

金芪降糖片入血成分抗糖尿病机制的网络药理学研究

朱晓芹, 王博龙^{*}(宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000)

摘要: 目的 基于网络药理学方法研究金芪降糖片入血成分治疗糖尿病的作用机制。方法 通过文献挖掘确定金芪降糖片入血成分, 在 TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库检索入血成分靶点, 通过 GeneCards 数据库查询糖尿病靶点, 将糖尿病靶点与入血成分靶点筛选得到入血成分抗糖尿病靶点, 借助 Cytoscape 软件构建入血成分-抗糖尿病靶点网络; 应用 STRING 平台构建入血成分抗糖尿病靶蛋白相互作用网络, 并导入 Cytoscape 软件计算拓扑参数, 筛选关键靶点; 通过 Cytoscape 中“ClueGO”插件进行 GO 生物过程分析; 利用 DAVID 数据库进行 KEGG 通路富集分析。结果 金芪降糖片 16 个入血成分作用于 123 个糖尿病靶点, 22 个关键靶点包括炎症因子 IL1 β 、IL6、IL8、TNF、PTGS2; 氧化还原反应酶 CAT、SOD1、MAOB; 心血管靶点 TBXA2R、VEGFA、NOS3; 细胞周期与凋亡蛋白 CDK2、MAPK、CASP3 等。参与急性炎症反应调节、外源性凋亡信号通路负调节、单加氧酶活性调节、过氧化氢生物合成等 14 大类生物过程。调节胰岛素抵抗、I 型糖尿病、TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等。结论 金芪降糖片主要通过抗炎、抗氧化、调节细胞凋亡及糖代谢等药理作用, 减轻胰岛 β 细胞损伤, 改善胰岛素抵抗, 产生抗糖尿病作用。

关键词: 金芪降糖片; 入血成分; 糖尿病; 网络药理学; 信号通路

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)04-0431-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.04.009

引用本文: 朱晓芹, 王博龙. 金芪降糖片入血成分抗糖尿病机制的网络药理学研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(4): 431-436.

Mechanism of Constituents Migrating to Blood of Jinqi Jiangtang Tablet in Treating Diabetes Mellitus by Network Pharmacology

ZHU Xiaoqin, WANG Bolong^{*} (School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the mechanism of constituents migrating to blood of Jinqi Jiangtang tablet in treating diabetes mellitus based on network pharmacology. **METHODS** Searched literature to obtain constituents migrating to blood of Jinqi Jiangtang tablet, screened targets corresponding to the constituents migrating to blood in TCMSP and Swiss Target Prediction databases, and found the targets of diabetes from GeneCards database, anti-diabetic targets of constituents migrating to blood were obtained by their intersection. The results were imported into Cytoscape software to construct a network of constituents migrating to blood anti-diabetic targets. Used STRING platform to construct a PPI network, imported the network to Cytoscape software to calculate topological parameters, and picked out key targets; the gene ontology(GO) function enrichment analysis was performed by “ClueGO” plug-in; the DAVID database was used for KEGG pathway enrichment analysis. **RESULTS** Sixteen constituents migrating to blood of Jinqi Jiangtang tablet acted on 123 diabetic targets. Twenty two key targets included inflammatory factors: IL1 β , IL6, IL8, TNF, and PTGS2; redox reaction enzymes: CAT, SOD1, MAOB; cardiovascular targets point: TBXA2R, VEGFA, NOS3; cell cycle and apoptosis proteins: CDK2, MAPK, CASP3, et al. They involved in 14 major biological processes such as regulation of acute inflammatory response, negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway, regulation of monooxygenase activity, and hydrogen peroxide biosynthetic processes, and regulated multiple signaling pathways such as insulin resistance, type I diabetes mellitus, TNF signaling pathway, NF- κ B signaling pathway, MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway. **CONCLUSION** Jinqi Jiangtang tablet mainly has pharmacological effects such as anti-inflammatory, anti-oxidation, regulation of apoptosis and glucose metabolism, alleviates islet β -cell damage, reduces insulin resistance, finally produces anti-diabetic effect.

