

结合生物信息学和分子对接技术探讨基于肝糖异生抑制策略治疗 2 型糖尿病的靶标蛋白标志物

张岩, 张桂贤, 杨子博, 刘庆煊, 张婷, 刘伟伟, 陈冠, 傅予^{*}(天津市医药科学研究所, 天津 300020)

摘要: 目的 基于肝糖异生抑制策略筛选 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的标志性靶标蛋白。方法 从 NCBI 数据库下载人类肝组织基因芯片数据集, 使用 GEO2R 在线分析工具筛选 T2DM 易感性基因; 利用 GeneCards 和 OMIM 数据库检索糖异生相关靶点; 整合数据获取 T2DM-肝糖异生交互靶点, 并构建蛋白质间相互作用网络筛选标志性靶标蛋白; 使用 Metascape 数据库对靶点进行基因本体论和通路富集分析; 借助分子对接预测 T2DM 治疗药物与标志性靶标蛋白之间的相互作用能力; 最后联合二甲双胍对标志性靶标蛋白在自发性 T2DM KKAY 小鼠肝组织中的影响进行验证。**结果** 共识别出 1 143 个 T2DM 易感性基因和 958 个糖异生相关靶点, 获得 56 个 T2DM-肝糖异生交互靶点, 并经网络分析筛选出 2 个标志性靶标蛋白 PTPRC 和 VCAM1; 交互靶点主要富集在葡萄糖分解代谢、典型糖酵解、葡萄糖-6-磷酸糖酵解等生物过程, 通过糖酵解/糖异生、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、内分泌抵抗等通路调节发挥作用; 26 个降糖药物均与标志性靶点同时具有较好的空间匹配、能量匹配以及不同程度的结合能力; T2DM 模型组小鼠血糖较正常组显著增高, 且在治疗后显著降低; T2DM 模型组小鼠肝组织中 PTPRC、VCAM1 的蛋白表达水平均较正常对照组显著增高, 并且均在二甲双胍治疗后显著降低。**结论** 本研究系统筛选并验证了肝组织中可能影响 T2DM 肝糖异生的 2 个标志性靶标蛋白, 揭示了 T2DM 中肝糖异生调控通路, 为深入研究肝糖异生防治机制, 寻找新的降糖药物作用靶点提供依据。

关键词: 2 型糖尿病; 肝糖异生; 生物信息学; 分子对接; 蛋白标志物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)16-2080-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.16.006

引用本文: 张岩, 张桂贤, 杨子博, 等. 结合生物信息学和分子对接技术探讨基于肝糖异生抑制策略治疗 2 型糖尿病的靶标蛋白标志物[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(16): 2080-2089.

Combining Bioinformatics and Molecular Docking Technology to Explore the Target Protein Markers for the Treatment of T2DM Based on Hepatic Gluconeogenesis Inhibitory Strategies

ZHANG Yan, ZHANG Guixian, YANG Zibo, LIU Qinghuan, ZHANG Ting, LIU Weiwei, CHEN Guan, FU Yu^{*}
(Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To screen the marker target protein of type 2 diabetes mellitus(T2DM) based on hepatic gluconeogenesis inhibition strategy. **METHODS** The microarray data set of human liver tissue was downloaded from NCBI database, and T2DM susceptibility genes were screened by GEO2R online analysis tool. Gluconeogenesis related targets were retrieved from GeneCards and OMIM databases. The interaction targets between T2DM and hepatic gluconeogenesis were obtained by integrating data, and the marker target proteins were screened by constructing a protein-protein interaction network. Gene ontology and pathway enrichment analysis were performed in Metascape database. The interaction ability between T2DM therapeutic drugs and marker target proteins was predicted by means of molecular docking. Finally, the effect of the marker target proteins in the liver tissue of spontaneous T2DM KKAY mice was validated by combining metformin. **RESULTS** A total of 1 143 T2DM susceptibility genes and 958 gluconeogenesis related targets were identified, 56 targets of T2DM interacting with hepatic gluconeogenesis were obtained, and two marker target proteins PTPRC and VCAM1 were screened by network analysis. The interaction targets were mainly enriched in glucose catabolic process, canonical glycolysis, glycolytic process through glucose-6-phosphate, and other biological processes. And they functioned through the regulation of pathways such as Glycolysis/Gluconeogenesis, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, and endocrine resistance. The 26 hypoglycemic drugs all had good spatial matching, energy matching and different degrees of binding ability with marker targets. The blood glucose of T2DM model group was significantly higher than that of normal group, and decreased significantly after treatment. The protein expression levels of PTPRC and VCAM1 in the liver tissue of the mice in the T2DM model group were significantly higher than those in the normal group, and they were significantly lower after metformin treatment.

基金项目: 天津市卫生健康科技项目(KJ20121, KJ20083); 天津市医药科学研究所青年科技创新基金项目(S202006)

作者简介: 张岩, 女, 硕士, 助理研究员 E-mail: yanyan0911110@126.com ***通信作者:** 傅予, 女, 硕士, 副研究员 E-mail: fyzyy_82@126.com

CONCLUSION This study systematically screened and verified two marker target proteins in human liver tissue that may affect hepatic gluconeogenesis in T2DM, reveal the regulatory pathway of hepatic gluconeogenesis in T2DM, and provide a basis for in-depth study of the prevention and treatment mechanism of hepatic gluconeogenesis and looking for new targets of hypoglycemic drugs.

KEYWORDS: type 2 diabetes mellitus; liver gluconeogenesis; bioinformatics; molecular docking; protein marker

糖尿病是一种严重危害人类健康、影响生活质量的慢性代谢性疾病。据国际糖尿病联盟估计,目前全球约有 4.51 亿糖尿病患者,预计 2045 年将会增加到 6.93 亿,其中 90% 以上为 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者^[1]。T2DM 是一种复杂的糖代谢性疾病,可引起组织器官功能失调,造成胰岛素分泌减少,导致机体出现高血糖症和代谢缺陷。T2DM 的重要特点和主要的临床诊断依据是高血糖症^[2]。高血糖症会引起多组织生理病变,加剧全身胰岛素抵抗反应,增加 T2DM 并发症的风险^[3],因此控制血糖是治疗 T2DM 的重要手段之一。

