

基于网络药理学及实验验证补骨脂乙素治疗 2 型糖尿病的作用机制

刘晓然, 李志齐, 李雅娜, 姜文国*, 夏振红*

滨州医学院, 山东 烟台 264003

摘要: **目的** 通过网络药理学与实验验证相结合的方法探究补骨脂乙素治疗 2 型糖尿病的作用机制。**方法** 使用 ECTM、SwissTargetPrediction、PubChem 数据库预测补骨脂乙素的作用靶点, 使用 GeneCards 数据库预测 2 型糖尿病的潜在靶点。使用 Venn 数据库进行靶点交互分析, 通过 STRING 数据库计算蛋白相互作用网络关系 (PPI), 通过 Cytoscape 3.9.1 插件 MCODE 和 Cytohubba 筛选核心靶点。通过 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 途径的富集分析。建立胰岛素抵抗的 HepG2 细胞模型, 通过 2-NBDG 检测细胞对葡萄糖摄取的能力, 通过 RT-PCR 和 Western blotting 检测网络药理学预测的磷脂肌醇-3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) 信号通路相关 mRNA 及蛋白表达。**结果** 补骨脂乙素和 2 型糖尿病共同作用的基因 92 个, PPI 网络 (交互得分 ≥ 0.150) 包含补骨脂乙素和 2 型糖尿病共同目标的 86 个节点和 379 个“边”。在 MCODE 和 Cytohubba 的筛选结果交叉后, 获得了 35 个共同靶点。聚类分析表明, 补骨脂乙素作用于 2 型糖尿病涉及 PI3K/Akt 信号通路等多种途径及细胞氧化还原反应等多种细胞进程。补骨脂乙素显著增强了胰岛素抵抗细胞对葡萄糖的摄取能力 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组相比, 补骨脂乙素处理后显著增加了胰岛素受体 (INS-R)、胰岛素受体底物 1 (IRS1)、葡萄糖转运蛋白 2 (GLUT2)、PI3K、Akt mRNA 的表达 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与模型组相比, 二甲双胍组和补骨脂乙素组的 INS-R、IRS1、GLUT2、Akt、PI3K、p-Akt、p-PI3K 的蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 补骨脂乙素可能通过 PI3K/Akt 信号通路增加胰岛素抵抗细胞对葡萄糖的摄取能力, 发挥其抗 2 型糖尿病作用。

关键词: 补骨脂乙素; 2 型糖尿病; 磷脂肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 胰岛素受体; 胰岛素受体底物 1; 葡萄糖转运蛋白 2

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)08-1881-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.08.011

Verification of mechanism of isobavachalcone in treatment of type 2 diabetes based on network pharmacology and experiment

LIU Xiao-ran, LI Zhi-qi, LI Ya-na, JIANG Wen-guo, XIA Zhen-hong

Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of isobavachalcone in treatment of type 2 diabetes based on network pharmacology and experimental verification. **Methods** ECTM, SwissTargetPrediction, and PubChem database were used to predict the target of isobavachalcone, and GeneCards database was used to predict the potential target of type 2 diabetes. Target interaction analysis was performed using Venn database, PPI were calculated using STRING database, and core targets were screened using Cytoscape 3.9.1 plug-ins MCODE and Cytohubba. Enrichment analysis of GO and KEGG pathways was performed using the DAVID database. A model of insulin-resistant HepG2 cells was established, and the ability of the cells to take up glucose was detected by 2-NBDG, and the expression of mRNA and protein related to PI3K/Akt signaling pathway predicted by network pharmacology was detected by RT-PCR and Western Blotting. **Results** There were 92 genes that interacted with isobavachalcone and type 2 diabetes, and the PPI network (interaction score ≥ 0.150) contained 86 nodes and 379 “edges” that shared the goal of isobavachalcone and type 2 diabetes. After crossing the screening results of MCODE and Cytohubba, 35 common targets were obtained. Cluster analysis shows that

收稿日期: 2023-05-07

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31702024); 山东省自然科学基金青年基金项目 (ZR2021QH305); 滨州医学院启动基金资助项目 (BY2020KYQD24)

作者简介: 刘晓然, 女, 硕士, 研究方向为细胞生物学。E-mail: 18865672032@163.com

*通信作者: 姜文国, 男, 博士, 研究方向为药理学。E-mail: jiangwg@bzmc.edu.cn

夏振红, 女, 博士, 研究方向为中药防治糖尿病。E-mail: xiazhenhong@bzmc.edu.cn

isobavachalcone acts on type 2 diabetes through multiple pathways such as the PI3K/Akt signaling pathway and cellular redox reactions. The experiment confirmed that isobavachalcone significantly enhanced the glucose uptake ability of insulin resistant cells ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the mRNA expressions of *INS-R*, *IRS1*, *GLUT2*, *PI3K*, and *Akt* were significantly increased after isobavachalcone treatment ($P < 0.01, 0.001$). Compared with model group, the protein expressions of *INS-R*, *IRS1*, *GLUT2*, *Akt*, *PI3K*, *p-Akt*, and *p-PI3K* in metformin group and isobavachalcone group were significantly up-regulated ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Isobavachalcone may increase the glucose uptake of insulin resistance cells through PI3K/Akt signaling pathway and exert its anti- type 2 diabetes effect.

Key words: isobavachalcone; type 2 diabetes; PI3K/Akt signaling pathway; *INS-R*; *IRS1*; *GLUT2*

2 型糖尿病是世界上发病率持续上升的流行病之一^[1-2],其特征是由胰腺 β 细胞的进行性丢失或胰岛素抵抗和高胰岛素血症诱导的高血糖^[3],这与肥胖、氧化应激和炎症密切相关^[4-6]。胰岛素抵抗主要发生在肌肉、脂肪和肝脏组织细胞中,胰岛素抵抗导致细胞摄取葡萄糖减少^[7-8];在肝细胞中,胰岛素抵抗导致糖异生和葡萄糖输出增加^[9]。随着 2 型糖尿病的加重,由于糖脂毒性 β 细胞数量逐渐减少,产生胰岛素的能力逐渐降低^[10]。2 型糖尿病可引起多种并发症,包括糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病和糖尿病心血管功能障碍等疾病^[11],因此糖尿病患者的需求不仅要控制血糖,还要预防和治疗由于长期高血糖引起的并发症。

