 predicted targets of Cuscutae Semen were selected by oral bioavailability (OB) and drug-likeness (DL). A total of 1671 known disease targets related to the occurrence and development of T2DM were retrieved through the disease database. The Cuscutae Semen mainly affected the prostate cancer pathway, estrogen signaling pathway, pathway in cancer, proteoglycans in cancer, such as bladder cancer, insulin resistance, pancreatic cancer, glioma, hepatitis C, phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) / Serine threonine protein kinase (Akt) signaling pathway etc. **Conclusion** The Cuscutae Semen mainly play its drug efficacy by multi-targets through multi-approach and multi-signaling pathways. Using network pharmacology can effectively predict and analyze the potential role and effect mechanism of drugs through a variety of databases and statistical analysis software.

**Key words:** network pharmacology; molecular docking; Cuscutae Semen; type-2 diabetes mellitus; signaling pathway

糖尿病的病理机制主要与胰岛素抵抗密切相关。传统中医药在防治2型糖尿病(T2DM)方面备受广泛关注<sup>[1-2]</sup>。本实验筛选菟丝子主要活性成分并预测其潜在分子机制。

## 资料与方法

### 1 菟丝子的活性成分筛选与靶标预测<sup>[3-6]</sup>

用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)以“菟丝子”为检索关键词,搜索此单味中药的全部化学成分信息<sup>[3-4]</sup>。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug-likeness, DL)作为药代动力学参数。

设置筛选阈值条件<sup>[5-6]</sup>:  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18$ 。据此得出草药的关键活性成分。将关键活性成分和靶点与相关文献进行比对分析,作为菟丝子的候选活性成分;再将候选活性成分输入到 PubChem 数据库中,搜索并下载相应的化学成分的分子结构式和 PubChem CID,根据活性化合物配体之间的化学相似性,在 SEA 数据库平台中预测化合物对应的靶点信息,筛选出物种为“Homo sapiens”的靶点蛋白,作为菟丝子主要活性成分的预测靶标,再通过 Uniprot 平台对所获取的靶点名称进行标准化校正,最终汇总出化合物的靶点数据。

### 2 T2DM 的疾病靶标获取<sup>[4]</sup>

通过基因疾病关联数据库(DisGeNET)、人类孟德尔遗传综合数据库(OMIM)、药物靶标数据库(DrugBank)、比较毒物基因组数据库(CTD)和遗传药

理学与药物基因组学数据库(PharmGKB)对已知靶基因进行检索与筛选,搜索关键词为“Diabetes Mellitus”或“Diabetes”,筛选关键词为“Type II Diabetes mellitus”或“Type II diabetes”,删除重复靶标,最终筛选出 T2DM 的疾病靶标。

### 3 构建“药物-疾病”交集靶标<sup>[4]</sup>

将草药菟丝子靶标与 T2DM 靶标的导入到 OmicShare 在线工具,对菟丝子所含主要活性成分的候选草药靶标与 T2DM 相关疾病靶标进行比对,得出菟丝子治疗 T2DM 的疾病靶基因,剔除无关和不匹配的活性成分,最终提取共同作用的靶标蛋白。

### 4 构建交互网络的分析<sup>[4]</sup>

将上述交集靶基因传至 String 网络数据库平台,设置物种“Homo sapiens”,构建靶标蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。

### 5 筛选关键作用靶标<sup>[4]</sup>

将上述数据列导入 Cytoscape 软件中,构建菟丝子作用于 T2DM 的直接或间接靶基因网络结构图,根据 CytoNCA 插件进行网络拓扑分析,通过度中心性(degree centrality, DC)、接近中心性(closeness centrality, CC)及介度中心性(betweenness centrality, BC)等参数,筛选出 DC 大于两倍节点中位数以上的节点,作为关键靶基因(Hubs),该靶基因是直接调控的关键作用靶标。

### 6 分子对接验证<sup>[7]</sup>

用 RCSB PDB 数据库检索菟丝子关键靶蛋白的 PDB Entry 蛋白构象体,从 PubChem 数据库获得菟丝子活性化合物的 3D 结构文件,将两者 SDF 文件导入