肝脏与 T2DM 的发病最为密切,是内源性葡萄糖产生的主要来源,也是糖异生的主要器官,起着调节机体血糖的作用^[4]。肝脏糖异生为调节机体血糖稳态的重要生理过程,在长期饥饿状态下维持机体的葡萄糖稳态以满足机体能量需求。在空腹状态下,全身约 65% 的血糖供应量来自肝脏通过糖异生输出的葡萄糖^[5]。肝脏糖异生功能亢进是导致 T2DM 患者空腹高血糖的重要来源^[6],T2DM 患者由于出现胰岛 β 细胞功能受损、胰岛素抵抗、胰高血糖素分泌增多等病理变化,会影响肝脏糖异生相关信号通路的不同环节、干扰糖异生转录调控相关蛋白,致使肝糖异生反应异常激活,从而导致肝糖调节功能障碍,出现高血糖症^[7]。因此,从研究肝糖异生调控机制出发,寻找治疗 T2DM 新的蛋白标志物、开发特异性靶向肝糖异生的抑制剂是目前 T2DM 治疗的重要途径^[7]。

疾病生物标志物研究,一直是现代医学研究的重点,也是 T2DM 临床诊断和治疗的迫切需要。以蛋白组学、基因组学为主的多组学研究方法作为新的生物标志物研究手段,已成为人们研究糖尿病发生发展的重要方法^[8],但由于数据庞大且复杂,仅依靠传统手段无法解决问题,必须借助生物信息学技术对大数据进行全方位地挖掘、处理和分析^[9]。为此,以多组学大数据为基础的生物信息网络分析技术脱颖而出,其以大数据为基础抽象建模,进行蛋白质间相互作用(protein-protein

interaction, PPI)分析以识别影响疾病的关键因子,从而揭示发病机制,鉴定出新的生物标志物或药物靶点^[10],为 T2DM 寻找新的生物标志物提供了可能。

为了探寻 T2DM 新的蛋白标志物,发现新的治疗途径,本研究将从肝糖异生抑制策略出发,借助生物信息学技术对人类肝脏组织 T2DM 基因组数据进行分析,利用大数据平台抽象建模获取肝糖异生相关的 T2DM 差异靶点,采用多种计算手段对差异靶点 PPI 进行分析以识别出基于肝糖异生影响 T2DM 的标志性靶点,进而揭示 T2DM 中肝糖异生调控机制,并以分子对接技术鉴定出新的生物标志物或药物靶点。该研究结果将为深入研究肝糖异生防治机制、寻找新的降糖药物作用靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 T2DM 肝组织差异基因的分析与筛选

从 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)检索与 T2DM 相关的肝脏组织基因芯片数据,并下载相应的基因芯片表达谱数据集。以基因表达值为计量资料,使用 GEO2R 在线分析工具对 T2DM 肝组织和正常肝组织的基因表达水平进行分析,以鉴定在实验条件下差异表达的基因。删除无效和冗余的基因,并以 $P < 0.05$ 和差异倍数(fold change, FC) > 1.0 为筛选截止值,筛选差异表达显著的易感性基因。使用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)对获得的基因进行靶点蛋白标准化转化。

1.2 整合数据库检索糖异生相关靶点

以“epatic gluconeogenesis”“luconeogenesis”检索词,利用 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<https://omim.org/>)检索与糖异生相关的靶点。所获基因使用 UniProt 数据库进行靶点蛋白标准化转化。

1.3 T2DM-肝糖异生相关靶点 PPI 网络构建

将 T2DM 易感性基因和糖异生相关靶点取交集,建立 T2DM 肝糖异生基因表达谱。将谱中各基因靶点导入 String 数据库(<https://string-db.org/>),

设定物种为人,进行 PPI 分析,并将结果导入 Cytoscape 3.2.1 软件,进而构建可视化网络模型。根据度值大小设置节点的大小和颜色,根据结合率评分大小设置边线的颜色和粗细,获得最终的 PPI 网络。

1.4 网络拓扑分析

通过网络节点中心性和网络模块计算,综合分析 T2DM 肝糖异生关键靶点。

使用 Cytoscape 软件中的 Hubba 插件进行网络节点中心性分析,包括:度中心性(degree centrality, DC)、紧密中心性(closeness centrality, CC)、间接中心性(betweenness centrality, BC);使用 MCODE 插件,采用 MCODE 算法进行网络模块拓扑分析。整合分析结果,筛选在各参数中均具有重要地位的关键靶点,即为 T2DM 肝糖异生方向的标志性靶标蛋白。

1.5 生物过程和通路分析

本研究使用 Metascape 数据库(<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>),限定物种为人,设定阈值 $P < 0.05$,对筛选靶点进行基因本体论(gene ontology, GO)、京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析,并根据 P 值和富集结果进行筛选分析。

1.6 基于分子对接技术探讨关键靶点与降糖药物的作用关系

1.6.1 结构预处理 在 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中下载关键靶点的蛋白晶体结构,使用 Pymol 2.5.2 软件删除冗余的蛋白链段和小分子,再利用 Autodock 1.5.6 软件对其进行删除水分子、加氢以及加电荷处理,结果保存为 pdbqt 格式文件。

在 DrugBank 数据库(<https://go.drugbank.com/>)中检索 FDA 批准上市的 T2DM 相关降血糖药物和文献中报道的相关药物成分,利用 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载药物成分结构,并用 Autodock 1.5.6 软件对其进行删除水分子、加氢以及加电荷处理,结果保存为 pdbqt 格式文件。

1.6.2 分子对接 利用基于 Autodocking 虚拟筛选的软件 PyRx-Virtual Screening Tool 0.9.1 对药物成分与靶点蛋白进行对接运算,利用 Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298 软件进行对接结果的可视化分析,探讨降糖药物与靶标蛋白之间的

结合能力,验证靶点在 T2DM 肝糖异生治疗药物中的作用。

1.7 验证靶标蛋白在 T2DM 小鼠肝组织中的表达

1.7.1 动物 12 周龄雄性自发性 T2DM KKAY 小鼠 20 只,高脂饲料喂养;同周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 10 只,普通饲料喂养。小鼠 2 只 1 笼喂养于屏障级动物实验室,饲养条件为温度 25℃,湿度 50%,每日 12 h 光照周期。所有动物均为 SPF 级,体质量为 25~35 g,由北京华阜康生物科技有限公司提供,动物合格证号:110322211100964372;动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0008。本研究设计的所有动物实验部分均符合天津市医药科学研究所动物伦理委员会的要求(伦理审查批准编号:IMPS-EAEP-Z-KZ20121-01)。

1.7.2 仪器与试剂 DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂);Tanon5200 型自动化学发光成像分析系统(上海天能公司)。盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:ABU5591;规格:每片 0.5 g); β -actin 抗体(货号:BM0627)、PTPRC 抗体(货号:A00555-2)、VCAM1 抗体(货号:A01199)均由博士德生物工程有限公司提供。