KEYWORDS: Jinqi Jiangtang tablet; constituents migrating to blood; diabetes mellitus; network pharmacology; signaling pathway

中药复方是中华民族使用天然药物千百年的经验结晶, 由于其化学成分复杂, 导致药效物质不明。复方药效物质的研究方法有多种, 其中通

过分析复方口服给药后血中移行成分, 确定其体内直接作用物质, 已成为快速确定复方药效物质的有效途径之一^[1]。金芪降糖片是由中国医学科学

作者简介: 朱晓芹, 女, 硕士生 Tel: (0795)3201985
Tel: (0795)3201985 E-mail: wblong77@126.com

E-mail: 1468448165@qq.com *通信作者: 王博龙, 男, 博士, 副教授, 硕导

院药物研究所依据《备急千金要方》中的复方黄连丸,结合现代药理学研发的一种安全有效的糖尿病治疗中成药^[2-3],但药效物质不清楚。Jin 等^[4]进行了金芪降糖片的血清药物化学研究,发现了新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木兰花碱、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀以及黄芪甲苷 16 种血中移行成分,为金芪降糖片的机制研究奠定了物质基础。

由于金芪降糖片入血成分众多,传统的单成分-单靶标-单通路研究难以揭示其治疗糖尿病的机制。网络药理学能够挖掘多种药学、生物学数据库的海量信息,运用专业的可视化分析及算法进行大数据分析,从网络层面系统、综合地观察多成分药物如何干预和影响疾病靶点,已成为中医药复杂体系研究公认的新机遇、新利器。本研究借助网络药理学方法,全面分析金芪降糖片 16 种入血成分的作用靶点、生物过程及信号通路,旨在阐明其治疗糖尿病的复杂机制。

1 材料与方法

1.1 入血成分抗糖尿病靶点筛选及其网络构建

在 TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库检索金芪降糖片 16 种入血成分作用靶点,并利用 UniProt 数据库将靶蛋白转换成对应的靶基因。在 GeneCards 数据库以“diabetes”为检索词,搜索糖尿病靶基因,将糖尿病靶基因与金芪降糖片入血成分靶基因输入 Venny 2.1 软件(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>),筛得二者交集靶基因作为金芪降糖片治疗糖尿病靶基因,将入血成分及其靶点导入 Cytoscape 软件,构建入血成分-抗糖尿病靶点网络图。

1.2 入血成分抗糖尿病靶点相互作用研究

将筛选得到的入血成分-抗糖尿病靶点导入 STRING 平台构建靶蛋白互作网络(protein-protein interaction, PPI),设置蛋白种类为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值为“medium confidence”,其他参数保持默认值。将 PPI 网络导入 Cytoscape 软件,利用“Network Analysis”功能计算蛋白节点的度值(Degree)和介数(Betweenness)2 个重要网络拓扑参数,每个参与互作的蛋白节点用一个圆圈表示,圆圈面积越大表示其度值越大,圆圈周线越粗代表其介数越大。选取 Degree 和 Betweenness 同时

在平均值之上的靶蛋白作为金芪降糖片治疗糖尿病的关键靶标。

1.3 入血成分抗糖尿病关键靶点的基因本体生物过程分析

通过 Cytoscape 软件中“ClueGO”插件对关键靶点进行基因本体(gene ontology, GO)生物过程富集分析,其中 GO Tree Interval 选项设置为 Min Lever=5, Max Lever=11; GO Term Selection 选项设置为 Number of Genes=2, Min Percentage=4.0; Kappa Score=0.4; 其余选项选择默认。分析关键靶点在体内可能参与的生物过程。

1.4 入血成分抗糖尿病关键靶点的 KEGG 通路分析

利用 DAVID 数据库进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路分析,物种与背景设置均为“Homo sapiens”(智人)进行操作,研究靶点投射的 KEGG 信号通路与疾病之间的相互关系,并通过 Omicshare 软件(<http://www.omicshare.com/tools/index.php/>),对富集分析结果进行可视化分析,明确其治疗糖尿病的主要药理机制。

2 结果

2.1 入血成分抗糖尿病靶点及其网状图

将 TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库检索得到的 133 个入血成分靶基因,与 GeneCards 数据库挖掘到的 11 330 个糖尿病靶基因筛选,得到 123 个入血成分抗糖尿病的靶基因,见图 1。入血成分-抗糖尿病靶点网络图见图 2,共有 141 个节点,452 条边,每个入血成分均能作用于多个抗糖尿病靶点,体现了金芪降糖片的多成分、多靶点作用。

