

异槲皮苷调控 PTP1B 改善胰岛素抵抗的网络药理学研究及体外实验验证

刘思宇¹, 于璐婧¹, 张传艺¹, 陆思华¹, 李英嘉¹, 蒙俊宇¹, 黄桂红^{2,3,4*}

1. 桂林医学院 临桂临床医学院, 广西 桂林 541199

2. 桂林医学院第二附属医院, 广西 桂林 541199

3. 广西壮族自治区卫生健康委员会糖脂代谢病重点培育实验室, 广西 桂林 541199

4. 广西糖尿病系统医学重点实验室, 广西 桂林 541199

摘要: **目的** 采用网络药理学及分子对接技术探析异槲皮苷改善胰岛素抵抗的分子机制, 并通过体外实验研究异槲皮苷对胰岛素抵抗的干预作用及机制。 **方法** 利用 PubChem、PharmMapper、GEO、CTD、GeneCards、OMIM 等多个数据库筛选异槲皮苷活性成分及胰岛素抵抗相关靶点; 采用 Cytoscape 软件将异槲皮苷治疗胰岛素抵抗的潜在靶点构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 并根据度值筛选核心靶点。利用基因本体 (GO) 与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析寻找与靶点蛋白相关的生物学通路, 采用 AutoDock Tools 软件模拟分子对接, 预测异槲皮苷与关键靶点的结合度。体外实验采用异槲皮苷干预蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 质粒转染 HepG2 细胞, 检测不同浓度异槲皮苷干预后 PTP1B 的活性; 构建 PTP1B 质粒转染 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型, 给予异槲皮苷 (40 $\mu\text{mol/L}$) 干预, 葡萄糖氧化酶法、qRT-PCR、Western Blotting 法检测 PTP1B 等相关因子的表达。 **结果** 网络药理学筛选得到异槲皮苷改善胰岛素抵抗的交集靶点 21 个, 富集到 GO 条目 2 761 个, 主要涉及胰岛素受体信号通路、糖原生物合成过程的调控等, 富集到 KEGG 通路 89 条, 涉及包括胰岛素信号通路、胰岛素抵抗、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、磷酸腺苷活化的蛋白激酶 (AMPK) 信号通路等。分子对接结果显示, 异槲皮苷与靶点 PTP1B、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1)、胰岛素受体 (INSR)、糖原合酶激酶 3 β (GSK3 β)、AKT2 均有一定的结合活性。体外实验结果显示, 异槲皮苷能有效抑制 PTP1B 活性, 降低 PTP1B 过表达 HepG2 胰岛素抵抗细胞中 PTP1B、GSK3 β 的表达, 升高胰岛素受体底物 1 (IRS-1)、葡萄糖转运蛋白-1 (GLUT-1) 等因子的表达, 改善细胞胰岛素抵抗。 **结论** 异槲皮苷可能通过抑制 PTP1B 调控 PI3K/Akt 信号通路因子活性改善胰岛素抵抗。 **关键词:** 网络药理学; 作用机制; 异槲皮苷; 胰岛素抵抗; 体外实验; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B; 磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1; 胰岛素受体

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)11-2444-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.11.005

Network pharmacological study and *in vitro* validation of isoquercitrin regulating PTP1B to improve insulin resistance

LIU Si-yu¹, YU Lu-jing¹, ZHANG Chuan-yi¹, LU Si-hua¹, LI Ying-jia¹, MENG Jun-yu¹, HUANG Gui-hong^{2,3,4}

1. Lingui Clinical College, Guilin Medical University, Guilin 541199, China

2. The Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199, China

3. Guangxi Health Commission Key Laboratory of Glucose and Lipid Metabolism Disorders, Guilin 541199, China

4. Guangxi Key Laboratory of Diabetic Systems Medicine, Guilin 541199, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of isoquercitrin in treating insulin resistance based on network pharmacology and molecular docking, and verify the mechanism by cell experiment. **Methods** PubChem, PharmMapper, GEO, CTD, GeneCards, OMIM were used to screen the active components of isoquercitrin and to predict the target. Cytoscape software was used

收稿日期: 2022-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260661, 81860658, 82160701); 广西自然科学基金资助项目 (2018GXNSFAA281168); 桂林市科学研究与技术开发计划项目 (20140120-1-9, 20170109-47, 20210227-5); 北京医卫健康公益基金会医学科学研究基金资助项目 (YWJKJHKYJJ-B184007, YWJKJHKYJJ-B20197DS, YWJKJHKYJJ-B20234DS); 北京康盟慈善基金会医学科研发展基金项目 (KM226002); 桂林医学院硕士研究生科研项目 (GYK2022004)

作者简介: 刘思宇, 女, 主管药师, 硕士研究生, 研究方向为临床药学。E-mail: 1357642498@qq.com

***通信作者:** 黄桂红, 女, 主任药师, 研究方向为抗糖尿病药物研究。E-mail: 281492507@qq.com

to construct a protein interaction (PPI) network for potential targets of isoquercitrin in the treatment of insulin resistance, and the core targets were screened according to the degree value. GO and KEGG enrichment analysis were used to find biological pathways related to target proteins. AutoDock Tools software was used to simulate molecular docking and predict the binding degree of isoquercitrin and key targets. HepG2 cells were transfected with PTP1B plasmid by isoquercitrin *in vitro*, and the activity of PTP1B after different concentrations of isoquercitrin was detected. HepG2 insulin-resistant cells were transfected with PTP1B plasmid, and treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ isoquercitrin. The expression of PTP1B and other related factors was detected by glucose oxidase, qRT-PCR, and Western Blotting. **Results** Network pharmacological screening obtained 21 intersection targets of isoquercitrin to improve insulin resistance, enriched into 2 761 GO items, mainly involved in the insulin receptor signaling pathway and the regulation of glycogen biosynthesis process, and enriched into 89 KEGG pathways. It involves insulin signaling pathway, insulin resistance, PI3K-Akt signaling pathway, AMPK signaling pathway and so on. The results of molecular docking showed that the key active components of isoquercitrin had certain binding activity to the targets PTP1B, PDPK1, INSR, GSK3 β , and AKT2. The results of *in vitro* experiments showed that isoquercitrin could effectively inhibit the activity of PTP1B, reduce the expression of PTP1B and GSK3 β , increase the expression of IRS-1, GLUT-1 and other factors in HepG2 insulin resistance cells with PTP1B overexpression, and improve the insulin resistance of cells. And isoquercitrin may improve insulin resistance by inhibiting the activity of PI3K/Akt signaling pathway factors regulated by PTP1B.

Key words: network pharmacology; action mechanism; isoquercitrin; insulin resistance; *in vitro* experiments; PTP1B; PDPK1; INSR

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病最主要的发病诱因之一^[1],是指机体促进葡萄糖摄取和利用的效率下降,分泌过多胰岛素从而产生高胰岛素血症^[2]。因此改善胰岛素抵抗对于预防、治疗、减少 2 型糖尿病及其并发症起着至关重要的作用^[3]。

胰岛素的降糖作用主要是通过其与胰岛素受体结合,使胰岛素受体磷酸化从而激活下游信号通路^[4]。蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 是胰岛素传导信号通路中的关键负性调节因子,它可通过对胰岛素受体上的酪氨酸残基去磷酸化,使胰岛素受体无法与胰岛素结合,阻断磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 下游信号通路的激活,引发胰岛素抵抗^[5]。近年来,从天然药物中寻找的降糖成分受到了学术界广泛的关注。异槲皮苷存在于鬼针草、草棉、红麻、番石榴叶等植物中,具有降糖^[6]、抗炎^[7]、抗癌^[8]等药理作用。课题组前期已证明异槲皮苷具有改善胰岛素抵抗作用,但其分子机制尚未完全明确。本研究通过网络药理学预测异槲皮苷的潜在作用机制^[9],结合分子对接技术探讨异槲皮苷能否通过调控 PTP1B 改善胰岛素抵抗,并通过体外细胞实验验证异槲皮苷对 PTP1B 和 PI3K/Akt 信号通路上下游因子表达的作用,为进一步明确异槲皮苷改善胰岛素抵抗分子机制,延缓糖尿病并发症的发生发展提供新的思路和方向。