1.7.3 分组与给药 KKAY 小鼠适应性喂养 1 周后,断尾取血,测随机血糖值 $\geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者入选,成模率为 100%,均入选。采用随机数字表法分为模型组、治疗组。另取 C57BL/6J 小鼠,作为正常对照组。治疗组每天灌胃给予 $166.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的盐酸二甲双胍,正常对照组及模型组灌胃给予等体积无菌水,连续给药 4 周。

1.7.4 空腹血糖和口服糖耐量检测 给药 4 周后,各组小鼠禁食不禁水 12 h,断尾取血检测空腹血糖水平,灌胃给予 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 40%葡萄糖溶液,分别测定给药后 0, 0.5, 1, 2 h 的血糖值,并计算各组给予葡萄糖后的血糖曲线下面积(area under curve ROC, AUC),进而观察小鼠口服糖耐量结果。

1.7.5 Western blotting 检测肝组织中靶标蛋白的表达 末次给药后,各组小鼠禁食不禁水 12 h,腹腔注射 10%水合氯醛[$0.3 \text{ mL} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$]进行麻醉,腹主动脉取血,快速解剖,取小鼠肝脏组织,加入蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白,以考马斯亮蓝法进行蛋白定量。所得蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶分离,以半干法转移到 PVDF 膜上,封闭 1.5 h,分别加入 PTPRC 抗体(1:1 000)、VCAM1 抗体(1:1 000)、内参 β -actin 抗体(1:2 000),于 4℃

摇床孵育过夜，次日洗膜，加入二抗，于 4℃下摇床震动孵育 2 h，洗膜除去游离二抗，曝光及洗片，置印迹膜于成像分析仪自动成像，Image J 软件分析蛋白条带灰度值，以 PTPRC、VCAM1 灰度值与 β -actin 灰度值之比表示目标蛋白的表达水平。

1.8 统计学分析

使用 GEO2R 在线分析工具对基因芯片数据的基因表达值进行差异分析；采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本比较采用 t 检验，多样本比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义， $P < 0.01$ 表示差异具有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 T2DM 易感性差异基因筛选

GSE23343 数据集来源于日本金泽大学医学院，用于分析 10 例 T2DM 患者和 7 例血糖正常人的肝脏组织基因表达情况，经 GEO2R 分析并去除无效和冗余的基因共获得 22 188 个差异基因，进而以 P 值和 FC 值过滤，筛选出 1 320 个差异基因，其中绿色下调基因 622 个、红色上调基因 698 个，结果见图 1。对筛选结果进行标准化转换并删除无 UniprotKB 编号的人类基因，最终识别出易感性差异基因 1 143 个。

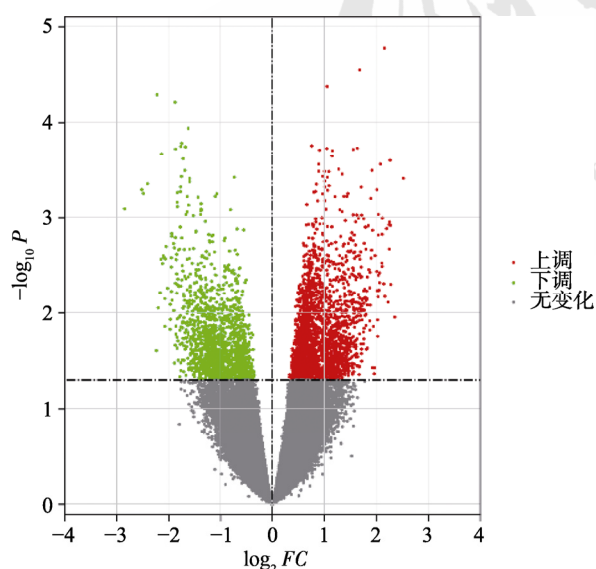


图 1 基因表达情况
Fig. 1 Gene expression

2.2 糖异生相关靶点筛选

在 GeneCards 数据库中检索到 941 个相关靶点，OMIM 数据库中检索到 108 个相关靶点，去除重复值共得到 970 个糖异生相关靶点，对其进

行 Uniprot 标准化并去除无 UniprotKB 编号的基因，最终识别出 958 个糖异生相关靶点。

2.3 T2DM-肝糖异生相关靶点 PPI 网络构建

利用 Venny 2.1 在线数据分析平台 (<https://bioinfop.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 对上述筛选的疾病靶点取交集，构建 T2DM 和肝糖异生疾病的交互靶点，结果共获取 56 个交互靶点，见图 2。对其表达情况进行矩阵分析，最终获得基于肝糖异生的 T2DM 基因表达谱，即为人类肝组织中由肝糖异生引起且具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的 T2DM 差异表达基因，结果见图 3。

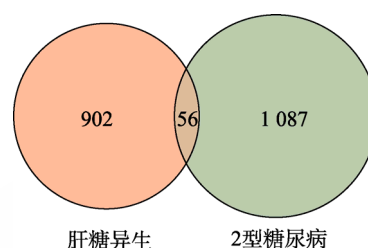


图 2 疾病靶点韦恩图
Fig. 2 Venn map of disease target

为了更合理地阐明 T2DM 肝糖异生靶点之间的关系，本研究对其进行 PPI 分析。将 56 个交互靶点导入 String 数据库分析其相互作用关系，并将分析结果导入 Cytoscape 软件构建可视化 PPI 网络，见图 4A。网络中节点越大、颜色越红反映节点度值越高，说明该节点蛋白越重要；边线越粗、颜色越接近绿色反映蛋白间结合率评分越高，说明蛋白间联系越紧密。网络直观分析发现，疾病中 PTPRC、VCAM1 和 MAPK14 节点较为重要，且与其他多个靶点具有较强的相互作用，可能为治疗疾病的关键作用靶点。

2.4 PPI 网络拓扑分析

关键靶点或靶点组合及它们之间的关系常常能够为先导化合物发现、药物研发提供重要指导，而网络分析就是从复杂关系中提取这些重要信息的过程^[9]。本研究从网络节点中心性分析和网络模块分析方面对 T2DM 肝糖异生关键靶点进行了分析。

使用 Cytoscape 插件 Hubba 进行网络节点中心性分析，分别筛选 DC、CC 和 BC 拓扑分析结果中位于前 10 位的靶点，结构见图 4B~D；使用 Cytoscape 插件 MCODE 进行网络模块分析，结果共获得 3 个网络模块，评分分别为 MCODE