目前临床上有许多治疗 2 型糖尿病的药物,但这些药物在降血糖的同时,具有一些不良反应^[12]。此外,糖尿病并发症的发展并未得到完全根治,因此开发新的、更有效和更安全的药物以治疗 2 型糖尿病及其并发症的需求仍然存在,据报道天然化合物及其有效成分在 2 型糖尿病的防治中不良反应少、疗效稳定、可长期使用,还通过多靶标、多途径调节代谢紊乱,改善葡萄糖稳态。因此,一些具有降血糖活性的中药越来越受到人们的关注。

补骨脂已被用于治疗多种疾病,包括癌症、炎症性疾病、神经退行性疾病等。补骨脂提取物通过抗凋亡和抗纤维化功能降低糖尿病的糖毒性,改善糖尿病肾病^[13-14]。补骨脂乙素是一种从补骨脂种子中提取的黄酮类化合物,传统上用作膳食成分,类黄酮对糖尿病具有多重保护作用^[15],补骨脂乙素作为黄酮类的化合物,可能对 2 型糖尿病产生有益影响。研究表明,补骨脂乙素具有抗菌、抗炎、抗癌、抗结核和抗氧化活性^[16];补骨脂乙素可以通过核因子- κ B (NF- κ B) 通路抑制糖尿病大鼠肾炎,改善糖尿病大鼠的肾损伤^[17];补骨脂乙素还可以抑制脂肪细胞和斑马鱼体内的脂质积聚^[18],表明补骨脂乙素和 2 型糖尿病和脂质代谢有一定的相关性,但补骨

脂乙素治疗 2 型糖尿病尚缺乏相关报道。

网络药理学利用公共数据库和文献作为样本,并使用网络可视化工具分析和发现潜在的药物和疾病靶点,以预测药物的潜在作用靶点和途径,揭示中药或其复杂成分的作用机制。本研究通过网络药理学数据分析以揭示补骨脂乙素在 2 型糖尿病治疗中的潜在作用,探究补骨脂乙素在 2 型糖尿病治疗中的作用机制,在细胞水平构建胰岛素抵抗细胞模型并进行实验验证,为补骨脂乙素在 2 型糖尿病治疗中的应用提供一个新的研究视角和理论基础。

1 材料与方法

1.1 补骨脂乙素作用靶点的获取

采用 ECTM 数据库 (<http://tcmlp.cn/ECTM/index.php>),查找补骨脂的活性成分补骨脂乙素相应的候选靶基因。将 PubChem 数据库 (<https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov>) 提供标准的补骨脂乙素的 Canonical SMILES 格式,导入为“Homo sapiens”预设的 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.SwissTargetPrediction.ch>) 中,预测补骨脂乙素潜在目标。整理补骨脂乙素作用靶点并删除重复靶点。

1.2 疾病靶点的获取

基于 GeneCards 以“type 2 diabetes”为关键词获取与 2 型糖尿病相关的靶点,靶点根据“Relevance score”降序排列,通过 MEDIAN 函数,保留 Relevance score > 5.795 82 的靶点,通过查阅文献补充靶点并删除重复的靶点。

1.3 补骨脂乙素抗 2 型糖尿病作用靶点的预测

将上述得到的补骨脂乙素作用的相关靶点以及 2 型糖尿病相关靶点导入 Venn 数据库 (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) 中进行交互分析,获得交集靶点作为补骨脂乙素治疗 2 型糖尿病的作用靶点。

1.4 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建与分析

将相互交集的靶点导入 STRING 数据库 (<http://string-db.org>),计算蛋白相互网络关系,物种

选“Homo sapiens”，以节点(node)和“边”(edge)表示靶点关联程度。同时采用 Cytoscape 3.9.1 软件对所得结果进行拓扑分析，通过插件 MCODE 进行基因簇的分析，结合插件 Cytohubba 的 MCC 算法筛选核心靶标。

1.5 富集分析

将关键靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov>) 做聚类分析，并对关键靶点所涉及的细胞功能(CC)、分子功能(MF)、生物功能(BP)进行富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。以 $P < 0.05$ 为阈值，完成关键靶点富集分析。通过微生信 (<http://bioinformatics.com.cn>) 平台得出相应的富集结果，根据 P 值将前 20 个结果绘制气泡图和通路气泡图。

1.6 药物与试剂

补骨脂乙素(质量分数 $\geq 98\%$ ，货号 20784-50-3)购自大连美仑生物技术有限公司；二甲双胍(质量分数 $\geq 99\%$ ，货号 1115-70-4)购自大连美仑生物技术有限公司；棕榈酸(质量分数 97%，货号 57-10-3)购自上海麦克林生化科技股份有限公司；DMEM 高糖液体培养基[赛默飞世尔科技(中国)有限公司，货号 11995065]；DMEM 无糖培养基[赛默飞世尔科技(中国)有限公司，货号 11966025]；胎牛血清(FBS)[赛默飞世尔科技(中国)有限公司，货号 C0232]；胰岛素(货号 11061-68-0)购自大连美仑生物技术有限公司；荧光 D-葡萄糖类似物 2-NBDG (货号 186689-07-6)购自武汉安捷凯生物医药科技有限公司。

Western 及 IP 细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司，货号 P0013J)；胰岛素受体(INS-R)抗体(ImmunoWay Biotechnology Company，货号 YT2361)；胰岛素受体底物 1(IRS1)抗体(沈阳万类生物科技有限公司，货号 WL03123)；磷脂肌醇-3-激酶(PI3K)抗体(CellSignaling Technology, Inc, 货号 4257S)；蛋白激酶 B(Akt)抗体(Proteintech Group, Inc, 货号 10176-2-AP)；Anti-葡萄糖转运蛋白 2(GLUT2) Rabbit pAb(沈阳万类生物科技有限公司，货号 WL03363)。

1.7 胰岛素抵抗细胞模型的建立、剂量确定及分组

1.7.1 胰岛素抵抗细胞模型的建立 HepG2 细胞培养条件：DMEM 培养基+10%胎牛血清+1%青-链霉素，置于 37℃、5%CO₂ 培养箱。细胞贴壁培养，当细胞密度约为 90%时，计数传代于 6 孔板培

