

• 药理与临床 •

基于网络药理学的四君子汤治疗 2 型糖尿病的作用机制研究

刘 培, 孙芮芮, 张莉丹, 王 科, 王伊楠, 董征艳, 郭宇航, 段秀俊*

山西中医药大学中药学院, 山西 晋中 030619

摘要:目的 通过网络药理学预测四君子汤治疗 2 型糖尿病 (T2DM) 的主要活性成分和作用靶点, 探讨其多成分-多靶点-多通路的潜在作用机制; 并选取 AMPK 信号通路中的 InsR、PI3K 进行动物实验验证。**方法** 通过中医药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP)、文献挖掘和本课题组已有研究收集四君子汤及其 4 味中药党参、白术、茯苓、甘草的化学成分, 经口服生物利用度 (OB)、类药性 (DL)、半衰期 (HL) 3 个条件筛选得到药物的有效成分, 通过 SwissTargetPrediction 数据库进行有效成分靶点预测; 同时从 TTD、Drugbank 和 DisGeNET 数据库对 T2DM 的靶点进行检索及筛选; 成分靶点与疾病靶点映射后使用 Cytoscape 3.2.1 软件构建药物有效成分-靶点蛋白相互作用网络, 对该网络进行拓扑学分析筛选节点自由度 (degree) $\geq$ 平均自由度的节点得到核心有效成分-核心靶点网络, 同时使用 String 数据库绘制核心靶点蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络; 对核心靶点基因利用 DAVID 数据库进行 GO 分析和 KEGG 分析, 构建核心有效成分-核心靶点-代谢通路网络图, 探讨四君子汤治疗 T2DM 的潜在作用机制。采用系统对接网站进行相关度前 3 蛋白对相关度前 5 成分的分子对接。并进一步采用动物实验进行验证: 选取 SD 大鼠, 运用高糖高脂饲料联合小剂量链脲佐菌素 (STZ) 诱导 T2DM 模型, 5.65 g/kg 四君子汤 ig 给药 28 d, 检测各组大鼠的空腹血糖 (FBG) 及口服葡萄糖耐量 (OGTT), RT-PCR 法检测 AMPK 信号通路中 InsR、PI3K mRNA 的表达量。**结果** 从四君子汤中筛选出 113 个化学成分, 涉及治疗 T2DM 的 47 个靶点; 根据节点自由度 $\geq$ 平均自由度, 筛选出核心成分 22 个, 核心靶点 27 个; GO 分析结果表明其涉及血糖稳态、脂肪组织发育的正调控等 7 个生物过程, 涉及类固醇激素受体活化、药物结合等 4 个分子功能, 包括质膜、核常染色质 2 个细胞组成; KEGG 分析结果表明其可能通过 AMPK 信号通路、PPAR 信号通路、胰岛素抵抗等 14 个信号通路治疗糖尿病。分子对接 60% 成分具有强烈的结合活性, 40% 成分具有较强的结合活性。四君子汤可显著改善 T2DM 大鼠 OGTT ($P < 0.001$), 同时降低 FBG ($P < 0.01$), 显著升高 InsR、PI3K mRNA ($P < 0.001$) 的表达量, 验证了网络药理学部分预测结果。**结论** 四君子汤通过多靶点、多通路治疗 T2DM, 为其分子机制的研究奠定一定的基础。

关键词: 四君子汤; 2 型糖尿病; 网络药理学; AMPK 信号通路; 胰岛素受体 (InsR); 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)06-1548-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.023

Action mechanism of Sijunzi Decoction in treatment of type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology

LIU Pei, SUN Rui-rui, ZHANG Li-dan, WANG Ke, WANG Yi-nan, DONG Zheng-yan, GUO Yu-hang, DUAN Xiu-jun
School of Pharmacy, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective The main active components and targets of Sijunzi Decoction for type 2 diabetes mellitus (T2DM) treatment were predicted by network pharmacology, and the potential mechanism of multi-component-multi-target-multi-pathway was discussed, and INSR and PI3K in the AMPK signal pathway were verified in animal experiment. **Methods** Based on TCM system pharmacology database and analysis platform (TCMSP), literature mining and previous studies of our research group, the chemical components of Sijunzi decoction and its four herbs *Codonopsis pilosula*, *Atractylodes macrocephala*, *Poria cocos*, *Glycyrrhiza uralensis* were screened. Three conditions of oral absorption rate (OB), drug-like (DL), half-life (HL) were used to screen the active components of the drug; The targets of active components were predicted through the Swiss Target Prediction database; TTD, Drupe and DisGNET databases were used to screen the targets of T2DM. After mapping the component target and disease target, the

收稿日期: 2019-09-21

基金项目: 山西省基础研究项目 (2013011048-6); 山西中医药大学重点培育项目 (2019PY-117)

作者简介: 刘 培, 在读研究生, 主要研究方向为中药新剂型、新技术、新工艺。Tel/Fax: (0351)3179903 E-mail: liupeisxzyydx@163.com