到 SystemsDock Web Site 在线平台实现分子对接,并评估配子-受体的结合潜力。在上述结果基础上,得出蛋白相互作用网络,根据 Degree 值筛选出关键靶标与菟丝子的主要活性成分进行分子对接,结果以 Docking Score 分数值判决配体与受体的结合程度的强弱。分值越高代表配体与受体结合越紧密, Docking Score 大于 4~5,有一定的结合活性;大于 5~6,有较好的结合活性;大于 6~7,有强烈的结合活性。

## 7 基因本体(GO)生物学分析

用 GOEAST 基因本体富集在线分析软件进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析,通过统计学(*P*值)和 FDR 值,评估 GO 生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组成(cellular component, CC)将这 3 大模块进行基因功能注释,所注释的 Terms 进行聚类分析并给出聚类分值。分值越高则代表所关注基因调控的生物学过程越重要。

## 8 KEGG 信号通路富集分析

用 DAVID 在线工具对关键靶标进行相关京都基因与基因组百科全书(the kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路富集分析,得到关键作用信号通路。David 数据库整合多种类别的数据库资源,用改进的 Fisher 精确检验算法,对基因集进行富集分析,KEGG 通路富集分析以  $P < 0.01$  视为有统计学意义的生物信号通路,根据所富集的通路功能条目,探究草药的潜在靶点可能参与的相关信号通路。

## 结 果

### 1 菟丝子的活性成分和靶标筛选

得到菟丝子活性成分 11 个。其中, MOL006649

活性化合物中未得到预测靶点;剩余 10 种活性化合物共得到预测靶点 483 个;去重后,最终得到 193 个靶点,其中不同活性化合物可作用于同一靶标,不同靶标可能来自于相同化合物,见表 1。

### 2 获取 T2DM 的疾病靶标

最终获得 1671 个 T2DM 相关作用的疾病靶标。

### 3 构建“药物-疾病”交集靶标

作为菟丝子治疗 T2DM 的直接或间接作用靶点,获得共同靶标 37 个,见表 2。

### 4 构建交互网络的分析

发生蛋白-蛋白相互作用的靶点有 32 个, 125 条边代表蛋白间相互作用,网络中各节点的平均自由度值为 6.76,平均中心度数为 0.64,见图 1。

### 5 筛选关键作用靶标

最终筛出 AKT1、EGFR、VEGFA、ESR1h 和 MMP9 作为关键靶标,明确菟丝子有效成分之间存在协同作用,见表 3。

### 6 分子对接验证

菟丝子的活性分子与关键靶标蛋白具有很好的结合活性,表明该草药分子的对接结果与网络药理学筛选结果相一致,进一步验证了网络药理学预测靶点的可靠性。其中,以槲皮素对接 MMP9 蛋白结构 4H82 的活性最稳定、Docking Score 结合分值最强。槲皮素与 MMP9 蛋白靶标相互作用、结合自由度受非极性相互作用的影响,使槲皮素可与 MMP9 蛋白结构 4H82 的结合形成较多的疏水作用力。通过 Ligplot 软件统计分析得出,槲皮素与该 MMP9 蛋白结构 4H82 结合的重要氨基酸位点,即与 4H82 结合的关键疏水氨基酸残基为 LEUD187、TYRC248、TYRD248、PROC246、LEUC222 和 VALD223。

表 1 菟丝子的主要活性成分信息

Table 1 Main active ingredient information of Semen cuscutae

TCMSP ID	Compound	Pubchem CID	Formula	OB(%)	DL	Target number
MOL001558	Sesamin	72307	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	56.55	0.83	10
MOL000184	Stigmasterol	5356634	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	39.25	0.76	26
MOL000354	Isorhamnetin	5281654	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	49.60	0.31	77
MOL000358	Beta-sitosterol	222284	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	36.91	0.75	48
MOL000422	Kaempferol	5280863	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	41.88	0.24	74
MOL005043	Campest-5-en-3beta-ol	173183	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	37.58	0.71	52
MOL005440	Isofucosterol	5281326	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	43.78	0.76	47
MOL005944	Matrine	91466	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	63.77	0.25	1
MOL006649	Sophranol	12442899	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	55.42	0.28	0
MOL000953	Cholesterol	5997	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	37.87	0.68	54
MOL000098	Quercetin	5280343	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	46.43	0.28	94