养皿中，进行后续实验。在细胞生长处于对数期时，通过无糖 DMEM 培养基饥饿细胞 12 h，接着用 200 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸处理细胞 24 h。

1.7.2 细胞活性的检测 按照 1×10^4 HepG2 个细胞/mL (100 μL /孔) 的密度将细胞接种于 96 孔培养板。设置对照组、DMSO 组、补骨脂乙素(4、8、10、12、14 $\mu\text{mol/L}$) 组，每组 7 个复孔。加药物处理 24 h 后，弃培养液，PBS 洗涤 2 遍，使用 DMEM 培养基按照 1:10 比例稀释 CCK8 试剂，加 CCK8 后置于培养箱中作用 30 min。后用酶标仪(TECAN)检测细胞在 450 nm 处 A 值。

1.7.3 2-NBDG 检测细胞对葡萄糖的摄取 按照 1×10^4 个细胞/mL (100 μL /孔) 的密度将细胞接种于 96 孔培养板。设置对照组、模型组、补骨脂乙素组、二甲双胍组，每组 7 个复孔。模型组、补骨脂乙素组、二甲双胍组细胞按 1.7.1 项下方法进行胰岛素抵抗诱导。补骨脂乙素组和二甲双胍(200 $\mu\text{mol/L}$) 组在胰岛素抵抗模型基础上分别加药物处理 24 h 后，弃培养液，PBS 洗涤 2 遍，更换为含有 1×10^{-6} mol/L 胰岛素的无糖 DMEM 培养基处理 10 min，更换至含 50 nmol/L 2-NBDG 的无糖的 DMEM 培养基培养 30 min 后 PBS 清洗 2 次，最后每孔加 100 μL PBS 溶液，用酶标仪(TECAN)检测细胞在 475、550 nm 处的 A 值。

1.7.4 细胞的分组及加药处理 胰岛素抵抗细胞模型随机分为模型组、二甲双胍组、补骨脂乙素组。二甲双胍组用 200 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 24 h，补骨脂乙素组用 10 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂乙素处理 24 h，正常培养条件的 HepG2 细胞作为对照组。

1.8 总 RNA 提取和浓度测定

6 孔板每孔细胞中加入 1 mL Trizol 裂解液，冰上裂解 15 min；加 200 μL 三氯甲烷剧烈振荡，4℃、12 000 r/min 离心 15 min，取上清液；加入与上清等体积的异丙醇后混匀，4℃、12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液；加 DEPC 水配制的 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀；4℃、7 500 r/min 离心 5 min 后弃上清液；RNA 沉淀晾干至透明，根据沉淀的体积加适量 DEPC 水充分溶解 RNA。通过 DEPC 水空白检测，通过 Nano 仪器(Nanodrop, 美国)检测 RNA 浓度，260、280 nm 的吸光度(A)比值需在 1.8~2.1。

1.9 RT-PCR 法检测 PI3K/Akt 信号通路相关 mRNA 的水平

使用高容量 cDNA 逆转录试剂盒(Vazyme,

HiScript® III. RT SuperMix) 将 RNA 逆转成 cDNA 用于 qPCR, 在 QuantStudio 3 Flex 实时荧光定量 PCR 系统 (美国 Thermo Fisher 公司) 检测相对基因表达, 将 mRNA 水平归一化至 Actin 表达水平, 数据按 qRT-PCR 荧光定量数据分析法计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。检测模型组与对照组细胞中 PI3K/Akt 信号通路指标 mRNA 含量, 并检测补骨脂乙素干预后的变化。

1.10 Western blotting 检测 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的水平

细胞加药处理结束后加入 RIPA 裂解液、Cocktail 冰上裂解 30 min 后将细胞碎片混悬液转移到离心管中, 12 000 r/min, 4 °C 离心 20 min, 取上清装至离心管中以待检测。使用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定蛋白含量。取适量上清, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 95 °C 蛋白变性 10 min。电泳后, 转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。加入一抗 (INS-R 按 1:1 000 稀释, IRS1 按 1:1 500 稀释, GLUT2 按 1:1 000 稀释, PI3K 按 1:500 稀释, p-PI3K 按 1:500 稀释, Akt 按 1:1 000 稀释, p-Akt 按 1:1 000 稀释, Actin 按 1:1 000 稀释), 4 °C 孵育过夜后 TBST 溶液洗 3 遍, 加入二抗 (按 1:20 000 稀释), 室温孵育 1 h。TBST 溶液 3 遍, 使用 ECL 试剂盒进行显影。以 Actin 为内参, 计算 INS-R、IRS1、GLUT2、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白相对表达量。

1.11 统计学方法

使用 GraphPad Prism9 软件用于所有数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用双尾、未配对的 Student T 检验来评估两组之间的统计学意义, 使用单因素方差分析 (单因子方差分析)。

2 结果

2.1 补骨脂乙素抗 2 型糖尿病的相关靶点

通过 PubChem 数据库获取补骨脂乙素的化学结构。从 ECTM 数据库、Swiss Target Prediction 数据库和结合文献挖掘方法收集到的基因删除重复项后, 共得到 100 个相关靶点; 利用 GeneCards 数据库获取了与 2 型糖尿病相关的靶点共 8 279 个。将收集到的补骨脂乙素靶点与 2 型糖尿病疾病靶点交互分析, 结果表明, 补骨脂乙素对应的靶点中有 92 个与 2 型糖尿病有关, 见图 1。

2.2 PPI 分析结果

将 92 个重叠基因进一步拟合到 STRING 中,

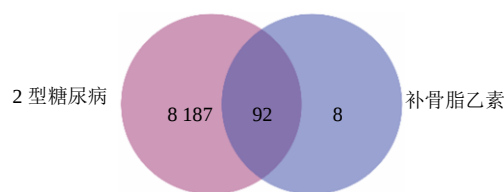


图 1 补骨脂乙素作用靶点与 2 型糖尿病疾病靶点相互交集情况

Fig. 1 Intersection between isobavachalcone target and type 2 diabetes target

PPI 网络 (交互得分 ≥ 0.150), 包含补骨脂乙素和 2 型糖尿病的共同目标的 86 个节点和 379 个“边” (图 2)。Cytoscape 3.9.1 软件中插件 MCODE 分析了具有 MCODE 默认值的整个网络, 这产生了 3 个 Score > 5 的模块, 即集群 1 (节点: 16, 得分: 6.8) (图 3A), 集群 2 (节点: 16, 得分: 6.4) (图 3B), 集群 3 (节点: 6, 得分: 5.2) (图 3C)。其中使用 Cytohubba 和最大团中心性 (MCC) 算法作为潜在目标预测的过滤条件, 筛选了从 2 个聚类中提取的前 38 个节点 (图 3D~F)。在 MCODE 和 Cytohubba 的筛选结果交叉后, 获得了 35 个共同靶点, 其中包括常见的雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α 基因 (PIK3CA)、丝裂原激活蛋白激酶 14 (MAPK14)、酪氨酸激酶受体 2 (ERBB2)、低氧诱导因子-1 (HIF1A)、间质表皮转化因子 (MET)、碳酸酐酶 9 (CA9) 等。

