

基于网络药理学及分子对接探索六味地黄丸治疗糖尿病相关骨质疏松症的分子机制

何雨池¹, 刘 桢²

¹成都中医药大学临床医学院, 四川 成都

²成都中医药大学附属医院内分泌科, 四川 成都

收稿日期: 2025年5月6日; 录用日期: 2025年6月23日; 发布日期: 2025年7月4日

摘 要

六味地黄丸作为临床常用的滋阴补肾经典复方, 常被用于糖尿病相关骨质疏松症的治疗。本研究运用网络药理学及分子对接, 对六味地黄丸治疗糖尿病相关骨质疏松症的作用机制展开系统阐释。具体方法是: 首先从TCMSP数据库和文献中检索筛选六味地黄丸药物中包含的主要化合物, 接着通过TCMSP和BATMAN-TCM获取化合物的作用靶点, 同时在GeneCards中检索疾病相关靶点, 然后取其交集靶点, 用STRING构建蛋白互作(PPI)网络, 再通过CytoNCA筛选核心节点, 随后进行GO与KEGG富集分析, 最后搭建“中药-化合物-靶点”以及“通路-靶点”网络, 并用分子对接验证结果。研究共筛选出73个主要化合物、234个药物作用靶点以及1215个疾病相关靶点, 经过取交集得到98个候选治疗靶点, 基于PPI分析和网络拓扑筛选, 确定了3个核心靶点, 分别是JUN、MAPK1和AKT1, 结合网络分析结果与富集分析, 明确了4个核心化合物, 即槲皮素、山奈酚、薯蓣皂苷元和 β -谷甾醇。7组核心配体-受体对接实验都呈现出较强的亲和力, 其中槲皮素与JUN的结合能最低, 为-9.3 kcal/mol。结果显示, 六味地黄丸可能通过槲皮素、山奈酚、薯蓣皂苷元和 β -谷甾醇等活性成分, 与JUN、AKT1、MAPK1等关键靶点相互作用, 对AGE-RAGE、脂质-动脉粥样硬化、流体剪切力-动脉粥样硬化以及IL-17等信号通路进行调控, 以此发挥治疗糖尿病相关骨质疏松症的多组分-多靶点-多通路协同作用。本研究为六味地黄丸治疗糖尿病相关骨质疏松症的后续实验以及临床应用提供了理论铺垫。

关键词

网络药理学, 分子对接, 糖尿病相关骨质疏松症, 六味地黄丸

Exploration of the Molecular Mechanism of Liuwei Dihuang in Treating Diabetes-Related Osteoporosis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

Yuchi He¹, Ya Liu²

¹School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

²Department of Endocrinology, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

Received: May 6th, 2025; accepted: Jun. 23rd, 2025; published: Jul. 4th, 2025

Abstract

Liuwei Dihuang, a classical yin-nourishing and kidney-tonifying herbal formula commonly used in clinical practice, is frequently prescribed for diabetes-related osteoporosis. In this study, we systematically elucidated the mechanisms of action of Liuwei Dihuang in the treatment of diabetes mellitus-associated osteoporosis using network pharmacology and molecular docking. The specific methods were as follows: Firstly, we identified the principal compounds contained in Liuwei Dihuang from the TCMSP database and relevant literature, then retrieved their putative targets via TCMSP and BATMAN-TCM. Disease-related targets were obtained from GeneCards, and the overlap between drug and disease targets yielded candidate therapeutic targets. These candidates were used to construct a protein-protein interaction (PPI) network in STRING, and core nodes were selected by CytoNCA, followed by GO and KEGG enrichment analysis, and finally, we built “herb-compound-target” and “pathway-target” networks and validated our findings through molecular docking. In total, we identified 73 main compounds, 234 drug-related targets, and 1215 disease-related targets. Their intersection produced 98 candidate targets, from which PPI and network topology analysis pinpointed three core targets: JUN, MAPK1, and AKT1. Integrating network and enrichment results revealed four core compounds—quercetin, kaempferol, diosgenin, and β -sitosterol. Seven core ligand-receptor docking pairs all showed strong affinities, among which quercetin had the lowest binding energy to JUN, which was -9.3 kcal/mol. The results suggest that Liuwei Dihuang may exert its therapeutic effects against diabetes-related osteoporosis through multi-component, multi-target, multi-pathway synergy: its active ingredients—quercetin, kaempferol, diosgenin, and β -sitosterol—interact with key targets—JUN, AKT1, and MAPK1—and regulate AGE-RAGE, lipid-arteriosclerosis, fluid shear stress-atherosclerosis, IL-17, and other pathways. This work provides a theoretical foundation for further experimental validation and clinical application of Liuwei Dihuang in treating diabetes-related osteoporosis.

