

基于药效团和分子对接的黄芪甲苷改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用及机制研究

唐文静, 卢敏, 唐标*

湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 观察黄芪甲苷(astragaloside IV, AST IV)改善人肝癌 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用, 基于药效团模型相互匹配和分子对接预测和验证 AST IV 可能作用靶点, 探讨 AST IV 改善胰岛素抵抗机制。方法 采用高浓度胰岛素诱导 HepG2 细胞制备胰岛素抵抗模型, AST IV 干预后, 检测细胞葡萄糖消耗量, 基于药效团模型相互匹配和分子对接预测 AST IV 可能作用靶点, Western blotting 法检测通路相关蛋白表达。结果 AST IV 干预能显著增加胰岛素抵抗的 HepG2 细胞葡萄糖消耗量, 且效应与盐酸吡格列酮相当; 基于药效团模型相互匹配和分子对接预测 AST IV 作用靶点与酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 相关; Western blotting 结果显示, 胰岛素抵抗的 HepG2 细胞 PTP1B 蛋白表达水平显著升高, 而胰岛素信号通路关键蛋白磷酸化的胰岛素受体(p-IR)和磷酸化的胰岛素受体底物 1 (p-IRS-1) 表达水平显著降低; AST IV 的干预能显著降低 PTP1B 蛋白表达水平, 升高 p-IR 和 p-IRS-1 蛋白表达水平。结论 AST IV 能显著改善高浓度胰岛素诱导的 HepG2 细胞的胰岛素抵抗, 其作用机制与抑制 PTP1B 激活胰岛素信号通路有关。

关键词: 胰岛素抵抗; 黄芪甲苷; HepG2 细胞; 药效团; 分子对接; 酪氨酸磷酸酶 1B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)01-0163-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.022

Effects and mechanism research of astragaloside IV improving insulin resistance of HepG2 cells based on pharmacophore and molecular docking

TANG Wen-jing, LU Min, TANG Biao

School of Medicine Sciences, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To research the effects of astragaloside IV (AST IV) on improving insulin resistance in HepG2 cells, and predict and verify the AST IV possible targets based on pharmacophore model matching and molecular docking. **Methods** HepG2 cells insulin resistance model was induced with high concentration insulin. After being interfered by AST IV, the glucose consumption was characterized by glucose test, AST IV possible targets were predicted by pharmacophore model matching and molecular docking, the expressions of related pathway protein were detected by Western blotting. **Results** AST IV significantly increased the glucose consumption in insulin-resistant HepG2 cells, the possible target of AST IV may be related to tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) based on pharmacophore model matching and molecular docking. The Western blotting results showed that, the level of PTP1B was significantly increased and the levels of p-IR and p-IRS-1 were significantly decreased in insulin-resistant HepG2 cells. The intervention of AST IV decreased the levels of PTP1B, and increased the levels of p-IR and p-IRS-1. **Conclusion** AST IV can significantly improve insulin resistance of insulin induced HepG2 cells, and its mechanism is related to inhibiting PTP1B and activating insulin signaling pathways.

Key words: insulin resistance; astragaloside IV; HepG2 cells; pharmacophore; molecular docking; tyrosine phosphatase 1B

胰岛素抵抗是指多种原因导致胰岛素促进脂肪细胞、肌肉细胞和肝细胞对葡萄糖摄取和利用的能力下降, 机体代偿性地分泌过高浓度胰岛素来维持

机体血液中葡萄糖含量稳态的现象^[1]。胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的早期症状、核心特征及主要发病机制, 同时也与肥胖、非酒精性脂肪肝病以及心血管

收稿日期: 2019-08-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503385); 湖南中医药大学“十三五”一级学科基础医学建设项目

作者简介: 唐文静(1995—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药理。Tel: (0731)88458201 E-mail: 1770166209@qq.com

*通信作者 唐标(1981—), 男, 硕士研究生导师, 副教授, 研究方向为中药药理。Tel: (0731)88458201 E-mail: njtangbiao@126.com

疾病等密切相关,目前被认为是导致代谢综合征的“共同的土壤”^[2-3]。

黄芪甲苷(astragaloside IV, AST IV)是黄芪主要活性成分之一,已有研究表明,AST IV 能够改善糖尿病及其并发症,是一种潜在治疗糖尿病及其并发症的活性物质,具有降血糖、调血脂、改善胰岛素抵抗等作用^[4-7]。但是 AST IV 改善胰岛素抵抗的机制尚不明确。本研究采用高浓度胰岛素诱导制备人肝癌 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型,验证 AST IV 改善胰岛素抵抗作用,并且基于药效团与分子对接的虚拟筛选方法预测 AST IV 改善胰岛素抵抗靶点并验证,揭示 AST IV 改善胰岛素抵抗机制。

