

基于网络药理学的分心木总黄酮抗2型糖尿病作用机制研究及关于AKT/FoxO1信号通路的细胞实验验证

李国艳¹, 程艳刚², 曾桐春¹, 李明杰¹, 孙芮芮¹, 李慧峰¹, 孔祥鹏¹, 裴妙荣^{1,3*}

1. 山西中医药大学 中药学院, 山西 晋中 030619

2. 黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

3. 山西振东健康产业集团有限公司太原工程技术中心, 山西 晋中 030619

摘要: 目的 通过网络药理学研究预测分心木总黄酮(TFDJF)的主要活性成分和作用靶点, 探讨其多成分-多靶点-多通路的抗2型糖尿病(T2DM)的作用机制; 并选取AKT/FoxO1信号通路进行细胞实验验证。方法 基于文献检索构建分心木黄酮类成分的化学成分数据库, 并以“类药五原则”筛选潜在的活性成分, 采用PharmMapper服务器反向药效团匹配方法预测活性成分可能的作用靶标, 并根据TTD、OMIM数据库中与T2DM相关的靶点, 筛选分心木黄酮类成分抗T2DM的作用靶标, 通过对靶标的基因本体(GO)功能富集分析和KEGG通路分析, 构建活性成分-抗T2DM作用靶点-代谢通路网络图, 探讨TFDJF抗T2DM的作用机制。采用系统对接网站进行GSK3B和AKT1对山柰酚的分子对接。并进一步采用细胞实验进行验证: 选取HepG2细胞, 运用高浓度胰岛素诱导胰岛素抵抗(IR)模型, 150 $\mu\text{g/mL}$ TFDJF处理细胞36 h, 氧化酶法检测各组细胞的葡萄糖消耗量, Western blotting法检测AKT-FoxO信号通路相关蛋白的表达。结果 共获得分心木潜在的黄酮类活性成分10个, 预测成分作用靶标共104个, 筛选出与抗T2DM相关的关键靶点15个, KEGG通路富集分析发现TFDJF抗T2DM的作用机制可能与胰岛素、FoxO、AMPK和PI3K-AKT等信号通路有关。山柰酚与GSK3B有强烈的结合活性, 与AKT1有较好的结合活性。进一步通过细胞实验验证, TFDJF可显著提高HepG2细胞IR模型葡萄糖消耗量($P < 0.01$), 显著升高AKT蛋白磷酸化水平($P < 0.01$), 显著降低FoxO1蛋白表达水平($P < 0.01$), 验证了网络药理学的部分预测结果。结论 TFDJF抗T2DM的作用机制可能与胰岛素、FoxO、AMPK和PI3K-AKT等信号通路有关。

关键词: 网络药理学; 2型糖尿病; 分心木; 总黄酮; 分子对接; 胰岛素抵抗; AKT-FoxO信号通路

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)01-0030-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.01.005

Action mechanism of total flavonoids of *Diaphragma Juglandis Fructus* in treating type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology and cellular experimental validation of AKT/FoxO1 signaling pathway

LI Guoyan¹, CHENG Yangang², ZENG Tongchun¹, LI Mingjie¹, SUN Ruirui¹, LI Huifeng¹, KONG Xiangpeng¹, PEI Miaorong^{1,3}

1. School of Chinese Pharmacy, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Key Laboratory of Basis and Application Research of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

3. Taiyuan Engineering Research Center, Shanxi Zhendong Health Industry Group Co., Ltd., Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective This paper aimed to investigate the anti-T2DM activity of total flavonoids of *Diaphragma Juglandis Fructus* (TFDJF), screen anti-T2DM compounds and predict targets of anti-T2DM to explore its multi-component, multi-target and multi-pathway anti-T2DM mechanism. AKT/FoxO1 signaling pathway was selected for cell experiment. **Methods** A database of chemical components of flavonoids of *Diaphragma Juglandis Fructus* was established through literature retrieval, and then the data were combined with five principles of drug absorption to screen active constituents. The targets of active constituents were predicted by

收稿日期: 2018-09-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373546、30472125、81273660)

第一作者: 李国艳(1994—), 女, 硕士生, 从事中医方剂化学研究。Tel: 18335143870 E-mail: liguoyan20150320@163.com

*通信作者: 裴妙荣(1956—), 女, 博士生导师, 教授, 从事中医方剂化学研究。Tel: (0351)3179901 E-mail: peimr602@163.com

using the reverse pharmacophore matching method and screened according to the anti-T2DM related targets in the databases such as TTD, OMIM, et al, and further analyzed the gene GO function and the KEGG pathway enrichment. And the active constituents-targets-pathways network model was also established to study the mechanisms of anti-T2DM of TFDJF. The molecular docking of kaempferol between GSK3B and AKT1 was carried out on the system docking website. Cell experiments were further used to verify: HepG2 cells were selected, insulin-induced insulin resistance (IR) model was used with high concentration of insulin. The cells were treated with 150 $\mu\text{g/mL}$ TFDJF for 36 hours. The glucose consumption of each group was measured by oxidase method, and the expression of AKT-FoxO signal pathway-related proteins was detected by Western blotting methods. **Results** This study screened 10 active constituents of flavonoids in *Diaphragma Juglandis Fructus* Totally 104 targets were predicted, and 15 targets related to the anti-T2DM effects were screened. The potential regulatory pathways included Insulin signaling pathway, FoxO signaling pathway, AMPK signaling pathway, PI3K-AKT signaling pathway and so on. Kaempferol has strong binding activity with GSK3B and good binding activity with AKT1. Results of the experimental testing prove that TFDJF could significantly elevate the glucose consumption in insulin resistance cell models ($P < 0.01$), enhance the p-AKT protein expression and decrease the FoxO1 protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion** The anti-T2DM mechanism of TFDJF may be related to the signaling pathways of insulin, FoxO, AMPK and PI3K-AKT.