OB: Oral bioavailability; DL: Drug-likeness

表2 菟丝子治疗2型糖尿病(T2DM)的作用靶点信息

Table 2 Potential targets of Semen cuscutae for type-2 diabetes mellitus(T2DM) prevention

Uniprot ID	Target gene	Target protein	Uniprot ID	Target gene	Target protein
P25101	EDNRA	Endothelin-1 receptor	P55055	NR1H2	Oxysterols receptor LXR-beta
P24530	EDNRB	Endothelin receptor type B	Q96R11	NR1H4	Bile acid receptor
P01730	CD4	T-cell surface glycoprotein CD4	P35869	AHR	Aryl hydrocarbon receptor
P11413	G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	P05091	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase 2
Q13133	NR1H3	Oxysterols receptor LXR-alpha	P0DP23	CALM1	Calmodulin-1
P04278	SHBG	Sex hormone-binding globulin	P14174	MIF	Macrophage migration inhibitory factor
P11473	VDR	Vitamin D3 receptor	P27169	PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1
Q9UNQ0	ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2	Q9H2K2	TNKS2	Tankyrase-2
P15056	BRAF	Serine/threonine-protein kinase B-raf	P31749	AKT1	Threonine-protein kinase 1
Q9NZ45	CISD1	Iron-sulfur domain-containing protein 1	Q9UM73	ALK	ALK tyrosine kinase receptor
P16220	CREB1	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1	P56817	BACE1	Beta-secretase 1
P03372	ESR1	Estrogen receptor 1	P25024	CXCR1	C-X-C chemokine receptor type 1
Q9HC97	GPR35	G-protein coupled receptor 35	P00533	EGFR	Epidermal growth factor receptor
P60568	IL2	Interleukin-2	P49841	GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta
P19838	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	P08069	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
P15559	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	P08253	MMP2	72 kDa type IV collagenase
Q13332	PTPRS	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase sigma	P08254	MMP3	Stromelysin-1
P15692	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	P14780	MMP9	Matrix metalloproteinase-9
P35638	EBP	Enhancer-binding protein			

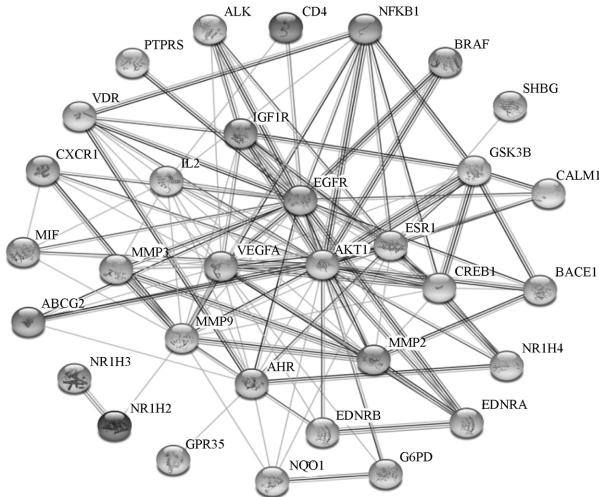


图1 菟丝子核心靶标的蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络图

Figure 1 Protein-protein interaction(PPI) network of potential diabetes targets of Semen cuscutae

表3 关键靶标的网络拓扑学特征指标

Table 3 Key nodes and network topology feature indicators

Node name	Node name	Degree centrality	Between centrality	Close centrality
AKT1	Threonine protein kinase 1	24	0.16	0.79
EGFR	Epidermal growth factor receptor	23	0.22	0.78
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	21	0.10	0.74
ESR1	Estrogen receptor 1	17	0.12	0.67
MMP9	Matrix metalloproteinase-9	16	0.16	0.67