1 材料

1.1 细胞

HepG2 细胞购于中国典型培养物保藏中心。

1.2 药品和试剂

AST IV (质量分数 $\geq 98.05\%$,批号 MUST-14102910,成都曼斯特生物科技有限公司);DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液、青霉素-链霉素,美国 Gibco 公司;二甲基亚砜(美国 Sigma 公司);胰岛素(批号 A1005A,大连美伦生物技术有限公司);细胞增殖及毒性检测试剂盒(大连美伦生物技术有限公司);葡萄糖检测试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司);盐酸吡格列酮[批号 H20052682,石药集团远大(大连)制药有限公司];酪氨酸磷酸酶 1B(PTP1B)、胰岛素受体(IR)抗体(Cell Signaling Technology 公司);胰岛素受体底物 1(IRS-1)抗体、PTP 抑制剂 FRJ, Santa Cruz Biotechnology 公司;磷酸化胰岛素受体(Tyr1158/Tyr1162/Tyr1163, p-IR)、磷酸化胰岛素受体底物 1(Tyr628, p-IRS-1)抗体, Sigma-Aldrich 公司; β -actin 抗体(Sigma 公司);山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(Merck Millipore 公司);极超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 仪器

CC2-170B-8 CO₂ 培养箱(长沙奇美仪器有限公司);SW-CJ-1FD 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);TDZ5-WS 台式常温低速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);ELx800 自动酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);IX73 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);电泳仪、转膜仪和凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 AST IV 含药培养基的制备

AST IV 用完全培养基配成 80 $\mu\text{g/mL}$ 原液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。实验时用完全培养基稀释至所需质量浓度的应用液。

2.2 细胞培养

HepG2 细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养液培养,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养,根据细胞生长状况,待细胞融合度为 80%左右时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化收集细胞并传代,取对数生长期的细胞用于实验。

2.3 CCK-8 实验检测 AST IV 对 HepG2 细胞活性的影响

取生长状态良好,融合度为 90%的 HepG2 细胞,接种于 96 孔板,每孔 1×10^4 个细胞,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养 4 h。待细胞贴壁后,弃去原培养液,加入无血清培养液,培养 24 h。同步化后,弃去原培养液,加入含药培养液 100 μL (AST IV 质量浓度分别为 80、40、20、10、5 $\mu\text{g/mL}$),同时设置不含药物、含培养液和细胞的对照组,干预 24 h。24 h 后弃去原培养液,加含 10% CCK-8 的培养液 100 μL ,设置空白组(不含细胞,只含 10% CCK-8 的培养液),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h 后,用酶标仪检测其在 450 nm 处的吸光度(A)值。实验每组设置 3 个复孔,重复 6 次。根据 A 值计算各组细胞相对活性。

$$\text{细胞相对活性} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的制备和葡萄糖相对消耗量的检测

参照文献方法^[8-9],采用高浓度胰岛素诱导制备 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型,取生长状态良好的对数生长期 HepG2 细胞种植于 96 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养至贴壁。待细胞贴壁后,弃去原培养液,加入含 1 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素的培养基诱导培养 24 h,制备 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型。造模成功后,设对照组、模型组、AST IV 干预组和阳性药物盐酸吡格列酮干预组(PLOG),并设空白组。AST IV 干预组分别加入含 80、40、20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ AST IV 的培养液,阳性药物干预组加入含 50 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸吡格列酮的培养液。药物干预 24 h 后,再加含 100 nmol/L 胰岛素培养 30 min,干预结束后吸取各孔上清,用于葡萄糖检测。细胞用 PBS 洗 3 次后加含 10% CCK8 的培养

液, 并放 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 1 h, 按照“2.3”项下方法检测细胞相对活性。