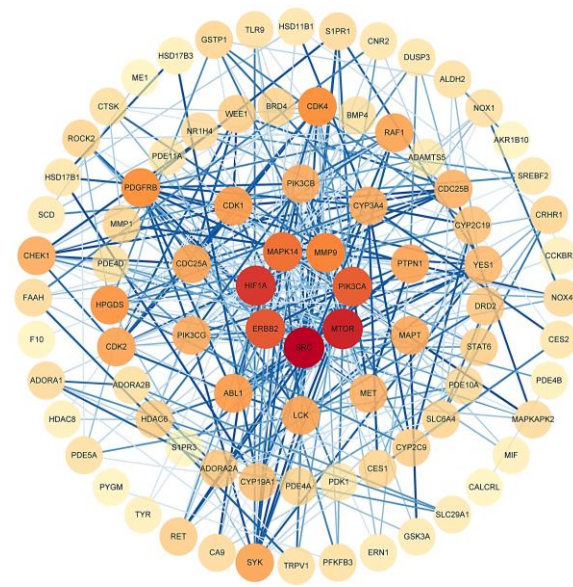
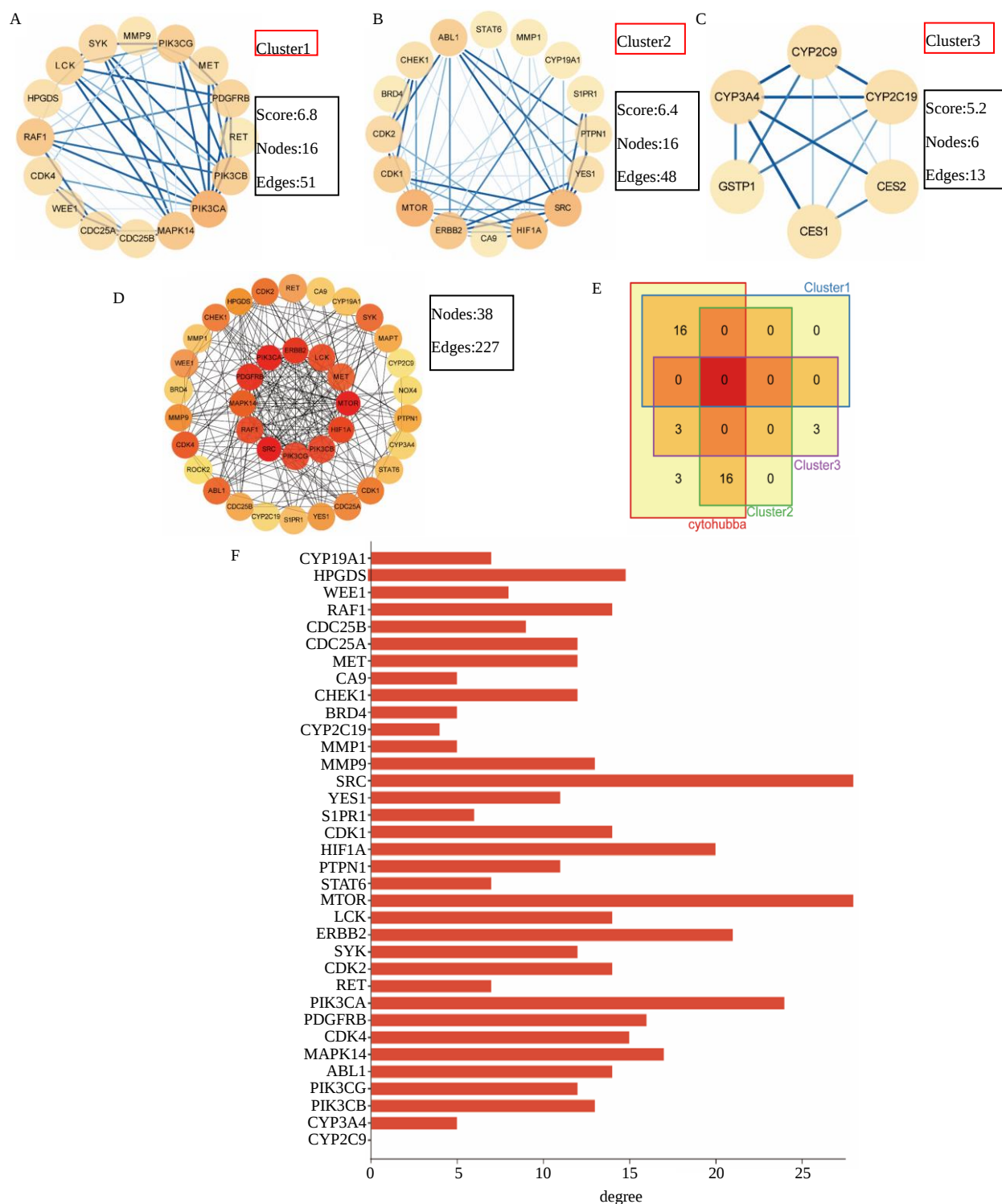


图 2 药物与疾病共同靶点的 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of drug and disease common targets



A-MCODE 网络集群 1 B-MCODE 网络集群 2 C-MCODE 网络集群 3 D-MCC 算法筛选的前 38 个节点 E-MCODE 和 Cytohubba 2 种算法的交集 F-补骨脂乙素治疗 2 型糖尿病的核心靶点