Key words: network pharmacology; T2DM; *Diaphragma Juglandis Fructus*; total flavonoids; molecular docking; insulin resistance; AKT-FoxO signaling pathway

糖尿病是以因胰岛素分泌或作用缺陷而致血糖升高为基本特征的一种内分泌代谢性疾病,其发病率逐年上升,2015年全球发病人数超过4.15亿,到2040年预计将达到6.42亿^[1-3]。根据发病机制的不同,糖尿病分为以胰岛素分泌不足为主要特征的1型糖尿病和以胰岛素抵抗(Insulin Resistance, IR)为主要特征的2型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM),其中以T2DM为主,占比超过90%。IR参与T2DM发生和发展的全过程,是T2DM的重要病理基础^[4]。目前临床上治疗T2DM的药物存在低血糖反应、变态反应等诸多不良反应,使患者承受更大的经济负担^[5]。近年来,中草药基于其安全性、有效性及低成本等优势受到研究人员越来越多的关注,从中草药中研究并开发出了诸多治疗糖尿病的药物^[6-8]。

分心木为胡桃科植物胡桃 *Juglans regia* L. 果核内的木质隔膜,具有涩精缩尿、止血止带、止泻痢的功效,临床常用于遗精滑泄、尿频遗尿、崩漏、带下等的治疗^[9]。分心木主要含有黄酮、挥发油、生物碱、皂苷类等成分,其中黄酮类成分含量高达6.259%^[10-11]。本课题组前期对分心木总黄酮(total flavonoids of *Diaphragma Juglandis Fructus*, TFDJF)的制备工艺进行了优选,实验研究表明TFDJF具有较强的抗氧化活性,并对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶具有较强的抑制作用,具有开发成治疗糖尿病药物的潜力^[12-13],然而其多成分、多靶点及多通路抗糖尿病的作用机制仍未被阐明,严重制约进一步的研究与开发。

网络药理学(network pharmacology)作为一种研究药物、疾病、靶点之间相互关系的网络分析方法,其结合系统生物学、药理学和计算机技术等多学科技术,基于疾病-基因-靶点-药物相互作用网络的基础上,利用专业网络分析软件计算法,系统发掘中药潜在活性成分和作用靶点,可实现药物作用的综合网络分析^[1,14-15]。网络药理学系统性、整体性的特点与中药多成分-多靶点-多途径作用特征相吻合,在深入揭示中药作用机制的研究中已经越来越受到研究者的重视,为中医药的现代化研究提供了一个新的策略和方向^[16-17]。

本研究在系统查阅国内外相关文献的基础上,构建了分心木黄酮类成分数据库,采用网络药理学的方法预测和筛选TFDJF的潜在活性成分和抗T2DM的作用靶点,探讨TFDJF多成分-多靶点-多通路抗T2DM的作用机制。在此基础上,采用胰岛素诱导HepG2细胞IR模型,对TFDJF抗T2DM的作用机制进行验证。本研究旨在明确TFDJF抗T2DM的作用机制,为TFDJF的深入开发奠定理论基础。

1 材料

1.1 实验细胞

人肝癌细胞系HepG2细胞,购于中国科学院上海细胞所。

1.2 药物与主要试剂

分心木药材购自河北安国药材市场,经山西中医药大学中药学院裴香萍副教授鉴定为胡桃科植物胡桃 *Juglans regia* L. 果核内的木质隔膜。TFDJF根据课题组前期实验建立的方法制备^[12-13];称取分

心木药材,加13倍量59%乙醇回流提取2次,每次77 min,提取液浓缩为0.5 g/mL,上样于径高比为1:6的AB-8型大孔树脂柱,上样体积流量为2 BV/h,上样量为2 BV,吸附4 h,加水1.5 BV洗脱水溶性杂质,加50%乙醇3 BV洗脱,洗脱体积流量为2 BV/h,收集洗脱液,减压浓缩后60℃干燥即得。以芦丁为对照品,采用硝酸铝显色法检测,其总黄酮质量分数为76.21%。

胰酶、胎牛血清(FBS)、DMEM培养基(美国Gibco公司,批号分别为1636024、L4R23305、1701408);青霉素-链霉素溶液(批号C0222),RIPA裂解液、BCA蛋白浓度定量试剂盒、磷酸蛋白酶抑制剂(批号分别为P0013B、P0010、P1006),兔抗FoxO1抗体(批号为AF603),均购自碧云天生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS,美国HyClone公司,批号ABA212020);葡萄糖测定试剂盒(北京北化康泰临床试剂有限公司,批号1017);胰岛素(Sigma公司,批号I9278);兔抗p-AKT抗体(英国Abcam公司,批号为ab38449);GAPDH抗体(proteintech,批号5174);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG二抗(Cell Signaling,批号7074);Clarity Western ECL Substrate试剂A及试剂B(美国Bio-Rad,批号1705041);二甲基亚砜(北京索莱宝科技有限公司,批号为ApplichemA3672);MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20170104)。

1.3 实验仪器

AB135-S电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);FA2104型电子分析天平(上海精科天平仪器厂);SB-800 DTD超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);-80℃超低温冰箱(中科美菱);GB-50隔水式恒温培养箱、YXQ-LS-50SII立式蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备

厂);SW-CJ-2FD超净工作台(苏净集团安泰公司);1-15K高速冷冻离心机(Sigma公司);DK-8D型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司);CK40型倒置显微镜(日本奥林巴斯);HT2型酶标仪(Biocell);164-5050型Western电泳仪、GelDoc2000型凝胶成像仪、电泳仪、水平和垂直电泳槽、转移槽(美国Bio-Rad公司);二氧化碳培养箱(ThermoFisher Scientific)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 分心木黄酮类化学成分收集及活性成分筛选 检索国内外相关文献,收集分心木黄酮类成分,结合Pubchem数据库<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>,采用ChemDraw软件绘制成分的化学结构并保存为Mol2格式,将该格式的化合物导入Molecular Operating Environment(MOE)软件,计算药物吸收的预测参数,并以“类药五原则”中的相对分子量(MW)≤500、氢键给体(nOHNH)≤5、氢键受体(nOH)≤10、脂水分配系数(miLogP)≤5进行筛选,获得分心木中潜在的黄酮类活性成分^[18-19]。在筛选过程中,有3个黄酮类成分木犀草苷、槲皮苷和芦丁,虽不符合“类药五原则”,但相关研究表明,这3个成分具有显著的治疗T2DM的作用^[20-22],因此保留这3个成分并进行后续研究。通过筛选共获得10个潜在的活性成分,具体信息见表1。

2.1.2 活性成分靶点预测与筛选 将Mol2格式的活性成分上传至PharmMapper服务器http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/submit_file.php,采用反向药效团匹配方法进行靶点预测,参数设置如下为Generate Conformers: Yes; Maximum Generated Conformations: 100; Select Target Set: Human

表1 分心木黄酮类活性成分具体信息

Table 1 Detail information of flavonoids in *Diaphragma Juglandis Fructus*

No.	化合物名称	分子式	MW	nOHNH	nOH	miLogP
1	儿茶酚	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	5	6	1.37
2	二氢槲皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304.25	5	7	0.71
3	山奈素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.27	3	6	2.71
4	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	4	6	2.17
5	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	4	6	1.97
6	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.26	3	5	2.12
7	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.24	5	7	1.68
8	木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.38	7	11	0.19
9	槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.38	7	11	0.64
10	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.52	10	16	1.06