采用葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶 (GOD-POD) 法检测各孔上清液中葡萄糖的量^[8], 并计算各组细胞对葡萄糖的相对消耗量。葡萄糖的检测参照试剂盒说明书, 取 10 μL 样本并加入葡萄糖试剂 1 mL, 混匀并 37 °C 水浴 10 min。并设校准管 (10 μL 校准液并加入葡萄糖试剂 1 mL) 和空白管 (10 μL 蒸馏水并加入葡萄糖试剂 1 mL) 混匀后 37 °C 水浴 10 min。将各组液体移至光径 1.0 cm 比色杯, 用分光光度计测定波长 505 nm 处各管的吸光度 (*A*) 值。实验每组设置 3 个复孔, 重复 3 次。

$$\text{葡萄糖含量} = 5.5 \times A_{\text{样品}} / A_{\text{校准品}}$$

葡萄糖消耗量 = 培养液中葡萄糖含量 - 细胞上清液中葡萄糖含量

$$\text{葡萄糖相对消耗量} = \text{葡萄糖消耗量} / \text{细胞相对活性}$$

2.5 基于药效团模型相互匹配和分子对接的 AST IV 改善胰岛素抵抗靶点分析

将 AST IV 与多个代表各靶标蛋白的药效团模型相互匹配, 最终按匹配评分的高低来判定潜在的作用靶标, Discovery Studio 的 ligand Profiler 模块可以自动实现多个分子和多个药效团模型的快速匹配并进行匹配打分排序。采用 Discovery Studio 2.5 软件的 ligand Profiler 模块进行药效团模型搜索, 小分子为 AST IV, 参数设定: 选择 HypoDB 数据库的全部药效团, 构象生成 (conformation generation) 为 Best; Fitting Method 采用 rigid, Maximum omitted features 的参数为 -1, 其他参数均为默认值。通过药效团模型搜索得到部分潜在靶点, 采用 Sybyl 2.0 软件将 AST IV 与靶标蛋白进行分子对接, 分析其结合模式。将靶标蛋白和小分子化合物进行加氢、加电荷、构象优化等, 以靶标蛋白的配体为活性位点中心, 采用标准对接模式 (surflex-dock), 小分子构象数为 20, 其他参数均为默认值。

2.6 Western blotting 法检测 PTP1B、IR、p-IR、IRS-1、p-IRS-1 蛋白表达

实验设对照组、模型组、AST IV 干预组 (80、40、20 μg/mL) 和 PTP1B 抑制剂 FRJ 干预组 (8 μmol/L)。取生长状态良好的细胞, 制备细胞悬液, 接种于 6 孔板内, 每孔 2 × 10⁵ 个细胞, 贴壁并长满后经造模和给药处理, 去上清, 用预冷 PBS 洗 1 次, 每孔加含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液 50 μL, 冰上裂解 30 min, 边裂解边用移液枪轻柔吹

打, 促进细胞裂解。裂解后, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取出含有组织总蛋白的上清液, BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量, 绘制出蛋白标准曲线后, 计算蛋白浓度并进行配平。加上样缓冲液后于沸水浴加热 10 min, 以充分变性蛋白。经电泳、转膜、封闭。将膜与 PTP1B (1:1 000)、IR (1:1 000)、p-IR (1:1 000)、IRS-1 (1:1 000)、p-IRS-1 (1:1 000) 和 β-actin (1:5 000) 一抗于 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 缓冲液洗膜后, 加入二抗 (1:10 000) 于室温摇床上孵育 60 min。ECL 显色曝光, 用 Quantity One 灰度分析软件进行图像定量分析, 计算蛋白相对表达量。实验每组设置 3 个复孔, 重复 3 次。

2.7 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析; 两两比较方差齐时采用最小显著差异法 *t* 检验; 方差不齐时采用 Dunnett-*t* 检验。若不服从正态分布, 则采用秩和检验。

3 结果

3.1 AST IV 对 HepG2 细胞活性的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 80、40、20、10、5 μg/mL AST IV 对 HepG2 细胞活性无明显影响。说明在此质量浓度范围内, AST IV 无细胞毒性。