*通信作者: 段秀俊, 硕士生导师, 副教授, 主要从事中药新剂型、新技术、新工艺研究。Tel/Fax: (0351)3179903 E-mail: dxjzhyxy@163.com

interaction network of the target proteins of the active components was constructed by using the software of Cytoscape 3.2.1. Through topological analysis of the network, the nodes with degree of freedom $\geq$ average degree of freedom were screened out, and the core target network of core active ingredient was obtained, while using the String database to draw core-target protein-protein interaction (PPI) networks, using DAVID database for GO analysis and KEGG analysis of core target genes to construct core active components-core target-metabolism Path network diagram to explore the potential mechanism of Sijunzi Decoction against T2DM. The system docking site was used for molecular docking of the top 5 components and the top 3 proteins. Further, animal experiments were used to verify. SD rats were fed with high-sugar high-fat diet combined with low-dose streptozotocin (STZ) to induce T2DM model, and administrated with 5.65 g/kg Sijunzi Decoction for 28 d, and the levels of blood glucose (FBG) and oral glucose tolerance (OGTT) of each group of mice were determined. The InsR, PI3K mRNA expression in AMPK signaling pathway was detected by RT-PCR. **Results** A total of 113 chemical components were selected from Sijunzi Decoction, involving 47 targets for the treatment of T2DM. Twenty-two core components and 27 core targets were screened according to node degree of freedom $\geq$ average degree of freedom. The GO analysis results showed that it involved seven biological processes such as blood glucose homeostasis, positive regulation of adipose tissue development, four molecular functions including steroid hormone receptor activation and drug binding, and cell composition including the plasma membrane and nuclear chromatin. The results of KEGG analysis showed that it might treat diabetes through 14 signaling pathways, such as AMPK signaling pathway, PPAR signaling pathway and insulin resistance. A total of 60% of the molecules had intense binding activity and 40% had stronger binding activity. The results of animal experiments showed that Sijunzi Decoction could significantly improve OGTT ($P < 0.001$), and decrease FBG ($P < 0.01$) in T2DM rats, and significantly increase the expression of INSR mRNA ($P < 0.001$) and PI3K mRNA ($P < 0.001$). Some of the predicted results of network pharmacology were verified. **Conclusion** This study reflects that Sijunzi Decoction can treat type 2 diabetes mellitus through multi-target and multi-channel, which lays a foundation for the future study of molecular mechanism.

Key words: Sijunzi Decoction; type 2 diabetes mellitus; network pharmacology; AMPK signaling pathway; insulin receptor (InsR); phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)

2 型糖尿病 (T2DM) 是一种由于胰岛素抵抗引起的, 以慢性高血糖为特征的代谢性疾病^[1]。随着人类社会的进步, 工作、生活方式与节奏的改变, T2DM 已经成为现代常见病、高发病, 此外随着人口老龄化程度日趋加深, 胰岛分泌功能衰退, 老年人患糖尿病的概率更大。2014 年国际糖尿病联合会 (IDF) 统计, 全球约有 3.87 亿糖尿病患者, 预计 2035 年患病人数将高达 5.92 亿^[2]。据世界卫生组织统计, 糖尿病并发症高达 100 多种, 是目前已知并发症最多的一种疾病, 可导致大血管、微血管受损并危及心、脑、肾、周围神经、眼睛、足等, 严重危害健康。

糖尿病自古有之, 中医谓之“消渴”, 消渴的发病与脾胃关系密切^[3]。对于脾虚与消渴病的关系, 早在《黄帝内经》时期就有详细的论述,《灵枢·本脏》指出“脾脆则善病消瘵易伤”, 明确提出脾气虚弱是发生消瘵的重要原因^[4], 后世医家王叔和、赵献可等名家的论述均表明脾气亏虚是糖尿病的重要病机。

四君子汤是健脾益气经方, 始载于《太平惠民和剂局方》, 由人参、白术、茯苓、甘草组成。党参性平, 益气健脾不弱人参, 若非大补元气, 临床常以党参代人参。清·鲍相璈《验方新编》中加味四君子汤即以党参代人参^[5],《中国药典》2015 年版四君子丸及四君子颗粒均以党参代人参^[6]。方中党参

为君, 甘温益气、健脾益肺; 臣以苦温之白术, 健脾燥湿, 加强益气助运之力; 佐以甘淡茯苓, 健脾渗湿, 苓术相配, 则健脾祛湿之功益著; 使以炙甘草, 益气和中, 调和诸药。四药配伍, 共奏益气健脾之功效, 文献报道^[7-8]四君子汤及其加味临床可用于治疗糖尿病, 同时报道了四君子汤降糖作用, 但四君子汤治疗 T2DM 的机制未见报道。

本课题组前期研究结果表明四君子汤的主要化学成分包括黄酮类、皂苷类、香豆素类、萜类、烯醇类、多糖类、氨基酸类等, 并通过实验验证了四君子汤调节 T2DM 大鼠胰岛素抵抗的作用及改善 T2DM 大鼠脂代谢紊乱作用。为了发现四君子汤调节 T2DM 的分子机制, 利用网络药理学技术建立“成分-疾病-通路”网络^[9], 并对筛选的主要靶点进行实验验证, 以期四君子汤治疗 T2DM 的作用机制研究提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 药材、药品与试剂

党参 (批号 180301) 为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的根, 茯苓 (批号 180302) 为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 白术 (批号 180101) 为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根

茎,甘草(批号 171201)为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎,以上药材均购自山西维康堂中药饮片有限公司,经山西中医药大学段秀俊副教授鉴定为正品。链脲佐菌素(STZ,批号 S8050)购于美国 Sigma 公司;RNAiso PLUS 试剂盒(批号 AI21592A)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒(批号 AI91404A)、TB Green™ Premix Ex Taq II (Tli RNaseH PLUS) 试剂盒(批号 AI52244A)均购自 TaKaRa 公司;无水乙醇、异丙醇、三氯甲烷、柠檬酸以及柠檬酸钠购自天津市光复科技发展有限公司;葡萄糖(批号 20180901)购自天津市大茂化学试剂厂。

