

基于网络药理学及分子对接研究消渴清颗粒治疗糖尿病前期的作用机制

张怡¹, 郭梦竹¹, 赵进东^{2,3*}, 方朝晖^{2,3*}

1. 安徽中医药大学 第一临床医学院, 安徽 合肥 230000

2. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031

3. 合肥综合性国家科学中心大健康研究院 新安医学与中医药现代化研究所, 安徽 合肥 230038

摘要: **目的** 利用网络药理学及分子对接探究消渴清颗粒治疗糖尿病前期的作用机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库搜索有关于消渴清颗粒中中药的有效成分与靶点, 在 GeneCards 数据库、OMIM 数据库搜索糖尿病前期的基因靶点, 进而获得药物-疾病交集靶点, 将交集靶点导入 String 蛋白质相互作用数据库和 Cytoscape 构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络图, 并筛选核心靶点, 再将药物-疾病交集靶点导入 DAVID 数据库, 对其分别进行基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 筛选出与疾病相关的通路, 通过 Cytoscape 得出“通路-靶点”网络图, 再通过插件分析得出“通路-靶点”网络核心靶点, 取二者度值排名前 7 位的靶点交集作为消渴清颗粒治疗糖尿病前期的关键靶点, 最后选择关键靶点与有效成分用 AutoDock 与 Pymol 软件进行分子对接及可视化。**结果** 筛选出消渴清颗粒中药活性成分 36 种, 其中筛选出 6 种关键活性成分, 分别为槲皮素、山柰酚、小檗碱、 β -谷甾醇、花生四烯酸、知母皂苷 C, 靶点基因 232 个; 筛选出糖尿病前期靶点 685 个, 交集靶点 93 个, 关键靶点 5 个, 分别为肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-6 (IL-6)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、环加氧酶 2 (PTGS2)。GO 通路富集主要涉及内容有炎症、药物反应, 细胞生长凋亡等; KEGG 通路富集分析显示糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物及其受体 (AGE-RAGE) 信号通路、TNF 信号通路、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、IL-17 信号通路、胰岛素抵抗通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /Akt 信号通路等, 分子对接结果显示关键靶点与有效成分具有较稳定的结合能力。**结论** 消渴清颗粒中各种药物成分通过多靶点、多通路协同治疗糖尿病前期的作用机制, 为进一步研究治疗糖尿病提供了线索。

关键词: 消渴清颗粒; 糖尿病前期; 网络药理学; 分子对接; 槲皮素; 山柰酚; 小檗碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)07-1727-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.07.008

Mechanism of Xiaokeqing Granules in treatment of prediabetes based on network pharmacology and molecular docking

ZHANG Yi¹, GUO Mengzhu¹, ZHAO Jindong^{2,3}, FANG Zhaohui^{2,3}

1. The First Clinical Medical College of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China

2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

3. Xin'an Institute of Medicine and Modernization of Traditional Chinese Medicine, Institute of Health and Medicine, Hefei Comprehensive National Science Center, Hefei 230038, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of Xiaokeqing Granules in treatment of prediabetes using network pharmacology and molecular docking. **Methods** The active ingredients and targets of Xiaokeqing Granules were searched in the Chinese medicine system pharmacology database, and the gene targets of prediabetes were searched in the GeneCards database and OMIM database,

收稿日期: 2024-04-14

基金项目: 安徽省卫生健康科研项目 (AHWJ2023BAC10002); 安徽省高等学校科学研究项目 (2023AH050782); 安徽省高等学校省级质量工程项目 (2021jyxm0834); 新安医学与中医药现代化研究所“揭榜挂帅”项目 (2023CXMMTCM024, 2023CXMMTCM003); 糖脂代谢病教育部重点实验室开放基金项目 (GYDKFXM01); 安徽省名中医方朝晖工作室 (2019-8-515); 安徽省高校优秀拔尖人才培养项目 (2022-371); 安徽中医药大学临床科研项目 (2021yfylc01); 安徽省卫生健康骨干人才培养对象 (2022-392); 2023 年度新时代育人省级质量工程项目 (研究生教育) 建设项目 (2023gjxslt014)

作者简介: 张怡, 硕士, 研究方向为中医药防治内分泌代谢性疾病研究。E-mail: zhangyi992022@163.com

***通信作者:** 赵进东, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向为中医药防治内分泌代谢性疾病研究。E-mail: zhaojindong1111@163.com
方朝晖, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治内分泌与代谢疾病。E-mail: fangzhaohui9097@163.com

and the drug-disease intersection targets were obtained. The intersection targets were imported into string protein interaction database and Cytoscape to construct protein-protein interaction networks (PPI) network map, and the core targets were screened, and then the intersection targets of drug-disease were imported into DAVID database. GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed to screen out disease-related pathways, and the “pathway-target” network diagram was obtained by Cytoscape. The core targets of the “pathway-target” network were obtained by plug-in analysis, and the intersection of the top 7 targets with the degree value of the two was taken as the key targets for the treatment of pre-diabetes. Finally, the key targets and active ingredients were selected for molecular docking and visualization by AutoDock and Pymol software. **Results** A total of 36 active ingredients of Xiaokeqing Granules were screened out, of which 6 key active ingredients were screened out, including quercetin, kaempferol, berberine, β -sitosterol, arachidonic acid, and asoside C. 232 target genes, 685 pre-diabetic targets, 93 intersection targets, and 5 key targets were screened out. These were TNF, IL-6, Akt1, IL-1 β , and PTGS2. GO pathway enrichment was mainly involved in inflammation, drug response, cell growth and apoptosis. KEGG pathway enrichment analysis showed AGE-RAGE signaling pathway, TNF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, IL-17 signaling pathway, insulin resistance pathway, PI3K/Akt signaling pathway in diabetic complications. Molecular docking results showed that the key targets had stable binding ability with active ingredients. **Conclusion** The results show that the various drug components in Xiaokeqing Granules treat prediabetes through multi-target and multi-pathway cooperation, which provides clues for further research and treatment of prediabetes.