Protein Target Only (v2010, 2241); Number of Reserved Matched Targets: 100; Perform GA Match: Yes。采用 Uniprot 数据库 <http://www.uniprot.org/> 对 PharmMapper 预测匹配得分前 30 的靶点进行搜索, 限定物种为人, 对靶点名称进行规范。以“type 2 diabetes”为关键词, 于 Therapeutic Target Database 数据库 (TTD, <https://db.idrblab.org/ttd/>)、Online Mendelian Inheritance in Man 数据库 (OMIM, <https://www.omim.org/>)、Disease Gene Search Engine 数据库 (DigSee, <http://210.107.182.61/geneSearch/>)、the Comparative Toxicogenomics Database 数据库 (CTD, <http://ctdbase.org/>) 进行检索及筛选, 删除重复的靶点, 获得与 T2DM 相关的靶点, 并与预测所得的活性成分的靶点进行对比, 筛选出 TFDJF 抗 T2DM 的潜在靶点。

2.1.3 GO 和 KEGG 富集分析 将获得的 TFDJF 抗 T2DM 的潜在作用靶点导入 DAVID 数据库 <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>, 对靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析, 并根据 P 值 ($P < 0.05$) 筛选出 TFDJF 抗 T2DM 的重要通路。

2.1.4 “活性成分-靶点-通路”网络模型构建与分析 采用 cytoscape 3.6.0 软件构建 TFDJF 抗 T2DM 的“活性成分-靶点-通路”网络模型, 网络包括活性成分、靶点或作用通路 3 类节点 (node), 并以边 (edge) 相连, 通过构建网络模型研究分心木黄酮类化合物多成分、多靶点、多通路的作用机制。

2.1.5 分子对接 采用系统对接网站 system dock web site, <http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>, 对度值 degree 较高的靶点与活性成分进行对接, 预测靶点和活性成分结合的性能。

2.2 细胞实验验证

2.2.1 细胞培养 HepG2 细胞复苏后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱, 待细胞贴壁长满至 90%, 用 0.25% 胰酶消化传代, 取对数生长期的细胞用于实验。

2.2.2 TFDJF 对 HepG2 细胞活性的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞按 3×10^4 /mL 密度接种于 96 孔细胞培养板, 200 μ L/孔, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至贴壁后, 吸弃培养基。加入用完全培养基配置的不同浓度的 TFDJF, 使其终质量浓度分别为 200、150、100、50、25、10 μ g/mL, 100 μ L/孔, 每个浓度设 6 个复孔, 另设空白 (仅含培养基, 不接种细胞) 组和对照 (不加药) 组。分别于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24、36、48 h, 每孔加入 10 μ L MTT 液, 震荡摇

匀后继续培养 4 h, 吸弃上清液, 每孔加入 100 μ L DMSO, 避光摇匀后于酶标仪 490 nm 测吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$$

2.2.3 HepG2 细胞 IR 模型的建立^[23] 取对数生长期的 HepG2 细胞按 1×10^6 /孔密度接种于 12 孔细胞培养板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 吸弃上清培养基, 加入无血清培养基及饥饿培养 12 h, 吸弃上清培养基, PBS 洗涤 2 次, 加入新配置的含有 10 μ g/mL 胰岛素的完全培养基培养 36 h, 即为 HepG2 细胞 IR 模型^[23]。

2.2.4 细胞分组及给药 根据“2.2.2”项下实验结果, 实验分为对照组、模型组、TFDJF (150 μ g/mL) 组。细胞接种及饥饿培养后, 模型组更换为含有胰岛素的培养基, TFDJF 组更换为含有胰岛素和 TFDJF 的培养基, 对照组加入完全培养基, 每组设 6 个复孔, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h。

2.2.5 TFDJF 对 IR HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 TFDJF 对 IR HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响按照“2.2.4”项下方法, 加药物培养 24 h 后以葡萄糖氧化酶法检测培养液上清液中的葡萄糖含量, 以未接种细胞的对照组的葡萄糖含量均值减去各组测得的培养液中葡萄糖含量均值, 即得各组细胞的葡萄糖消耗量。

2.2.6 Western blotting 法检测 AKT-FoxO 信号通路相关蛋白的表达 PBS 洗涤各实验组细胞 2 次, 收集各实验组细胞, 加入新鲜配制的含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 而后于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 并用 BCA 法蛋白定量。制备蛋白上样样品, 取蛋白样品 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST (0.3% Tris、0.8% NaCl、0.02% KCl、0.01% 吐温-20、pH 7.4) 封闭 2 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 化学发光显色, 采用 Quantity One 软件对相关蛋白表达进行分析。

2.2.7 数据分析 实验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所得数据作方差齐性试验后作 t 检验。

3 结果

3.1 靶点预测与筛选

通过 PharmMapper 服务器对分心木 10 个潜在的活性成分进行靶点预测, 并选取每个成分 Fit

score 排名前30的靶点进行后续分析,去除重复后共获得104个潜在靶点。通过搜索TTD、OMIM等数据库,共获得与T2DM相关的靶点498个,并与预测所得的活性成分的靶点进行对比分析,筛选出TFDJF抗T2DM的潜在靶点15个,具体靶点信息见表2。

3.2 GO和KEGG富集分析

对TFDJF抗T2DM的15个潜在靶点进行GO富集分析,获得靶点基因的生物学过程、细胞组分和分子功能,将 $P < 0.05$ 作为注释结果的筛选条件,结果见图1。15个靶点主要集中于细胞器膜上,涉及免疫反应、刺激反应及代谢等生物学过程,发挥

表2 相关靶点信息

Table 2 Information of related targets

No.	缩写	基因	蛋白质	UniProt
1	PCK1	PCK1	烯醇丙酮酸磷酸羧激酶	P35558
2	AR	AR	雄激素受体	P10275
3	GSK3B	GSK3B	糖原合成酶激酶-3	P49841
4	SOD2	SOD2	超氧化物歧化酶	P04179
5	NOS3	NOS3	一氧化氮合成酶	P29474
6	ESR1	ESR1	雌激素受体	P03372
7	NR3C2	NR3C2	盐皮质激素受体	P08235
8	LCK	LCK	酪氨酸受体激酶	P06239
9	SHBG	SHBG	性激素结合蛋白	P04278
10	PTPN1	PTPN1	非受体1型酪氨酸蛋白磷酸酶	P18031
11	HK1	HK1	己糖激酶1	P19367
12	AKT1	AKT1	RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	P31749
13	BRAF	BRAF	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶B	P15056
14	APCS	APCS	血清淀粉样蛋白P	P02743
15	PPARG	PPARG	过氧化物酶体增殖激活受体	P37231