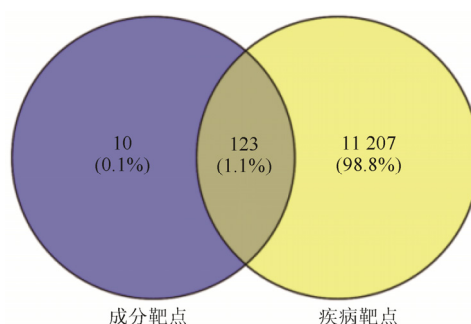


图 1 入血成分-糖尿病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn's diagram of targets of constituents migrating to blood and diabetes

2.2 入血成分抗糖尿病靶点的 PPI 网络分析

PPI 网络共有 114 个节点(9 个靶蛋白未参与),903 条相互作用连线,平均 degree 为 15.84,平均

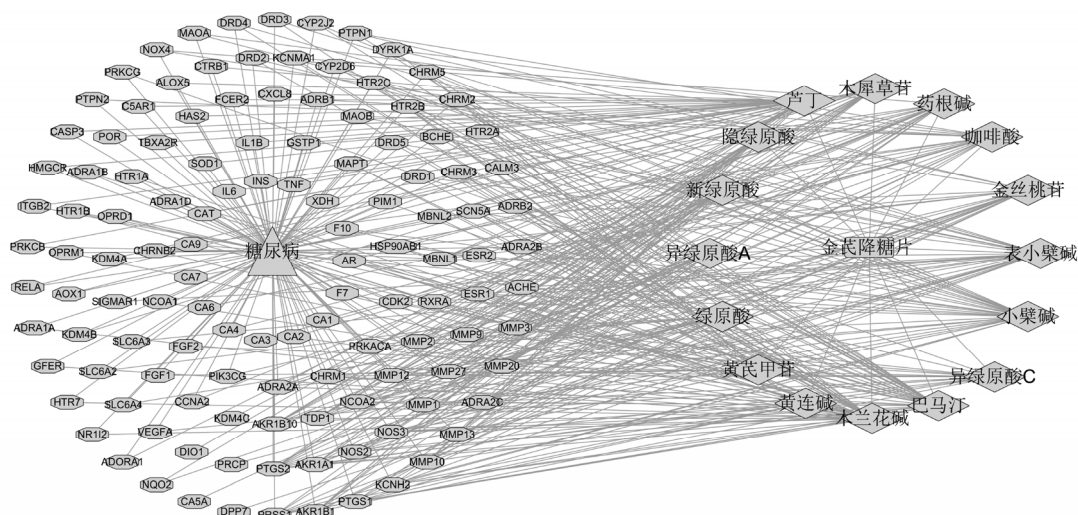


图2 入血成分-抗糖尿病靶点网络

Fig. 2 Network of constituents migrating to blood anti-diabetic targets

betweenness 为 1.04×10^{-2} , degree 和 betweenness 都超过平均值的靶点共有 22 个, 主要包括 IL1 β 、IL6、IL8、TNF、PTGS2 炎症因子, CAT、SOD1、MAOB 氧化还原反应酶, TBXA2R、VEGFA、NOS3 心血管靶点, ESR1、AR 性激素受体, CDK2、MAPT、CASP3 细胞周期与凋亡蛋白以及 INS 等, 说明金芪降糖片作用与其调节炎症、氧化应激、性激素受体、心血管生理、细胞周期及凋亡等密切相关。结果见图 3, 表 1。