Keywords

Network Pharmacology, Molecular Docking, Diabetes-Related Osteoporosis, Liwei Dihuang

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,对生活质量有显著影响,已成为全球范围内的重大公共卫生问题[1]。最新的流行病学显示,全球糖尿病患者的数量呈现出逐年上升的趋势,预估在未来 20 年之内将突破 7 亿[2]。糖尿病病人长期处于高血糖状态,不仅可引发心脏、肾脏、眼睛以及周围神经的慢性并发症,对骨代谢也会产生严重的不良影响[3]。许多临床研究表明,2 型糖尿病患者尽管骨密度可能不会出现明显的下降,但由于骨质量受到损害,常常会表现出更高的骨脆性,骨折的风险升高,而且一旦出现骨折情况,患者恢复起来较为缓慢,再次骨折的几率也会升高,使病残率以及病死率攀升,给个人以及社会经济带来沉重的负担[4]。

现代医学研究发现,糖尿病相关骨质疏松症的发病机制涉及多个方面,其中包括胰岛素/IGF-1 信号欠缺、AGE-RAGE 激活后氧化应激加剧、慢性低度炎症出现、脂代谢紊乱状况以及成骨-破骨平衡遭到破坏等[5]。而成骨细胞对于高糖微环境十分敏感,长时间的糖毒性会抑制 Runx2 等关键成骨转录因子的表达,还会促使破骨细胞过度活化,加重了骨小梁微结构的损坏[6]。

中医学早在《黄帝内经》中便提出了“肾主骨生髓”这一观点,认为“骨痿”大多是因为“肾虚”所引发的。糖尿病长期患病会损耗阴液,致使肾阴亏虚,其临床表现属于“消渴”以及“骨痿”的范畴之内,治疗应以滋阴补肾为主要原则。六味地黄丸最早记载于北宋钱乙所著的《小儿药证直诀》,是由熟地黄、山茱萸、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻这六味药物配伍组合而成的。方中大量使用熟地黄来补肾滋阴,借助山茱萸来固摄阴精,利用牡丹皮清泻肝火以保护阴液,山药可健脾帮助气化生精血,茯苓有淡渗之性利于健运,泽泻则可利湿泄浊,这三者相互配伍可稳固护养中土,避免滋补的药物妨碍胃部产生湿气,整个药方在滋阴的同时蕴含着阳气,补泻相互配合、相辅相成[7]。现代药理研究显示,六味地黄丸可抑制 NF- κ B 介导的炎症轴、降低氧化应激反应、上调 OPG/RANKL 比值、促进 Wnt/ β -catenin 途径等多种靶点机制,发挥出降糖、保护肾脏以及促进骨骼形成等作用[8][9]。在糖尿病肾病合并骨质疏松的动物模型当中,六味地黄丸可提高骨密度、改善骨小梁形态学参数并且抑制骨吸收标志物的表达,为临床应用提供了实验方面的依据[10][11]。