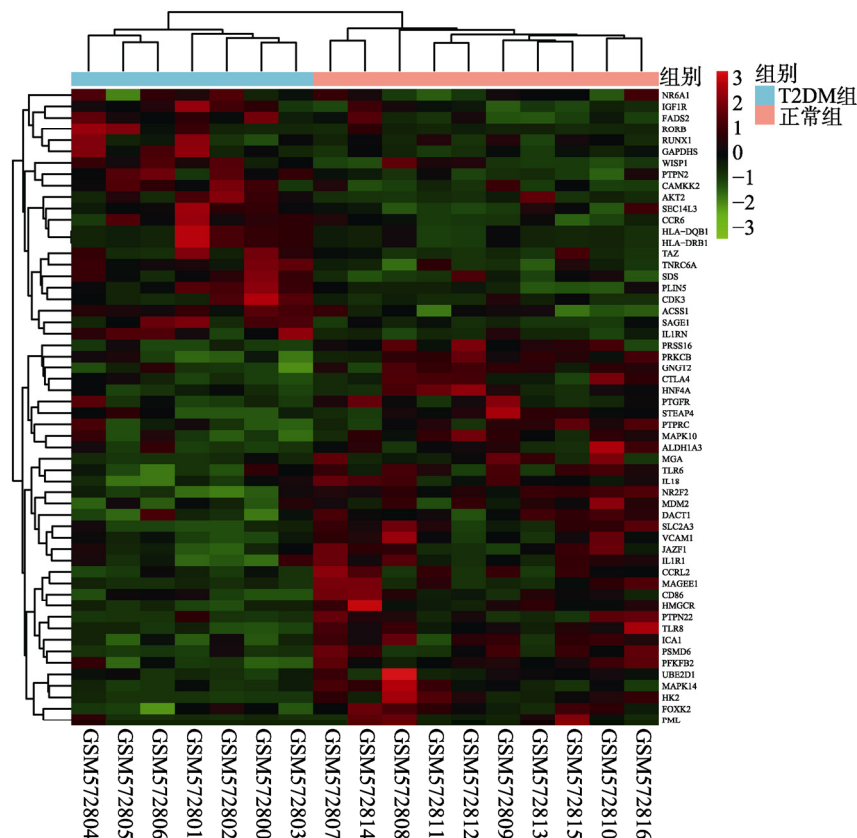


图3 基于肝糖异生的 T2DM 基因表达谱
绿色-下调基因；红色-上调基因。

Fig. 3 T2DM gene expression profile based on hepatic gluconeogenesis
Green-down regulated gene; red-up-regulated gene.

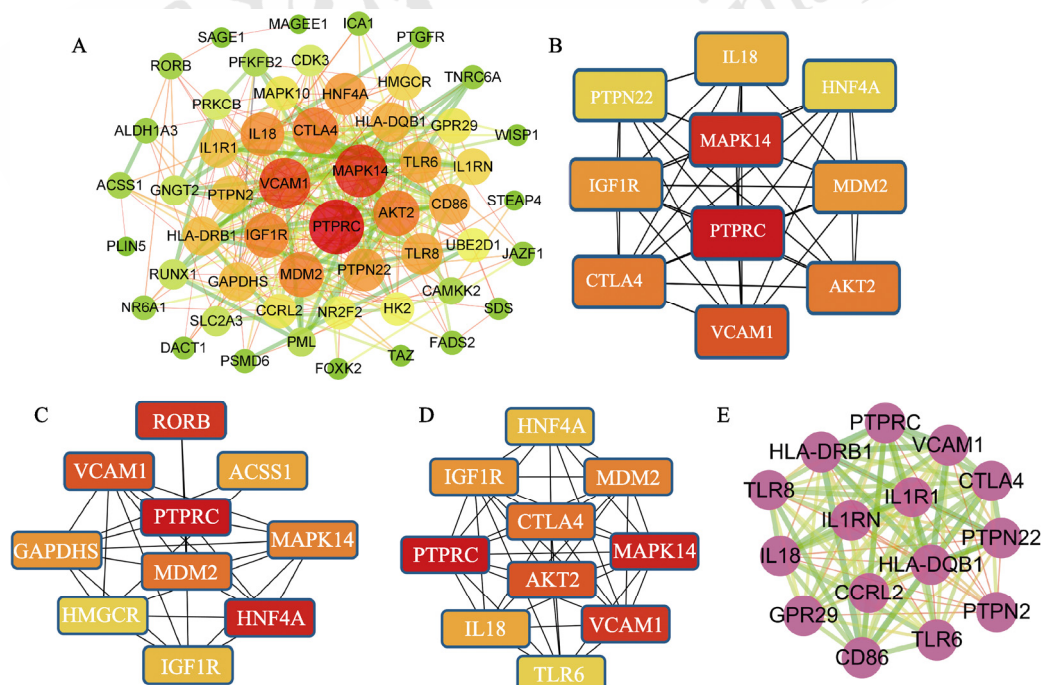


图4 PPI 网络分析模型

A-交互靶点 PPI 网络；B-度中心性；C-介度中心性；D-接近中心性；E-MCODE 模型。

Fig. 4 PPI network analysis model

A-PPI network of interacting targets; B-degree centrality; C-betweenness centrality; D-closeness centrality; E-MCODE model.

114.286, MCODE2 4.286, MCODE3 4.000, 其中评分最高的 MCODE1 模块涉及靶点为 CTLA4、PTPN2、TLR8、CD86、PTPN22、HLA-DQB1、TLR6、PTPRC、VCAM1、CCRL2、IL1RN、IL18、HLA-DRB1、IL1R1、GPR29, 结果见图 4E。

最终对节点中心性和网络模型分析结果进行加权评分并建立韦恩图取交集, 得到在各分析结果中均具有重要地位的 2 个关键性靶点 PTPRC 和 VCAM1, 其中 PTPRC 加权评分最高, 其次为 VCAM1, 结果见图 5。因此推测 PTPRC 和 VCAM1 可能为基于肝糖异生的 T2DM 疾病的标志性靶标蛋白。

2.5 生物过程和通路分析

使用 Metascape 数据库对筛选靶点进行 GO 分析, 并根据富集结果分别筛选排名前 10 位的生物过程、细胞成分和基因功能, 结果发现, 基于肝糖异生的 T2DM 靶标蛋白主要参与了 α - β T 细胞增殖的正调控、利用细胞内钙源进行钙介导的信号转导、白细胞介素-2 产生的正调控、葡萄糖分解代谢过程、典型糖酵解等生物过程, 涉及了网格蛋白包被内吞囊泡、胞吞泡膜、质膜外侧等细胞成分, 并且具有核受体活性、转录因子活性、直接配体调节序列特异性 DNA 结合以及细胞因子受体活性等分子功能, 结果见图 6。