A-MCODE network cluster 1 B-MCODE network cluster 2 C-MCODE network cluster 3 D-Top 38 nodes screened by the MCC algorithm E-Intersection of MCODE and Cytohubba F-Core targets of isobavachalcone for the treatment of type 2 diabetes target

图 3 补骨脂乙素治疗 2 型糖尿病核心靶点的筛选

Fig. 3 Screening of core targets of isobavachalcone for the treatment of type 2 diabetes

2.3 GO 分析和 KEGG 富集分析结果

有 177 个 BP、28 个 CC、54 个 MF 和 113 个 KEGG 途径满足 $P < 0.05$ 的条件。KEGG 途径富集分析揭示了与 2 型糖尿病治疗靶点密切相关的途径,包括 PI3K/Akt 信号通路、胰岛素信号通路和 2 型糖尿病信号通路。在 BP 分析中,靶基因主要富

集于信号转导、蛋白磷酸化的调节、参与跨膜受体酪氨酸激酶信号通路的调节以及炎症反应的调节等。核膜、质膜和细胞器包膜内腔被发现参与 CC 富集分析, MF 分析发现靶点参与结合 SH2 结构域激活激酶活性、结合 ephrin 受体参与细胞增殖活动以及氧化还原反应,见图 4。

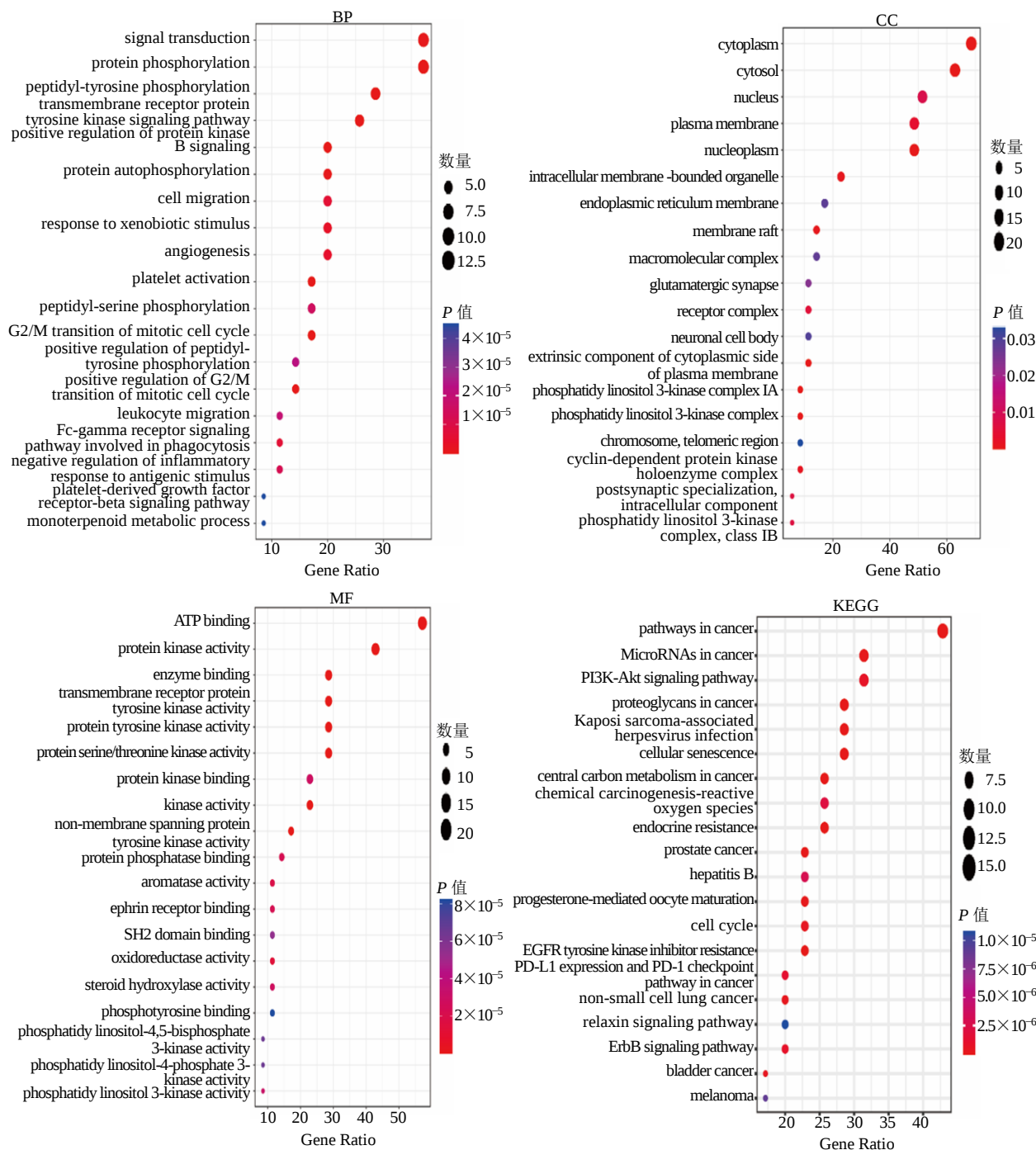


图 4 补骨脂乙素 35 个潜在治疗 2 型糖尿病靶点的 GO 富集和 KEGG 途径富集分析

Fig. 4 GO enrichment and KEGG pathway enrichment analysis of isobavachalcone 35 potential therapeutic targets for type 2 diabetes

2.4 体外实验验证

2.4.1 补骨脂乙素最佳刺激浓度筛选 为了探寻补骨脂乙素最佳作用浓度,使用0、4、8、10、12、14 $\mu\text{mol/L}$ 补骨脂乙素作用 HepG2 细胞 24 h,检测细胞活力,与对照组相比,当补骨脂乙素浓度为4、8、10 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力均没有下降,当浓度为12 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力开始有显著下降趋势 ($P < 0.05$),因此选择干预浓度为4、8、10 $\mu\text{mol/L}$ 。当补骨脂乙素浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 时能显著提高模型细胞的葡萄糖摄取能力 ($P < 0.01$),因此后续研究选用补骨脂乙素的干预浓度为10 $\mu\text{mol/L}$,见图5。