1 材料

人肝癌 (HepG2) 细胞,购买于中国科学院上海细胞库。异槲皮苷 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 B21529) 购买于南京源植生物科技有限公司。胰岛

素注射液 (规格 10 mL : 400 IU, 批号 22003210) 购买于江苏万邦生化医药股份有限公司。

棕榈酸 (批号 SLBS5145) 购买于美国 Sigma 试剂公司。青链霉素混合液 (批号 20210607)、无酚红 (批号 2414543) / 有酚红高糖 DMEM 培养基 (批号 8122356)、胰蛋白酶 (批号 20210201) 购买于北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司。PTP1B 过表达质粒及阴性对照质粒 (批号 1346589、134653D) 由上海吉凯基因化学技术有限公司协助构建。 β -actin、PTP1B、糖原合酶激酶 3 β (GSK3 β)、胰岛素受体底物-1 (IRS-1)、胰岛素受体底物 2 (IRS-2)、PI3K、AKT、葡萄糖转运蛋白-1 (GLUT-1) (批号 A093482、A093480、A093490、A093486、A093488、A093478、A093476、A093484) 的 mRNA 引物均购买于武汉金开瑞生物工程有限公司。Trizol 裂解液、Lip3000 高效转染液 (批号 X0614、2399133) 等转染试剂购买于北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司。PTP1B 抑制剂试剂盒 (批号 ab139465) 购买于美国 Abcam 生物技术有限公司。葡萄糖氧化酶试剂盒 (批号 EXP202110) 购买于北京普利莱基因技术有限公司。逆转录试剂盒 (批号 120216)、实时定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒 (批号 110622) 购买于莫奈生物技术有限公司。蛋白一抗稀释液 (批号 P0023A) 购买于上海碧云天生物科技有限公司。蛋白指示 (Marker, 批号 912465550) 购买于 Thermo Scientific 公司。 β -actin、p-IRS-1、PTP1B、PI3K、p-PI3K、p-GSK3 β 、GLUT-1 (批号 S3700、ab109543、ab244207、ab178703、ab278545、ab32391、ab115730)

抗体均购买于美国 Abcam 公司。

-80 °C 超低温冰箱(美国 Thermo Forma 公司), 4 °C、-20 °C 冰箱和制冰机(日本 Panasonic 公司), 超纯水系统(美国 Millipore 公司), 微量移液枪(美国 Thermo Forma 公司), NanoDropOne 核酸微量检测仪(美国赛默飞公司), MLS-3750 高压蒸汽灭菌锅(日本 Sanyo 公司), FYL-YS-150L 37 °C 培养箱(北京福音电器有限公司), ML4002 电子分析天平(德国梅特勒公司), Allerga 64R 低温高速离心机(美国贝克曼库尔特公司), Mini Spin 小型常温高速离心机(德国 Eppendorf 公司), 凝胶电泳仪(美国 BIO-RAD 公司), 蛋白转膜仪(美国 BIO-RAD 公司), ChemicalDoc XRS+凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司), T100 梯度 PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司), QuantStudio3 荧光定量 PCR 检测仪(美国 ABI 公司), IX53 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), DP73 显微镜拍照系统(日本 Olympus 公司), BX53 显微镜(日本 Olympus 公司), SWCJ-2FD 超净工作台(苏州净化设备工程有限公司), ELX-800 酶标仪(美国 BioTek 公司), DH36001B 电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司)。

2 方法

2.1 异槲皮苷改善糖尿病胰岛素抵抗的网络药理学分析

2.1.1 异槲皮苷治疗糖尿病胰岛素抵抗靶点预测和筛选 从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载异槲皮苷结构文件, 利用 Pharm Mapper 数据库(http://www.lilab-ecust.cn/pharm_mapper/)预测异槲皮苷治疗糖尿病胰岛素抵抗靶点, 筛选 Fit Score 大于 3 的靶点作为异槲皮苷的潜在靶点^[10]。

2.1.2 胰岛素抵抗差异基因分析 利用 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)检索“insulin resistance”样本。纳入标准: 样本应包含胰岛素抵抗样本与非胰岛素抵抗样本; 样本为人组织来源(Homo sapiens)且芯片数据类型为基因表达谱。使用 R 语言 limma 包对数据集进行差异基因分析, 设置阈值: 差异倍数(fold change) ≥ 2 , $P < 0.05$ ^[11]。

2.1.3 胰岛素抵抗疾病相关基因的收集 基于 CTD 数据库(<http://ctdbase.org/>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)检索“insulin resistance”, 对于 CTD 数据库来源的数据筛选具有直接证据的结果,

对于 GeneCards 数据库来源的数据筛选分数大于 20 的结果, 获得胰岛素抵抗相关基因^[12]。

2.1.4 蛋白相互作用(PPI)网络构建及分析 对异槲皮苷潜在靶点和胰岛素抵抗相关基因取交集, 将异槲皮苷治疗胰岛素抵抗的潜在靶点上传至 STRING 数据库(<https://www.string-db.org/>), 进行高置信度的靶点 PPI 关系分析, 在 Cytoscape 软件(<http://www.cytoscape.org/>)中构建 PPI 网络, 根据度值筛选核心靶点^[13]。

2.1.5 基因本体(GO)功能与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析以及成分-靶点-通路网络的构建 基于 R 语言 clusterProfiler 包对潜在治疗靶点进行 GO 分析和 KEGG 分析, 设定物种为人, 设置阈值 $P < 0.05$ 。并基于 Cytoscape 软件绘制化合物-靶点-通路图^[14]。

2.1.6 分子对接验证 从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载核心靶点的结构文件, 利用 PyMol 软件对蛋白进行加氢、去水、分离配体与受体, 在 AutoDock Tools 软件中获取 Grid box 参数, 利用 AutoDock Vina 软件进行异槲皮苷与核心靶点蛋白的分子对接模拟验证, 最后利用 PyMol 软件对分子对接模式进行可视化^[15]。

2.2 异槲皮苷通过抑制 PTP1B 活性调控 PI3K/Akt 信号通路改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗

2.2.1 细胞培养 HepG2 细胞用 10%完全培养基(500 μ L 青霉素/链霉素混合液+5 mL FBS+DMEM 至 50 mL EP 管中定容)培养, 放置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育。选取处于对数生长期的细胞进行后续的实验。

2.2.2 异槲皮苷对 PTP1B 酶活性的抑制作用 参考文献方法^[16-17]称取 2.321 mg 异槲皮苷粉末溶于 250 μ L DMSO+750 μ L 双蒸水(dd H₂O)混合溶剂中, 使其充分溶解。将异槲皮苷溶液稀释至 20、40、80、160 μ mol/L 分组待用; PTP1B 酶稀释至 0.5 ng/ μ L 待用。酶标板每孔分别加入 10 μ L 不同浓度异槲皮苷溶液、35 μ L 的 1 倍缓冲液、5 μ L PTP1B 酶、50 μ L PTP1B 反应底物, 30 °C 培养箱, 培育 30 min。培育结束后, 避光, 每孔加入 25 μ L 终止液, 用酶标仪检测 620 nm 处吸光度(A), 利用 A 绘制标准曲线, 求出各样品浓度, 并计算不同浓度异槲皮苷干预后 PTP1B 酶的活性。

$$\text{PTP1B 酶活性} = \frac{\text{待测孔浓度} - \text{空白孔浓度(零时)}}{\text{对照孔浓度} - \text{空白孔浓度(零时)}}$$

2.2.3 细胞瞬时转染 参照文献方法^[18-19], 将 HepG2 细胞接种至 2 块 6 孔板中, 做好标记, 1×10^6 个细胞/mL, 每孔 2 mL, 待细胞生长融合至约 70% 左右且细胞状态良好时开始准备转染。转染前 1 h, 将 6 孔板内的完全培养基换成等体积的 opti-MEM 培养基, 于细胞培养箱中继续孵育 1 h。按 Lipofectamine3000 Transfection Reagent 转染试剂说明书配制转染液。转染 1 h 后加入转染液至细胞中。转染 8 h 后, 将 6 孔板中的培养基换成 10% 无双抗培养基, 继续放入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱孵育。24 h 后, 采用倒置荧光显微镜, 拍摄荧光, 可根据荧光数量粗略判断转染情况。