Key words: Pre-diabetes; Xiaokeqing Granules; network pharmacology; molecular docking; quercetin; kaempferol; berberine

糖尿病前期是血糖失稳态与糖尿病发病之间的糖代谢状态, 主要包括空腹血糖受损、糖耐量受损及二者的混合状态^[1]。糖尿病前期是糖尿病的高风险因素, 科学地干预糖尿病前期人群可延缓甚至阻止其向糖尿病发展^[2], 此阶段患者无明显多饮、多食、多尿等糖尿病典型临床症状^[3]。本病的发病机制主要与胰岛素抵抗、脂质代谢异常有关^[4]。治疗上主要采取生活方式干预, 如饮食运动等和降糖药物的使用, 但降糖药物存在胃肠道不适等不良反应。中医学将糖尿病前期归于“脾瘅”的范畴^[5]。《灵枢·五变》云:“五脏皆柔弱者, 善病消瘅。”《素问·奇病论》云:“夫五味入口, 藏于胃, 脾为之行其精气。津液在脾, 故令人口甘也。此肥美之所发也。此人必数食甘美而多肥也。肥者令人内热, 甘者令人中满, 故其气上溢, 转为消渴”, 脾气脾阴脾阳虚致消渴的发生^[6], 故脾瘅病位主要在于脾胃, 过食肥甘厚味损伤脾胃, 脾失统摄, 水湿停滞成痰, 血溢脉外成瘀, 而痰浊、瘀血损伤脾气脾阳, 气血津液输布失常, 水谷津微失于运化而导致脾瘅, 故病机主要为阴虚燥热、痰瘀互结^[7]。消渴清颗粒由知母、苍术、黄连、蒲黄、地锦草组成, 具有滋阴清热、活血化瘀的功效^[8]。知母为君药滋阴生津润燥, 苍术燥湿健脾、黄连清热燥湿, 共为臣药, 佐以蒲黄、地锦草活血化瘀清热^[8]。现代临床研究认为, 消渴清对阴虚热盛挟血瘀型的 2 型糖尿病患者具有一定的降糖效果, 并且能够改善多食易饥、怕热心烦、溲赤、尿多等症状^[9]; 也有临床研究表明, 消渴清颗

粒可以改善糖尿病周围神经病变患者肢体疼痛、麻木及感觉异常等症状, 并且具有降糖、调节异常血脂、改善血循环障碍等作用^[10]。但是消渴清颗粒对糖尿病前期治疗机制尚待研究, 本文利用网络药理学与分子对接方法探讨消渴清颗粒治疗糖尿病前期的作用机制, 为后续深入进行临床循证及机制研究提供基础。

1 方法

1.1 消渴清颗粒活性成分与靶点收集与处理

通过 TCMS (https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php) 网站上分别以“知母”“苍术”“黄连”“蒲黄”“地锦草”为关键词, 并以口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 为条件搜索, 并且获取消渴清颗粒有效活性成分, 对检索到的化学成分进行筛选, 并得到各个成分的靶点蛋白, 并将靶点蛋白通过 STRING (https://cn.string-db.org/) 网站和 Uniprot (https://www.uniprot.org/) 数据库得到对应的药物靶点基因。

1.2 “中药-活性成分-靶点”网络图的构建和分析

整理活性成分预测得到的靶点信息, 通过 Cytoscape 3.9.1 软件 (http://www.cytoscape.org/) 进行拓扑学分析, 构建中药-活性成分-靶点网络图。

1.3 获取糖尿病前期靶点

分别在 GeneCards (https://www.genecards.org/) 数据库、OMIM (https://www.omim.org/) 数据库, 以“pre-diabetes、impaired glucose tolerance”为关键词检索糖尿病前期的疾病靶点基因。

1.4 获取消渴清颗粒药物靶点与糖尿病前期疾病靶点的交集靶点

通过 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 平台, 输入消渴清颗粒药物靶点与糖尿病前期疾病靶点, 绘制韦恩图, 得到交集靶点。

1.5 构建蛋白质相互作用 PPI 网络和“化合物 - 靶点”网络

将得到的交集靶点导入 String 数据库, 构建消渴清颗粒 - 糖尿病前期靶点 PPI 并导出。使用 Cytoscape 3.7.2 软件对 PPI 网络进行分析和优化处理, 利用 Network Analyzer 插件分析其 degree 等网络拓扑特征值, 筛选出核心靶点。并且将消渴清颗粒药物的有效活性成分与其相对应的靶点导入 Cytoscape 3.7.2 中构建“化合物 - 靶点”网络, 并通过 Network Analyzer 插件分析其 Degree 等网络拓扑特征值, 获取 degree 值较高的有效活性成分。

1.6 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析与关键靶点获取

将交集靶点导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库, 选择物种为人, 然后进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析, 其中 GO 功能富集分析包括细胞组分 (CC)、生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 3 个部分, 选取前 20 位条目进行分析并且应用微生信在线工具绘制气泡图。根据现有临床研究和药理学研究对 KEGG 通路分析所得结果进行筛选, 剔除不相关通路。将筛选所得通路和其相关靶点信息输入 Cytoscape 3.7.2 软件, 建立“通路 - 靶点”网络, 并且通过 Network Analyzer 插件分析其 degree 等网络拓扑特征值筛选“通路 - 靶点”网络核心靶点, 并将核心靶点与“通路 - 靶点”网络核心靶点取交集获取消渴清颗粒治疗糖尿病前期关键靶点。

1.7 分子对接验证

基于“化合物 - 靶点”网络, 选取 degree 值较高的有效活性成分与筛选出的关键靶点进行分子对接, 首先在 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库中下载关键靶点蛋白的 pdb 文件, 然后再 pymol 与 autodouktool 软件中进行去水、加氢等操作后, 获得 pdbqt 格式文件, 作为对接受体, 然后从 tcmsp 网站上下载有效活性成分的 mol2 格式, 通过 autodouktool 软件转化为 pdbqt 格式文件, 作为对接配体, 将受体与配体均导入 AutoDock 软件进行分子对接, 获得结合自由能值, 而后通过 PyMOL 2.5.0 软件对部分结合组合进行可视化分析。

2 结果

2.1 消渴清颗粒药物靶点基因

通过 TCMSP 网站上分别以“知母”“苍术”“黄连”“蒲黄”“地锦草”为关键词, 并以口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 为条件搜索, 去重后共获取消渴清颗粒 36 个有效成分, 见表 1, 再将“知母”“苍术”“黄连”“蒲黄”“地锦草”的靶点蛋白通过 STRING 网站和 Uniprot 数据库得到对应的药物靶点基因, 最终 5 种药物去除重复靶点基因后得到 232 个靶点基因。

2.2 “中药 - 活性成分 - 靶点”网络图的构建及分析

利用 Cytoscape 3.9.1 软件对“药物 - 活性成分 - 靶点”的关系网络进行可视化并分析, 共获得 272 个节点和 1 098 条边关系, 结果见图 1。

2.3 糖尿病前期靶点筛选

分别在 GeneCards 数据库、OMIM 数据库, 以“pre-diabetes”“impaired glucose tolerance”为关键词检索糖尿病前期的疾病靶点基因 685 个。