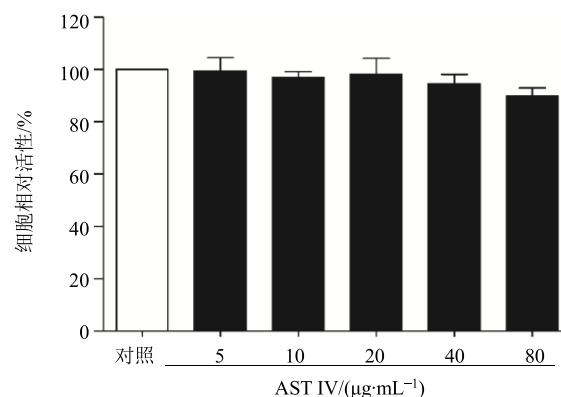
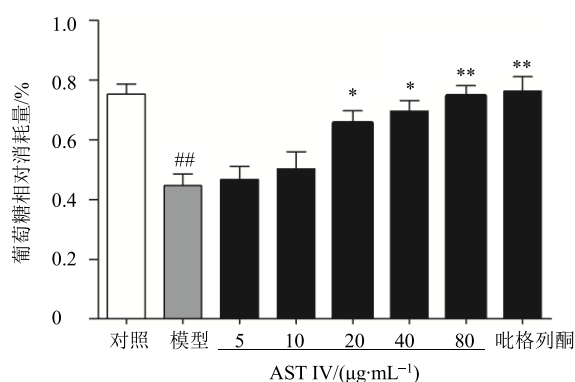


图 1 AST IV 对 HepG2 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of AST IV on cell viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 AST IV 对胰岛素抵抗的 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量的影响

与对照组比较, 胰岛素处理后的 HepG2 细胞葡萄糖消耗量显著降低。而药物干预后, AST IV 10、5 μg/mL 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量无明显影响, AST IV 80、40、20 μg/mL 及盐酸吡格列酮均能显著增加 HepG2 细胞葡萄糖消耗量 ($P < 0.05, 0.01$, 图 2)。



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 4 同

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as Fig. 4

图 2 AST IV 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of AST IV on glucose consumption in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 1 药效团匹配和分子对接评分

Table 1 Pharmacophore matching and docking scores

序号	靶点蛋白编号	蛋白名	基因名	药效团匹配得分	分子对接得分
1	1c87-opa-2.10-d-1	PTP1B	PTPN1	0.550 3	6.93
2	1d9i-chnhmmsml-2.30-h-1	thrombin	F2	0.481 3	6.59
3	1nf7-myd-2.60-d-1	IMPDH	IMPDH12	0.330 1	2.13
4	2v0m-kln-3.80-x-2	CYP 3A4	CYP3A4	0.329 0	7.99
5	2c6e-hpm-2.10-h-1	aurora-A	AURKA	0.285 4	1.31
6	1vyz-n5b-2.21-d-1	CDK2	CDK2	0.282 9	2.74
7	1o3p-655-1.81-d-1	uPA	PLAU	0.113 0	5.70
8	1yhs-sto-2.15-h-1	Pim-1	PIM1	0.061 5	3.08
9	1d5l-cyn-1.90-x-1	myeloperoxidase	MPO	0.031 4	3.28
10	1db1-vdx-1.80-h-1	VDR	VDR	0.003 1	-3.89
11	1r9o-flp-2.00-x-2	CYP2C9	CYP2C9	0.000 1	0.86
12	1u59-sto-2.30-h-1	zap 70	ZAP70	0.000 1	3.87

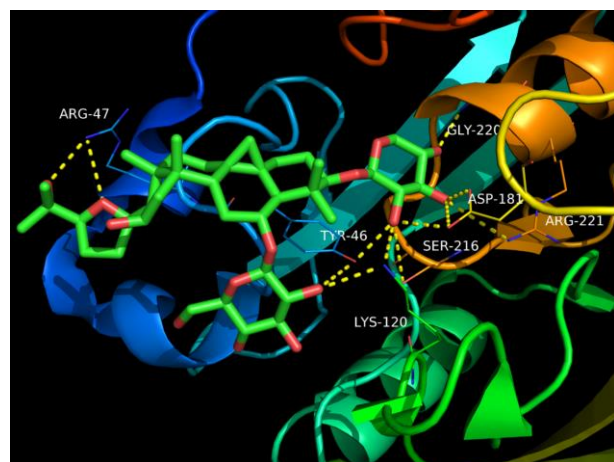


图 3 AST IV 和 PTP1B 蛋白相互作用模式

Fig. 3 Interactions between AST IV and PTP1B

3.3 基于药效团和分子对接的 AST IV 改善胰岛素抵抗靶点分析

黄芪甲苷药效团匹配和分子对接评分见表 1, 在预测靶点中与胰岛素抵抗密切相关的主要是 PTP1B 蛋白, 进一步分子对接结果分析发现, AST IV 与 PTP1B 蛋白的主要作用为氢键作用, 吡喃环上的羟基与氨基酸 Tyr46、Lys120、Asp181、Ser216、Gly220 和 Arg221 多个氨基酸有氢键作用, 另一吡喃环上的羟基与 Tyr46、Lys120 有氢键作用, 五元环上的 O 和 -OH 与氨基酸 Arg47 有氢键作用, 氢键作用使得该结构比较稳定, 对接结果说明 AST IV 与 PTP1B 蛋白能较好地结合 (图 3)。