1.2 动物

8 周龄雄性 SD 大鼠,SPF 级,体质量(200.9±5.3) g,购自中国医学科学院实验动物中心,许可证号 SCXK(军)2017-0004。

1.3 仪器

三诺安稳血糖仪(产品注册证编号 201724000323,三诺生物传感股份有限公司);TGL18M 型离心机(湖南湘立科学仪器有限公司);HH-6 型水浴锅(上海乔跃电子有限公司);-80℃超低温冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(苏净集团安泰公司);Bead Ruptor 12 多样品研磨珠均质仪(Omni 公司);Step One Plus 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司);Thermo NanoDrop 超微量核酸蛋白检测仪(美国 Thermo Scientific 公司);移液枪(上海盛创医疗器械有限公司台州分公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 四君子汤化学成分筛选及作用靶点预测 以四君子汤的化学成分为研究对象,整合课题组前期四君子汤实验研究及查阅相关文献资料^[10-11],同时用中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP)(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)进行成分的查询及筛选。该数据库中包含了《中国药典》2010 年版收录的所有药物,以及涉及口服生物利用度(OB)的天然化合物的药动学特性、药物相似、肠上皮通透性、血脑屏障、水溶性等,OB、类药性(DL)和半衰期(HL)是评价一个化合物是否可发展成为一个药物的重要指标^[12]。实验筛选 OB≥30%、DL≥0.18 及 HL≥4 的化合物作为候选成分,在 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)中根据成分名称查询相应的 SMILE 号,在 Swiss Target

Prediction 数据库(<http://www.SwissTargetPrediction.ch>)根据 SMILE 号预测候选成分对应的靶点。

2.1.2 T2DM 靶点预测 在 TTD 数据库(<https://db.idrblab.org/ttd/target/t02777>)、DRUGBANK 数据库(<https://www.drugbank.ca>)、DisGeNET 数据库(<http://www.disgenet.org>)网页检索框输入“type 2 diabetes”,获取 T2DM 蛋白靶标,选择 3 个数据库中 2 个数据库及以上共有的靶点作为疾病候选靶点,并在 UnitProt 数据库(<https://www.Uniprot.org/>)查询靶点蛋白的基因名,选择生物物种为 homo sapiens (human)。

2.1.3 成分疾病相互作用靶点映射及药物-靶点相互作用网络构建 获得四君子汤候选成分的对应靶点以及 T2DM 的靶点蛋白之后,取两者的交集靶点蛋白,用 Cytoscape 3.6.1 软件进行蛋白网络结构可视化处理。根据获得的靶点数据结果,构建四君子汤治疗 T2DM 的药物成分-靶点相互作用网络。通过选择节点自由度≥平均自由度的节点,构建四君子汤治疗 T2DM 的药物成分-靶点核心作用网络;在 String 数据库(<https://string-db.org/>)绘制蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络。

2.1.4 基因本体论(GO)分析 使用 DAVID 在线分析工具(<https://david.ncifcrf.gov/>)对网络合并后获得的核心靶点蛋白进行 GO 富集分析,用统计学超几何分布定量(P)<0.01 评估存在于各 GO 注释中的蛋白质群,以 P 值反映蛋白质生物学功能的显著性;选择生物过程、分子功能和细胞组分 3 个模块。

2.1.5 KEGG 通路富集分析 应用 DAVID 工具对药物-疾病交集核心蛋白靶标基因进行 KEGG 通路富集分析。通过富集分析的功能条目,考察中药的潜在靶标可能具有的生物学功能及参与的生物学通路,进而得到四君子汤治疗 T2DM 的主要作用通路。

2.2 分子对接

采用系统对接网站(system dockweb site,<http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>),对度值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。

2.3 动物实验验证

2.3.1 溶液的制备 ①四君子汤水提液:按处方配比(党参-茯苓-白术-甘草 9:9:9:6)称取饮片适量,加水煎煮 3 次,每次加 10 倍量水,回流提取 60 min,合并煎液减压浓缩至 0.848 g/mL(按生药量计算),即得(其中含总多糖 95.65 mg/g、总黄酮 17.97 mg/g、总皂苷 11.02 mg/g、尿苷 0.423 mg/g、甘草苷 1.029

mg/g、党参炆苷 0.123 mg/g、甘草素 0.103 mg/g、甘草酸 2.542 mg/g、白术内酯 III 0.039 mg/g)。②STZ 溶液: 取柠檬酸 2.1 g 用双蒸水定容至 100 mL 作为 A 液, 取柠檬酸钠 2.94 g 用双蒸水定容至 100 mL 作为 B 液; 用时将 A、B 液按一定比例混合, pH 计测定 pH 值, 调节 pH 值在 4.2~4.5, 得到柠檬酸缓冲液。注射前用柠檬酸缓冲液溶解 STZ, 配制成 20 mg/mL 溶液, 即得。③葡萄糖溶液: 取葡萄糖适量, 精密称定, 用蒸馏水配制成 0.1 g/mL, 即得。

2.3.2 造模 取雄性 SD 大鼠, 高糖高脂饲料(基础饲料 58.5%、胆固醇 1%、蛋黄粉 10%、蔗糖 20%、猪油 10%、胆酸钠 0.5%) 喂养 4 周, 末次喂养后禁食不禁水 12 h, 按 2 mL/kg ip STZ (40 mg/kg) 溶液, 高糖高脂饲料喂养 72 h 后禁食不禁水 12 h, 断尾取血, 测空腹血糖 (FBG), $\text{FBG} \geq 11.1 \text{ mmol/L}$ 者即造模成功^[13-14]。