2.4 药物靶点与疾病靶点的交集

通过 Venny 2.1.0 平台, 输入消渴清颗粒药物靶点与糖尿病前期疾病靶点, 绘制韦恩图, 得到交集靶点 93 个, 见图 2。

2.5 构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络和“化合物 - 靶点”网络

将 Venny 2.1.0 平台获得的交集靶点导入 String 数据库, 物种选择为人, 设置置信度 > 0.5 , 隐藏离散蛋白节点, 构建消渴清颗粒 - 糖尿病前期靶点 PPI 并导出。使用 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行分析和优化处理, 利用 Network Analyzer 分析其 degree 等网络拓扑特征值, 包括连接度、介度及紧密度等, 按照介度 $\geq 52.387\ 096\ 774\ 193\ 54$, 紧密度 $\geq 0.007\ 094\ 343\ 306\ 486\ 89$, 连接度 $\geq 41.397\ 849\ 462\ 365\ 59$ 筛选获得核心靶点 27 个, 得到 27 个节点, 344 条边, 并将其可视化, 见图 3, 连接度排名靠前的靶点有肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-6 (IL-6)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、环加氧酶 2 (PTGS2) 和肿瘤蛋白 53 (TP53)。基于消渴清颗粒药物的有效活性成分与其相对应的靶点导入 Cytoscape 3.7.2 中构建“化合物 - 靶点”网络, 见图 4, 其中活性成分颜色越深, 形状越大, 表示其连接度值越高, 说明其能够作用于更多的靶点并可能在治疗中发挥更多的作用。

表 1 消渴清颗粒有效活性成分

Table 1 Active components of Xiaokeqing Granules

MOL ID	有效成分	OB/%	DL	来源
MOL000173	汉黄芩素 (wogonin)	30.68	0.23	苍术
MOL000184	柱头甾醇 (NSC63551)	39.25	0.76	苍术
MOL000188	3β-乙酰氧基苍术酮 (3β-acetoxyatractylone)	40.57	0.22	苍术
MOL000085	胡萝卜苷 (beta-daucosterol_qt)	36.91	0.75	苍术
MOL001454	小檗碱 (berberine)	36.86	0.78	黄连
MOL002894	小檗红碱 (berberrubine)	35.74	0.73	黄连
MOL002897	表小檗碱 (epiberberine)	43.09	0.78	黄连
MOL002903	四氢小檗碱[(R)-canadine]	55.37	0.77	黄连
MOL002904	氧化小檗碱 (berlambine)	36.68	0.82	黄连
MOL002907	黄麻苷 A (corchoroside A_qt)	104.95	0.78	黄连
MOL000622	木兰二内酯 (magnograndiolide)	63.71	0.19	黄连
MOL000785	黄藤素 (palmatine)	64.60	0.65	黄连
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28	黄连、蒲黄、地锦草
MOL001458	黄连碱 (coptisine)	30.67	0.86	黄连
MOL002668	甲基黄连碱 (worenine)	45.83	0.87	黄连
MOL001677	灰绿曲霉酰胺 (asperglaucide)	58.02	0.52	知母
MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	41.88	0.24	知母、地锦草、蒲黄
MOL004373	脱水淫羊藿素 (anhydroicaritin)	45.41	0.44	知母
MOL004489	知母皂苷 F (anemarsaponin F_qt)	60.06	0.79	知母
MOL004497	小星石蒜 (hippeastrine)	51.65	0.62	知母
MOL004514	知母皂苷 BIII (timosaponin B III_qt)	35.26	0.87	知母
MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76	知母
MOL004528	淫羊藿苷 (icariin I)	41.58	0.61	知母
MOL004540	知母皂苷 C (anemarsaponin C_qt)	35.50	0.87	知母
MOL000483	(Z)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	118.35	0.26	知母
MOL000546	薯蓣皂素 (diosgenin)	80.88	0.81	知母
MOL000631	对香豆酰酪胺 (coumaroyltyramine)	112.90	0.20	知母
MOL001040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	42.36	0.21	蒲黄
MOL001439	花生四烯酸 (arachidonic acid)	45.57	0.20	蒲黄
MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)	49.60	0.31	蒲黄
MOL000358	β-谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75	蒲黄
MOL001002	鞣花酸 (ellagic acid)	43.06	0.43	地锦草
MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.75	地锦草
MOL006321	(3S,4S,5R,10S,13R,14R,17R)-4,10,13,14-tetramethyl-17-((R)-6-methyl-5-methyl eneheptan-2-yl)-2,3,4,5,6,10,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta [a]phenanthren-3-ol	46.29	0.76	地锦草
MOL006326	恩沙库林 (ensaculin)	45.76	0.86	地锦草
MOL006331	5,4'-二羟基黄酮 (4',5-dihydroxyflavone)	48.55	0.19	地锦草