3.4 AST IV 对胰岛素抵抗的 HepG2 细胞 PTP1B 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组细胞 PTP1B 蛋白表达水平显著升高。与模型组比较, AST IV 80、40 $\mu\text{g/mL}$ 及

FRJ 能显著降低 PTP1B 蛋白表达量 ($P < 0.01$, 图 4)。

3.5 AST IV 对胰岛素抵抗的 HepG2 细胞 p-IR 和 p-IRS-1 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组细胞 p-IR/IR 和 p-IRS-1/IRS-1 显著降低。与模型组比较, AST IV 80、40 $\mu\text{g/mL}$ 及 FRJ 能显著增加 p-IR/IR 和 p-IRS-1/IRS-1 ($P < 0.05$ 、0.01)。与对照组比较, AST IV 80 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞 p-IR/IR 和 p-IRS-1/IRS-1 显著升高 ($P < 0.01$, 图 5)。

4 讨论

HepG2 细胞是体外研究胰岛素抵抗发病机制和降糖药物作用机制的理想细胞模型, 而高浓度的胰岛素诱导是建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的常用方法^[9-12]。本研究结果显示, 高浓度胰岛素诱

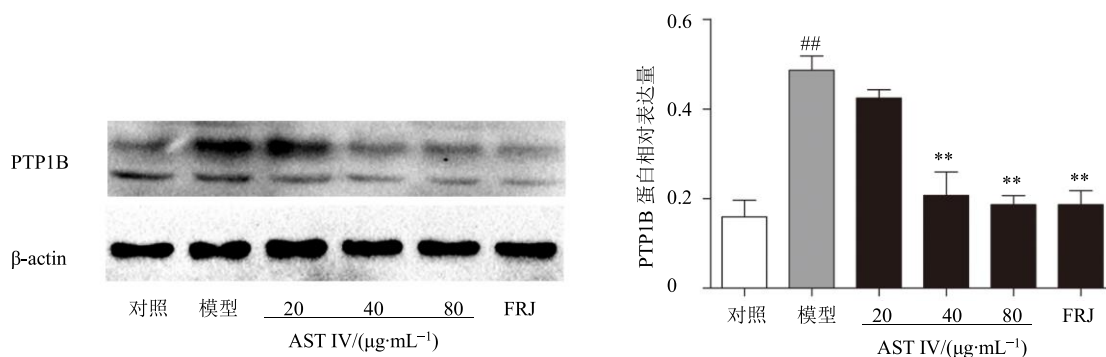
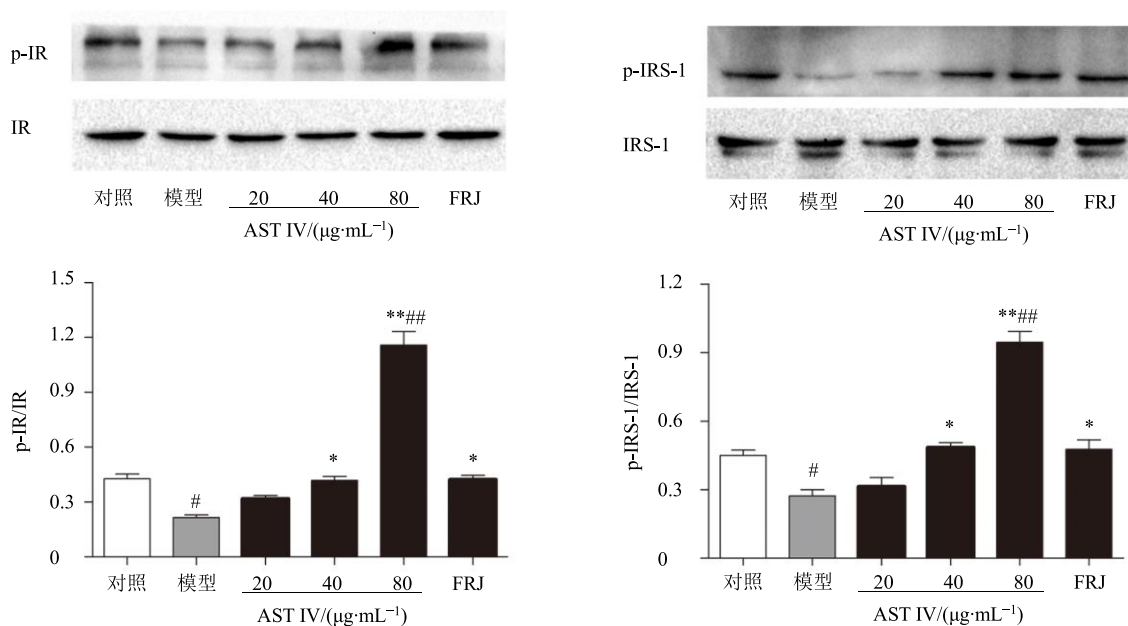