2.3.3 分组 将大鼠随机分为对照组、模型组、四君子汤组 (5.65 g/kg, 相当于临床日用量的 2 倍), 每组 8 只。对照组正常饲料喂养, 其余 2 组均以高糖高脂饲料喂养并 ip STZ。

2.3.4 给药 对照组和模型组按 10 mL/kg ig 蒸馏水, 四君子汤组大鼠 ig 四君子汤水提液 10 mL/kg (5.65 g/kg), 每天 1 次, 连续给药 28 d。

2.3.5 动物处理及指标观察 给药结束后大鼠均禁食不禁水 12 h, 按 10 mL/kg ig 葡萄糖溶液 (10 g/kg), 并于给予葡萄糖后 0、30、60、120 min 断尾取血, 测定大鼠血糖值, 计算血糖-时间曲线下面积 (AUC) 考察口服葡萄糖耐量 (OGTT)。考察 OGTT 后饲养 1 d, 禁食不禁水 12 h, 断尾取血, 测定大鼠 FBG, 乙醚麻醉, 摘取大鼠肝脏, 生理盐水漂洗干净后液氮速冻, -80°C 存放。

2.3.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测胰岛素受体 (InsR) 和磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) mRNA 表达 称取适量肝脏组织, 加入 1 mL TRIZOL 试剂冰上匀浆后, 按照总 RNA 提取试剂盒说明书方法进行提取。总 RNA 提取完后, 于超微量核酸蛋白检测仪测定所提取 RNA 的浓度、纯度 ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 在 1.8~2.0)。取总 RNA 1 μg , 按照 TaKaRa 公司 RT-reagent 逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应。反应体系为 Prime Script RT Master Mix 500 ng 样本对应的总 RNA 体积加 ddH₂O 至 10 μL , 反应条件: 37°C , 15 min; 85°C , 5 s。按 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq 荧光定量试剂说明书进行 qRT-PCR

反应, 以 SYBR Green 为荧光标记物, GAPDH 为内参对照。取 2 μL cDNA 加入 20 μL 反应体系进行扩增, 反应体系: SYBR Premix Ex TaqII 12.5 μL , Primer F 1 μL , Primer R 1 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 8.5 μL 。扩增条件: 95°C 、30 s; 95°C 、15 s; 62°C 、20 s。共 40 个循环。扩增反应结束后关闭仪器, 分析数据。InsR 引物序列: 上游, 5'-CAATGGTGC-TGAGGACACTAGG-3'; 下游, 5'-GTGCTCTTCGT-GGCTTGTGG-3', 扩增长度 139 bp。PI3K 引物序列: 上游, 5'-GGTGAGGAACGAAGAATGGC-3'; 下游, 5'-TCCGAGGCAAGACAGGGATA-3'。扩增长度 176 bp。GAPDH 引物序列: 上游, 5'-CTCCTGCG-ACTTCAACAGTG-3'; 下游, 5'-TGCTGTAGCCA-AATTCGTTG-3', 扩增长度 99 bp。扩增反应完成后, 结果采用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 计算各基因相对表达量。

2.3.7 统计学方法 采用 Graphpad prime 8 统计软件对数据进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 网络药理学预测结果

3.1.1 四君子汤化学成分筛选、作用靶点预测以及疾病靶点预测结果 从 TCMSP 数据库中搜索四君子汤各味药的成分: 党参 135 个, 白术 56 个, 茯苓 35 个, 甘草 281 个; 根据 $\text{OB} \geq 30\%$ 、 $\text{DL} \geq 0.18$ 、 $\text{HL} \geq 4$ 的要求, 选定 113 个化合物, 其中来源于党参 18 个, 白术 5 个, 茯苓 14 个, 甘草 75 个, 其中党参与甘草的共有成分 1 个。将成分在 SwissTargetPrediction 数据库进行检索获得成分对应的靶标。在 TTD 数据库、DRUGBANK 数据库、DisGeNET 数据库网页搜索 “type 2 diabetes”, 获取 T2DM 蛋白靶标, 选择 3 个数据库中 2 个数据库及以上共有靶标, 共得到 70 个疾病靶点。

3.1.2 药物成分及疾病靶点映射结果及相互作用网络构建及核心网络提取结果 筛选出四君子汤成分与 T2DM 相同的靶标 47 个。将成分及对应靶标信息导入 Cyto-scape 3.6.1 软件绘制相互作用网络图, 选取网络中节点自由度大于平均自由度的节点, 提取出四君子汤成分与 T2DM 相互作用核心网络, 得到核心成分 22 个, 核心靶点 27 个, 核心有效成分及核心靶点相关信息见表 1、2。在 String 数据库绘制核心蛋白的 PPI 网络, 见图 1。

表 1 药物成分-疾病映射筛选核心靶点信息

Table 1 Drug composition-disease mapping screening core target information

靶点名称	基因名称	UniProt ID
ATP binding cassette subfamily G member 1	ABCG1	P33527
ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group)	ABCG2	Q9UNQ0
cannabinoid receptor 1	CNR1	P21554
cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19	CYP2C19	P33261
dopamine D1 receptor	DRD1	P21728
glucagon receptor	GCGR	P47871
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	HMGCR	P04035
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	HSD11B1	P28845
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2	HSD11B2	P80365
5-hydroxytryptamine receptor 2A	HTR2A	P28223
insulin like growth factor 1 receptor	IGF1R	P08069
insulin receptor	INSR	P06213
maltase-glucoamylase, intestinal	MGAM	O43451
nuclear receptor subfamily 1 group H member 4	NR1H4	Q96R11
nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	NR3C1	P04150
nuclear receptor subfamily 3 group C member 2	NR3C2	P08235
phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma	PIK3CG	P48736
peroxisome proliferator activated receptor alpha	PPARA	Q07869
peroxisome proliferator activated receptor delta	PPARD	Q03181
peroxisome proliferator activated receptor gamma	PPARG	P37231
prostaglandin-endoperoxide synthase 1	PTGS1	P23219
prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	P35354
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	PTPN1	P18031
retinoid X receptor gamma	RXRG	P48443
stearoyl-CoA desaturase	SCD	O00767
sirtuin 1	SIRT1	Q96EB6
solute carrier family 5 member 1	SLC5A1	P13866