Fig. 3 Core target PPI diagram

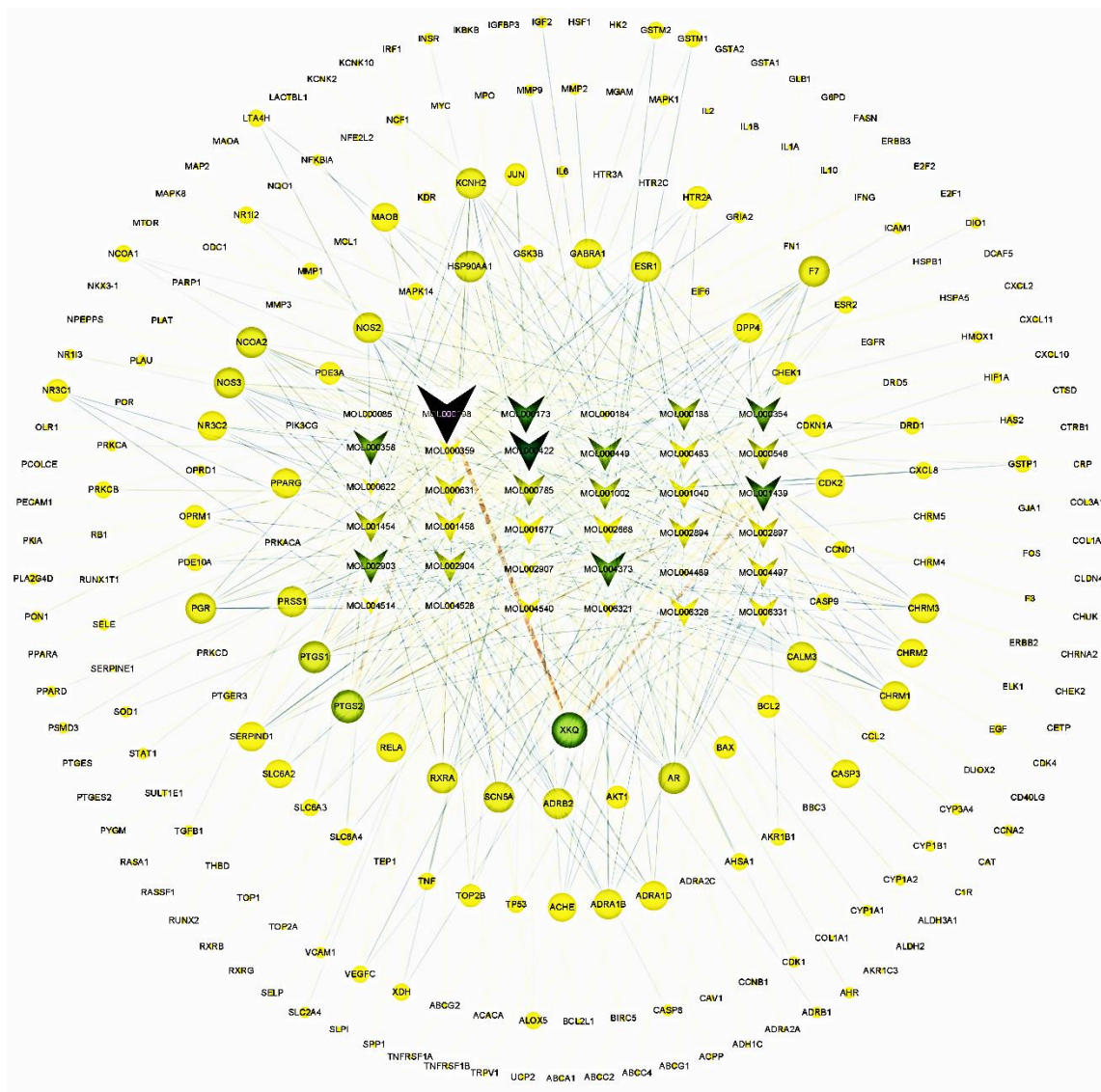


图 4 “化合物 - 靶点”网络图

Fig. 4 Compound-target network diagram

血管生成、细胞迁移等生物过程。获得了 MF 104 项，其中包括酶结合、相同蛋白结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性、配体激活的序列特异性 DNA 结合、蛋白结合、类固醇激素受体活性、蛋白质同源二聚化活性雌激素反应元件结合、类固醇结合、细胞因子活性、序列特异性 DNA 结合、蛋白酶结合、锌离子结合等各种结合作用。筛选了 CC 54 项，包括细胞外间隙、胞外区、膜筏、大分子络合物、质膜外侧、受体复合物、卡韦奥拉、质膜、细胞表面、线粒体、胞外分泌体、高尔基体、质膜整体成分、细胞质核周区等，通过微生信平台绘图对分析结果进行可视化展示，见图 5。将所得交集靶点导入 DAVID 数据库进

行 KEGG 通路富集分析，共获得 153 条信号通路，剔除与糖尿病前期不相关的通路，筛选得到血脂与动脉粥样硬化通路、流体剪切力与动脉粥样硬化通路、糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物及其受体 (AGE-RAGE) 信号通路、TNF 信号通路、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、IL-17 信号通路、胰岛素抵抗通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /Akt 信号通路、内分泌的阻力通路、表皮生长因子受体 (EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂耐药通路等 10 条通路，通过微生信平台绘图对分析结果进行可视化展示，见图 6。基于信号通路筛选结果，将所得通路及相关靶点信息输入 Cytoscape 3.7.2 软件建立“通路 - 靶点”网络，

见图 7。如图所示，“通路-靶点”网络包含 10 个信号通路节点和 69 个靶点节点，利用 Network Analyzer 分析其连接度等网络拓扑特征值，筛选获得“通路-靶点”网络核心靶点 22 个，其中按照连接度值从高到低取前 7 位，分别为 TNF、Akt1、IL-1 β 、IL-6、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、转化生长因

子- β 1 (TGF- β 1)、PTGS2。并且从交集靶点中筛选出的 27 个核心靶点中连接度值排前 7 位的靶点与 22 个“通路-靶点”网络核心靶点中连接度值排前 7 位的靶点取交集，从而获得消渴清颗粒治疗糖尿病前期的关键靶点，分别为 TNF、IL-6、Akt1、IL-1 β 、PTGS2。