图 4 AST IV 对 HepG2 细胞中 PTP1B 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of AST IV on protein level of PTP1B in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 图 4 同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as Fig. 4

图 5 AST IV 对 HepG2 细胞中 p-IR 和 p-IRS-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of AST IV on protein levels of p-IR and p-IRS-1 in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

导的 HepG2 细胞葡萄糖消耗量显著降低,这与已有的研究结果一致^[9-10],表明造模成功。而 AST IV 和盐酸吡格列酮的干预均能显著增加 HepG2 细胞葡萄糖消耗量,且 AST IV 和盐酸吡格列酮效应相当。已有研究揭示 AST IV 和盐酸吡格列酮能在动物和细胞水平促进葡萄糖的消耗和利用,改善胰岛素抵抗^[4-5,7,13-14],本研究结果提示 AST IV 能改善高浓度胰岛素诱导的 HepG2 细胞胰岛素抵抗。

基于药效团与分子对接的虚拟筛选方法是中药有效成分作用机制研究的有效手段,为中药的研究提供了重要方向^[15-16]。本研究基于药效团与分子对接的虚拟筛选结果显示与胰岛素抵抗密切相关的 PTP1B 有较高的药效团匹配和分子对接评分,并且

分子对接显示 PTP1B 与 AST IV 能较好地结合,药效团与分子对接的虚拟筛选结果提示 PTP1B 为 AST IV 干预胰岛素抵抗的潜在重要靶点。

PTP1B 是胰岛素信号通路中的关键的负调节蛋白,PTP1B 通过对 IR 和 IRS-1 进行脱磷酸化反应抑制胰岛素通路的激活^[17-18]。PTP1B 的抑制剂能抑制 PTP1B 激活胰岛素通路改善胰岛素抵抗^[19-20]。本研究结果显示,胰岛素抵抗的 HepG2 细胞 PTP1B 水平显著升高,这与前期研究结果一致^[9-10],表明 PTP1B 介导了高浓度胰岛素诱导 HepG2 细胞的胰岛素抵抗,而 AST IV 和 PTP1B 抑制剂的干预能显著降低 PTP1B 水平,提示 AST IV 能抑制胰岛素抵抗的 HepG2 细胞中 PTP1B。

PTP1B 在胰岛素通路中通过将胰岛素信号通路中的关键蛋白 IR 和 IRS-1 脱磷酸化而发挥负调控作用, IR 和 IRS-1 磷酸化程度作为衡量胰岛素信号通路激活程度的标准^[21-22]。本研究结果显示, 胰岛素诱导的 HepG2 细胞 IR 和 IRS-1 磷酸化水平明显降低, 而 AST IV 和 PTP1B 抑制剂干预后, IR 和 IRS-1 磷酸化水平显著升高, 已有研究报道, 抑制 PTP1B 可以激活胰岛素抵抗通路改善胰岛素抵抗^[9-10], 本研究提示 AST IV 能抑制胰岛素抵抗的 HepG2 细胞中 PTP1B, 激活胰岛素信号通路。