2.2.4 异槲皮苷对 PTP1B 转染 HepG2 细胞的影响 利用 Western blotting 法对不同浓度 (20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 异槲皮苷干预 PTP1B 过表达质粒转染后 HepG2 细胞的蛋白表达水平进行检测。

2.2.5 细胞造模与给药 将处于对数生长期的 HepG2 细胞用含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化后, 按照 1×10^6 个细胞/mL, 每孔 2 mL, 接种于 6 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。设立对照组、空载质粒组、PTP1B 转染组、胰岛素抵抗组、胰岛素抵抗+空载质粒组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染组、胰岛素抵抗+异槲皮苷 40 $\mu\text{mol/L}$ 组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染+异槲皮苷 40 $\mu\text{mol/L}$ 组。

待细胞贴壁后, 吸出培养基。向对照组、空载质粒组、PTP1B 转染组加入 2 mL 10% 完全培养基, 其余 5 组加入 2 mL 造模液 (0.125 mmol/L 棕榈酸和 1.0×10^{-7} mol/L 胰岛素) 构建胰岛素抵抗模型, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 24 h 后将造模液和 10% 完全培养基吸出。胰岛素抵抗+异槲皮苷 40 $\mu\text{mol/L}$ 组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染+异槲皮苷 40 $\mu\text{mol/L}$ 组加入 2 mL 含 40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷

培养液, 其余 6 组加入 2 mL 10% 完全培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 24 h。收集细胞及上清液进行后续实验。

2.2.6 葡萄糖氧化酶检测 将细胞按 2.2.3 项和 2.2.5 项操作进行转染、造模给药。并按 2.2.1 项方法培养 12 h, 弃上清, 用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗 2 遍后吸走, 加入无酚红完全培养基, 继续培养 12 h, 收集上清液, 按葡萄糖氧化酶测定试剂盒说明书检测标准品或样品, 置于 37 °C 培养箱反应 5 min。反应结束后将避光 96 孔板放入酶标仪中, 在 570 nm 处测定 A 值, 由标准曲线计算出葡萄糖浓度。

2.2.7 qRT-PCR 检测胰岛素信号通路相关因子的 mRNA 表达 将细胞按 2.2.3 项和 2.2.5 项实验方法转染及造模给药, 并按 2.2.1 项培养 48 h, 弃上清, 用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗 2 遍, Trizol 法提取总 RNA, 核酸微量检测仪测定总 RNA, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 视为 RNA 提取纯度高, 逆转录试剂盒及 miRNA 逆转录试剂盒按照试剂盒说明书进行。引物序列见表 1。内参为 β -actin, 扩增条件为预变性阶段: 95 °C 反应 10 min; 循环阶段: 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延展 10 s, 总共重复 40 个循环。溶解曲线: 60 °C、15 s→95 °C、15 s→60 °C、15 s。其余 RT-qPCR 的扩增条件为预变性阶段: 50 °C 反应 2 min, 95 °C 反应 2 min; 循环阶段: 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延展 1 min, 总共重复 40 个循环。溶解曲线: 60 °C、15 s→95 °C、15 s→60 °C、15 s。反应结束后保存及记录数据。

2.2.8 Western Blotting 检测胰岛素信号通路上相关因子的蛋白及磷酸化水平 将细胞按实验方法 2.2.3 项和 2.2.5 项转染及给药与造模, 并按 2.2.1 项培养 48 h, 弃上清, 用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗 2 遍, 加入细胞裂解液 100~150 μL /孔, 冰上静置 5 min 后刮下

表 1 胰岛素信号通路上的基因引物序列

Table 1 Sequence list of insulin signaling pathway gene primers

引物名称	正向引物	反向引物	长度/bp
PTP1B	5'-AGCCAGTGACTTCCCATGTAG-3'	5'-TGTTGAGCATGACGACACCC-3'	257
β -actin	5'-TCCATCATGAAGTGTGACG-3'	5'-GTACTTGCGCTCAGGAGGA-3'	171
GLUT-1	5'-CGGGCCAAGAGTGTGCTAAA-3'	5'-TGACGATACCGGAGCCAATG-3'	283
IRS-1	5'-GGAAGAGACTGGCACTGAGG-3'	5'-CTGACGGGGACAACCTCATCT-3'	199
IRS-2	5'-GGCTTCCAGAATGGTCTCAA-3'	5'-AAGTCAATGCTGGCGTAGGT-3'	239
GSK3 β	5'-AACTGCCCCGACTAACACCAC-3'	5'-TGCAGAAGCAGCATTATTGG-3'	169
PI3K	5'-TAACGATCAGCCTTCGCTCC-3'	5'-AGGTTCTGTGGGATGCCTTG-3'	157
AKT	5'-CAGTTTGTCTCCGGGTGTG-3'	5'-CTGACAGAGTGAGGGGACAC-3'	140

细胞, 移入 2 mL EP 管, 4 °C 转速为 12 000 r/min, 离心 15 min, 取上清液, 用 BCA 蛋白定量法测蛋白浓度, -80 °C 保存, 灌制 10% 浓缩胶和 10% 分离胶备用。经湿转到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 2 h, 并加入抗体孵育 (1:3 000), 4 °C 摇床过夜 (18~24 h), TBST 洗涤 3 次, 加入相应二抗溶液中, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 配制 ECL 发光液, 根据 Image lab 软件分析处理数据。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 及 Graph Pad Prism 5.0 进行统计分析, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 异槲皮苷治疗糖尿病胰岛素抵抗的网络药理学分析

3.1.1 异槲皮苷治疗糖尿病胰岛素抵抗靶点预测和筛选 从 PubChem 数据库下载异槲皮苷的结构式见图 1。通过 PharmMapper 数据库共获得异槲皮苷治疗糖尿病胰岛素抵抗潜在靶点有 116 个。

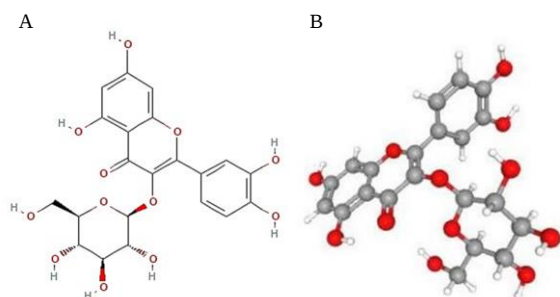


图 1 异槲皮苷的 2D (A)、3D (B) 化学结构

Fig. 1 2D (A) and 3D (B) chemical structures of isoquercetin

3.1.2 胰岛素抵抗差异基因分析 通过 GEO 数据库查询胰岛素抵抗相关研究并筛选抽提样本, 选择编号为 GSE23343 的基因表达谱数据, 该数据集共包括 10 例 2 型糖尿病胰岛素抵抗样本和 7 例糖耐量正常样本。基于 normalize 函数对 GSE23343 进行组内归一化, 使各次/组测量或各种实验条件下的测量可以相互比较。火山图 (图 2) 反映总体基因的表达情况。聚类图 (图 3) 反映差异基因的表达水平, 共获得 568 个差异基因。

3.1.3 胰岛素抵抗疾病相关基因的收集 基于 CTD 数据库、Genecards 数据库、OMIM 数据库分

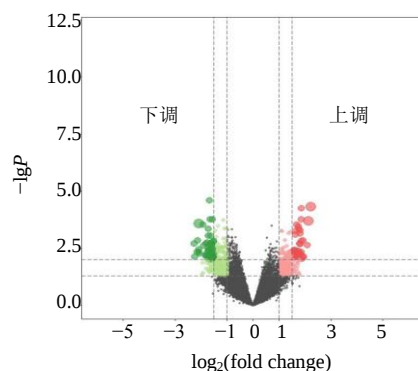


图 2 差异分析火山图

Fig. 2 Volcano map of difference analysis

别获得 94、153、778 个胰岛素抵抗相关基因。对胰岛素抵抗差异基因合并去重后共获得 958 个基因, 与异槲皮苷潜在靶点取交集共获得 21 个潜在治疗靶点, 见图 4。