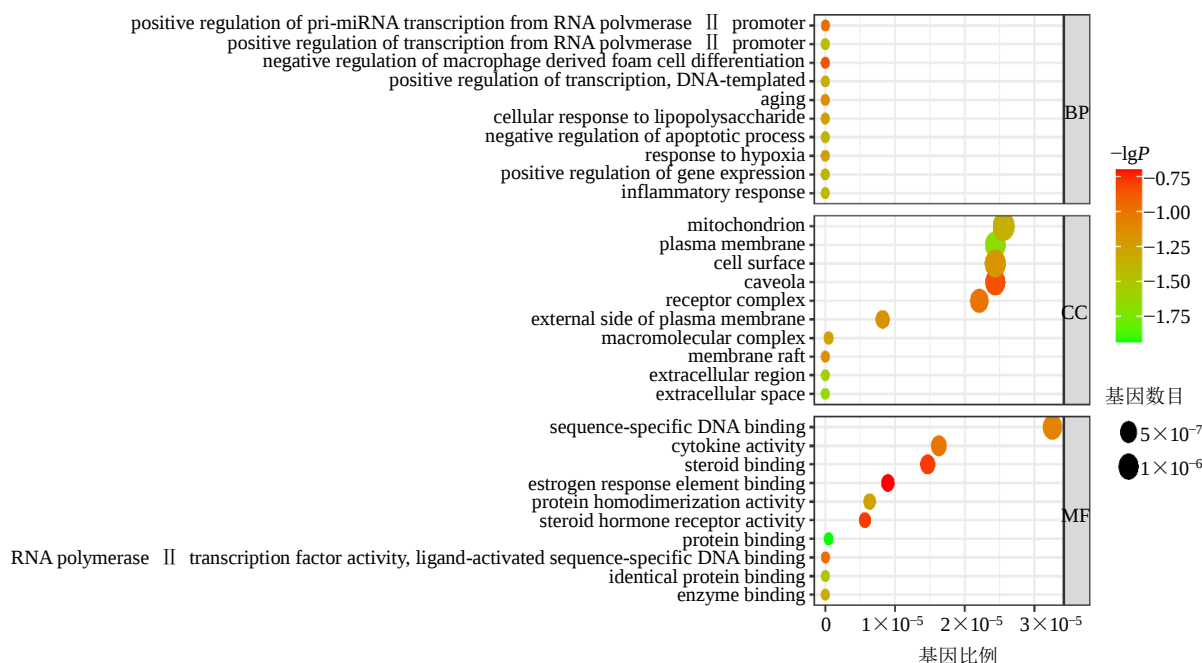


图 5 GO 富集分析图

Fig. 5 GO enrichment analysis diagram

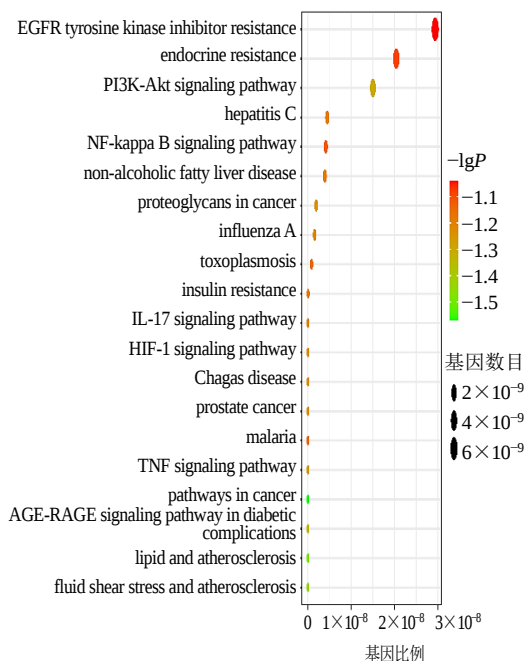


图 6 KEGG 富集分析图

Fig. 6 KEGG enrichment analysis diagram

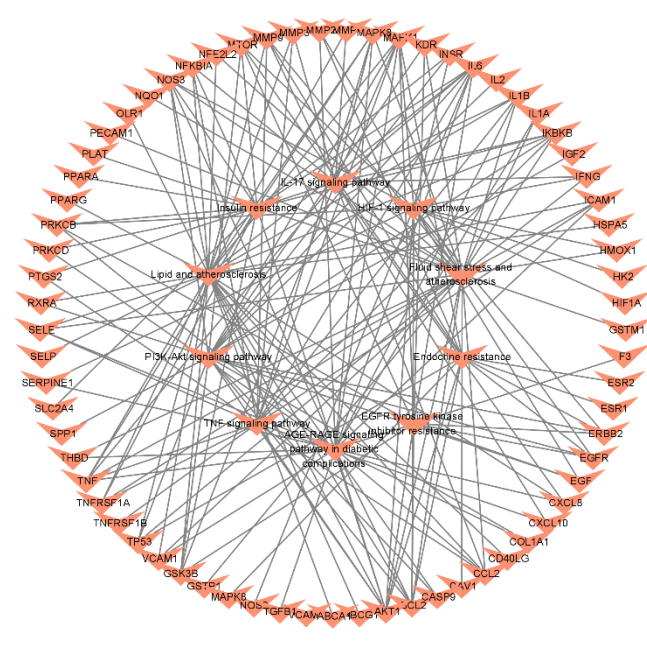


图 7 “通路-靶点”网络图

Fig. 7 Pathway-target network diagram

2.7 分子对接

将筛选出的 TNF、IL-6、Akt1、IL-1β、PTGS2 5 个关键靶点作为分子对接的大蛋白受体，将“化合物-靶点”网络中 degree 值较高的槲皮素、山柰酚、小檗碱、β-谷甾醇、花生四烯酸、知母皂苷 C 6 种活性成分作为配体进行分子对接，对应的结合自由能见表 2，选取与每个蛋白对接最好的小分子作图进行展示，其中活性成分与关键靶点之间存在氢键连接，山柰酚通过 ARG-163、THR-125 形成

氢键维持和 TNF 之间的稳定构象（图 8A），通过 ARG-11、GLN-105 形成氢键维持和 IL-1β 之间的稳定构象（图 8B），小檗碱通过 ILE-151 形成氢键维持和 IL-6 之间的稳定构象（图 8C），花生四烯酸通过 TRP-80、LEU-78 形成氢键维持和 Akt1 之间的稳定构象（图 8D），知母皂苷 C 通过 SER-114 形成氢键维持和 PTGS2 之间的稳定构象（图 8E），这些小分子与周围的氨基酸残基均形成了较强的疏水作用。

表 2 主要活性成分与关键靶点分子对接结果
Table 2 Docking results of main active components and key target molecules

关键靶点	PDB ID	主要活性成分	结合自由能/(kcal·mol ⁻¹)
TNF	2wnu-pdb	槲皮素 (quercetin)	-5.37
		山柰酚 (kaempferol)	-5.73
		小檗碱 (berberine)	-5.17
		知母皂苷 C (anemarsaponin C_qt)	-5.35
		花生四烯酸 (arachidonic acid)	-5.68
		β-谷甾醇 (beta-sitosterol)	-5.21
IL-6	2d9q-pdb	槲皮素 (quercetin)	-2.37
		山柰酚 (kaempferol)	-1.89
		小檗碱 (berberine)	-4.48
		知母皂苷 C (anemarsaponin C_qt)	-4.42
		花生四烯酸 (arachidonic acid)	-4.36
		β-谷甾醇 (beta-sitosterol)	-4.40
Akt1	3o96-pdb	槲皮素 (quercetin)	-4.46
		山柰酚 (kaempferol)	-5.83
		小檗碱 (berberine)	-5.96
		知母皂苷 C (anemarsaponin C_qt)	-6.12
		花生四烯酸 (arachidonic acid)	-6.32
		β-谷甾醇 (beta-sitosterol)	-6.25
IL-1β	3ltq-pdb	槲皮素 (quercetin)	-2.25
		山柰酚 (kaempferol)	-4.92
		小檗碱 (berberine)	-4.86
		知母皂苷 C (anemarsaponin C_qt)	-4.45
		花生四烯酸 (arachidonic acid)	-4.58
		β-谷甾醇 (beta-sitosterol)	-4.36
PTGS2	5kir-pdb	槲皮素 (quercetin)	-3.40
		山柰酚 (kaempferol)	-3.92
		小檗碱 (berberine)	-4.56
		知母皂苷 C (anemarsaponin C_qt)	-5.67
		花生四烯酸 (arachidonic acid)	-5.65
		β-谷甾醇 (beta-sitosterol)	-5.39