综上所述, AST IV 能改善高浓度胰岛素诱导的 HepG2 细胞胰岛素抵抗, 其机制与抑制 PTP1B 激活胰岛素信号通路有关。

参考文献

- [1] Nolan C J, Ruderman N B, Kahn S E, *et al.* Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: Implications for the management of subsets of type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2015, 64(3): 673-686.
- [2] Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: Insights from mouse models into disease mechanisms [J]. *J Endocrinol*, 2014, 220(2): t1-t23.
- [3] Khan R S, Bril F, Cusi K, *et al.* Modulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2019, 70(2): 711-724.
- [4] Yue S J, Liu J, Feng W W, *et al.* System pharmacology-based dissection of the synergistic mechanism of Huangqi and Huanglian for diabetes mellitus [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00694.
- [5] Wang C, Li Y, Hao M, *et al.* Astragaloside IV inhibits triglyceride accumulation in insulin-resistant HepG2 cells via AMPK-induced SREBP-1c phosphorylation [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00345.
- [6] He K Q, Li W Z, Chai X Q, *et al.* Astragaloside IV prevents kidney injury caused by iatrogenic hyperinsulinemia in a streptozotocin induced diabetic rat model [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 1078-1088.
- [7] 尤良震, 林逸轩, 方朝晖, 等. 黄芪甲苷治疗糖尿病及其并发症药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(24): 4700-4706.
- [8] 卢 骋, 刘 祥, 唐延婷, 等. 基于酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 的 II 型糖尿病药物设计、合成和体外活性及毒性的初步评价 [J]. *化学学报*, 2016, 74(2): 155-164.
- [9] Jung H A, Bhakta H K, Min B S, *et al.* Fucosterol activates the insulin signaling pathway in insulin resistant HepG2 cells via inhibiting PTP1B [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(10): 1454-1464.
- [10] Bhakta H K, Paudel P, Fujii H, *et al.* Oligonol promotes glucose uptake by modulating the insulin signaling pathway in insulin-resistant HepG2 cells via inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B [J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(11): 1314-1327.
- [11] Malik S A, Acharya J D, Mehendale N K, *et al.* Pterostilbene reverses palmitic acid mediated insulin resistance in HepG2 cells by reducing oxidative stress and triglyceride accumulation [J]. *Free Rad Res*, 2019, 53(7): 815-827.
- [12] Chen L, Sun X, Xiao H, *et al.* PAQR3 regulates phosphorylation of FoxO1 in insulin-resistant HepG2 cells via NF-kappaB signaling pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 381(2): 301-310.
- [13] Tozzo E, Bhat G, Cheon K, *et al.* Pioglitazone increases whole body insulin sensitivity in obese, insulin-resistant rhesus monkeys [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126642.
- [14] Yadollah S, Kazemipour N, Bakhtiyari S, *et al.* Palmitate-induced insulin resistance is attenuated by Pioglitazone and EGCG through reducing the gluconeogenic key enzymes expression in HepG2 cells [J]. *J Med Life*, 2017, 10(4): 244-249.
- [15] Zhang D, Lin Y, Chen X, *et al.* Docking- and pharmacophore-based virtual screening for the identification of novel mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (MptpB) inhibitor with a thiobarbiturate scaffold [J]. *Bioorg Chem*, 2019, doi: 10.1016/j.bioorg.2018.12.038
- [16] Jiang Y, Gao H. Pharmacophore-based drug design for potential AChE inhibitors from traditional Chinese medicine database [J]. *Bioorg Chem*, 2018, doi: 10.1016/j.bioorg.2017.12.015.
- [17] Cho H. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity [J]. *Vitam Horm*, 2013, 91: 405-424.
- [18] Bellomo E, Birla Singh K, Massarotti A, *et al.* The metal face of protein tyrosine phosphatase 1B [J]. *Coord Chem Rev*, 2016, doi: 10.1016/j.ccr.2016.07.002.
- [19] Prabhakar P K, Sivakumar P M. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: A novel therapeutic strategy for the management of type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Pharm Design*, 2019, 25(23): 2526-2539.
- [20] Eleftheriou P, Geronikaki A, Petrou A. PTP1b Inhibition, a promising approach for the treatment of diabetes type II [J]. *Curr Topic Med Chem*, 2019, 19(4): 246-263.
- [21] Wu C L, Buszard B, Teng C H, *et al.* Dock/Nck facilitates PTP61F/PTP1B regulation of insulin signalling [J]. *Biochem J*, 2011, 439(1): 151-159.
- [22] Lu B, Gu P, Xu Y, *et al.* Overexpression of protein tyrosine phosphatase 1B impairs glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 cells [J]. *Minerv Endocrinol*, 2016, 41(1): 1-9.