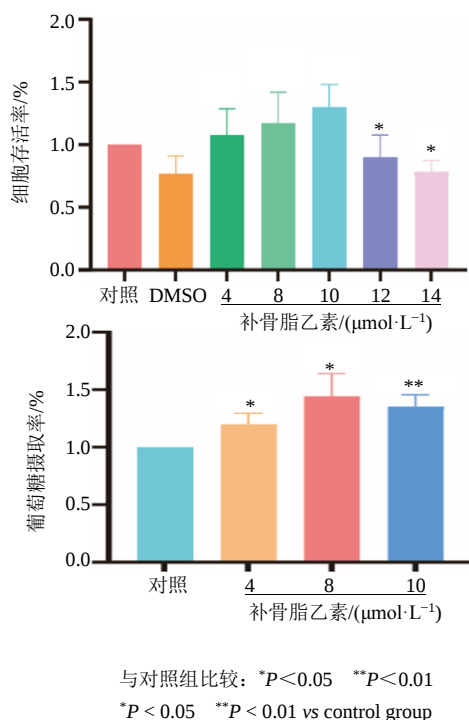


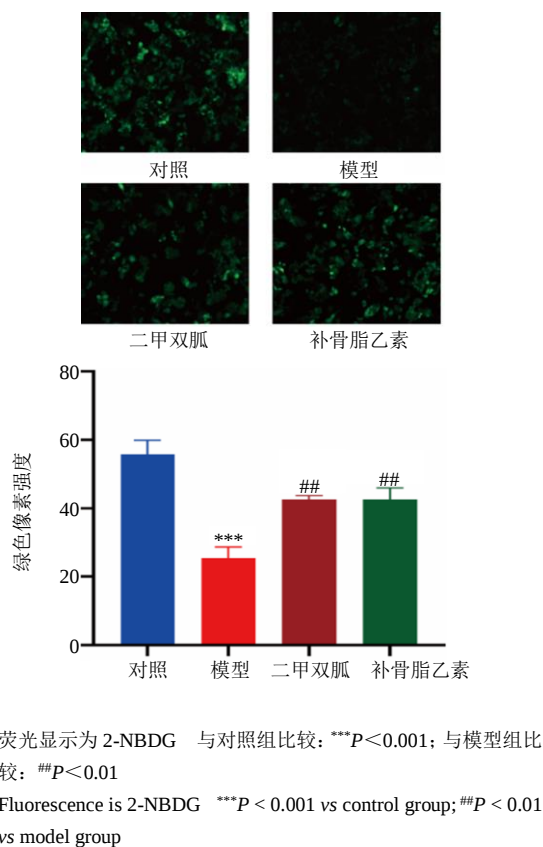
图5 补骨脂乙素对 HepG2 细胞活力及葡萄糖摄取能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of isobavachalcone on HepG2 cell viability and glucose uptake capacity ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.4.2 补骨脂乙素对胰岛素抵抗细胞葡萄糖摄取能力的影响 与对照组相比,模型组 HepG2 细胞摄取 2-NBDG 的荧光强度显著降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,二甲双胍组和补骨脂乙素组细胞荧光强度显著增强 ($P < 0.01$)。二甲双胍组和补骨脂乙素组显著提高了棕榈酸处理细胞后葡萄糖的摄取能力,见图6。

2.5 补骨脂乙素对胰岛素抵抗细胞模型 PI3K/Akt 信号通路相关基因 mRNA 表达的影响

与对照组相比,模型组 *INS-R*、*IRS1*、*GLUT2*、



荧光显示为 2-NBDG 与对照组比较: *** $P < 0.001$;与模型组比较: ## $P < 0.01$

Fluorescence is 2-NBDG *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

图6 葡萄糖的摄取能力的检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Detection of 2-NBDG ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

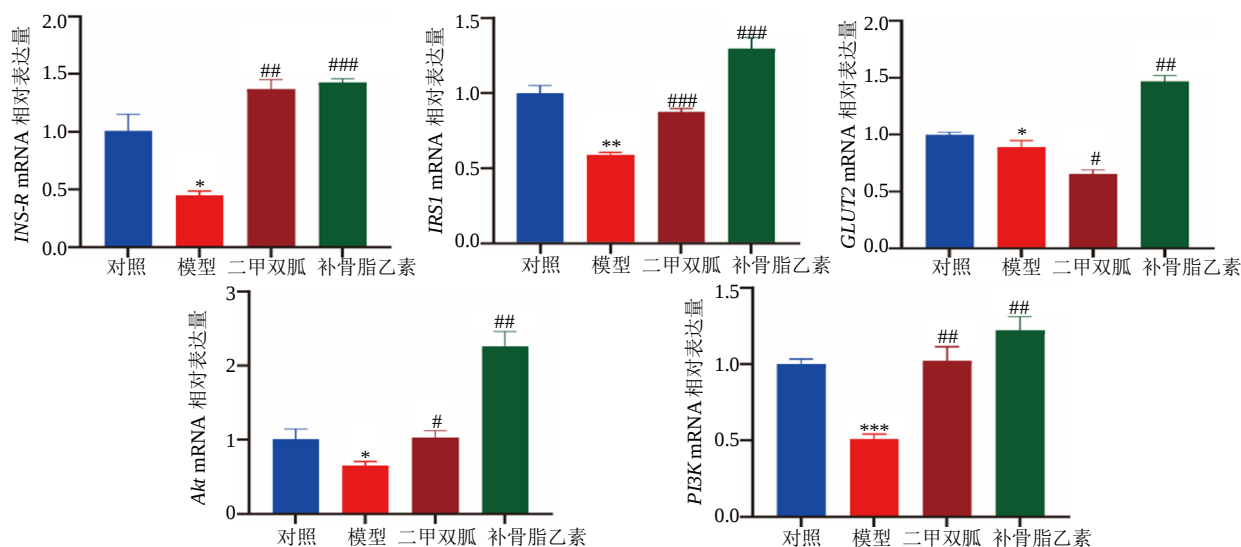
PI3K、*Akt* mRNA 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。补骨脂乙素组 *INS-R*、*IRS1*、*GLUT2*、*PI3K*、*Akt* mRNA 的表达水平显著高于模型组 ($P < 0.01$ 、 0.001),见图7。

2.6 补骨脂乙素对胰岛素抵抗细胞模型 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组处理显著降低了 *INS-R*、*IRS1*、*GLUT2*、*Akt*、*PI3K*、*p-Akt*、*p-PI3K* 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)。与模型组相比,二甲双胍组和补骨脂乙素组的 *INS-R*、*IRS1*、*GLUT2*、*Akt*、*PI3K*、*p-Akt*、*p-PI3K* 的蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001),见图8。