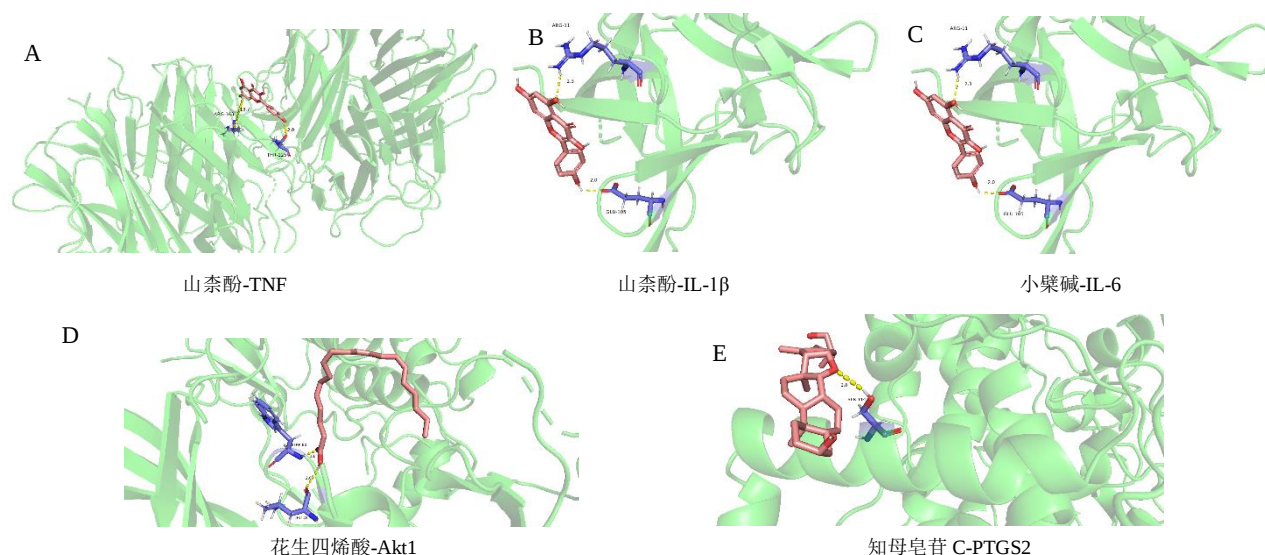


图 8 主要活性成分与关键靶点分子对接可视化图

Fig. 8 Docking visualization diagram of main active components and key target molecules

3 讨论

研究表明,糖尿病前期发病机制与氧化应激^[11]和炎症^[12]密切相关,除此之外,还与机体胰岛素敏感性降低^[13]和血管内皮功能障碍^[14]有关。本研究从数据库中根据条件筛选出消渴清颗粒治疗糖尿病前期的共 36 种有效活性成分,其中选择连接度值较高的 6 种活性成分进行分析。槲皮素、山柰酚都属于黄酮类化合物,研究表明槲皮素可以激活大鼠肝脏中的腺苷单磷酸活化蛋白激酶 (AMPK),下调磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (PEPCK) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase) 来减少葡萄糖合成^[15];槲皮素还可以降低肠道中葡萄糖转运蛋白 2 (GLUT2) 的表达和肠道钠依赖性葡萄糖摄取以及降低葡萄糖吸收来调节血糖^[16]。实验表明山柰酚增加了糖尿病大鼠的血浆胰岛素水平,促进胰岛素分泌从而降低了血糖水平^[17]。此外,研究表明山柰酚可以通过插入 α -葡萄糖苷酶的活性位点诱导构象变化而阻断其对葡萄糖苷的催化作用,是一种新型的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,因此减少碳水化合物的吸收降低餐后血糖水平^[18]。花生四烯酸是一种多不饱和脂肪酸,具有调节血糖和血脂的作用^[19-20], Gundala 等^[21]研究表明花生四烯酸可以使糖尿病大鼠血浆中 TNF- α 和 IL-6 水平降低,恢复胰岛素敏感性降低胰岛素抵抗和葡萄糖耐量。 β -谷甾醇属于植物甾醇,能够抑制糖尿病的发生^[22], Rahimifard 等^[23]研究发现 β -谷甾醇能够增强胰岛 β 细胞功能,促进胰岛素的分泌, Chai 等^[24]研究表明 β -谷甾醇能够增加脂肪细胞吸收葡萄糖,并且能够

诱导发生脂解作用,能够降低血糖。小檗碱属于生物碱类,研究表明小檗碱可以直接结合钾电压门控通道亚家族 H 成员 6 (KCNH6) 钾通道,降低 KCNH6 电流,延长高糖依赖性细胞膜去极化,最终促进胰岛素分泌,从而降低血糖^[25]。知母皂苷 C 属于皂苷类化合物,研究表明知母皂苷可以使得 2 型糖尿病大鼠肝脏组织中脂质合成相关基因脂肪酸合酶 (Fas) 的表达降低,减少肝脏组织中脂质的堆积,减轻肝脏胰岛素抵抗^[26];此外,知母皂苷还可以激活 2 型糖尿病大鼠骨骼肌组织中核因子-E2 相关因子 2 (Nrf2) 基因表达减轻氧化应激,促进葡萄糖利用减轻骨骼肌胰岛素抵抗状态^[26]。以上 6 种关键活性成分都具有调节血糖的作用。

经过网络分析后得出消渴清颗粒治疗糖尿病前期的关键靶点,分别为 TNF、IL-6、Akt1、IL-1 β 、PTGS2。根据 KEGG 通路富集分析结果筛选出血脂与动脉粥样硬化通路、流体剪切力与动脉粥样硬化通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、IL-17 信号通路、胰岛素抵抗通路、PI3K/Akt 信号通路、内分泌抵抗通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药通路等 10 条通路,其中,比较靠前的通路为 TNF 信号通路与 PI3K/Akt 信号通路。根据 TNF 信号通路图 (图 9),可以看出分为 2 个部分,一部分为 TNF 基因在细胞外与细胞内经过一系列基因之间的反应最后与 TNF、IL-6、IL-1 β 等炎症因子密切相关,上文提及糖尿病前期的发病机制与氧化应激^[11]和炎症^[12]密

切相关, 研究表明, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 依赖性的许多其他促炎细胞因子和趋化因子是诱导机体重要器官炎症的最重要的促炎介质, 因此促炎介质相互依赖地参与诱导组织特异性炎症, 可能导致胰岛素抵抗的发展和糖尿病前期的发病机制^[27]。研究表明, TNF- α 可以通过激活 IKK β 和 NF- κ B, 诱导低级别组织特异性炎症, 从而促进胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的发病, 可增强胰岛素的敏感性以及调节血糖, 通过促进 TNF 信号通路增强胰岛素抵抗^[28-29]。此外, 高 IL-6 可导致信号传导紊乱从而引发炎症反应及胰岛素抵抗^[30]; 低浓度 IL-1 β 和 IL-6 炎症因子诱导糖尿病前期小鼠内质网应激, 减少其胰岛素分泌, 增加其胰岛细胞死亡^[31]; 另一部分为 TNF 基因在细胞外与细胞内经过一系列反应与 PI3K/Akt 信号通路产生联系, PI3K/Akt 信号通路是胰岛素的作用得到发挥以及糖代谢过程中的重要环节^[32], 研究表明, 在进食状态下, PI3K/Akt 信号通路减少肝糖生成和糖原分解, 增加糖原的合成和脂肪酸的合成, 以便储存和随后被其他组织利用^[33-34]。Akt 分为