2.3 关键靶点的 GO 生物过程富集分析

富集 22 个关键靶点 GO 生物过程得到 198 条 GO 条目, 主要分为一氧化氮合酶活性(nitric-oxide

表 1 关键靶点及其拓扑参数

Tab. 1 Key targets and their topological parameters

靶点名称	中文名	靶点	度值	介数
insulin	胰岛素	INS	66	1.98×10^{-2}
interleukin-6	白细胞介素-6	IL6	48	6.94×10^{-2}
interleukin-8	白细胞介素-8	IL8	42	4.68×10^{-2}
vascular endothelial growth factor A	血管内皮生长因子 A	VEGFA	41	3.43×10^{-2}
tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子	TNF	40	3.87×10^{-2}
nitric-oxide synthase, endothelial	一氧化氮合酶, 内皮细胞	NOS3	39	5.55×10^{-2}
prostaglandin G/H synthase 2	前列腺素 G/H 合成酶 2	PTGS2	36	5.12×10^{-2}
caspase-3	半胱氨酸蛋白酶 3	CASP3	36	2.48×10^{-2}
estrogen receptor	雌激素受体	ESR1	34	5.84×10^{-2}
acetylcholinesterase	乙酰胆碱酯酶	ACHE	34	3.56×10^{-2}
interleukin-1 beta	白细胞介素-1 β	IL1 β	34	2.04×10^{-2}
67 kDa matrix metalloproteinase-9	67 kDa 基质金属蛋白酶-9	MMP9	32	2.34×10^{-2}
catalase	过氧化氢酶	CAT	30	4.70×10^{-2}
sodium-dependent serotonin transporter	钠依赖性 5-羟色胺转运蛋白	SLC6A4	30	1.12×10^{-2}
sodium-dependent dopamine transporter	钠依赖性多巴胺转运蛋白	SLC6A3	28	1.25×10^{-2}
amine oxidase [flavin-containing] B	单胺氧化酶 B	MAOB	27	1.65×10^{-2}
androgen receptor	雄激素受体	AR	26	2.51×10^{-2}
superoxide dismutase [Cu-Zn]	超氧化物歧化酶 [Cu-Zn]	SOD1	25	4.83×10^{-2}
cytochrome P450 2D6	细胞色素 P450 2D6	CYP2D6	21	2.36×10^{-2}
microtubule-associated protein tau	微管相关蛋白 tau	MAPT	17	2.97×10^{-2}
cell division protein kinase 2	细胞分裂蛋白激酶 2	CDK2	17	1.31×10^{-2}
thromboxane A2 receptor	血栓素 A2 受体	TBXA2R16	1.51	1.51×10^{-2}

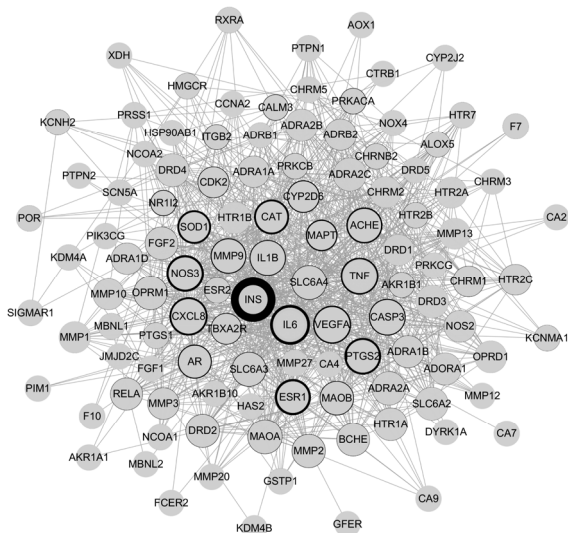


图3 靶蛋白 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of targets

synthase activity)、急性期应答(acute-phase response)、急性炎症反应调节(regulation of acute inflammatory response)、外源性凋亡信号通路负调节(negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway)、单加氧酶活性调节(regulation of monooxygenase activity)、过氧化氢生物合成过程(hydrogen peroxide biosynthetic process)等 14 大类,说明金芪降糖片药理作用主要与炎症反应、细胞凋亡、氧化反应等生物过程密切相关。见图 4。

2.4 关键靶点的 KEGG 通路分析

以 $P < 0.05$ 作为筛选条件,富集 22 个关键靶点的 KEGG 通路,得到 39 条通路,其中与糖尿病密切相关的有肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、胰岛素抵抗(insulin resistance)、I型糖尿病(type I diabetes mellitus)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)、NF- κ B 信号通路(NF- κ B signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)等。结果见图 5。