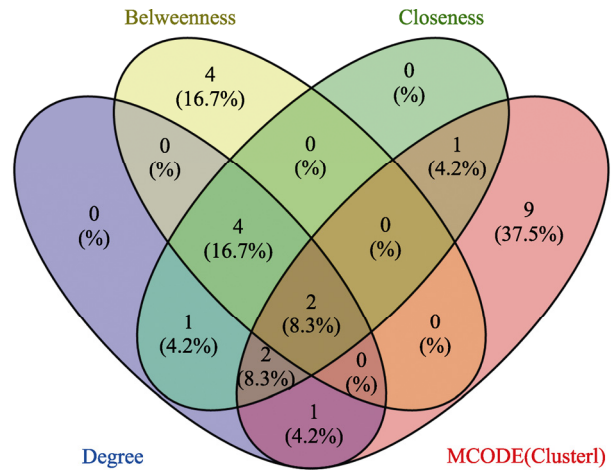


图 5 关键靶点筛选韦恩图

Fig. 5 Venn map of key target screening

使用 Metascape 数据库对筛选靶点进行 KEGG 通路富集分析, 富集结果排名前 20 位的信号通路见图 7, 涉及 1 型糖尿病、糖酵解/糖异生、内分泌抵抗、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、AMPK 信号通路、自身免疫性甲状腺疾病、胶质瘤、Toll 样受体信号通路、Th17 细胞分化、类风湿性关节炎、甲型流感、利什曼病、弓形虫病、Th1 和 Th2 细胞分化、细胞黏附分子等信号通路, 表明筛选的靶点具有多通路协同调节作用, 可通过参与这些信号通路的调控来干预 T2DM 肝糖异生反应。

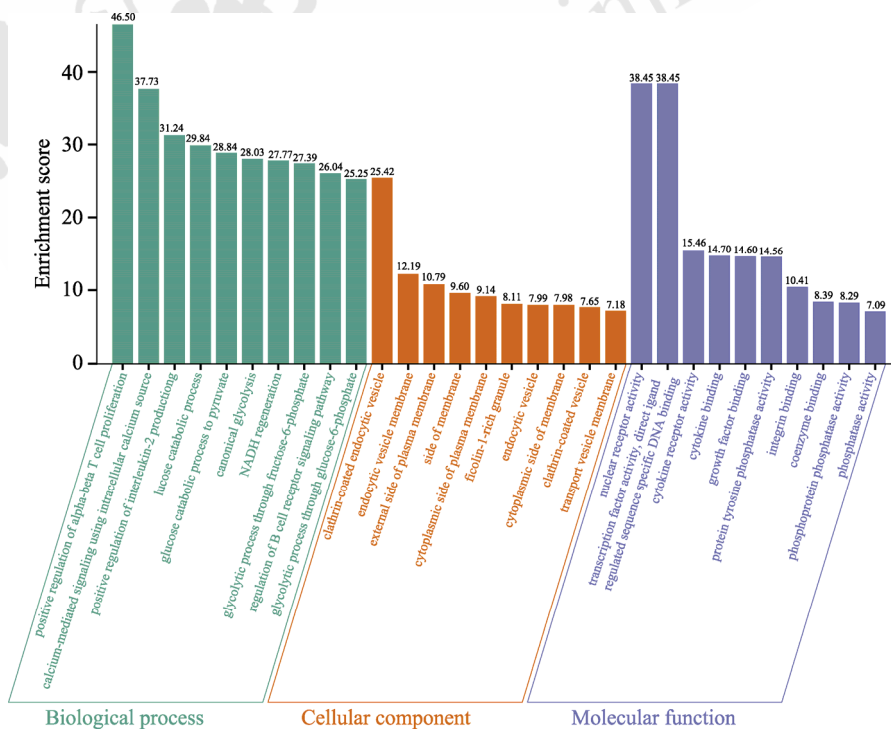


图 6 GO 分析结果

Fig. 6 Results of GO analysis

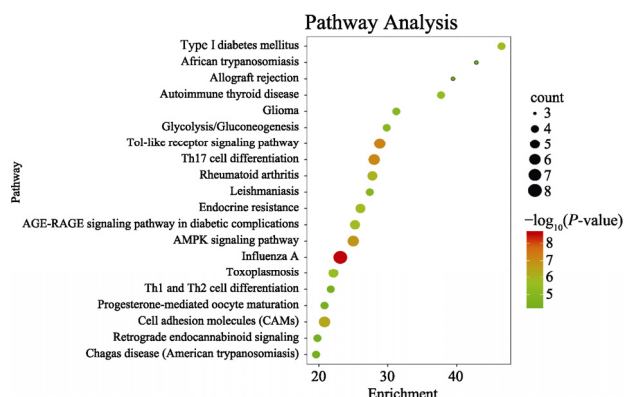


图7 KEGG 通路分析结果

Fig. 7 Results of KEGG analysis

2.6 基于分子对接技术探讨关键靶点与降糖药物的作用关系

通过 PyRx-Virtual Screening Tool 运算得到 26 种用于治疗 T2DM 的降糖药物及成分与标志性靶标蛋白 PTPRC 和 VCAM1 的对接结果, 其对接结合能分值为 $-9.5 \sim -4.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结果见表 1。一般认为, 对接结合能分值的绝对值 $>4.25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表示分子与靶标具有一定的结合能力, $>5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表示结合能力较强, $>7.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表示结合能力很强^[11-12]。结果表明 26 个降糖药物、成分与关键靶点 PTPRC 和 VCAM1 同时具有较好的空间匹配和能量匹配以及不同程度的结合能力($>4.25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)。其中与 PTPRC 具有一定结合能力的有 1 个, 结合能力较强的有 11 个, 结合能力很强的有 14 个; 与 VCAM1 具有一定结合能力的有 1 个, 结合能力较强的有 13 个, 结合能力很强的有 12 个。表明各药物、成分均可通过调节关键靶点 PTPRC 和 VCAM1 来发挥治疗 T2DM 的作用。