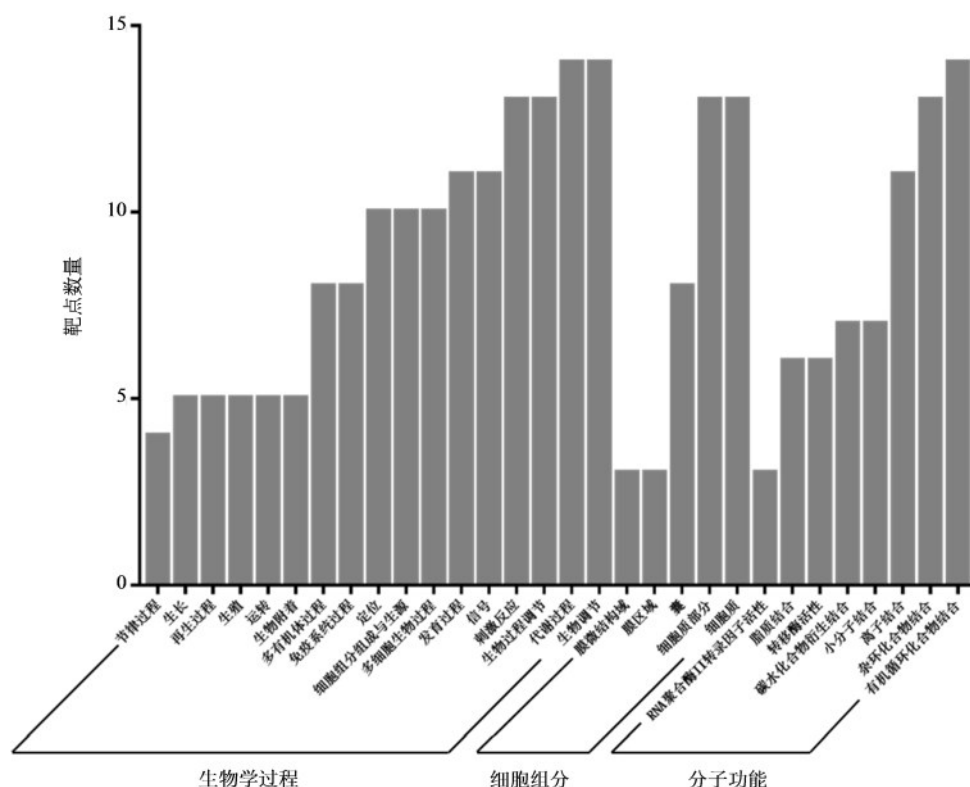


图1 TFDJF潜在活性成分抗T2DM靶点GO注释分析

Fig. 1 GO annotation analysis of anti-T2DM targets of active ingredients in total flavonoids of *Diaphragma Juglandis Fructus*

有机环状物结合、脂质结合、杂环化合物结合、离子结合等功能作用。

KEGG 通路分析结果见表3,15个靶点分布于胰岛素信号通路、前列腺癌、FoxO 信号通路等22条信号通路,相互协调和共同调节可能为TFDJF抗T2DM的作用机制。

3.3 “活性成分-靶点-通路”网络模型构建与分析

采用Cytoscape 3.6.0软件建立“活性成分-靶点-通路”网络模型,如图2所示,共有48个节点(10个活性成分节点、15个靶点节点及23个通路节点)。采用NetworkAnalyzer插件对网络的拓扑参数进行分析,平均相邻节点数(average number of neighbors)为5.149,网络异质性(network heterogeneity)为0.771,网络度(network density)为0.112,网络中心度(network centralization)为0.383。活性成分、靶点、通路三者存在复杂的网络关系,活性成分通过不同的蛋白靶点在不同的代谢通路中发挥作用,相互协调,符合中药作用的“多成分-多靶点-多通路”特性。

3.4 分子对接结果

由“活性成分-靶点-通路”网络可知,TFDJF抗T2DM的10个潜在活性成分中,山柰酚的degree(degree=7)最高,15个靶点中,degree较大的2个靶点为AKT1(degree=22)和GSK3B(degree=20),

表3 相关通路信息

Table 3 Information of related pathways

No.	通路	靶点数	P-value
1	胰岛素信号通路	6	2.09×10^{-6}
2	胰岛素抵抗	5	2.54×10^{-5}
3	前列腺癌	4	4.04×10^{-4}
4	FoxO 信号通路	4	1.38×10^{-3}
5	子宫内膜瘤	3	3.49×10^{-3}
6	癌症通路	5	3.54×10^{-3}
7	大肠癌	3	4.93×10^{-3}
8	催乳素信号通路	3	6.43×10^{-3}
9	ErbB 信号通路	3	9.53×10^{-3}
10	HIF-1 信号通路	3	0.012
11	雌激素信号通路	3	0.012
12	T细胞受体信号通路	3	0.013
13	甲状腺素信号通路	3	0.016
14	神经营养因子信号通路	3	0.018
15	AMPK 信号通路	3	0.018
16	PI3K-Akt 信号通路	4	0.019
17	破骨细胞分化	3	0.021
18	丙型肝炎	3	0.021
19	趋化因子信号通路	3	0.040
20	肿瘤蛋白多糖	3	0.045
21	焦点粘连	3	0.048
22	甲状腺癌	2	0.049

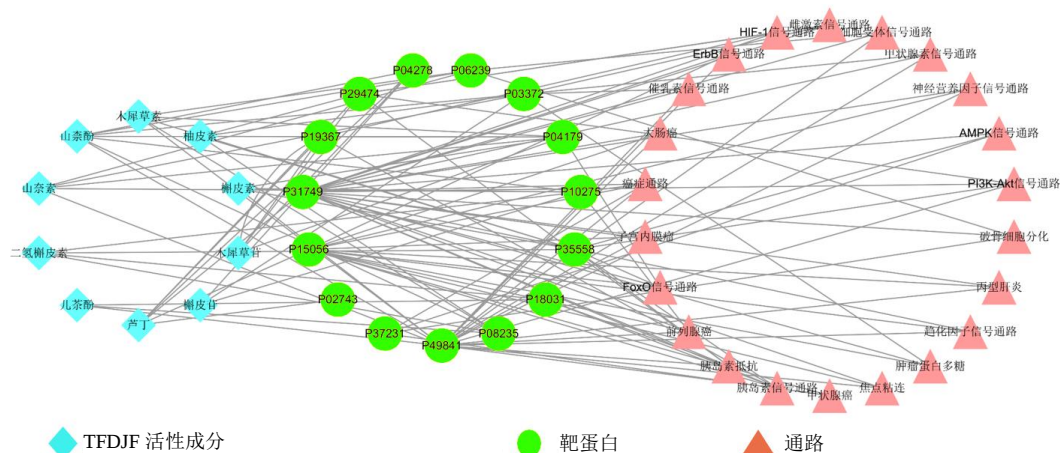


图2 TFDJF“活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 2 “active ingredient -target proteins-signaling pathway” network of TFDJF