尽管有关六味地黄丸的研究成果持续增多,但其“多组分-多靶点-多通路”整体效应背后的物质基础以及作用网络尚未得到系统的阐释。网络药理学借助计算生物学,从“病-药-靶-通路”的整体角度对中药复方展开研究,这与“整体-动态”的中医理论相契合。分子对接可在原子层面验证关键活性成分与靶蛋白的结合模式以及稳定性,以此弥补传统“单靶-单药”研究范式存在的不足,运用网络药理学整合化合物可及靶点信息,并依靠分子对接进行验证,系统解析六味地黄丸治疗糖尿病相关骨质疏松症的分子机制,既可阐释经典名方的现代科学内涵,还可为多靶点药物创新以及临床精准用药提供理论依据。

2. 方法

2.1. 主要成分筛选与靶点预测

首先把六味地黄丸的六味药材作为检索词,在 TCMSP 数据库里提取全部相关的候选化合物,根据数据库的药代动力学参数,将口服生物利用度 $\geq 30\%$ 以及药物相似性 ≥ 0.18 设为阈值,符合条件的就纳入“数据库候选化合物集”,接着检索近十年的中英文文献,补充 TCMSP 没有收录的、但与六味地黄丸相关且具有药理活性的化合物,将这部分导入 SwissADME 进行批量评估,筛选出胃肠道吸收为“High”且 Bioavailability Score ≥ 0.5 的化合物,形成“文献补充集”。将上述两集合并之后,分别借助 TCMSP 内置的 Target Fishing 功能以及 BATMAN-TCM 来预测潜在的作用靶点,并且将得到的蛋白 ID 映射到

UniProtKB/Swiss-Prot, 去除冗余和未注释的条目, 最终得到“预测靶点集”。

2.2. 疾病相关靶点收集

在 GeneCards Human Gene Database 中, 通过对“diabetes-related osteoporosis”、“diabetic osteoporosis”以及“diabetes-induced osteoporosis”等关键词逐个展开检索操作, 将汇总得到的基因列表予以去重处理, 构建“疾病靶点数据库”。

2.3. PPI 网络构建与核心靶点筛选

把“预测靶点集”和“疾病靶点集”相交得到候选治疗靶点, 之后将其导入 STRING, 把物种限定为 Homo sapiens, 将置信度阈值设定为 0.900, 以此构建蛋白-蛋白互作(PPI)网络, 接着在 Cytoscape 里载入该网络, 利用 CytoNCA 插件来计算其 Degree、Betweenness、Closeness、Eigenvector、Network 以及 LAC 这六项拓扑参数, 第一次筛选保留各参数中位数以上的节点, 接着在缩小的网络中再次重复上述流程, 最终确定“核心靶点”。

2.4. GO 与 KEGG 富集分析

通过 R 语言及 Bioconductor 平台中的 clusterProfiler 工具包, 结合 org.Hs.eg.db 数据库, 对潜在靶点进行了基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路的功能注释。研究采用 Benjamini-Hochberg 法对多重假设检验进行校正, 将校正后 p 值小于 0.05 作为显著性筛选标准。最终, 根据各通路中富集基因数量的降序排列, 对分析结果进行系统性的呈现。

2.5. 网络可视化与关键节点判定

采用 Cytoscape 软件, 本研究构建了“中药组分-化学成分-潜在靶标”的多层级网络模型, 系统整合了六味中药的活性成分及其相互作用靶点, 基于“成分-靶标”关联关系建立网络连接。通过 KEGG 通路富集分析, 选取显著性排名前 20 的生物学通路, 建立“信号通路-作用靶点”的关联网络。基于网络拓扑分析, 计算各节点的 Degree 值, 将网络平均度值作为筛选标准, 确定网络中的“核心化学成分”与“重要作用靶点”。