表 2 四君子汤治疗 T2DM 核心活性成分

Table 2 Core active components of Sijunzi Decoction in treatment of T2DM

药材	代码	筛选的成分	代号	成分中文名称
甘草	GC-02	mairin	MOL000211	丁子香酚
甘草	GC-09	licochalcone a	MOL000497	甘草查耳酮 A
甘草	GC-16	naringenin	MOL004328	柚皮苷
甘草	GC-18	euchrenone	MOL004806	真烯酮
甘草	GC-22	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl) prop-2-en-1-one	MOL004815	(E)-1-(2,4-二羟基苯基)-3-(2,2-二甲基色-6-基)丙-2-烯-1-酮
甘草	GC-25	glepidotin A	MOL004828	北美甘草醇甲
甘草	GC-53	sigmoidin-B	MOL004935	乙肝素 B
甘草	GC-61	icos-5-enoic acid	MOL004985	顺式-5-二十碳烯酸
甘草	GC-66	gadelaic acid	MOL004996	反鳕油酸
甘草	GC-76	xambioona	MOL005018	光甘草酚
茯苓	FL-02	trametenolic acid	MOL000275	曲美妥酸
茯苓	FL-06	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	MOL000282	麦角甾-7,22E-二烯-3β-醇
茯苓	FL-08	3beta-hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	MOL000287	3β-羟基-24-亚甲基-8-兰诺酮-21-酸
茯苓	FL-09	pachymic acid	MOL000289	茯苓酸
茯苓	FL-12	poricoic acid C	MOL000292	茯苓酸 C
茯苓	FL-13	hederagenin	MOL000296	常春藤皂苷元
茯苓	FL-14	dehydroeburicoic acid	MOL000300	脱氢苯甲酸
党参	DS-03	chondrillasterol	MOL001006	粉苞甾醇
党参	DS-07	spinasterol	MOL004355	菠菜甾醇
党参	DS-10	stigmast-7-enol	MOL006774	柱头-7-烯醇
党参	DS-13	5alpha-stigmastan-3,6-dione	MOL008391	5α-豆甾烷-3,6-二酮
党参	DS-16	glycitein	MOL008400	大豆黄素

3.1.3 药物-疾病交集靶基因 GO 分析及 KEGG 通路富集分析结果 为了进一步阐明候选靶点的可能作用,使用 DAVID 工具对四君子汤治疗 T2DM 的 27 个核心候选靶点进行 GO 富集分析。在生物过程、分子功能和细胞组成中的排列条目见表 3。在生物过程中,涉及血糖稳态、血压调节、细胞缺氧反应、脂肪组织发育的正调控、环氧化酶途径、

DNA 转录、细胞三酰甘油稳态 7 个生物过程,涉及类固醇激素受体活化、药物结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性-配体激活序列特异性 DNA 结合、前列腺素内过氧化物合酶活化 4 个分子功能,包括质膜、核常染色质 2 个细胞组成。应用 DAVID 数据库,通过 KEGG 生物途径富集分析,识别四君子汤治疗 T2DM 有显著影响的生物途径。结果显示,其