3.1.4 PPI 网络及核心靶点分析 将 21 个潜在治疗靶点, 导入 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建 PPI 网络 (图 5), 去除孤立靶点后, 共包括 20 个节点和 33 条边, 并计算网络节点度值 (表 2)。选择度值前 5 的靶点作为核心靶点, 分别为 PTP1B、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1)、胰岛素受体 (INSR)、GSK3 β 、AKT2。

3.1.5 GO、KEGG 分析及成分-靶点-通路网络 对潜在作用靶点进行 GO 和 KEGG 分析。共有 2 761 个 GO 项目显著富集, 主要涉及细胞对胰岛素刺激的反应、对胰岛素的反应、肽激素刺激的细胞反应、细胞对肽的反应、胰岛素受体信号通路、对肽激素的反应、糖原生物合成过程的调控等, 见图 6。有 89 条 KEGG 通路显著富集, 包括胰岛素信号通路、胰岛素抵抗、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路、T 细胞受体信号通路、低氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、甲状腺激素信号通路、PI3K-Akt 信号通路、叉头框蛋白 O1 (FoxO) 信号通路、催乳激素信号通路、磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路等, 见图 7。化合物-靶点-通路网络共有 59 个节点和 174 条边, 涉及 40 条 KEGG 通路和 17 个靶点, 见图 8。

3.1.6 分子对接结果 从 PDB 数据库下载度值前 5 的靶点蛋白, 利用 AutoDock Vina 软件计算化合物与靶点蛋白的最低结合能, 见表 3。化合物与蛋白最低结合能小于 -5 kcal/mol (1 cal=4.2 J), 则说明两者具有较好结合活性。本研究中化合物与度值排

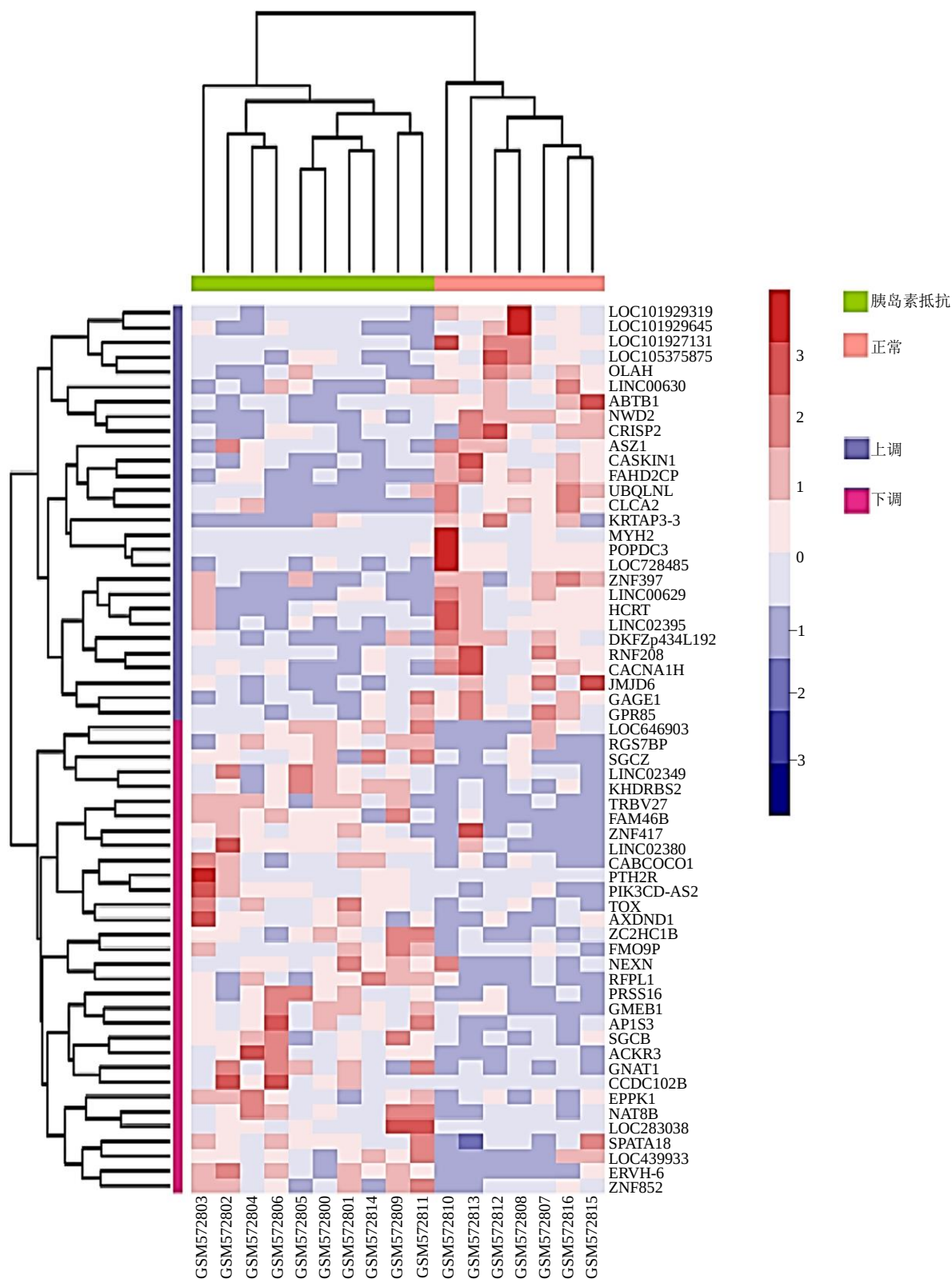


图 3 差异分析聚类图

Fig. 3 Cluster diagram of difference analysis

名前 5 的靶点蛋白的最低结合能均小于 -5 kcal/mol, 说明两者能够较好结合。使用 PyMOL 对

分子对接结果进行可视化, 见图 9。靶点蛋白与活性成分通过氢键、芳香相互作用等能分子间相互作用

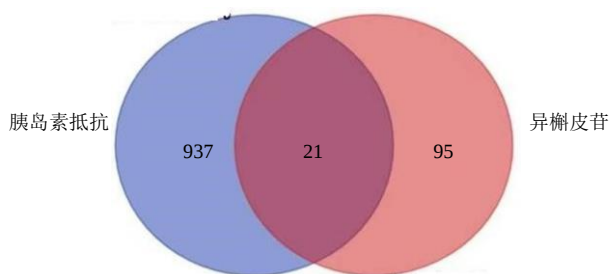


Fig. 4 Venn diagram of component and disease targets

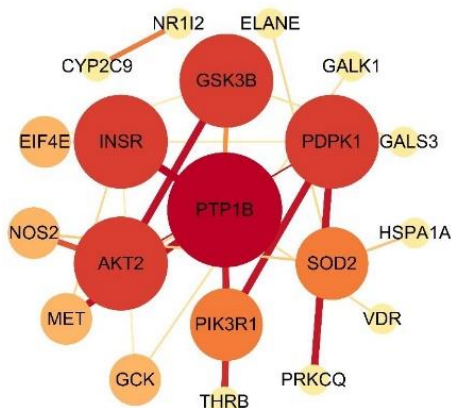


Fig. 5 PPI network of key targets related to isoquercetin in treatment of insulin resistance

表 2 PPI 网络节点度值

Table 2 PPI network node degree value

基因名称	度值	基因名称	度值
PTP1B	5	NOS2	2
PDPK1	4	HSPA1A	1
INSR	4	GALK1	1
GSK3 β	4	ELANE	1
AKT2	4	THRB	1
SOD2	3	PRKCQ	1
PIK3R1	3	VDR	1
GCK	2	LGALS3	1
MET	2	NR1I2	1
EIF4E	2	CYP2C9	1

用紧密结合, 进一步说明活性成分和靶点蛋白能够形成较为稳定的构象从而较好地结合。

3.2 异槲皮苷通过抑制 PTP1B 活性调控 PI3K/Akt 信号通路改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗

3.2.1 异槲皮苷对 PTP1B 活性的抑制作用 如图 10 所示, 与对照组比较, 不同浓度的异槲皮苷均可显著降低 PTP1B 活性 ($P<0.01$), 并呈浓度相关性。当异槲皮苷浓度为 $40\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时, 已表现出对 PTP1B 活性显著的抑制作用, 浓度为 $160\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时, 对 PTP1B 活性的抑制率最高, 达到 78.09% , 半数抑制率 (IC_{50}) 为 $54.963\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。因课题组前期研究发现当异槲皮苷浓度为 $160\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时, 胰岛素抵抗