2.6. 分子对接

三维配体结构及 SDF 文件自 PubChem 数据库下载后, 使用 Chem3D 17.0 (CambridgeSoft)通过 MM2 力场进行三维构建与能量最小化(收敛阈值 0.100 kcal/(mol·Å)); 随后在 AutoDockTools (ADT 1.5.7)中添加所有极性氢、计算 Gasteiger 电荷、合并非极性氢、指定 AD4 原子类型并保存为 PDBQT 格式。受体蛋白自 RCSB PDB 下载后, 在 PyMOL (Schrödinger 2.0)中去除水分子及辅因子, 仅保留 A 链并导出为 PDB, 再于 ADT 中添加极性氢、赋予 Kollman 电荷、定义刚性残基后转换为 PDBQT。以共晶配体重心为网格中心, 分别设置对接盒, 网格间距统一设为 0.375 Å。AutoDock 4.2 对接参数在 DPF 中设置, 使用 receptor.map 地图文件; 完成对接后, 选取能量最低且聚类最大(RMSD $\leq$ 2.0 Å)构象为最佳模型, 最终以最低结合能构象作为对接结果。

3. 结果

3.1. 化合物与潜在靶点的确定

在对六味地黄丸六味药材进行数据库检索与补充文献挖掘后, 共筛得 73 个符合 ADME 条件的活性化合物。其中, 从 TCMSP 得到 60 个分子, 文献补充并经 SwissADME 筛选后得到 13 个分子。利用 TCMSP

与 BATMAN-TCM 的“Target Fishing”功能共得到 234 个潜在蛋白靶点。从 GeneCards 数据库检出糖尿病相关骨质疏松症的基因 1215 个。对两个集合取交集, 得到 98 个候选治疗靶点, 构成后续网络与功能富集分析的基础。

3.2. 蛋白互作网络与核心靶点

将候选治疗靶点上传至 STRING (置信度 0.900)后形成 PPI 网络。网络整体包含 100 余节点与 600 余条相互作用边, 平均度数 12.0, 聚类系数 0.49。以 Cytoscape-CytoNCA 计算 Degree、Betweenness、Closeness 等六项拓扑指标并实施两轮筛选。筛选后 Degree 及 Betweenness 均位列前 5% 的节点为 JUN、MAPK1、AKT1。三者不仅连接度最高, 而且在其网络中心性评分也较高, 作为在药物-疾病作用体系中的“枢纽靶点”。

3.3. GO 功能与 KEGG 通路富集

对 98 个候选治疗靶点进行 GO 富集显示, 它们显著聚集于“对脂多糖反应”、“营养水平反应”、“氧水平反应”、“细胞应激反应”等生物过程, 提示炎症-氧化-代谢应答可能是六味地黄丸介导骨代谢调控的重要生物学基础。在细胞组分层面富集于细胞质、膜区与转录因子复合物。分子功能层面则以蛋白激酶活性、DNA-结合转录调控活性最为突出。KEGG 分析共获得 156 条显著通路, 排名靠前的通路包括 AGE-RAGE 信号、脂质-动脉粥样硬化、流体剪切力-动脉粥样硬化、IL-17 信号、TNF 信号及 PI3K-Akt 信号等。整体结果揭示六味地黄丸可能通过同步调控氧化应激、炎症放大与脂质代谢失衡等环节, 协同改善由高糖-高脂微环境驱动的骨质损害。

3.4. 网络整合与核心化合物

在“中药-化合物-靶点”三层网络中, 共呈现 129 个节点与 208 条化合物-靶点连接。节点度数排行显示, 槲皮素、山奈酚、薯蓣皂苷元、 β -谷甾醇 4 个分子与靶点的连边最多, 作为核心活性成分。另构建的“通路-靶点”网络中, AKT1、IL6、JUN、MAPK1 等节点连入通路数最高, 再次印证其关键调控地位。两张网络交叉验证后, 最终确定 4 个核心化合物-3 个核心靶点的核心调控子集。