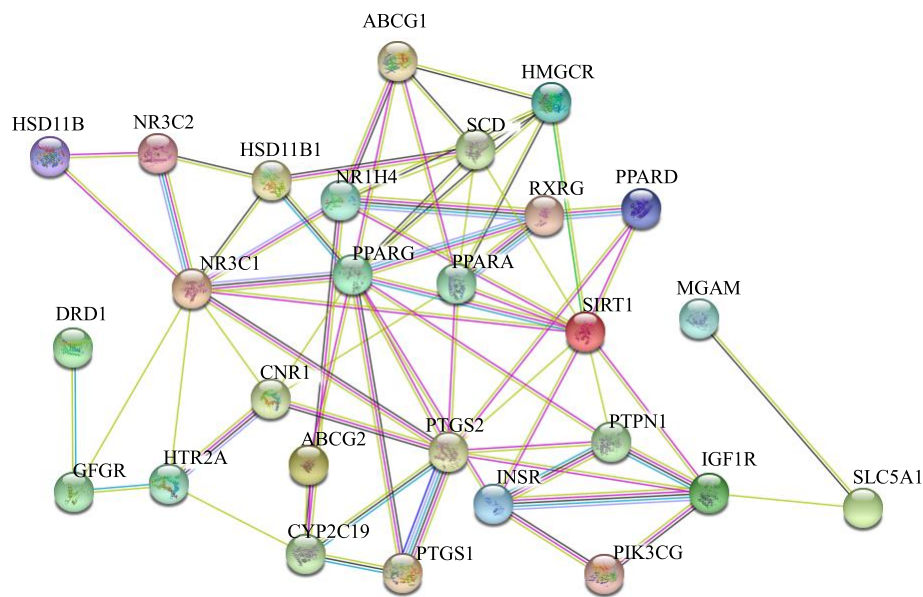


图 1 核心蛋白 PPI 网络

Fig. 1 PPI network of core protein

表 3 GO 分析及 KEGG 分析结果

Table 3 Results of GO analysis and KEGG analysis

类别	条目	数量	P 值	基因
生物过程	GO: 0042593 glucose homeostasis	5	<0.001	CNR1、PPARG、GCGR、INSR、NR1H4
	GO: 0008217 regulation of blood pressure	3	0.001 479 682	PTGS2、PPARG、PTGS1
	GO: 0071456 cellular response to hypoxia	3	0.002 966 673	PPARD、PTGS2、SIRT1
	GO: 1904179 positive regulation of adipose tissue development	2	0.003 708 227	SIRT1、NR1H4
	GO: 0019371 cyclooxygenase pathway	2	0.003 708 227	PTGS2、PTGS1
	GO: 0006351 transcription, DNA-templated	4	0.007 297 109	PPARD、PPARG、NR3C1
	GO: 0035356 cellular triglyceride homeostasis	2	0.009 245 965	SIRT1、NR1H4
分子功能	GO: 0003707 steroid hormone receptor activity	4	<0.001	PPARD、PPARG、NR1H4
	GO: 0004879 RNA polymerase II transcription factor activity, ligand-activated sequence-specific DNA binding	3	<0.001	PPARD、PPARG
	GO: 0008144 drug binding	3	0.001 641 706	PPARD、PPARG、HTR2A
	GO: 0004666 prostaglandin-endoperoxide synthase activity	2	0.004 326 853	PTGS2、PTGS1
	GO: 0005887 integral component of plasma membrane	5	0.033 725 892	SLC5A2、DRD1、SLC5A1、GCGR、HTR2A
细胞组成	GO: 0005719 nuclear euchromatin	2	0.033 807 837	SIRT1、NR1H4

机制主要涉及腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路、醛固酮调节的钠重吸收、脂肪细胞脂解的调