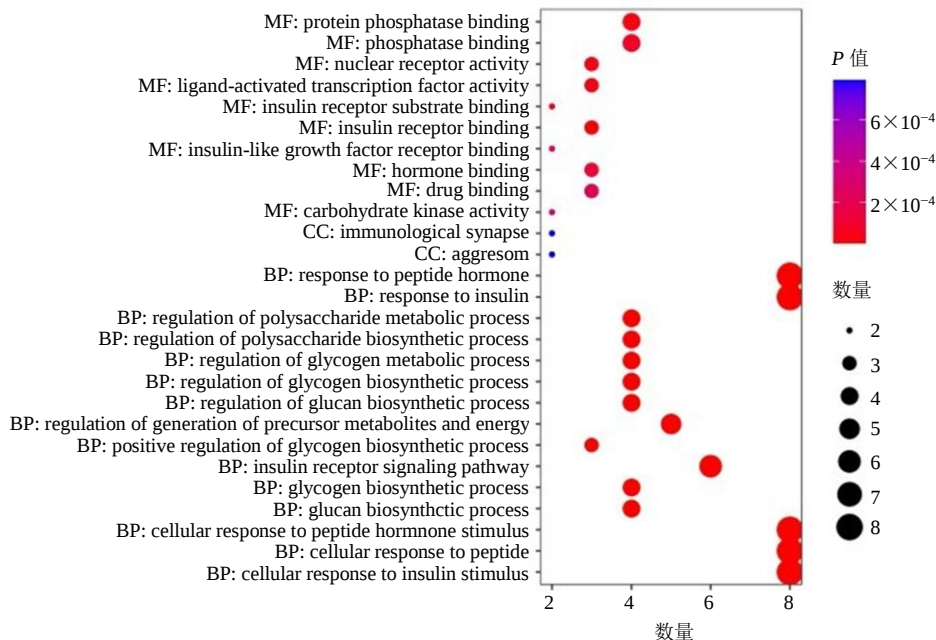


Fig. 6 Bubble diagram of GO function analysis

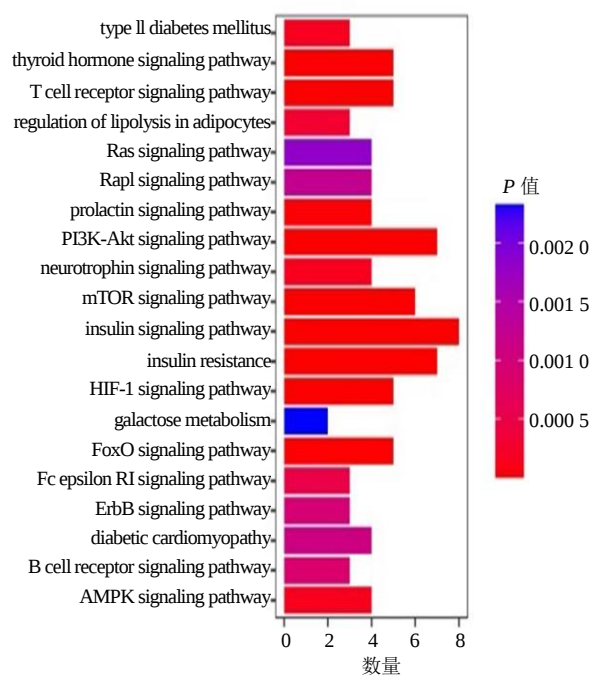


图 7 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment analysis

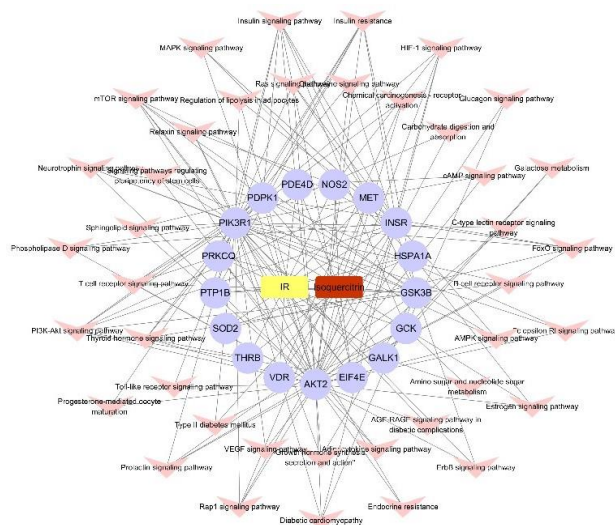


图 8 化合物 - 靶点 - 通路图

Fig. 8 Chemical compound-target-pathway network

表 3 异槲皮苷与核心靶点的分子对接结果

Table 3 Molecular docking of isoquercetin with core targets

基因名称	与异槲皮苷结合能/(kcal·mol ⁻¹)
PTP1B	-6.6
PDPK1	-7.8
INSR	-7.5
GSK3β	-8.0
AKT2	-9.0

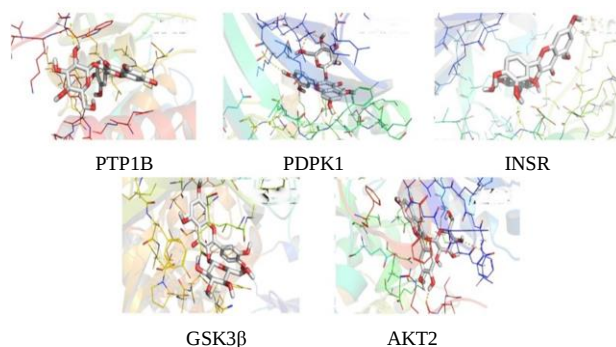
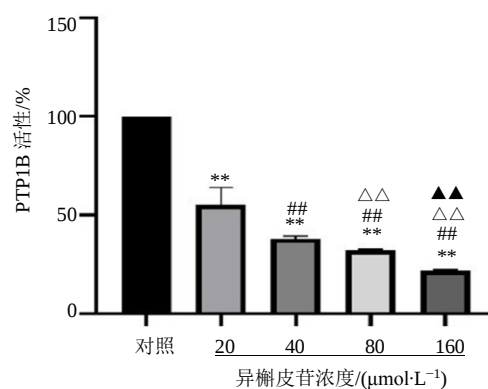


图 9 异槲皮苷 - 靶点对接相互作用模式

Fig. 9 Isoquercetin-target docking model



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与异槲皮苷 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: ## $P < 0.01$; 与异槲皮苷 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与异槲皮苷 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs isoquercetin 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs isoquercetin 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs isoquercetin 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group

图 10 异槲皮苷对 PTP1B 活性的抑制 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)Fig. 10 Inhibition of isoquercetin on PTP1B protein activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

HepG2 细胞的存活率过低^[20], 故不采用此浓度, 且为保证实验顺利进行, 选择异槲皮苷中间浓度 (40 $\mu\text{mol/L}$) 进行后续实验。

3.2.2 PTP1B 过表达质粒瞬时转染 HepG2 细胞 如图 11 所示, 采用荧光标记对转染效率进行验证, 图中转染后显示荧光的部分为转染成功的细胞, 证明 PTP1B 过表达质粒转染成功。由此可以表明, PTP1B 过表达瞬时转染 HepG2 细胞模型建立成功。

3.2.3 异槲皮苷对 PTP1B 转染 HepG2 细胞的影响 如图 12 所示, 与对照组比较, PTP1B 转染组的 PTP1B 表达量明显升高 ($P < 0.01$); 与 PTP1B 转染组比较, 不同浓度异槲皮苷组的 PTP1B 表达量均明显下降 ($P < 0.05$, 0.01)。说明异槲皮苷对过表达 PTP1B HepG2 细胞中的 PTP1B 有抑制作用。