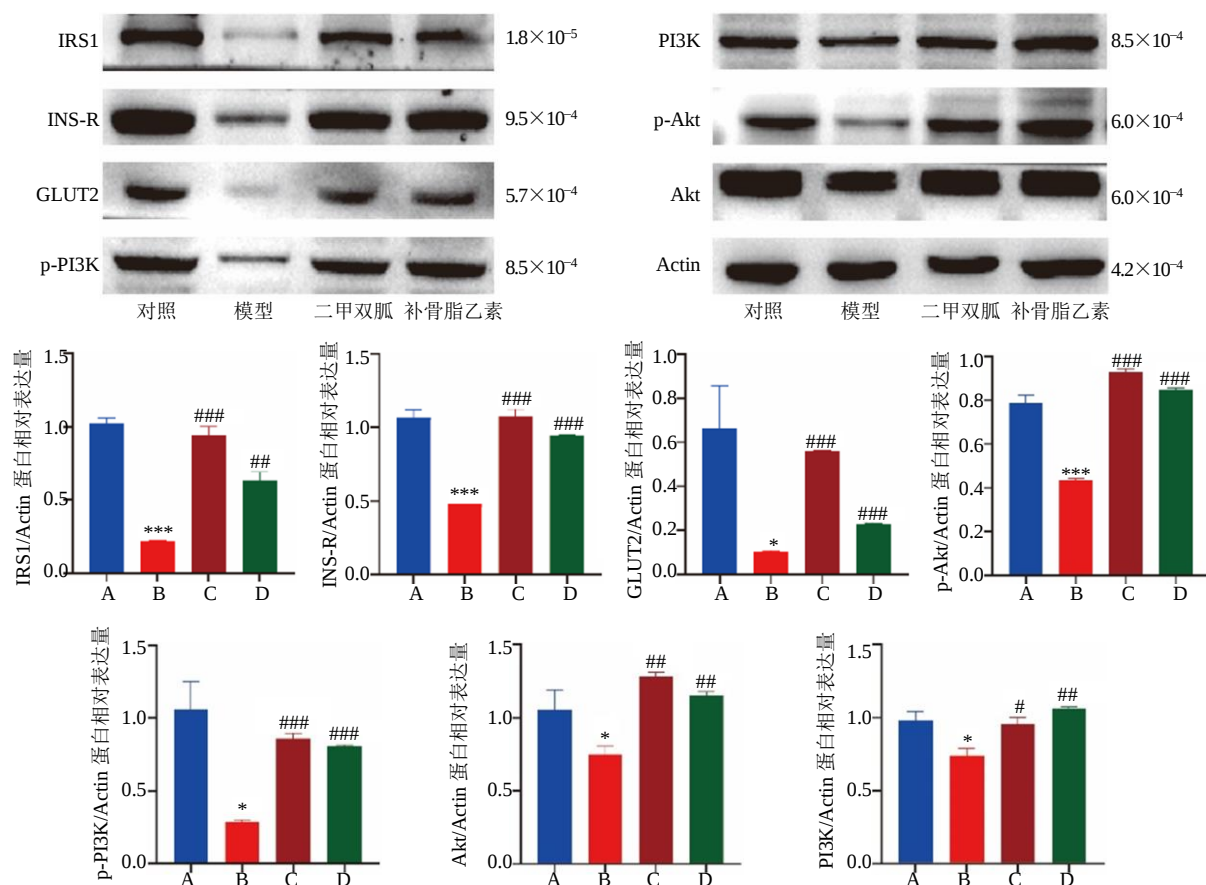
3 讨论

2 型糖尿病是多基因、多因素作用的疾病,仅根据单一作用靶点难以达到良好的治疗效果^[19]。中药或天然药物具有多成分、多靶点的特点,被视为药物开发的重要来源^[20]。由于中药成分复杂且涉及靶点较多,从多成分中寻找具有潜在开发价值的天然产品通常具有挑战性。网络药理学作为一种新的方法,从系统层次和生物网络的整体角度出发,解



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

图 7 补骨脂乙素对胰岛素抵抗细胞模型 PI3K/Akt 信号通路相关基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
 Fig. 7 Effect of isobavachalcone on mRNA expression of PI3K/AKT signaling pathway in insulin resistant cell model ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-对照 B-模型 C-二甲双胍 D-补骨脂乙素 与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$
 A-control B-model C-metformin D- isobavachalcone * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

图 8 补骨脂乙素对胰岛素抵抗细胞模型 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
 Fig. 8 Effect of isobavachalcone on protein expression of PI3K/Akt signaling pathway in insulin resistant cell model ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

析药物与疾病之间的靶点网络^[21]。补骨脂乙素是补骨脂中的黄酮类的化合物,补骨脂乙素可以抑制 NF- κ B 通路改善大鼠糖尿病肾病,抑制肾脏炎症,改善肾损伤^[22],表明补骨脂乙素与 2 型糖尿病有一定的相关性。但补骨脂乙素在 2 型糖尿病中的作用效果及机制仍需进一步的研究。

通过补骨脂乙素作用靶点与 2 型糖尿病靶点的交集得到多个重叠的基因及核心靶点, PPI 显示补骨脂乙素作用于 2 型糖尿病的靶蛋白之间具有密切的相互作用, KEGG 分析表明靶基因富集在 PI3K/Akt 信号通路, GO 分析表明补骨脂乙素治疗 2 型糖尿病的核心靶点参与 PI3K 酶活性及 PI3K 复合物的形成,表明 PI3K/Akt 在补骨脂乙素治疗 2 型糖尿病机制可能起着重要的作用。PI3K/Akt 及其相关信号通路在生物体生长和关键 BP (如葡萄糖稳态、脂质代谢、蛋白质合成和细胞增殖和存活) 中起着关键的作用^[23]。在血糖调节过程中,胰岛素与靶细胞膜上的胰岛素受体 (IR) 结合促进 IRS-1 磷酸化, IRS1 通过 SH2 结构域激活 PI3K, PI3K 与下游效应物 Akt 结合并激活其表达,进一步导致 GLUT4 易位至细胞膜,增加细胞对葡萄糖的摄取,调节血糖平衡^[24], GLUT4 表达的改变会导致葡萄糖摄取或输出障碍,导致胰岛素抵抗的发生^[25]。补骨脂乙素的潜在靶点与 2 型糖尿病靶点的交集中均发现 PI3K/Akt 通路相关靶点,如 PIK3CA、磷酸肌醇-3-激酶催化亚基 β 肽 (PIK3CB)、mTOR 等。PI3K/Akt 通过下游叉头框蛋白 O1 (FOXO1) 和糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 调节葡萄糖代谢,通过 mTOR 蛋白复合体 1 (mTORC1) 和固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 调节脂质代谢^[26]。KEGG 富集分析中发现补骨脂乙素靶点也富集在 PI3K/Akt 下游 FOXO 和 mTOR 信号通路。本研究利用细胞实验对网络药理学预测结果 PI3K/Akt 信号通路进行了验证。