控、胆汁分泌、胰岛素抵抗、碳水化合物消化吸收等 14 个信号通路, 见图 2, 最显著信号通路 (AMPK signaling pathway) 见图 3。

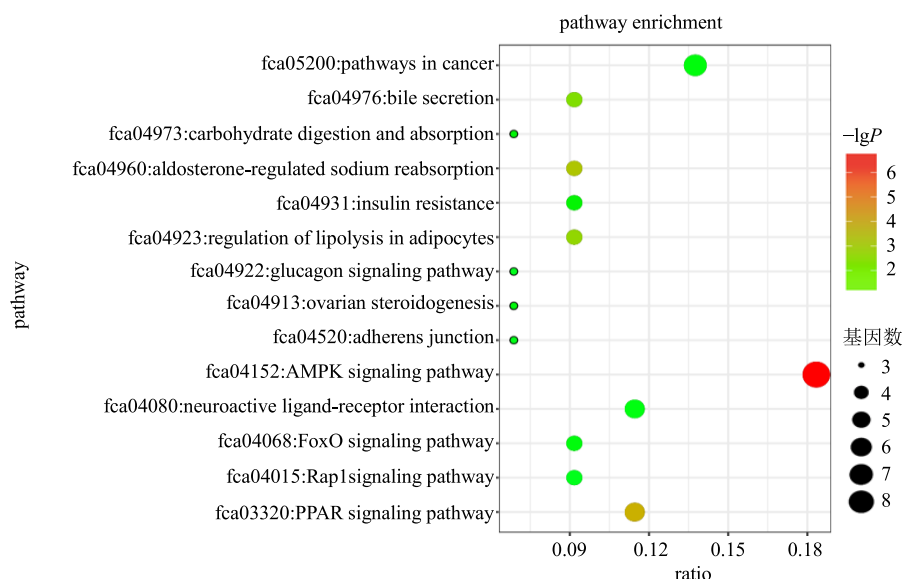


图 2 KEGG 富集信号通路

Fig. 2 KEGG enrichment signaling pathway

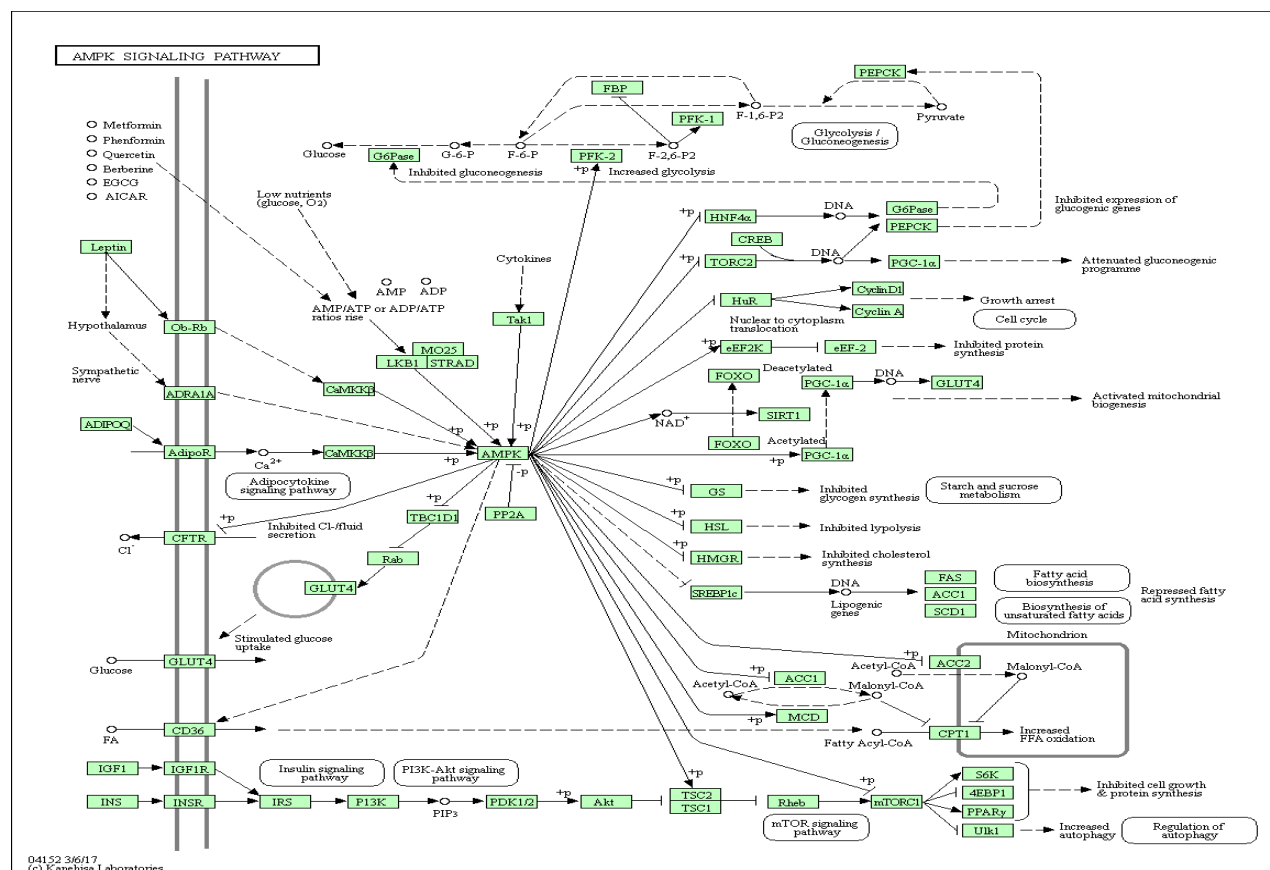


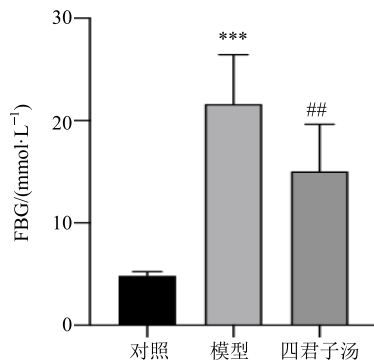
图 3 AMPK 信号通路

Fig. 3 AMPK signaling pathway

表 4 内源性配体、活性成分与 PTPN、PPARG、PTGS2 靶蛋白分子对接分数

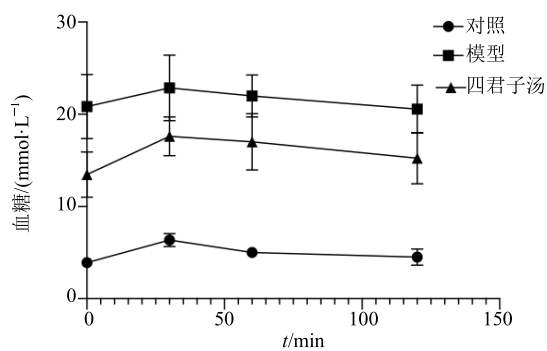
Table 4 Molecular docking scores between native ligand, active components and PTPN, PPARG, PTGS2

靶蛋白	化合物	对接分数	配体
PTPN	内源性配体	6.090	SER A 216、HIS A 214、ARG A 221、GLY A 218、ILE A 219、ALAA 217、GLY A 220、ASN A 111
	hederagenin	8.526	SER A 216、HIS A 214、ARG A 221、GLY A 218、ILE A 219、ALAA 217、GLY A 220、ASN A 111、LEU A 222、PHE A 225、MET A 109、ASP A 181、ALA A 262
	3beta-hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	8.420	SER A 216、HIS A 214、ARG A 221、GLY A 218、ILE A 219、ALAA 217、GLY A 220、ASN A 111、DHE A 109、TYR A 46、LEU A 222、GLN A 85、GLY A 86、ASP A 181、ALA A 262
	trametenolic acid	8.415	SER A 216、HIS A 214、ARG A 221、GLY A 218、ILE A 219、ALAA 217、GLY A 220、ASN A 111、LEU A 110、PHE A 182、MET A 109、TYR A 46、VAL A 213、SER A 222、VAL A 49、VAL A 108、ALA A 262
	gadelaic acid	6.276	SER A 216、HIS A 214、ARG A 221、GLY A 218、ILE A 219、ALAA 217、GLY A 220、ASN A 111、PHE A 182、LEU A 110、GLN A 85、SER A 222、THR A 84、ALA A 262
	icos-5-enoic acid	6.267	SER A 216、HIS A 214、ARG A 221、GLY A 218、ILE A 219、ALAA 217、GLY A 220、ASN A 111、PHE A 182、SER A 222、GLY A 86、LEU A 110、TYR A 46、ASP A 181、ALA A 262
PPARG	内源性配体	4.400	HIS X 323、HIS X 449、SER X 289、CYS X 285、MET X 364、PHE X 282、ILE X 341、TYR X 473、GLY X 284、LEU X 469
	hederagenin	8.303	HIS X 323、HIS X 449、SER X 289、CYS X 285、MET X 364、PHE X 282、ILE X 341、LEU X 330、ARG X 288、PHE X 363、ILE X 326、TYR X 327、LEU X 333、VAL X 339、LEU X 340
	trametenolic acid	8.259	HIS X 449、SER X 289、CYS X 285、PHE X 282、ILE X 341、LEU X 469、ARG X 288、LEU X 330、TYR X 327、VAL X 339、PHE X 363、ILE X 326、LEU X 333、LEU X 340
	3beta-hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	8.232	TYR X 473、HIS X 323、HIS X 449、SER X 289、CYS X 285、MET X 364、PHE X 282、ILE X 341、LEU X 469、GLN X 286、ILE X 326、LEU X 330、VAL X 339、ARG X 288、TYR X 327、LEU X 453、LEU X 340、PHE X 363
	icos-5-enoic acid	6.463	SER X 289、CYS X 285、MET X 364、ILE X 341、GLY X 284、TYR X 327、ARG X 288、LEU X 330、VAL X 339、PHE X 363
	gadelaic acid	6.452	SER X 289、CYS X 285、MET X 364、ILE X 341、GLY X 284、ARG X 288、LEU X 330、VAL X 339、MET X 348、ILE X 281、ILE X 326、LEU X 333
PTGS2	内源性配体	4.730	THR B 212、HIS B 388、ASN B 382、GLN B 203、LEU B 391、HIS B 207、PHE B 210、TYR B 385、HIS B 386、PHE B 395
	trametenolic acid	8.285	HIS B 388、GLN B 203、LEU B 391、HIS B 207、PHE B 210、HIS B 386、TRP B 387
	3beta-hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	8.191	HIS B 388、GLN B 203、HIS B 207、TYR B 385、HIS B 386、TRP B 387、VAL B 447、HIS B 214、LEU B 294
	hederagenin	8.109	HIS B 388、GLN B 203、HIS B 207、TYR B 385、HIS B 386、THR B 206、VAL B 291、TRP B 387、HIS B 214、LEU B 294、UAL B 447
	gadelaic acid	6.260	HIS B 388、GLN B 203、LEU B 391、HIS B 207、PHE B 210、TYR B 385、HIS B 386、PHE B 395、TRP B 387、PHE B 200、VAL B 295
	icos-5-enoic acid	6.236	HIS B 388、GLN B 203、LEU B 391、HIS B 207、PHE B 210、HIS B 386、TRP B 387