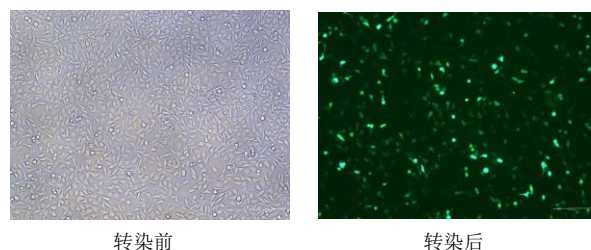
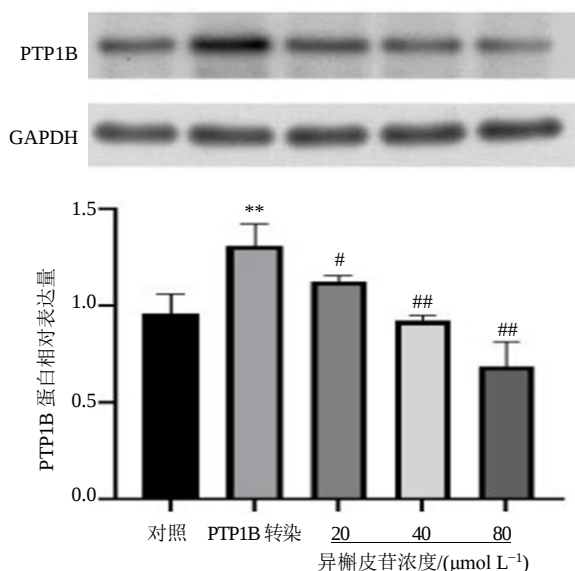


图 11 转染情况的监测
Fig. 11 Monitoring of transfection

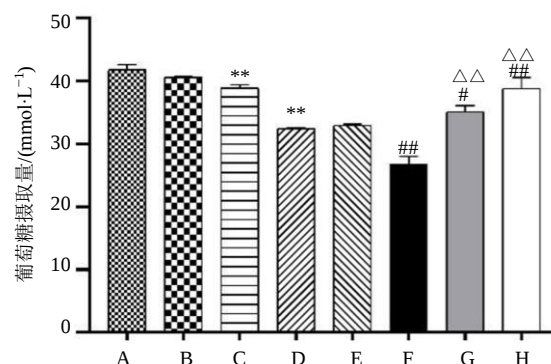


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 PTP1B 转染组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs PTP1B transfection group

图 12 转染组细胞 PTP1B 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Expression of PTP1B protein in transfected cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2.4 异槲皮苷对葡萄糖摄取量的影响 如图 13 所示,与对照组比较,PTP1B 转染组、胰岛素抵抗组的葡萄糖摄取量明显下降($P < 0.01$),说明 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型构建成功。与胰岛素抵抗组比较,胰岛素抵抗+PTP1B 转染组葡萄糖摄取量明显下降($P < 0.01$),而胰岛素抵抗+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组明显上升($P < 0.05$ 、 0.01);与胰岛素抵抗+PTP1B 转染组相比,胰岛素抵抗+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组的葡萄糖摄取量明显上升($P < 0.01$)。说明 PTP1B 过表达可使细胞对葡萄糖摄取量减少,而



A-对照 B-空载质粒 C-PTP1B 转染 D-胰岛素抵抗 E-胰岛素抵抗+空载质粒 F-胰岛素抵抗+PTP1B 转染 G-胰岛素抵抗+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷 H-胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与胰岛素抵抗组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与胰岛素抵抗+PTP1B 转染组比较: Δ $P < 0.01$

A-control B-empty plasmid C-PTP1B transfected D-insulin resistance E-insulin resistance + empty plasmid F-insulin resistance + PTP1B transfected G-insulin resistance + 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ isoquercetin H-insulin resistance + PTP1B transfected + 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ isoquercetin

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs insulin resistance group; Δ $P < 0.01$ vs insulin resistance + PTP1B transfected group

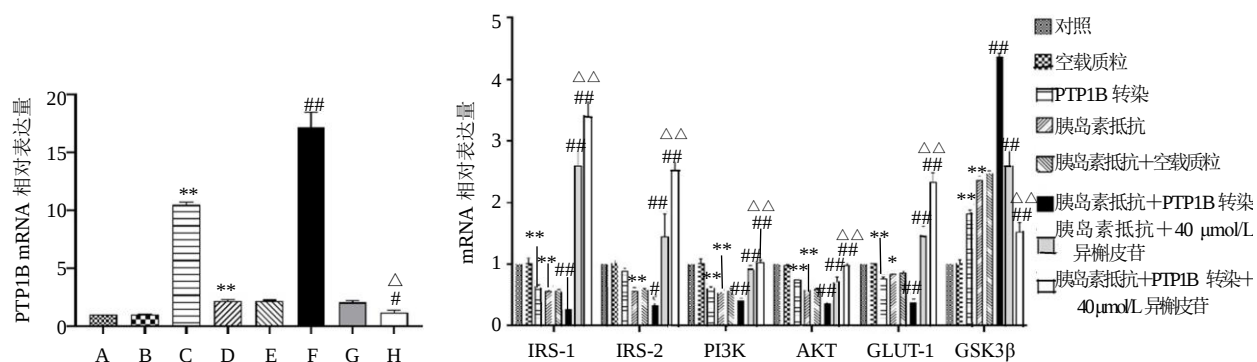
图 13 PTP1B 过表达与胰岛素抵抗 HepG2 细胞的葡萄糖摄取量情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Fig. 13 Glucose uptake of PTP1B overexpressing and insulin resistant HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

通过异槲皮苷的干预可明显改善胰岛素抵抗+PTP1B 转染过表达所引起的葡萄糖摄取量的减少。

3.2.5 qRT-PCR 检测异槲皮苷对 PTP1B 过表达与胰岛素抵抗 HepG2 细胞相关因子 mRNA 表达 如图 14 所示,与胰岛素抵抗组相比,胰岛素抵抗+PTP1B 转染组 PTP1B 的 mRNA 表达量明显增加($P < 0.01$)。与胰岛素抵抗+PTP1B 转染组比较,胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷 PTP1B mRNA 表达量明显降低($P < 0.05$)。

与胰岛素抵抗组相比,胰岛素抵抗+PTP1B 转染组中的 IRS-1、IRS-2、PI3K、AKT、GLUT-1 的 mRNA 表达明显降低,而 GSK3 β 明显增加($P < 0.05$ 、 0.01);胰岛素抵抗+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组的 IRS-1、IRS-2、PI3K、AKT、GLUT-1 的 mRNA 表达明显增加,而 GSK3 β 表达明显减少($P < 0.05$ 、 0.01)。与胰岛素抵抗+PTP1B 转染组相比,胰岛素



A-对照 B-空载质粒 C-PTP1B 转染 D-胰岛素抵抗 E-胰岛素抵抗+空载质粒 F-胰岛素抵抗+PTP1B 转染 G-胰岛素抵抗+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷 H-胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与胰岛素抵抗组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与胰岛素抵抗+PTP1B 转染组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$
A-control B-empty plasmid C-PTP1B transfected D-insulin resistance E-insulin resistance + empty plasmid F-insulin resistance + PTP1B transfected G-insulin resistance + 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ isoquercetin H-insulin resistance + PTP1B transfected + 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ isoquercetin

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs insulin resistance group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs insulin resistance + PTP1B transfected group

图 14 各组细胞 PTP1B、IRS-1、IRS-2、PI3K、AKT、GLUT-1、GSK3 β 的 mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)
Fig. 14 Relative expression level of mRNA of PTP1B, IRS-1, IRS-2, PI3K, AKT, GLUT-1 and GSK3 β in cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

抵抗+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组 IRS-1、IRS-2、PI3K、AKT、GLUT-1 的 mRNA 表达明显上升, 而 GSK3 β 明显下降 ($P < 0.01$)。

3.2.6 Western blotting 检测异槲皮苷对 PTP1B 过表达胰岛素抵抗 HepG2 细胞中相关因子蛋白表达 与对照组相比, PTP1B 转染组、胰岛素抵抗组 PTP1B、p-GSK3 β 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$), 见图 15。

与胰岛素抵抗组相比, 胰岛素抵抗+PTP1B 转染组的 PTP1B、p-GSK3 β 的蛋白表达明显增高, p-IRS-1、p-PI3K/PI3K、GLUT-1 的蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$); 胰岛素抵抗+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组的 PTP1B, 及胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组的 p-GSK3 β 明显减少 ($P < 0.05$ 、0.01), 胰岛素抵抗+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组的 p-IRS-1、p-PI3K/PI3K、GLUT-1 的蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。