实验结果显示,胰岛素抵抗细胞经补骨脂乙素处理后,胰岛素抵抗细胞的葡萄糖摄取能力明显增强,胰岛素抵抗细胞中 PI3K、Akt、INS-R、IRS1 的 mRNA 显著升高,与葡萄糖摄取相关的 GLUT2 mRNA 表达水平也显著增加。PI3K 和 Akt 蛋白及其磷酸化也显著升高,INS-R、IRS1、GLUT2 的蛋白表达水平与转录水平表达趋势一致,说明补骨脂乙素通过 PI3K/Akt 信号通路增加葡萄糖的摄取改善胰岛素抵抗,从而发挥抗 2 型糖尿病的作用。

综上所述,本研究通过网络药理学及细胞生物学技术对补骨脂乙素靶点及作用通路进行分析,表明补骨脂乙素治疗 2 型糖尿病是多成分、多靶点、多途径协同作用的结果。补骨脂乙素可能通过 PI3K/Akt 信号通路发挥对 2 型糖尿病的治疗作用,为其后续进一步深入研究提供了基础和参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nanda M, Sharma R, Mubarik S, *et al.* Type-2 diabetes mellitus (T2DM): Spatial-temporal patterns of incidence, mortality and attributable risk factors from 1990 to 2019 among 21 world regions [J]. *Endocrine*, 2022, 77(3): 444-454.
- [2] Zheng Y, Ley S H, Hu F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(2): 88-98.
- [3] Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, *et al.* Type 2 diabetes mellitus: A review of multi-target drugs [J]. *Molecules*, 2020, 25(8): 1987.
- [4] Malone J I, Hansen B C. Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? [J]. *Pediatr Diabetes*, 2019, 20(1): 5-9.
- [5] Hernandez L F, Eguchi N, Whaley D, *et al.* Anti-oxidative therapy in diabetic nephropathy [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2022, 14(2): 14.
- [6] Halim M, Halim A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes) [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(2): 1165-1172.
- [7] Ahmed B, Sultana R, Greene M W. Adipose tissue and insulin resistance in obese [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111315.
- [8] Park S Y, Lee H J, Song J H, *et al.* Dimethyl itaconate attenuates palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle cells through the AMPK/FGF21/PPARdelta-mediated suppression of inflammation [J]. *Life Sci*, 2021, 287: 120129.
- [9] Zhao H, Zhang F, Sun D, *et al.* Branched-chain amino acids exacerbate obesity-related hepatic glucose and lipid metabolic disorders via attenuating Akt2 signaling [J]. *Diabetes*, 2020, 69(6): 1164-1177.
- [10] Moin A S M, Butler A E. Alterations in beta cell identity in type 1 and type 2 diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2019, 19(9): 83.
- [11] Mishriky B M, Cummings D M, Powell J R. Diabetes-related microvascular complications-A practical approach [J]. *Prim Care*, 2022, 49(2): 239-254.

- [12] Bai Y, Mo K, Wang G, *et al.* Intervention of gastrodin in type 2 diabetes mellitus and its mechanism [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 710722.
- [13] Seo E, Kang H, Oh Y S, *et al.* *Psoralea corylifolia* L. seed extract attenuates diabetic nephropathy by inhibiting renal fibrosis and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Nutrients*, 2017, 9(8): 828.
- [14] 杨秀伟, 吕倩, 许青霞, 等. 补骨脂环己烷溶性化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(11): 3269-3279.
- [15] Al-Ishaq R K, Abotaleb M, Kubatka P, *et al.* Flavonoids and their anti-diabetic effects: Cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(9): 430.
- [16] Wang M, Lin L, Lu J J, *et al.* Pharmacological review of isobavachalcone, a naturally occurring chalcone [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 165: 105483.
- [17] Dong W H, Chu Q Q, Liu S Q, *et al.* Isobavachalcone ameliorates diabetic nephropathy in rats by inhibiting the NF- κ B pathway [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(9): e13405.
- [18] Lee H, Li H, Kweon M, *et al.* Isobavachalcone from *Angelica keiskei* inhibits adipogenesis and prevents lipid accumulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1693.
- [19] Meigs J B. The genetic epidemiology of type 2 diabetes: Opportunities for health translation [J]. *Curr Diab Rep*, 2019, 19(8): 62.
- [20] Xu L, Li Y, Dai Y, *et al.* Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 130: 451-465.
- [21] 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.
- [22] Dong W H, Chu Q Q, Liu S Q, *et al.* Isobavachalcone ameliorates diabetic nephropathy in rats by inhibiting the NF- κ B pathway [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(9): e13405.
- [23] Huang X, Liu G, Guo J, *et al.* The PI3K/Akt pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483-1496.
- [24] Zhu Y, Zhang H, Wei Y, *et al.* Pea-derived peptides, VLP, LLP, VA, and LL, improve insulin resistance in HepG2 cells via activating IRS-1/PI3K/Akt and blocking ROS-mediated p38MAPK signaling [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(11): e13454.
- [25] Xiao H, Sun X, Lin Z, *et al.* Gentiopicroside targets PAQR3 to activate the PI3K/Akt signaling pathway and ameliorate disordered glucose and lipid metabolism [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(6): 2887-2904.
- [26] Santoleri D, Titchenell P M. Resolving the paradox of hepatic insulin resistance [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(2): 447-456.

【责任编辑 高源】