靶标蛋白与效应物质相互作用经 Discovery Studio Visualizer 软件分析发现, 与靶标蛋白结合的 26 种化合物主要以范德华力、氢键、共价键等方式与靶蛋白结合, 使得效应物质能够牢固地结合在活性位点区域, 靶标蛋白与配体结合能位于前 3 位的相互作用关系见图 8。VCAM1 氢键结合的活性位点主要集中在 TYR(A:119)、LYS(A:147)和 ASP(A:178)区域, 范德华力作用位点主要集中在 LEU(A:12)、GLU(A:142)和 TYR (A:89)区域; PTPRC 活性位点较多, 效应物质可通过多种结合方式作用于活性位点进而发挥作用, 其中氢键的结合位点多发生于 SER(B:1163)、HIS(B:804)、LYS(B:1003)、ARG(B:657)、VAL(B:659)、ALA(B:830)等氨基酸活性位点上。

表 1 化合物与 PTPRC 和 VCAM1 亲和力

Tab. 1 Affinity of compounds with PTPRC and VCAM1 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$

化合物名称	VCAM1 对接结合能分值	PTPRC 对接结合能分值
利格列汀	-7.7	-7.5
沙格列汀	-6.0	-7.0
阿格列汀	-5.7	-6.1
恩格列净	-6.8	-7.1
小檗碱	-7.1	-6.6
埃格列净	-7.5	-7.4
氯磺丙脲	-5.8	-5.5
苯磷硫胺	-6.4	-5.9
格列齐特	-6.9	-6.4
格列美脲	-8.1	-7.7
格列吡嗪	-7.6	-7.8
格列本脲	-7.9	-7.9
二甲双胍	-4.6	-5.0
阿卡波糖	-7.4	-7.5
西格列汀	-8.1	-7.3
米格列醇	-5.1	-5.5
异牡荆苷	-7.5	-7.5
比格列酮	-6.8	-8.3
鸢尾素	-7.9	-7.1
那格列奈	-7.2	-6.1
妥拉磺脲	-6.4	-6.7
瑞格列奈	-6.4	-9.0
维达列汀	-6.8	-6.1
罗格列酮	-6.5	-7.8
格列喹酮	-8.2	-9.5
达格列净	-6.4	-7.0

结果表明各药物、成分均可通过多种键合能力牢固地结合在关键靶点 PTPRC 和 VCAM1 的活性位点区域, 进而发挥效应作用来实现相关生物学过程, 同时也说明 PTPRC 和 VCAM1 在 T2DM 的治疗中具有重要作用, 与上述网络分析结果一致, 可作为 T2DM 诊断和治疗的关键性靶点。

2.7 空腹血糖和口服糖耐量检测

与正常对照组比较, 模型组小鼠空腹血糖显著增加且均 $>7.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明了该 T2DM 模型的有效性。为了验证生物信息学研究结果, 本研究采用了 T2DM 一线药物且具有肝糖异生抑制作用的二甲双胍^[13]为治疗药物探讨分析结果。结果发现治疗后模型鼠血糖显著下降, 且该下降趋势与模型组相比具有显著性差异($P < 0.01$), 证实了肝糖异生类治疗药物的降糖效果, 结果见表 2。

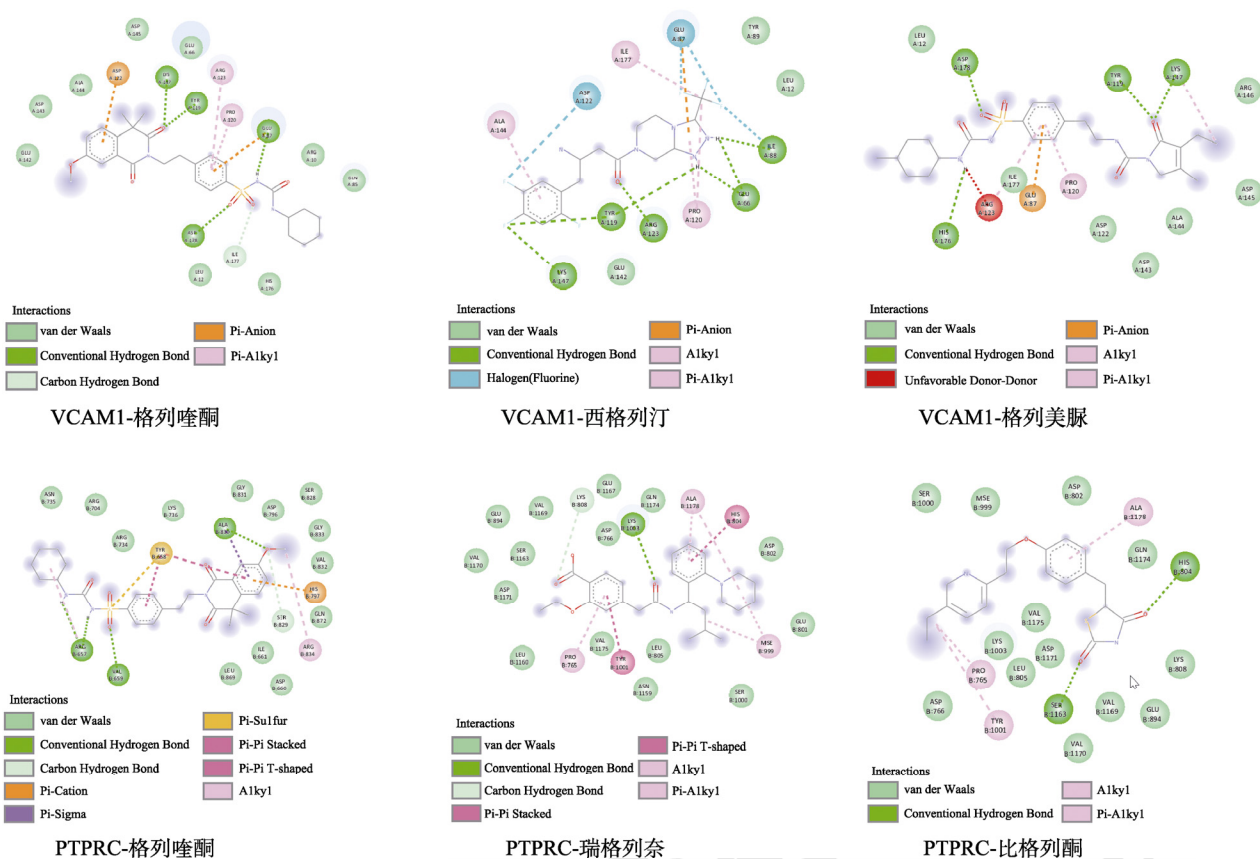


图 8 靶标蛋白与效应物质相互作用
Fig. 8 Interaction between target protein and effector

为了探讨造模前后和治疗前后小鼠对葡萄糖的耐受程度,进行了口服糖耐量检测,与正常对照组相比,模型组血糖 AUC 显著增加,表明葡萄糖耐受能力显著降低;与模型组相比,治疗组 AUC 显著降低,葡萄糖耐受能力显著提高,表明糖异生类药物治疗后机体对葡萄糖的调节能力得到有效改善,结果见表 2。