与胰岛素抵抗+PTP1B 转染组比较, 胰岛素抵抗+PTP1B 转染+40 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮苷组的 PTP1B、p-GSK3 β 明显减少 ($P < 0.01$), p-IRS-1、p-PI3K/PI3K、GLUT-1 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。

4 讨论

胰岛素抵抗主要是由于外周组织对胰岛素敏

感性降低, 机体对葡萄糖吸收和利用率降低导致机体分泌过多的胰岛素来维持体内血糖的稳定, 进而引发高胰岛素血症^[21]。肝脏作为胰岛素作用的主要器官, 参与维持体内糖代谢平衡。本研究选择 HepG2 细胞作为实验对象, HepG2 细胞是一种来源于人体的肝胚胎肿瘤细胞株, 其形态与肝细胞极为相似, 用棕榈酸诱导 HepG2 细胞构建的胰岛素抵抗模型能极大程度模拟体内发生胰岛素抵抗时的生理环境, 所以 HepG2 细胞也是国内外用于研究胰岛素抵抗机制最为常用的细胞之一。胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的致病因素之一, 根据国际糖尿病联盟提供的数据, 预计到 2045 年全球糖尿病患者将突破 7 亿^[22], 是继癌症后对人类影响最大的疾病之一^[23]。所以, 改善胰岛素抵抗才是治疗 2 型糖尿病和改善人们生活质量的根本。

有研究表明^[24-25], 胰岛素抵抗主要是因胰岛素信号通路传导异常引起的, PI3K/Akt 是胰岛素信号通路上调节血糖的主要途径, 在正常生理情况下, 胰岛素与胰岛素受体结合, 使胞浆中的 β 亚基酪氨酸 (Tyr) 位点磷酸化而被激活, 进而作用于胰岛素受体底物 (IRS-1 和 IRS-2), IRS-1 和 IRS-2 被磷酸化后与下游 PI3K 相结合, 并将胰岛素信号传导到丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt), 当 Akt 被激活后可使下游的糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 失活。糖原合成酶 (GS) 因去磷酸化而被活化, 促进 GLUT-1 从

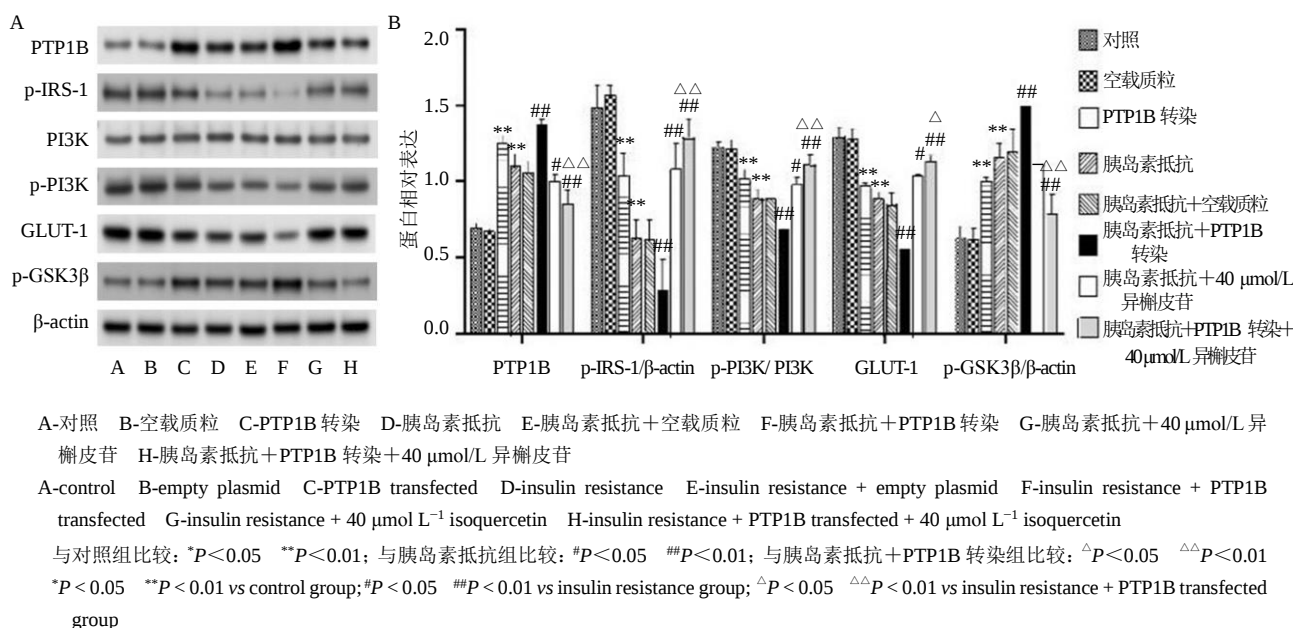


图 15 各组细胞 PTP1B、p-IRS-1、p-PI3K、GLUT-1、p-GSK3β 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Fig. 15 Protein expression of PTP1B, p-IRS-1, p-PI3K, GLUT-1, p-GSK3β in cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

囊泡易位至质膜,增加葡萄糖的转运,促进肝糖原的合成,抑制糖原分解,降低机体血糖浓度。在此过程中,任意一个环节出现问题都会使胰岛素信号通路受阻,诱导胰岛素抵抗。

近年来有研究报道,PTP1B 与多种代谢性疾病相关^[26-27]。其中最重要的发现就是 PTP1B 是胰岛素受体信号传递中最为关键的负向调节因子,易诱发胰岛素抵抗最终形成 2 型糖尿病^[28]。国内外也有研究显示,在体外环境下,通过调控 PTP1B 酶的表达,可以明显改善胰岛素抵抗^[29-30],这说明 PTP1B 有望成为改善胰岛素抵抗治疗 2 型糖尿病的新靶点,也为临床上治疗 2 型糖尿病提供了新思路 and 实验依据。

异槲皮苷是一种具有多种功效的黄酮醇苷类化合物^[31-32]。有研究发现,异槲皮苷不仅能降低胰岛素抵抗小鼠的血糖、总胆固醇、甘油三酯及尿素氮水平,还能改善葡萄糖耐量和炎症反应,促进胰岛 β 细胞的免疫反应^[33-34]。本研究是在课题组前期研究的基础上,合理提出假设,结合网络药理学分析和实验验证进一步推断,异槲皮苷可通过 PTP1B 调控 PI3K/Akt 信号通路各因子表达改善糖尿病胰岛素抵抗。

本研究通过构建 PPI 网络,对异槲皮苷治疗糖尿病胰岛素抵抗的靶点进行了网络拓扑学分析,结果显示,PTP1B、PDPK1、INSR、GSK3B 等靶点度值较

高,且分子对接结果显示,异槲皮苷与靶点 PTP1B 具有良好的结合活性,进一步验证了异槲皮苷与 PTP1B 的相互作用关系。据研究显示,磷酸化降低是胰岛素抵抗的一个标志,降低 PTP1B,上调典型 IRS-1、IRS-2、PI3K 胰岛素通路成员的磷酸化能够促进胰岛素增敏^[35]。当 PTP1B 在细胞或机体分泌过多时,则会引起 INSR、IRS-1 酪氨酸磷酸化表达减少,导致胰岛素敏感性降低,诱发胰岛素抵抗^[36]。

通过 GO、KEGG 功能分析发现异槲皮苷改善胰岛素抵抗的过程主要涉及胰岛素信号通路、mTOR、PI3K-Akt、FoxO、AMPK 等信号通路。多项研究显示,胰岛素信号通路参与调控糖尿病胰岛细胞功能细胞凋亡^[37-38]。调控胰岛素信号通路,能够抑制胰岛细胞凋亡,改善胰岛细胞功能,维持血糖稳态,可达到防治 2 型糖尿病的重要作用^[39]。