3.5. 核心配体-受体分子对接

本研究对四种核心化合物(槲皮素、薯蓣皂苷元、山奈酚、 β -谷甾醇)与三大核心靶点(JUN、AKT1、MAPK1)进行了分子对接, 获得 7 组配体-受体复合物, 其结合能均优于 $-7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明良好的亲和性。其中, 槲皮素-JUN 结合能最低($-9.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), 构象显示槲皮素通过与 JUN 的 Lys55 和 Arg62 形成多点氢键, 并借助芳香环与 Leu43、Ile45 等疏水残基的堆叠作用, 牢固嵌入活性位点; 薯蓣皂苷元和山奈酚在 AKT1 口袋中分别与 Glu234、Asp292 形成多重氢键, 同时通过甾体骨架或 π - π 堆叠与 Phe293 及 Ile290-Leu294 等区域的疏水相互作用, 实现高稳定结合; β -谷甾醇则与 JUN 疏水口袋精准契合, 并以羟基与 Arg62 形成关键氢键。这些多点氢键与疏水相互作用模式不仅与网络富集分析中锁定的“炎症-氧化-能量代谢”通路高度吻合, 还提示各配体可通过调控 MAPK 和 PI3K-Akt 信号通路, 协同下调炎症与代谢紊乱基因表达, 为六味地黄丸治疗糖尿病相关骨质疏松的分子机制提供了有力支撑。

4. 讨论

基于网络药理学与分子对接技术, 本研究系统解析了六味地黄丸治疗糖尿病相关骨质疏松症的分子机制。结果提示, 槲皮素、山奈酚、薯蓣皂苷元及 β -谷甾醇构成了该方剂与疾病间的关键桥梁。实验证实, 槲皮素具有多重生物学效应, 包括促进骨骼肌对葡萄糖的利用、抑制炎症反应及发挥抗氧化功能,

这些作用共同实现了骨形成增强与骨吸收抑制的双重效果[12]; 山奈酚的作用机制涉及 AGE-RAGE/MAPK 信号通路的阻断, 从而减轻高糖环境下的氧化应激, 并通过激活 Wnt 信号通路促使骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化[13]; 薯蓣皂苷元能够调节 Nrf2/HO-1 信号轴, 改善炎症-氧化微环境, 并在动物实验中显示出对生长板及骨小梁的保护作用[14]; β -谷甾醇则通过促进胰岛素受体磷酸化、缓解胰岛素抵抗来调节糖脂代谢紊乱[15]。通过网络拓扑分析, 筛选出与胰岛素信号传导、骨重塑及细胞自噬密切相关的 JUN、AKT1 和 MAPK1 等关键节点。GO/KEGG 功能富集分析进一步揭示了 AGE-RAGE、脂质-动脉粥样硬化、流体剪切应力-动脉粥样硬化及 IL-17 等通路在其中的重要作用。这些发现表明, 六味地黄丸可能通过“抗氧化-抗炎-调节胰岛素/脂质代谢-平衡成骨/破骨耦合”的多重机制发挥保护作用, 这一机制与中医“滋阴补肾”的理论高度一致。

值得注意的是, 本研究所聚焦的四种关键活性成分并未在熟地黄中检测到, 然而传统中医药理论强调熟地黄在六味地黄丸组方中具有不可替代的作用。这一矛盾现象提示当前数据库可能存在信息缺失或筛选标准过于严格, 导致部分潜在有效成分未被识别。同时, 鉴于本研究仅采用计算机模拟预测方法, 尚未通过实验手段进行体内外验证, 未来研究亟需围绕核心成分与作用靶点的相互作用, 从分子、细胞到动物模型等多个层次开展系统性验证工作, 并整合组分配伍优化、药代动力学特征分析及多组学技术, 深入阐释复方整体协同作用的分子基础。就临床转化而言, 本研究构建的分子作用网络可为六味地黄丸在糖尿病相关性骨质疏松患者中的精准用药提供理论依据, 未来可设计基于核心活性成分的剂量-效应关系临床试验, 结合骨代谢标志物和成像评估疗效与安全性; 同时, 可依托真实世界研究或多中心队列研究, 评估不同患者群体中的疗效差异及最优给药策略; 此外, 还应探索制剂工艺优化与个体化给药方案, 以进一步推动六味地黄丸向标准化、现代化和精准化的临床应用转化。尽管存在上述局限性, 本研究仍构建了六味地黄丸干预糖尿病相关性骨质疏松的分子作用网络, 为其临床精准化应用及基于多靶点策略的新药研发提供了重要的依据。