表 2 空腹血糖和口服糖耐量($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 2 Fasting blood glucose and oral glucose tolerance ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

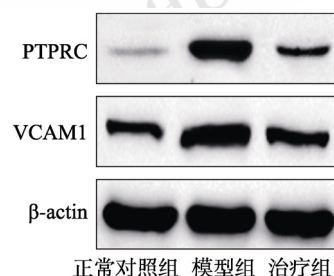
组别	空腹血糖/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	AUC/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
正常对照组	6.16 ± 1.00	30.31 ± 7.64
模型组	$14.06 \pm 2.93^{1)}$	$81.61 \pm 5.07^{1)}$
治疗组	$8.18 \pm 1.22^{2)}$	$64.05 \pm 7.90^{2)}$

注:与正常对照组比较, $^{1)}P<0.01$;与模型组比较, $^{2)}P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, $^{1)}P<0.01$; compared with model group, $^{2)}P<0.01$.

2.8 验证靶标蛋白在 T2DM 小鼠肝组织中的表达

为了验证标志性靶标蛋白 PTPRC 和 VCAM1 在 T2DM 发生和治疗中的作用,本研究采用 Western blotting 对其蛋白表达水平进行了论证,结果见图 9。正常对照组 PTPRC 和 VCAM1 的相



正常对照组 模型组 治疗组

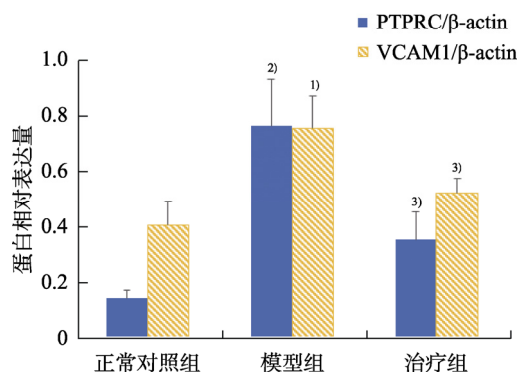


图 9 各组肝脏相关蛋白表达

与正常对照组比较, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$;与模型组比较, $^{3)}P<0.05$ 。

Fig. 9 Expression of liver associated protein in each group Compared with the normal control group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; compared with model group, $^{3)}P<0.05$.

对表达量分别为 0.14 ± 0.03 , 0.40 ± 0.09 ; 与正常对照组相比, 模型组肝组织中 PTPRC 和 VCAM1 的相对表达量均显著升高, 分别为 0.76 ± 0.17 ($P < 0.01$), 0.75 ± 0.12 ($P < 0.05$), 说明二者的异常激活在 T2DM 的产生中起重要作用; 二甲双胍治疗后, PTPRC 和 VCAM1 的相对表达量均较模型组显著降低, 分别为 0.35 ± 0.10 ($P < 0.05$), 0.52 ± 0.05 ($P < 0.05$), 表明肝糖异生类典型药物二甲双胍治疗 T2DM 作用的发挥可通过抑制 PTPRC 和 VCAM1 的表达来实现。此外, 研究发现 PTPRC 和 VCAM1 参与了 T2DM 发生和治疗的全过程, 并在每个阶段均呈现显著变化, 再次说明 PTPRC 和 VCAM1 在 T2DM 的治疗中具有重要作用, 验证了上述分析结果。

3 讨论

肝糖异生亢进是 T2DM 的一个标志性特征, 也是目前临床上治疗 T2DM 药物的主要靶点^[7]。肝糖异生受多基因相互作用调控, 影响糖异生途径, 进而调节葡萄糖的生成。基因表达谱和靶点数据库在 T2DM 中的应用, 为本研究提供了以多组学大数据为基础的生物信息学研究 T2DM 发病机制、发现新生物标志物的可能性。本研究综合利用生物信息学技术对 T2DM 患者肝组织基因组数据和网络平台数据库进行数据建模分析, 最终筛选出 56 个与 T2DM 肝糖异生密切相关的易感性差异表达靶点, 并对筛选出的靶点进行了生物过程和通路富集分析。研究发现基于肝糖异生筛选出的 T2DM 靶点蛋白主要涉及了网格蛋白包被内吞囊泡、胞吞泡膜、质膜外侧等细胞成分, 并且具有多种生物活性, 其在 T2DM 肝糖异生反应中呈现的主要分子功能包括核受体活性、转录因子活性、直接配体调节序列特异性 DNA 结合以及细胞因子受体活性等, 这些靶点蛋白凭借其生物特性通过相互作用对 α - β T 细胞增殖的正调控、利用细胞内钙源进行钙介导的信号转导、白细胞介素-2 产生的正调控、葡萄糖分解代谢、典型糖酵解等生物过程进行干预, 进而调控肝糖异生反应, 影响 T2DM 进程。此外, 研究还发现这些筛选的靶点蛋白对 T2DM 肝糖异生反应的干预作用不仅与其对 1 型糖尿病通路、糖酵解/糖异生通路、内分泌抵抗通路等常见的糖尿病信号通路调控有关, 还与其对肿瘤、免疫缺陷性疾病、炎症疾病等相关通路的调控有关, 是多靶点相互作用、多通路

协同调节的结果, 同时说明这些信号通路及其关键蛋白的差异表达对于 T2DM 的发病机制具有重要贡献。

为了寻找 T2DM 新的生物标志物, 本研究借助多种网络计算手段对 56 个差异靶点进行了 PPI 分析以探寻关键蛋白, 结果共识别出影响肝糖异生的 2 个 T2DM 标志性靶点蛋白 PTPRC 和 VCAM1, 此二者的异常高表达很可能是 T2DM 产生的重要机制(图 3)。PTPRC 为受体型酪氨酸蛋白磷酸酶 C, 目前对它的研究多集中在自身免疫性疾病和炎症等方面^[14], 尽管有生物信息学研究显示 PTPRC 与糖尿病肾病^[15]、T2DM 脑缺血^[16]发病机制有关, 但也仅限于理论研究层面, 其在 T2DM 中的贡献仍需进一步研究和验证。VCAM1 为血管细胞黏附分子-1, 是免疫球蛋白超家族的一员, 虽然已有文献报道显示其在血液、血管细胞中的异常表达与 T2DM 的发病有关^[17-18], 但其在 T2DM 肝组织中并没有类似的研究, 其与糖异生反应的关系也未见研究报道。因此, PTPRC 和 VCAM1 作为基于肝糖异生治疗 T2DM 的潜在生物标志物, 其在 T2DM 肝组织中的具体作用仍需进一步实验验证。