## 7 GO 生物学功能分析

共获得61个功能富集。其中44个显著富集到生物过程分析,涉及凋亡过程负调节、RNA聚合酶II启动子转录的正调控、类固醇激素介导的信号通路、肽酰丝氨酸磷酸化的正调控、信号转导、细胞蛋白代谢过程负调节、蛋白质磷酸化的正调控、胆固醇稳态调节、细胞溶质钙离子浓度的正调节和基因表达负调控等;2个显著富集到细胞组成层次,主要涉及受体复合物和膜筏;15个显著富集到分子功能,主要涉及相同蛋白质结合、一氧化氮合酶调节活性、RNA聚合酶II转录因子活性、配体激活序列特异性DNA结合、类固醇激素受体活性、酶结合、类视黄醇X受体结合和蛋白质结合、转录激活活性、RNA聚合酶II核心启动子近端区序列特异性结合、激酶活性和锌离子结合等作用于T2DM的主要生物学功能关联,GO富集前22位结果见图2。

## 8 KEGG 通路富集分析

主要参与到27条最关键的信号通路与T2DM密切相关,其中前10条主要信号通路包含前列腺癌通路(prostate cancer, count = 7,  $P < 0.01$ ),雌激素信号通路(estrogen signaling pathway, count = 7,  $P < 0.01$ ),癌症中的蛋白聚糖(pathways in cancer, count = 11,  $P < 0.01$ ),膀胱癌(Bladder cancer, count = 5,  $P < 0.01$ ),胰岛素抵抗(insulin resistance, count = 6,  $P < 0.01$ ),胰腺癌(pancreatic cancer, count = 5,  $P < 0.01$ ),神经胶质瘤(glioma, count = 5,  $P < 0.01$ ),丙型肝炎(hepatitis C, count = 6,  $P < 0.01$ ),PI3K-