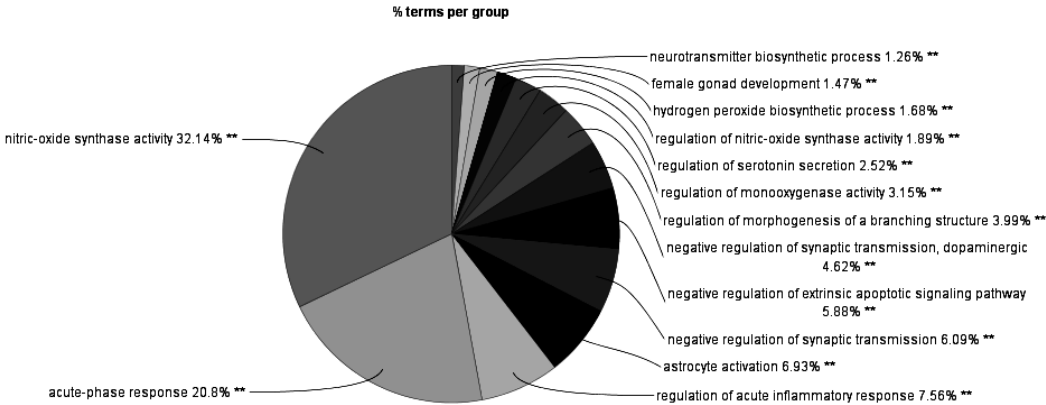


图 4 GO 功能注释饼状图
Fig. 4 Pie diagram of GO function annotation



图 5 KEGG 信号通路点状图
Fig. 5 Dot graph of KEGG signaling pathway

3 讨论

金芪降糖片由黄芪、黄连和金银花组成,清热益气、生津止渴,主要用于气阴两虚合并内热症候的糖尿病患者,组方中药都是糖尿病中医治疗的常用药物,含有多种抗糖尿病活性成分。如黄芪甲苷具有降血糖、降血脂、改善胰岛素抵抗、抑制炎症反应与氧化应激等作用,能够改善糖尿病动物与细胞模型中糖尿病血管病变、糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病周围神经病变、糖尿病心肌病等病理性损伤^[5]。黄连素的糖脂代谢调节功能已被各种临床及动物实验证实,其通过促进胰岛素分泌、抑制肝糖原异生^[6]、改善胰岛素抵抗^[7]等多种机制治疗糖尿病。金银花的降血糖作用与其抑制 α -淀粉酶和 α -糖苷酶活性^[8],以及改善胰岛素抵抗^[9]有关,Yan 等^[10]发现金银花中的 3,5-二咖啡酰奎宁酸能选择性抑制小肠 α -葡萄糖苷酶的活性,且活性抑制的强弱与其所含的 2 个咖啡酰氧基团密切相关。除了研究上述单味药的抗糖尿病作用,Wang 等^[11]还整体考察了金芪降糖片中黄芪总黄酮、黄芪总皂苷、金银花总有机酸、黄连总生物碱 4 个标准组分的抗糖尿病作用,发现其能清除自由基、抑制一氧化氮释放以及 α -糖苷酶、醛糖还原酶和脂肪酶的活性,呈现出多组分多靶点抗糖尿病作用,但具体活性成分及作用靶点并不清楚。

本研究基于网络药理学方法,明确了金芪降糖片 16 种入血成分作用的 123 个糖尿病靶点,并依据 PPI 网络分析筛出 22 个关键靶点,发现关键靶点主要归属于炎症因子、氧化还原反应酶、性激素受体、细胞周期与凋亡相关蛋白等,其 GO 生物过程主要包括急性炎症反应调节、外源性凋亡信号通路负调节、单加氧酶活性调节、过氧化氢生物合成等 14 大类。这与高血糖、游离脂肪酸、脂肪因子、炎症因子、氧化应激和线粒体功能紊乱等因素导致胰岛 β 细胞损伤或胰岛素抵抗,诱发糖尿病的病理机制相吻合,说明金芪降糖片主要通过抗炎、抗氧化,调节激素效应以及细胞凋亡等药理作用,减轻胰岛 β 细胞损伤,改善胰岛素抵抗来治疗糖尿病。

关键靶点 KEGG 通路包括与糖尿病直接相关的胰岛素抵抗和 I 型糖尿病;与炎症相关 TNF、NF- κ B、Toll 样受体信号通路;与体内糖代谢相关 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路等,这些通路都与糖

尿病的发生发展息息相关。越来越多的证据表明糖尿病长期处于一种慢性低度炎症状态,在各种炎症因子相互影响和相互作用网络中,NF- κ B 起着中心调控作用,而 Toll 样受体是 NF- κ B 上游信号调节因子,可激活多种细胞因子,最终引起一系列的免疫和炎症反应^[12],导致胰岛 β 细胞损伤,胰岛素抵抗等,而实验证实金芪降糖片治疗作用与其有效降低 NF- κ B 表达有关^[13]。PI3K/Akt 信号通路是胰岛素调控肝糖原生成的关键通路,Aoki 等^[14]应用基因敲除技术,使得 PI3K 的调节亚基、催化亚基基因功能缺陷,导致糖代谢紊乱;如果 PI3K 的表达或活性降低,则胰岛素信号无法通过 PI3K 通路向葡萄糖摄取的方向传递而出现胰岛素抵抗^[15]。MAPK 通过磷酸化靶蛋白来调控信号通路,促进脂肪酸氧化、抑制肝脏对糖的输出、降低脂肪生成和三酰甘油的合成,从而发挥能量代谢功能^[16];还可以上调葡萄糖转运载体-4 的表达,促进糖的吸收和利用,增加胰岛素受体的敏感性,改善胰岛素抵抗^[17]。由此可见,金芪降糖片通过调节多条炎症通路、糖代谢通路治疗糖尿病,具有多靶点、多通路作用的特点。