对这2个靶点与山柰酚进行对接,对接结果的分数是实验解离/抑制常数(K_D/K_I)的负对数,通常为0至10(由弱到强),以分数值为判决山柰酚与靶点的结合程度,分数>4.25认为有一定的结合活性,>5有较好的结合活性,>7具有强烈的结合活性。分子对接结果如表4、图3所示,山柰酚与GSK3B有强烈的结合活性,与AKT1有较好的结合活性,进一

表4 山柰酚与靶点分子对接

Table 4 Docking of kaempferol with targets

靶点	PDB ID	分数
AKT1	4EKK	6.34
GSK3B	4ACH	7.00

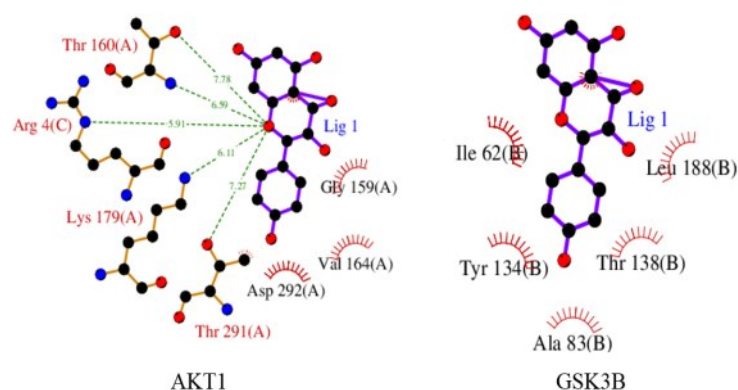


图3 山奈酚与靶点相互作用分析

Fig. 3 Intermolecular interaction analysis between Kaempferol and targets

步表明网络药理学实验预测结果的可靠性。

3.4 TFDJF对HepG2细胞活性的影响

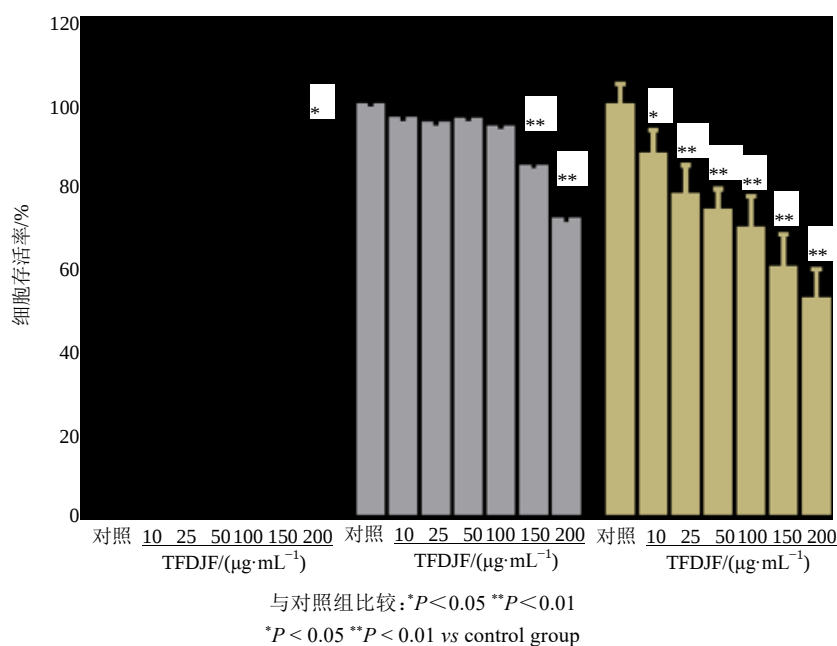
用MTT法检测TFDJF对HepG2细胞活性的影响,结果如图4所示。与对照组比较,随着TFDJF浓度和处理时间的增加,细胞活性也随之下降低,不同浓度的TFDJF处理细胞24 h后,仅200 $\mu\text{g/mL}$ TFDJF组细胞存活率显著下降($P<0.05$);当处理36 h时,200、150 $\mu\text{g/mL}$ TFDJF组细胞存活率显著下降($P<0.01$);当处理时间延长至48 h时,各浓度TFDJF对HepG2细胞活性的抑制作用均显著增强($P<0.05$ 、 0.01),为尽量避免TFDJF对细胞活性的影响及更好发挥TFDJF改善IR活性,本实验选择150 $\mu\text{g/mL}$ TFDJF处理细胞36 h。

3.5 TFDJF对IR HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响

与对照组比较,经过胰岛素处理后,模型组细胞产生了IR作用,葡萄糖消耗量明显减少($P<0.01$);与模型组比较,TFDJF给药组细胞葡萄糖消耗量明显增加,差异具有统计学意义($P<0.01$),表明药物干预后能改善HepG2细胞IR状态,见图5。

3.6 TFDJF对IR HepG2细胞AKT-FoxO信号通路相关蛋白表达的影响

如图6所示,与对照组比较,模型组细胞p-AKT蛋白表达显著降低($P<0.01$),FoxO1蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,TFDJF干预后p-AKT蛋白表达显著升高($P<0.01$),FoxO1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。

图4 TFDJF对HepG2细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Fig. 4 Effect of TFDJF on activity of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

4 讨论

中药及复方具有多成分、多靶点、多通路的作用特点,作用机制不明确将影响其有效性和安全性研究。近年来网络药理学的提出打破了传统“一个药物、一个靶标、一个疾病”的理念,基于高通量组学数据分析、计算机虚拟计算及网络数据库检索构建“药物-基因-靶点-疾病”相互作用网络,通过分析药物与机体相互作用,实现了对中药及复方的作用机制研究的整体化、系统化,为中药及复方作用机制的研究提供了新方法,也为新药的开发奠定前期基础^[24]。