5. 结论

本研究通过网络药理学整合分子对接, 系统阐明了六味地黄丸治疗糖尿病相关骨质疏松症的分子机制。结果表明, 槲皮素、山奈酚、薯蓣皂苷元和 β -谷甾醇是方中关键活性成分, 能够高亲和结合 JUN、AKT1、MAPK1 等枢纽靶点, 进而协同调控 AGE-RAGE、脂质-动脉粥样硬化、流体剪切应力-动脉粥样硬化、IL-17 等信号通路及“对脂多糖反应”等生物过程, 实现抗炎、抗氧化、改善胰岛素抵抗与促进骨重塑的多维干预, 整体上遏制糖尿病相关骨质疏松症的进展。本研究为六味地黄丸的现代药理学解释及其在糖尿病相关骨质疏松症中的临床应用提供了基础。

参考文献

- [1] Popoviciu, M.S., Paduraru, L., Nutas, R.M., Ujoc, A.M., Yahya, G., Metwally, K., *et al.* (2023) Diabetes Mellitus Secondary to Endocrine Diseases: An Update of Diagnostic and Treatment Particularities. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 12676. <https://doi.org/10.3390/ijms241612676>
- [2] GBD 2021 Diabetes Collaborators (2023) Global, Regional, and National Burden of Diabetes from 1990 to 2021, with Projections of Prevalence to 2050: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet*, **402**, 203-234.
- [3] Hofbauer, L.C., Busse, B., Eastell, R., Ferrari, S., Frost, M., Müller, R., *et al.* (2022) Bone Fragility in Diabetes: Novel Concepts and Clinical Implications. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, **10**, 207-220. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(21\)00347-8](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(21)00347-8)
- [4] Sheu, A., Greenfield, J.R., White, C.P. and Center, J.R. (2022) Assessment and Treatment of Osteoporosis and Fractures in Type 2 Diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **33**, 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.02.006>
- [5] Kupai, K., Kang, H.L., Pósa, A., Csonka, Á., Várkonyi, T. and Valkusz, Z. (2024) Bone Loss in Diabetes Mellitus: Diaporosis. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article 7269. <https://doi.org/10.3390/ijms25137269>

-
- [6] Delgado-Calle, J. and Bellido, T. (2022) The Osteocyte as a Signaling Cell. *Physiological Reviews*, **102**, 379-410. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2020>
- [7] 袁晗, 邓小敏. 六味地黄丸从肾论治糖尿病研究进展[J]. 光明中医, 2024, 39(21): 4418-4421.
- [8] 刘兴兴, 郭怡鲲, 艾奇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术分析六味地黄丸治疗骨质疏松症的作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(9): 1593-1602, 1638.
- [9] 丁文君, 王静, 沈明霞, 等. 六味地黄丸对糖尿病肾病合并骨质疏松大鼠的作用及机制[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2025, 58(1): 54-60.
- [10] 殷贝, 毕艺鸣, 黄锦珠, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨六味地黄丸治疗糖尿病肾病的作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(17): 2060-2069.
- [11] 黄红丽, 王慧丰, 胡艳玲. 基于网络药理学和分子对接探讨六味地黄丸治疗糖尿病的作用机制[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(3): 493-500.
- [12] 朱丁, 林玮婧, 李欣颖, 等. 槲皮素在糖尿病创面修复中的作用及机制[J]. 免疫学杂志, 2024, 40(10): 752-760.
- [13] 王超, 魏翠婷, 李润, 等. 山奈酚通过改善肾小管上皮细胞的氧化应激与炎症反应减轻 1 型糖尿病小鼠的肾脏损伤[J]. 解放军医学院学报, 2024, 45(3): 261-269.
- [14] 苗常鑫, 冷锦红. 薯蓣皂苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(11): 113-118.
- [15] 张玲, 冷锦红. 薯蓣皂苷元对代谢系统疾病治疗作用及机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(6): 161-165.