综上所述,本研究应用网络药理学方法,对金芪降糖片入血成分的作用靶点及其信号通路进行了系统研究,发现金芪降糖片主要通过抗炎、抗氧化、调节细胞凋亡及糖代谢等药理作用,减轻胰岛 β 细胞损伤,改善胰岛素抵抗,产生抗糖尿病作用,为金芪降糖片的临床应用提供科学依据。

REFERENCES

- [1] WANG X J. Studies on serum pharmacochimistry of traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med(世界科学技术), 2002, 4(2): 1-4, 78.
- [2] YUAN X H, LU N, JIN X H, et al. Hypoglycemic effect of Jinqijiangtang Tablet prepared by new technology [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(21): 3219-3222.
- [3] CHEN R, MA N N, FAN S S, et al. Mechanism of Jinqi Jiangtang tablets on improving lipid metabolism disorder of type 2 diabetic rats based on metabonomics [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(20): 102-107.
- [4] JIN H, MOU J J, XIA N, et al. Identification and analysis of absorbed components in rat plasma after oral administration of Jinqi Jiangtang Tablets by UPLC-ESI-MS [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2018, 41(12): 2227-2231.
- [5] YOU L Z, LIN Y X, FANG Z H, et al. Research advances on astragaloside-IV in treatment of diabetes mellitus and its complications pharmacological effects [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(24): 4700-4706.
- [6] XIA X, YAN J, SHEN Y, et al. Berberine improves glucose

- metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis [J]. PLoS One, 2011, 6(2): 16556-16565.
- [7] LIU L Z, CHEUNG S C, LAN L L, et al. Berberine modulates insulin signaling transduction in insulin-resistant cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 317(1): 148-153.
- [8] CHEN X L. Effects of water extract from Honeysuckle on Glycometabolism *in vitro* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(3): 628-629.
- [9] LIANG X Y, ZHANG H J, ZHU L Y, et al. Effects of extracts of *Lonicera japonica* Thunb. on hepatic PGC-1 α expression and insulin resistance in mouse [J]. Chin J Diabetes(中国糖尿病杂志), 2011, 19(3): 197-200.
- [10] YAN H, QIU C, ZHONG K, et al. Inhibition of α -Glucosidase activity by 3,5-Dicaffeoylquinic acid from *Lonicera japonica* Thunb flower buds [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2015, 31(7): 44-49.
- [11] WANG Y, WANG T, WU J X, et al. Anti-diabetic effect and mechanism of components in Jinqi Jiangtang tablet *in vitro* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(16): 105-109.
- [12] ANTHONY N, FOLDI I, HIDALGO A. Toll and Toll-like receptor signalling in development [J]. Development, 2018, 145(9). Doi: 10.1242/dev.156018.
- [13] 薛小芳. 沙格列汀结合金芪降糖片对糖尿病患者临床疗效及核因子 κ B 表达的影响研究[J]. 首都食品与医药, 2019, 26(3): 60.
- [14] AOKI K, MATSUI J, KUBOTA N, et al. Role of the liver in glucose homeostasis in PI 3-kinase p85 α -deficient mice [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 296(4): E842-E853.
- [15] CORDERO-HERRERA I, MARTÍN M Á, GOYA L, et al. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2014(64): 10-19.
- [16] VONHOLSTEIN-RATHLOU S, BONDURANT L, PELTEKIAN L, et al. FGF21 mediates endocrine control of simple sugar intake and sweet taste preference by the liver [J]. Cell Metab, 2016, 23(2): 335-343.
- [17] WANG C, ZHANG H X, XING H Y, et al. Oxymatrine alleviates oxidative stress in fat-induced insulin resistance mice by suppressing p38MAPK pathway [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(15): 2872-2876.
- 收稿日期: 2019-05-31
(本文责编: 沈倩)