本研究通过查阅国内外相关文献,搜集并整理分心中黄酮类成分,通过“类药五原则”筛选出10个潜在的活性成分,大量研究表明,所筛选的活性成分均具有显著的抗糖尿病活性^[20-22,25-30],在一定程

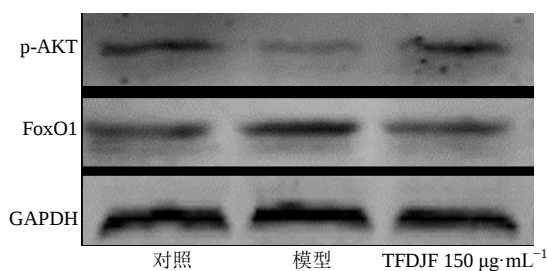
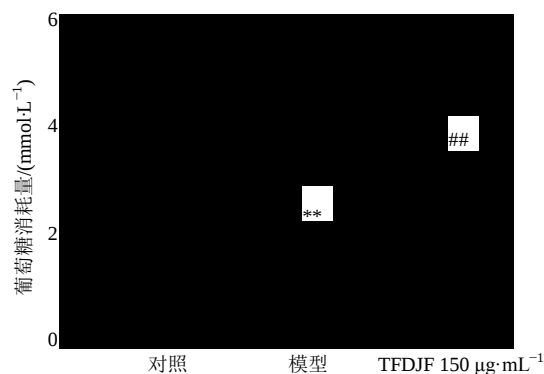


图6 TFDJF对IRHepG2细胞p-AKT、FoxO1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of TFDJF on expression of p-AKT, FoxO1 in IR HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

度上证实了网络药理学研究方法的可行性及可靠性。采用PharmMapper服务器对潜在活性成分的靶点进行预测,共得到104个靶点,各成分的靶点重叠程度较大,即不同成分具有共同或相似的靶点,它们之间具有协同作用。经与T2DM相关靶点进行比对分析,获得TFDJF抗T2DM的15个靶点,通过构建“成分-靶点-通路”的网络图,并对网络拓扑参数进行分析,结果显示,活性成分中山奈酚的degree为7,排在潜在活性成分首位,提示其可能是分心木发挥抗T2DM的主要活性成分。山奈酚为黄酮醇类的黄酮单体,广泛存在于苹果、西兰花等水果蔬菜及多种中草药中,具有抗氧化^[31]、抗炎^[32]、抗凋亡^[33]等多种药理活性,大量实验研究表明,山奈酚可通过IKK/NF- κ B^[34]、AMPK/mTOR^[35]、ASK1/MAPK^[36-37]等信号通路发挥抗糖尿病及其并发症的作用。15个靶点中degree较大的两个靶点为

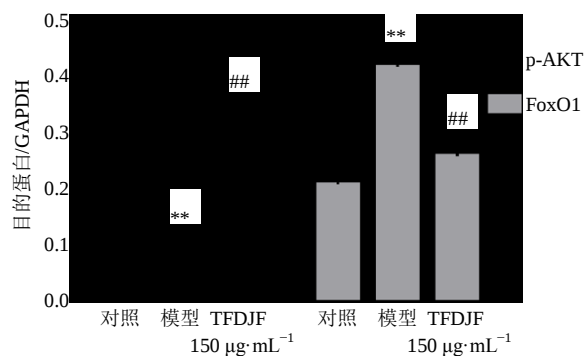


与对照组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

图5 TFDJF对IRHepG2细胞葡萄糖消耗量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Effect of TFDJF on glucose consumption of IR HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



AKT1 (degree=22) 和 GSK3B (degree=20)。AKT1(P31749)又被称为蛋白激酶Ba,是PI3K/AKT信号转导通路中心环节AKT的亚型之一,在调节胰岛素依赖的新陈代谢细胞应答方面具有重要作用^[38]。当AKT1被激活后,可调节糖摄取、脂质代谢等胰岛素的相关生物功能,AKT1的过表达还会导致机体空腹或非空腹血糖的升高并诱导产生IR^[39-41]。GSK3B(P49841)是一种丝/苏氨酸激酶,也是AKT的直接下游靶点,可参与胰岛素信号通路,胰岛素通过受体及其本身磷酸化GSK-3B,促进肝糖原合成酶去磷酸化,增加糖原合成,降低血糖浓度,而GSK3B的过度表达则减弱胰岛素信号传导通路,有研究表明GSK3B还能通过调控炎症过程来调控T2DM的发展,近年来,研究人员以GSK3B为切入点,运用GSK3B抑制剂来缓解IR,进而治疗T2DM及其并发症,取得了一定的进展^[42-44]。

通过KEGG通路富集分析,确定了包括胰岛素信号通路、IR、FoxO信号通路、AMPK信号通路及PI3K-AKT信号通路在内的22条信号通路。胰岛素信号通路作为一个重要的信号通路,主要参与调节机体的糖、脂肪和蛋白质代谢^[45]。IR作为T2DM的主要发病机理,与胰岛素信号通路相互影响,两者密切相关,又共同影响T2DM的发生发展。长期IR易导致T2DM患者血中胰岛素分泌增多,引起慢性代偿性高胰岛素血症的产生,高胰岛素血症可通过负反馈调节机制下调胰岛素受体基因的表达,减少受体蛋白合成,阻碍胰岛素信号的传导,使机体长期处于高血糖的状态,加重糖尿病症状^[47-48]。此外,长期高脂饮食及缺乏运动是产生IR的主要原因,而胰岛素信号通路的异常是IR发生的重要分子生物学机制^[45, 48-49]。PI3K-AKT信号通路是胰岛素信号通路中的重要环节,也是葡萄糖的吸收与利用、调节血糖平衡的主要转导途径^[50],胰岛素可通过胰岛素受体蛋白激活PI3K-AKT信号通路,进而促进细胞摄取葡萄糖、氨基酸及脂肪酸,促进糖原蛋白质和三酰甘油的合成,在IR状态下,受胰岛素的刺激,PI3K-AKT信号通路传导作用会被减弱,而在高胰岛素血症状态下,AKT可介导PI3K信号使IR进一步加重^[51-52]。肝脏是机体调节糖代谢的重要器官,也是胰岛素作用的主要靶器官,通过调节糖原合成、分解以及糖异生,维持机体对葡萄糖摄取和存储的平衡。肝脏糖异生异常为T2DM的主要病理特征,FoxO1是决定糖异生启动的关键转录因子之一,PI3K可磷酸化FoxO1而发挥调节葡萄糖转运、糖原合成、抗脂肪分解等作用^[53-54],此外,作为AKT的直接靶蛋白之一,磷酸化的AKT也可使FoxO1磷酸化而使其活性降低,以维持细胞生长,促进糖原合成,从而调节葡萄糖转运^[55]。AMPK信号通路是机体组织细胞能量调节的重要信号转导通路,激活该通路可增强葡萄糖的摄取及利用,改善IR,增加胰岛素敏感性,因此,AMPK信号通路为T2DM治疗的关键信号通路^[56-57]。