为了验证网络药理学的预测结果,本研究结果显示:异槲皮苷能有效抑制 PTP1B 活性,并呈浓度相关性。葡萄糖氧化酶功能性实验结果显示:异槲皮苷可增加胰岛素抵抗组、胰岛素抵抗+PTP1B 转染组葡萄糖摄取量,说明异槲皮苷可改善 PTP1B 过表达所引起的胰岛素抵抗。通过 qRT-PCR 和 Western blotting 验证异槲皮苷对胰岛素信号通路相关因子表达的影响,结果显示:异槲皮苷可上调 PI3K、Akt 等因子的表达,下调 PTP1B 的表达。细胞实验结果进一步验证网络药理学预测药物作用

于疾病靶点的可靠性,与现有研究“PTP1B 酶过表达易引发胰岛素抵抗”相符合^[40],说明异槲皮苷可通过调控 PTP1B 酶进而改善糖尿病胰岛素抵抗,这是在国内外研究领域中新发现,也为后续药物剂型的研发提供了药理学验证。

综上所述,本研究通过网络药理学挖掘异槲皮苷改善胰岛素抵抗的疾病靶点及相关生物学通路,同时从“活性成分-疾病靶点-生物学通路”角度揭示异槲皮苷治疗胰岛素抵抗的作用机理;通过构建 PTP1B 过表达转染 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型,给予 40 $\mu\text{mol/L}$ 的异槲皮苷进行干预,检测 PTP1B 及 PI3K/Akt 信号通路上各因子的 mRNA、蛋白表达,证明 PTP1B 过表达易诱发或加重胰岛素抵抗,异槲皮苷对 PTP1B 具有良好的抑制作用,能明显改善胰岛素抵抗。但异槲皮苷对 PTP1B 抑制的分子机制还有待于进一步深入研究,以期能为临床开发安全、有效、经济的天然降糖药物为治疗糖尿病胰岛素抵抗,延缓糖尿病并发症的发生发展提供新的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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: 271-281.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版) [J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(4): 315-409.
- [3] 刘妍, 常丽萍, 高怀林. 胰岛素抵抗的发病机制研究进展 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(11): 1671-1674.
- [4] Li D, Zhang S, Yang C, et al. A novel PTP1B inhibitor-phosphate of polymannuronic acid ameliorates insulin resistance by regulating IRS-1/Akt signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12693.
- [5] Jäger M, Hubert A, Gogiraju R, et al. Inducible knockdown of endothelial protein tyrosine phosphatase-1B promotes neointima formation in obese mice by enhancing endothelial senescence [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30(7): 927-944.
- [6] Jayachandran M, Zhang T, Ganesan K, et al. Isoquercetin ameliorates hyperglycemia and regulates key enzymes of glucose metabolism via insulin signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 829: 112-120.
- [7] 刘天旭, 李娟, 蒋国君, 等. 异槲皮苷对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞产生炎症因子的调控 [J]. *医药导报*, 2017, 36(6): 601-605.
- [8] 蒋国君, 刘天旭, 黄桂红, 等. 异槲皮苷对 HepG2 细胞中 Raf/MEK/ERK 信号通路的干预作用 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(10): 1382-1387.
- [9] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [10] 闫方艳. 灯盏花素改善胰岛素抵抗作用机制网络药理学分析及实验验证 [D]. 太原: 山西医科大学, 2020.
- [11] 杨欣, 李亚辉, 袁龙飞, 等. 基于网络药理学结合 GEO 数据集分析白术改善 2 型糖尿病的分子机制 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2021, 38(12): 1309-1318.
- [12] Barrett T, Wilhite S E, Ledoux P, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets-update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D991-995.
- [13] 张薛建, 吕雪辉, 王尽欢, 等. 基于网络药理学研究黄精中活性成分改善胰岛素抵抗作用机制 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(12): 190-195.
- [14] Luo J, Chai Y, Zhao M, et al. Hypoglycemic effects and modulation of gut microbiota of diabetic mice by saponin from *Polygonatum sibiricum* [J]. *Food Funct*, 2020, 11(5): 4327-4338.
- [15] 李佳川, 李思颖. 基于分子对接技术的藤茶总黄酮对高尿酸血症肾功能损伤保护机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(3): 727-735.
- [16] 黄琪琦. 苦豆子中黄酮类成分通过抑制 PTP1B 改善胰岛素抵抗作用研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2021.
- [17] 李想. 树豆酮酸 A 对 PTP1B 过表达 HepG2 细胞胰岛素信号通路的作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [18] Han X, Xu X, Wu Z, et al. Synchronous conjugation of i-motif DNA and therapeutic siRNA on the vertexes of tetrahedral DNA nanocages for efficient gene silence [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(10): 3286-3296.
- [19] 李欣蓉. miR-335 靶向 FTH1 促进帕金森病大鼠铁死亡的体内外研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [20] 黄桂红, 刘天旭, 朱钊铭, 等. 鬼针草黄酮对 HepG2 胰岛素抵抗细胞 PI3K/AKT1/GLUT4 信号通路的调控作用 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(24): 3994-3998.
- [21] 李佳欣, 陈思琦, 葛鹏玲. 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(12): 94-97.
- [22] Roden M, Shulman G I. The integrative biology of type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 51-60.
- [23] Hassan S, Peluso J, Chalhoub S, et al. Quercetin potentializes the respective cytotoxic activity of gemcitabine or doxorubicin on 3D culture of AsPC-1 or HepG2 cells, through the inhibition of HIF-1 α and MDR1 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0240676.
- [24] 肖娟, 任伟. 胰岛素抵抗与胰岛素信号通路异常研究

- 进展 [J]. 现代医药卫生, 2020, 36(21): 3463-3466.
- [25] Zhao J, Wang M, Deng W, *et al.* ADP-ribosylation factor-like GTPase 15 enhances insulin-induced AKT phosphorylation in the IR/IRS1/AKT pathway by interacting with ASAP2 and regulating PDPK1 activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(4): 865-871.
- [26] 张薇, 李静雅, 李佳. 糖尿病和肥胖症治疗新靶点 PTP1B 抑制剂的进展 [J]. 生命科学, 2006(5): 462-466.
- [27] 王永森. 以 PTP1B 为靶点的降糖药物筛选 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [28] 张敬芳, 吴勇, 欧阳静萍, 等. 胰岛素信号转导调节分子 PTP1B 及其抑制剂研究的进展 [J]. 中国糖尿病杂志, 2006(3): 235-236.
- [29] Lori G, Cecchi L, Mulinacci N, *et al.* Honey extracts inhibit PTP1B, upregulate insulin receptor expression, and enhance glucose uptake in human HepG2 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113: 108752.
- [30] Teimouri M, Hosseini H, Arabsadeghabadi Z, *et al.* The role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *J Physiol Biochem*, 2022, 78(2): 307-322.
- [31] Rha C S, Choi J M, Jung Y S *et al.* High-efficiency enzymatic production of α -isoquercitrin glucosides by amylsucrase from *Deinococcus geothermalis* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2019, 120: 84-90.
- [32] 房仙颖, 章祎唯, 萧伟, 等. 异槲皮素的制备及研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(4): 708-717.
- [33] Zhang R, Yao Y, Wang Y, *et al.* Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-Ay mice [J]. *Nutr Metab*, 2011, 8: 85.
- [34] Jayachandran M, Wu Z, Ganesan K, *et al.* Isoquercetin upregulates antioxidant genes, suppresses inflammatory cytokines and regulates AMPK pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 303: 62-69.
- [35] Roden M, Shulman G I. The integrative biology of type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 51-60.
- [36] Dearmond P D, Xu Y, Strickland E C, *et al.* Thermodynamic analysis of protein-ligand interactions in complex biological mixtures using a shotgun proteomics approach [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(11): 4948-4958.
- [37] 柳杨青, 汪艳芳. 敲除 MSTN 基因可上调骨骼肌胰岛素信号通路并减轻 2 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(11): 1957-1964.
- [38] Baczek J, Silkiewicz M, Wojszel Z B. Myostatin as a biomarker of muscle wasting and other pathologies-state of the art and knowledge gaps [J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2401.
- [39] 龚光明, 刘桠, 张翕宇, 等. 参芪复方调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路改善糖尿病 GK 大鼠胰岛功能减少血糖波动的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(9): 173-176.
- [40] 孙梦楚. 利拉鲁肽对肥胖 2 型糖尿病患者血清 FGF21 及 PTP1B 水平的影响 [D]. 承德: 承德医学院, 2020.

[责任编辑 高源]