Akt1、Akt2 和 Akt3 3 种亚型, Akt1 普遍表达, Akt2 主要表达于胰岛素敏感组织, 如骨骼肌、脂肪组织和肝脏, Akt3 表达于睾丸和大脑^[35-36]。研究认为 Akt1 可以调节胰腺 β 细胞生长和存活^[37]; Peng 等^[38]研究发现, 在胰岛 β 细胞特异性 Akt1 缺陷的小鼠中, 发现其慢性低水平内质网应激伴随着胰岛 β 细胞无法增殖以及长期高脂饲料喂养后胰岛 β 细胞凋亡增强; 在大鼠和人类体内注射胰岛素可激活骨骼肌中的 Akt, 表明在糖原合成过程中, Akt 可能发挥了作用^[39]。研究表明体内 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平降低, 能够提高 PI3K 与 Akt 活性, 进而提高胰岛素敏感性以及调节胰岛素抵抗水平^[40]。PTGS2 是一种重要的免疫调节因子^[41], Chen 等^[42]研究表明 PTGS2 敲低可促进小鼠胰腺 β 细胞的增殖和胰岛素分泌, PTGS2 的过表达则相反。因此消渴清颗粒可能通过下调 TNF 信号通路, 上调 PI3K/Akt 信号通路, 升高 Akt1, 降低 IL-6、IL-1 β 、TNF、PTGS2 等炎症因子, 达到降低血糖的作用, 为有效逆转糖尿病提供了新思路。

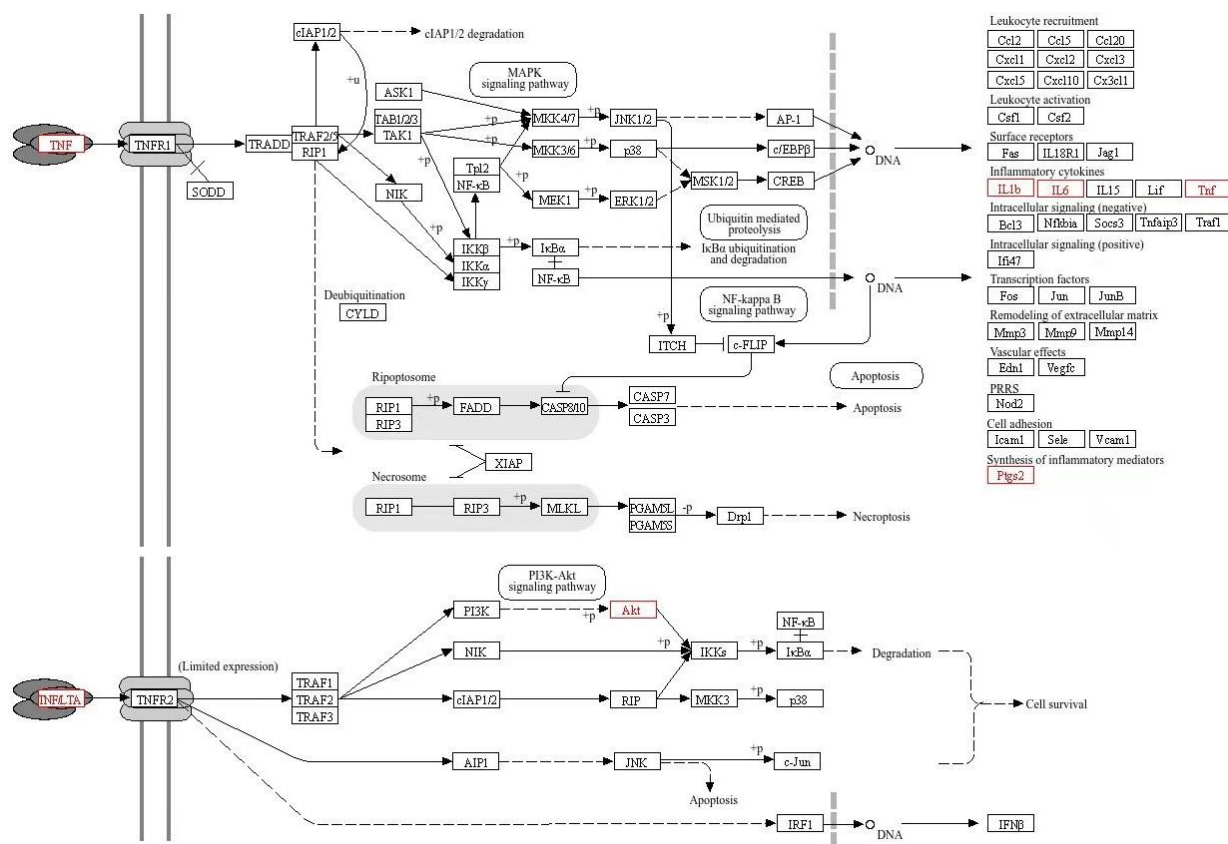


图 9 TNF 信号通路 (图中标红的为关键靶点)

Fig. 9 TNF signaling pathway (the red one in the figure is the key target)

本研究通过分子对接进行验证,将筛选出的 TNF、IL-6、Akt1、IL-1 β 、PTGS2 5 个关键靶点与槲皮素、山柰酚、小檗碱、 β -谷甾醇、花生四烯酸、知母皂苷 C 6 个活性成分进行分子对接。表明槲皮素、山柰酚、小檗碱、 β -谷甾醇、花生四烯酸、知母皂苷 C 均能与关键靶点蛋白具有良好的结合能力,说明以上 6 种关键活性成分通过与这些靶点结合发挥作用可能是消渴清颗粒治疗糖尿病前期的重要机制之一。