本研究选取HepG2细胞,运用高浓度胰岛素诱导IR模型,该模型不仅保留了正常肝细胞的基本生物学特性,且还排除了正常肝细胞表现的细胞衰亡现象,是研究IR发病及相关降糖药物作用机理的理想模型^[58-59]。选取AKT/FoxO1信号通路,对TFDJF抗T2DM的作用机制进行验证,对相关蛋白的表达进行测定。有文献报导,在糖尿病状态下,高糖血症可使AKT的磷酸化水平降低,FoxO1表达升

高^[60-61],本研究结果表明,TFDJF可使IR模型HepG2细胞AKT蛋白磷酸化水平升高,FoxO1蛋白表达水平降低。

本研究应用网络药理学方法,对TFDJF的多成分-多靶点与T2DM之间复杂网络关系进行研究,并采用胰岛素诱导IR模型,初步验证了TFDJF抗T2DM的基本药理学作用和相关机制,然而TFDJF抗T2DM的具体作用机制仍需大量的体内外实验进行阐明,本研究旨在为进一步深入探讨其作用机制奠定基础。

参考文献

- [1] Ge Q, Chen L, Tang M, et al. Analysis of mulberry leaf components in the treatment of diabetes using network pharmacology [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 833: 50-62.
- [2] Shaw J E, Sicree R A, Zimmet P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87(1): 4-14.
- [3] Ge Q, Chen L, Chen K P. Treatment of diabetes mellitus using iPS cells and spice polyphenols [J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 5837804.
- [4] Samuel V T, Shulman G I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links [J]. Cell, 2012, 148(5): 852-871.
- [5] 王艳梅, 王根杰, 张树林, 等. 临床常用降糖药物的不良反应及防治策略 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(24): 2233-2236.
- [6] 吴坚, 竺春玲, 沈晓喻, 等. 金芪降糖片对2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝病胰岛素抵抗及血管活性因子的影响 [J]. 湖北中医杂志, 2015, 37(12): 4-6.
- [7] 闫田田, 汤云昭, 李晨光, 等. 金芪降糖片联合吡格列酮对2型糖尿病胰岛素抵抗的研究 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2016, 24(8): 589-592.
- [8] 邓小敏, 唐丽丽, 陆斌, 等. 生脉散合六味地黄丸治疗2型糖尿病气阴两虚证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 192-194.
- [9] 景援朝, 赵焕新, 孙永丽, 等. 分心木化学成分的研究 [J]. 食品与药品, 2015, 17(2): 87-90.
- [10] 韩艳春, 阿布都热合曼·合力力, 阿依吐伦·斯马义, 等. 分光光度法测定维吾尔药核桃分心木中总皂苷的含量 [J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(3): 286-287.
- [11] 王艳梅, 白洁, 马木提·库尔班, 等. 核桃隔膜总黄酮和微量元素的测定 [J]. 食品科学, 2007, 28(10): 477-479.
- [12] 程艳刚, 谭金燕, 李国艳, 等. 响应面法优化分心木总黄酮提取工艺 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(2): 40-43.
- [13] 程艳刚, 李国艳, 谭金燕, 等. 分心木总黄酮体外抗氧化活性及对 α -葡萄糖和 α -淀粉酶抑制作用研究 [J]. 辽宁

- 中医药大学学报, 2018, 20(8): 170-174.
- [14] 刘楠, 姜云耀, 黄婷婷, 等. 基于网络药理学方法研究补阳还五汤治疗脑梗死的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2190-2198.
- [15] Zhang Y Q, Mao X, Guo Q Y, et al. Network pharmacology-based approaches capture essence of chinese herbal medicines [J]. Chin Herb Med, 2016, 8(2): 107-116.
- [16] Zhao R L, He Y M. Network pharmacology analysis of the anti-cancer pharmacological mechanisms of Ganoderma lucidum extract with experimental support using Hepal-6-bearing C₅₇ BL / 6 mice [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 210: 287-295.
- [17] Zhu B C, Zhang W T, Lu Y, et al. Network pharmacology-based identification of protective mechanism of Panax Notoginseng Saponins on aspirin induced gastrointestinal injury [J]. Biomed Pharmacother. 2018, 105: 159-166.
- [18] 吴丹, 高耀, 向欢, 等. 基于网络药理学的栀子豉汤抗抑郁作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1594-1602.
- [19] 王静, 赵可惠, 唐策, 等. 藏药多血康胶囊治疗HAPC的网络药理学机制研究 [J]. 中药材. 2017, 40(7): 1687-1694.
- [20] Sohn E, Kim J, Kim C S, et al. *Osteomeles schwerinae* extract prevents diabetes-induced renal injury in spontaneously diabetic torii rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 6824215.
- [21] Wang Y B, Ge Z M, Kang W Q, et al. Rutin alleviates diabetic cardiomyopathy in a rat model of type 2 diabetes [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(2): 451-455.
- [22] 李世升, 杨报, 向福, 等. 金银花绿原酸提取物对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制作用 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(8): 3096-3102.
- [23] 李秀丽, 贺嵩敏, 朱莹, 等. HepG2细胞胰岛素抵抗模型的建立与鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 203-207.
- [24] Zhang Y Q, Mao X, Guo Q Y, et al. Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines [J]. Chin Herb Med, 2016, 8(2): 107-116.
- [25] 王金铎, 李艳涛, 卞晓芸. 儿茶素对糖尿病性白内障大鼠晶状体热休克蛋白27表达的影响 [J]. 眼科新进展, 2015, 35(11): 1029-1032.
- [26] Xing B H, Yang F Z, Wu X H. Naringenin enhances the efficacy of human embryonic stem cell-derived pancreatic endoderm in treating gestational diabetes mellitus mice [J]. J Pharmacol Sci, 2016, 131(2): 93-100.
- [27] Zhuang M J, Qiu H H, Li P, et al. Islet protection and amelioration of type 2 diabetes mellitus by treatment with quercetin from the flowers of *Edgeworthia gardneri* [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 955-966.
- [28] 吴巧敏, 倪海祥, 卢笑, 等. 山奈酚延缓自发性肥胖2型糖尿病小鼠肾损伤研究 [J]. 心脑血管病防治, 2017, 17(1): 19-22.
- [29] 王娅, 李嘉盈. 桑叶抗糖尿病活性成分研究 [J]. 安徽医药. 2016, 20(3): 425-428.
- [30] El-Bassossy H M, Abo-Warda S M, Fahmy A. Chrysin and luteolin attenuate diabetes-induced impairment in endothelial-dependent relaxation: effect on lipid profile, AGEs and NO generation [J]. Phytother Res, 2013, 27(11): 1678-1684.
- [31] Al-Numair K S, Veeramani C, Alsaif M A, et al. Influence of kaempferol, a flavonoid compound, on membrane-bound ATPases in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Pharm Biol, 2015, 53(9): 1372-1378.
- [32] Yoon H Y, Lee E G, Lee H, et al. Kaempferol inhibits IL-1 β -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of COX-2, PGE2 and MMPs [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(4): 971-977.
- [33] Xiao J, Sun G B, Sun B, et al. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity *in vivo* and *in vitro* [J]. Toxicology, 2012, 292(1): 53-62.
- [34] Luo C, Yang H, Tang C Y, et al. Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- κ B signal in type 2 diabetic rats [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(1): 744-750.
- [35] Varshney R, Varshney R, Mishra R, et al. Kaempferol alleviates palmitic acid-induced lipid stores, endoplasmic reticulum stress and pancreatic β -cell dysfunction through AMPK / mTOR-mediated lipophagy [J]. J Nutr Biochem, 2018, 57: 212-227.
- [36] Feng H, Cao J L, Zhang G Y, et al. Kaempferol attenuates cardiac hypertrophy via regulation of ASK₁ / MAPK signaling pathway and oxidative stress [J]. Planta Med, 2017, 83(10): 837-845.
- [37] Alkhalidy H, Moore W, Zhang Y, et al. Small molecule kaempferol promotes insulin sensitivity and preserved pancreatic β -cell mass in middle-aged obese diabetic mice [J]. J Diabetes Res, 2015, 2015: 1-14.
- [38] Vasudevan K M, Garraway L A. AKT signaling in physiology and disease [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2010, 347: 105-133.
- [39] Matsuda S, Nakanishi A, Wada Y, et al. Roles of PI₃K / AKT / PTEN Pathway as a target for pharmaceutical therapy [J]. Open Med Chem J, 2013, 7: 23-29.
- [40] 石明隽, 肖瑛, 桂华珍, 等. 糖尿病大鼠肾组织中AKT的表达及意义 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(22): 4375-4378.