现阶段研究发现, 临床常用的降糖药物二甲双胍、噻唑烷二酮类、磺脲类、磷酸酶抑制剂和二肽基肽酶-4 抑制剂类等, 均能够通过调控肝糖异生反应发挥作用^[1,5], 但它们在肝糖异生的干预中是否存在共同调节的标志性靶点尚未可知。因此, 本研究选取了包括上述类别在内的 23 个 FDA 批准的降糖药物及 3 个化学成分异牡荆苷(α -葡萄糖苷酶抑制剂)^[19]、小檗碱(磷酸酶抑制剂)^[5]和鸢尾素(蛋白类激素)^[20]对筛选的 T2DM 肝糖异生靶点蛋白标志物进行虚拟验证, 结果各药物、成分与靶点均具有较好的空间匹配和能量匹配以及不同程度的结合能力, 表明它们均可通过调节关键靶点 PTPRC 和 VCAM1 来实现相关生物学过程。

为了进一步证实上述研究结果, 本研究建立了自发性 T2DM KKAY 小鼠模型, 选取了具有抑制肝糖异生作用的一线降糖药二甲双胍为治疗药物, 通过分子生物学方法验证了 PTPRC 和 VCAM1 在 T2DM 发生及治疗前后的表达情况。结果显示, T2DM 产生后, 在血糖异常升高的同时 PTPRC 和 VCAM1 的表达也显著增高, 并且都在治疗药物干

预后显著降低,表明 PTPRC 和 VCAM1 的表达与糖异生的变化趋势相一致,并且也与其在图 3 中的表达结果相互印证,可用以间接反映 T2DM 肝糖异生的状态,也说明基于肝糖异生的 T2DM 治疗与二者的调控密切相关。这些结果再次印证了生物信息学分析结果,也表明了该研究方法的正确性。

综上所述,PTPRC 和 VCAM1 在 T2DM 的治疗中具有重要作用,二者有望成为 T2DM 新的生物标志物。该研究为 T2DM 肝糖异生的特异性治疗及靶向药物筛选提供了参考。

REFERENCES

- [1] LI H X, KUANG H Y. Regulation mechanism of hepatic gluconeogenesis and intervention of hypoglycemic drugs[J]. Med Recapit(医学综述), 2020, 26(18): 3690-3695.
- [2] BONNER C, KERR-CONTE J, GMYR V, et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion[J]. Nat Med, 2015, 21(5): 512-517.
- [3] LOTFY M, ADEGHATE J, KALASZ H, et al. Chronic complications of diabetes mellitus: A mini review[J]. Curr Diabetes Rev, 2017, 13(1): 3-10.
- [4] TOMITA T. Apoptosis in pancreatic β -islet cells in Type 2 diabetes[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2016, 16(3): 162-179.
- [5] CHEN Y Q, WANG P F, LIU Y. Research progress in anti-hyperglycemics targeting gluconeogenesis in liver[J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2017, 41(10): 733-741.
- [6] WANG J L, YAO J H, NING Q, et al. Beneficial effects of nanosuspensions of honokiol in mice on high fat diet through suppression of hepatic gluconeogenesis[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2019, 54(2): 288-293.
- [7] HATTING M, TAVARES C D J, SHARABI K, et al. Insulin regulation of gluconeogenesis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2018, 1411(1): 21-35.
- [8] YIN W, FU X, LI P. Application research progress of proteomics[J]. Biotechnol Bull(生物技术通报), 2014(1): 32-38.
- [9] MA J J, WANG X C, NIE X J. Advances in the application of bioinformatics in proteomics research[J]. China J Bioinform (生物信息学), 2021, 19(2): 85-91.
- [10] LI J. Studies on identification of potential therapeutic targets for complex diseases and miRNA pharmacogenomics based on multi-omics data and network models[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2018.
- [11] ZHAO L Q, XIAO J H, LI S. Molecular docking for in structure-based drug designing[J]. Acta Biophys Sin(生物物理学报), 2002, 18(3): 263-270.
- [12] WANG M Q, LIN Z Z, ZHU C C. Mechanism prediction of medicine pair of Ramulus et Folium Picrasmae and Herba Andrographis against cholestasis based on network pharmacology[J]. Pharm Today(今日药学), 2020, 30(7): 453-461, 473.
- [13] TANG H J, ZHANG Y Q, WANG X, et al. On the mechanism of metformin-inhibited hepatic gluconeogenesis[J]. Chin J Endocrinol Metab(中华内分泌代谢杂志), 2013, 29(11): 971-976.
- [14] KRALOVA J, PAVLIUCHENKO N, FABISIK M, et al. The receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45 promotes onset and severity of IL-1 β -mediated autoinflammatory osteomyelitis[J]. J Biol Chem, 2021, 297(4): 101131.
- [15] YAN R J, ZANG W W. Chip analysis and bioinformatics analysis of diabetic nephropathy[J]. J Taishan Med Coll(泰山医学院学报), 2019, 40(1): 18-20.
- [16] ZHAO L. Transcatheter study on the cerebral protective effect of ischemic postcondition in T2DM tree shrews and the analysis of related factors in clinic[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2017.
- [17] FADEL M M, ABDEL GHAFAR F R, ZWAIN S K, et al. Serum netrin and VCAM-1 as biomarker for Egyptian patients with type II diabetes mellitus[J]. Biochem Biophys Rep, 2021(27): 101045.
- [18] CHONG X J, YU Q Y, YANG L X. Expression and clinical significance of miR-126 and sVCAM-1 in patients with type 2 diabetic nephropathy[J]. Hebei Med J(河北医药), 2019, 41(3): 334-337, 342.
- [19] ZHANG X, XU D H. Research progress of pharmacological action of vitexin[J]. China Med Herald(中国医药导报), 2013, 10(35): 35-38, 42.
- [20] 张睿, 顾玉姣, 田楚琪, 等. 鸢尾素对二型糖尿病的影响[J]. 甘肃科技, 2020, 36(13): 169-171, 12.

收稿日期: 2021-05-18

(本文责编: 李艳芳)