综上所述,本研究通过网络药理学及分子对接方法探究了消渴清颗粒可以通过槲皮素、山柰酚、小檗碱、 β -谷甾醇、花生四烯酸、知母皂苷 C 等成分作用于多靶点如 TNF、IL-6、Akt1、IL-1 β 、PTGS2 进而调节多条通路如 TNF 信号通路与 PI3K/Akt 信号通路达到对糖尿病前期治疗作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 石康乐, 刘晓玉, 胡影, 等. 试用临界慢化原理探讨常见未病状态: 血糖失稳态 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(8): 1037-1047.
- [2] 李丽, 毛拥军, 胡松, 等. 糖尿病前期人群管理的循证医学证据总结 [J]. 中国临床研究, 2022, 35(7): 943-947.
- [3] 买迪娜·奴尔江, 陈阳, 虞梅. 糖尿病前期的中医药研究进展 [J]. 新疆中医药, 2023, 41(3): 141-144.
- [4] 王景霞, 姜斯佳, 刘双巧, 等. 糖尿病前期及其中医证候动物模型的构建策略 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 297-306.
- [5] 方朝晖, 仝小林, 段俊国, 等. 糖尿病前期中医药循证临床实践指南 [J]. 中医杂志, 2017, 58(3): 268-272.
- [6] 张怡, 郭梦竹, 赵进东, 等. 从脾论治 2 型糖尿病理论研究及临床应用 [J]. 山西中医药大学学报, 2023, 24(11): 1244-1248.
- [7] 杨渤, 谭宏韬, 林明欣. 基于“痰瘀互结”辨治糖尿病前期 [J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(2): 448-451.
- [8] 王丽媚, 张凤莲. 消渴清颗粒联合利格列汀治疗血糖控制不佳的 2 型糖尿病的临床研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(5): 875-879.
- [9] 仝小林, 林兰, 高齐健, 等. 消渴清颗粒治疗 2 型糖尿病的随机、双盲、阳性对照、平行组、多中心 III 期临床试验 [A] // 2010 年中国药学会大会暨第十届中国药师周论文集 [C]. 天津: 天津市药学会, 2010: 983-987.
- [10] 张国民. 消渴清颗粒治疗糖尿病周围神经病变疗效分析 [J]. 西部中医药, 2012, 25(8): 66-67.
- [11] Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. NADPH oxidases in vascular pathology [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(17): 2794-2814.
- [12] Luc K, Schramm-Luc A, Guzik T J, et al. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2019, 70(6): 10.
- [13] Wang J, Liu L P, Zhou Y, et al. Increased fasting glucose and the prevalence of arterial stiffness: A cross-sectional study in Chinese adults [J]. *Neurol Res*, 2014, 36(5): 427-433.
- [14] Eringa E C, Serne E H, Meijer R I, et al. Endothelial dysfunction in (pre)diabetes: Characteristics, causative mechanisms and pathogenic role in type 2 diabetes [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2013, 14(1): 39-48.
- [15] Vafadar A, Shabaninejad Z, Movahedpour A, et al. Quercetin and cancer: New insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 32.
- [16] Borghi S M, Mizokami S S, Pinho-Ribeiro F A, et al. The flavonoid quercetin inhibits titanium dioxide (TiO₂)-induced chronic arthritis in mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 53: 81-95.
- [17] Al-Numair K S, Chandramohan G, Veeramani C, et al. Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Redox Rep*, 2015, 20(5): 198-209.
- [18] 彭旭, 张刚, 廖勇, 等. 山柰酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学及机制 [J]. 食品化学, 2016, 190(2): 7-15.
- [19] Malcher-Lopes R, Franco A, Tasker J G. Glucocorticoids shift arachidonic acid metabolism toward endocannabinoid synthesis: A non-genomic anti-inflammatory switch [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 583(2/3): 322-339.
- [20] Aslam R, Saeed S A, Ahmed S, et al. Lipoproteins inhibit platelet aggregation and arachidonic acid metabolism in experimental hypercholesterolaemia [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(5/6): 656-662.
- [21] Gundala N K V, Naidu V G M, Das U N. Amelioration of streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats by arachidonic acid [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(1): 105-113.
- [22] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- [23] Rahimifard M, Manayi A, Baeri M, et al. Investigation of β -sitosterol and prangol extracted from *Achillea tenuifolia* along with whole root extract on isolated rat pancreatic islets [J]. *Iran J Pharm Res*, 2018, 17(1): 317-325.
- [24] Chai J W, Lim S L, Kanthimathi M S, et al. Gene regulation in β -sitosterol-mediated stimulation of adipogenesis, glucose uptake, and lipid mobilization in rat primary adipocytes [J]. *Genes Nutr*, 2011, 6(2): 181-188.

- [25] Zhao M M, Lu J, Li S, *et al.* Berberine is an insulin secretagogue targeting the KCNH6 potassium channel [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5616.
- [26] 刘芬. 知母皂苷通过 Nrf2 信号通路改善大鼠胰岛素抵抗的机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [27] Akash M S H, Rehman K, Liaqat A. Tumor necrosis factor- α : Role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 105-110.
- [28] Demir S, Nawroth P P, Herzig S, *et al.* Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(18): e2100275.
- [29] 王苑铭, 周春楠, 袁小利, 等. 黄连化浊胶囊调控 MCP-1/TNF- α 对糖尿病大鼠内质网应激及胰岛素抵抗的作用 [J/OL]. 海军军医大学学报, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2187.R.20230824.1232.003.html>.
- [30] Khairul-Anwar I, Wan-Nazatul-Shima S, Siti-Lailatul-Akmar Z, *et al.* Evaluation of TNF- α and IL-6 in saliva among diabetic retinopathy patients in East Coast Malaysia [J]. *Trop Med Int Health*, 2022, 27(3): 310-316.
- [31] O'Neill C M, Lu C, Corbin K L, *et al.* Circulating levels of IL-1 β +IL-6 cause ER stress and dysfunction in islets from prediabetic male mice [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(9): 3077-3088.
- [32] 朱海瑀, 管洪艺, 闫慧新, 等. 中医药通过调控 PI3K/Akt 信号通路防治 2 型糖尿病肝脏胰岛素抵抗的研究进展 [J]. 吉林中医药, 2023, 43(11): 1356-1360.
- [33] Titchenell P M, Quinn W J, Lu M J, *et al.* Direct hepatocyte insulin signaling is required for lipogenesis but is dispensable for the suppression of glucose production [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(6): 1154-1166.
- [34] Kubota N, Kubota T, Itoh S, *et al.* Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding [J]. *Cell Metab*, 2008, 8(1): 49-64.
- [35] Abeyrathna P, Su Y C. The critical role of Akt in cardiovascular function [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 74: 38-48.
- [36] Krycer J R, Sharpe L J, Luu W, *et al.* The Akt-SREBP nexus: Cell signaling meets lipid metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(5): 268-276.
- [37] Wan M, Easton R M, Gleason C E, *et al.* Loss of Akt1 in mice increases energy expenditure and protects against diet-induced obesity [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(1): 96-106.
- [38] Peng Z C, Aggarwal R, Zeng N, *et al.* Akt1 regulates endoplasmic reticulum stress and mediates the adaptive response of pancreatic β cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(11): e00031-e00020.
- [39] 尹世伟, 崔玉兰, 贾小玉, 等. 当归补血汤对 2 型糖尿病大鼠 IRS-1/PI3K/Akt2 信号通路的影响研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(10): 1369-1374.
- [40] 姜立娟. 经典名方玉液汤通过 PI3K/Akt 信号途径改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗的作用及机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2021.
- [41] Covarrubias S, Robinson E K, Shapleigh B, *et al.* CRISPR/Cas-based screening of long non-coding RNAs (lncRNAs) in macrophages with an NF- κ B reporter [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(51): 20911-20920.
- [42] Chen Q, He Y, Wang X F, *et al.* LncRNA PTGS2 regulates islet β -cell function through the miR-146a-5p/ RBP4 axis and its diagnostic value in type 2 diabetes mellitus [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(10): 11316-11328.

[责任编辑 金玉洁]