- [41] Albury-Warren T M, Pandey V, Spinel L P, et al. Prediabetes linked to excess glucagon in transgenic mice with pancreatic active AKT1 [J]. J Endocrinol, 2016, 228 (1): 49-59.
- [42] 韩艳秋, 王嘉欣, 崔文鹏, 等. GSK β 抑制剂对糖尿病肾病大鼠 CTGF 和 ICAM-1 的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(1): 125-127.
- [43] 周文华, 孔丽丽, 贾治, 等. GSK3 β 抑制剂对糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF- β 1 和血清 PAI-1 表达的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(4): 634-639.
- [44] Jope R S, Yuskaitis C J, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK β): inflammation, diseases, and therapeutics [J]. Neurochem Res, 2007, 32(4-5): 577-595.
- [45] 袁海瑞, 牛燕媚, 刘效磊, 等. 高脂饮食诱导胰岛素抵抗小鼠骨骼肌胰岛素信号通路相关基因表达的变化 [J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(4): 357-362.
- [46] 李颖. 老年2型糖尿病合并慢性阻塞性肺疾病患者胰岛素抵抗和胰岛素功能分析 [J]. 中国药物经济学, 2015, 10(2): 137-138.
- [47] 杨运华. 胰岛素抵抗对肝胰岛素 PI3K/Akt/GSK-3 信号传导通路的影响 [J]. 黔南民族医学学报. 2013, 26(2): 79-81.
- [48] Prudente S, Morini E, Trischitta V. Insulin signaling regulating genes: effect on T2DM and cardiovascular risk [J]. Nat Rev Endocrinol, 2009, 5(12): 682-693.
- [49] Karlsson H K, Zierath J R. Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle [J]. Cell Biochem Biophys, 2007, 48(2/3): 103-113.
- [50] Araujo E P, Amaral M E, Souza C T, et al. Blockade of IRS β in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion [J]. FEBS Lett, 2002, 531(3): 437-442.
- [51] Choi K, Kim Y B. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes [J]. Korean J Intern Med, 2010, 25(2): 119-129.
- [52] Camer D, Yu Y H, Szabo A, et al. Bardoxolone methyl prevents insulin resistance and the development of hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet [J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 412: 36-43.
- [53] Jayashree S, Indumathi D, Akilavalli N, et al. Effect of Bisphenol-A on insulin signal transduction and glucose oxidation in liver of adult male albino rat [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2013, 35(2): 300-310.
- [54] 郭明飞, 高家荣, 方朝晖, 等. 肝脏胰岛素信号通路对改善胰岛素抵抗的影响 [J]. 中医药临床杂志, 2017, 29 (8): 1175-1179.
- [55] 王帅, 金磊, 海春旭, 等. PI3K/Akt 信号通路在胰岛素抵抗中作用的研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2015, 29(4): 313-316.
- [56] Novikova D S, Garabadzhiu A V, Melino G, et al. AMP-activated protein kinase: structure, function, and role in pathological processes [J]. Biochemistry Mosc, 2015, 80 (2): 127-144.
- [57] Carling D, Thornton C, Woods A, et al. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles ? [J]. Biochem J, 2012, 445(1): 11-27.
- [58] Lorenzo C, Hanley A J, Wagenknecht L E, et al. Relationship of insulin sensitivity, insulin secretion, and adiposity with insulin clearance in a multiethnic population: the insulin resistance atherosclerosis study [J]. Diabetes Care, 2013, 36(1): 101-103.
- [59] Birkenfeld A L, Shulman G I. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes [J]. Hepatology, 2014, 59(2): 713-723.
- [60] Battiprolu P K, Hojaye B, Jiang N, et al. Metabolic stress-induced activation of FoxO β triggers diabetic cardiomyopathy in mice [J]. J Clin Invest, 2012, 122(3): 1109-1118.
- [61] Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, et al. The forkhead transcription factor FoxO1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth [J]. J Clin Invest. 2002, 110(12): 1839-1847.