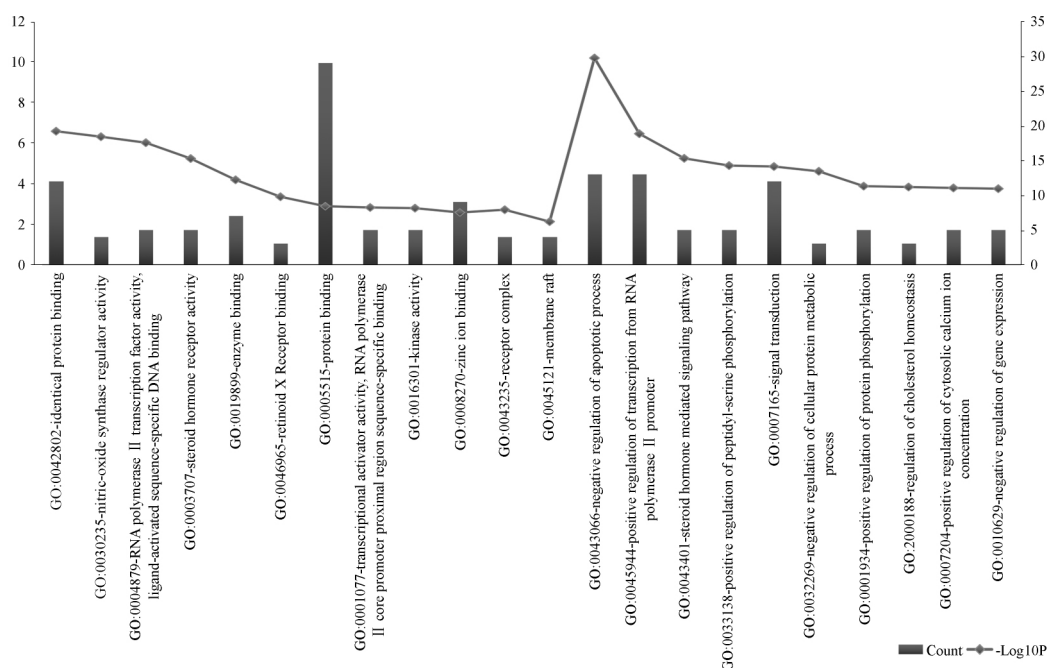


图2 基因本体(GO)功能分析

Figure 2 Gene ontology(GO) function analysis

AKT 信号通路(PI3K - Akt signaling pathway ,count = 8  $P < 0.01$ ) ,HIF - 1 信号通路 (HIF - 1 signaling pathway ,count = 5  $P < 0.01$ )。此 10 条作用通路均与菟丝子相关的 5 个以上靶基因富集重叠 ,揭示菟丝子的有效成分可能通过作用于以上多条信号通路来治疗 T2DM; 同时 ,菟丝子的关键靶点基因富集于多种癌症信号通路上 ,提示癌症通路可作为未来研究菟丝子单味草药的抗癌疗效的重要方向。

## 讨 论

菟丝子所含的多糖成分能有效改善胰岛素抵抗 ,不仅具有延缓衰老和类激素样作用而有效发挥调节内分泌功能 ,同时还可抑制  $\alpha$  - 淀粉酶和减轻自由基对胰岛细胞的损伤而有效发挥降糖的作用 ,菟丝子具有很好的益阴清热、生津止渴和滋消渴之功<sup>[8-9]</sup>。

本研究通过筛选得出菟丝子主要活性成分 11 个 ,治疗 T2DM 潜在靶标 37 个。其中  $\beta$  - 谷甾醇、山奈酚、苦参碱、异丙醇和槲皮素等入血活性成分 ,可同时调控 EGFR、MMP9 和 VEGFA 等靶蛋白 ,而 AKT1 和 ESRI 能被多个活性成分共同作用调控。菟丝子作用于 T2DM 有 5 个关键靶蛋白及 27 条信号通路 ,主要是通过调节类固醇激素水平、调控细胞增殖周期、调控营养物质的代谢平衡、参与多种疾病信号通路等多靶点、多途径和多层面来有效发挥改善胰岛素抵抗的作用。将活性成分中作用靶点最多的槲皮素作为配体 ,与所筛出的 5 个关键靶蛋白受体分别进行分子对接 ,明晰相互作用的配体与受体之

间氢键的亲水疏水作用 ,以及对小分子与靶蛋白结合的稳定性与生物活性进行数值比对。以槲皮素与 MMP9 蛋白结构 4H82 之间相互结合为例 ,发挥氢键、PI 键和两者复合键作用力的疏水氨基酸残基为 LEUD187、TYRC248、TYRD248、PROC246、LEUC222 和 VALD223。

## 参考文献:

- [1] 葛均波 ,徐永健 . 西医内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社 , 2014: 87.
- [2] CHO N H , SHAW J E , KARURANGA S *et al.* IDF diabetes atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract* 2018 , 138( 4) : 271 - 281.
- [3] 姚楠 ,丁茂鹏 ,王志旺 ,等 . 基于网络药理学研究当归平喘的分子机制 [J]. *中国临床药理学杂志* 2019 , 35( 24) : 3250 - 3253.
- [4] 张功 ,于莹 ,黄海量 ,等 . 基于网络药理学和生物信息学探讨四神丸治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志* , 2019 , 25( 24) : 142 - 149.
- [5] XU X , ZHANG W , HUANG C , *et al.* A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Int J Mol Sci* , 2012 , 13( 6) : 6964 - 6982.
- [6] WALTERS J R F. New advances in the molecular and cellular biology of the small intestine [J]. *Curr Opin Gastroenterol* 2006 , 18( 2) : 161 - 167.
- [7] HSIN K Y , MATSUOKA Y , ASAI Y , *et al.* SystemsDock: A web server for network pharmacology - based prediction and analysis [J]. *Nucleic Acids Res* 2016 , 44( 4) : 507 - 513.
- [8] 李道中 ,彭代银 ,徐先祥 ,等 . 菟丝子多糖降糖作用机制研究 [J]. *中华中医药学刊* 2008 , 26( 12) : 2717 - 2718.
- [9] 庞国明 ,闫镛 ,朱璞 ,等 . 纯中药治疗 T2DM( 消渴病) 的临床研究 [J]. *世界中西医结合杂志* 2017 , 12( 1) : 74 - 77.

( 本文编辑 权菊香)