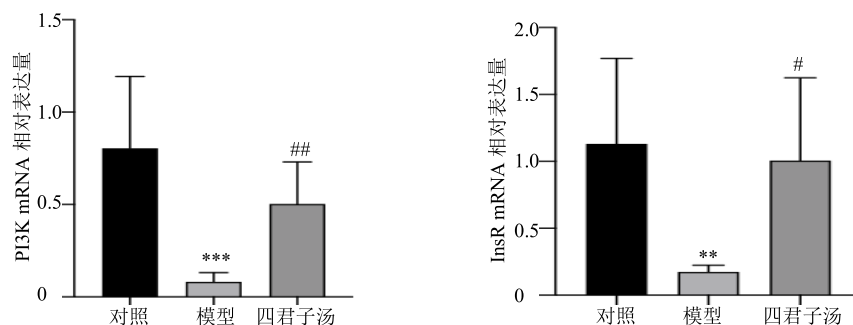
与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$
 *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

图 5 四君子汤对 T2DM 大鼠 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Fig. 5 Effect of Sijunzi Decoction on FBG in T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



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

图 6 四君子汤对 T2DM 大鼠 OGTT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Fig. 6 Effect of Sijunzi Decoction on OGTT in T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



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

图 7 四君子汤对 T2DM 大鼠 InsR、PI3K mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Fig. 7 Effect of Sijunzi Decoction on mRNA expression of InsR and PI3K mRNA in T2DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性, 表 4 的结果显示, 5 种活性成分与 3 种靶蛋白对接区域与内源性配体结合位置基本相同, 因此可能起到和内源性配体相同的作用。

四君子汤治疗 T2DM 的作用机制, 发现该方可能通过血糖稳态、血压调节、细胞缺氧反应、脂肪组织发育的正调控、环氧化酶途径、DNA 转录、细胞三酰甘油稳态生物过程, 并结合类固醇激素受体活化、药物结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性-配体激活序列特异性 DNA 结合、前列腺素内过氧化物合酶活化分子功能, 包括质膜、核常染色质 2 个细胞组成发挥作用, 其作用机制主要与 AMPK 信号通路、PPAR 信号通路、醛固酮调节的钠重吸收、脂肪细胞脂解的调控、胆汁分泌、胰岛素抵抗、碳水化合物消化吸收有关, 与目前研究所证实的某些药物^[17-18]作用于 T2DM 的信号通路基本相符。综上所述

述,四君子汤治疗 T2DM 具有多靶点、多通路的特点。

本研究应用网络药理学方法,对四君子汤的多成分-多靶点与 T2DM 之间复杂网络关系进行研究,并采用 T2DM 模型,通过验证 InsR、PI3K mRNA 的表达初步验证了基于 AMPK 信号通路的四君子汤抗 T2DM 的作用机制,然而四君子汤抗 T2DM 的作用机制仍需大量的体内实验进行阐明,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] 许曼音. 糖尿病学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010.
- [2] 刘 培, 王鹏飞, 王 科, 等. 基于 PI3K/Akt 通路的中药治疗糖尿病研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 220-228.
- [3] 钟伟才, 朱国福, 李文龙, 等. 消渴病病因病机探讨 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1770-1772.
- [4] 郭霁春. 灵枢经校释 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [5] 鲍相璈. 孙玉信, 朱平生点校 [M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2007.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [7] 周良军. 益气健脾法治疗脾虚型 II 型糖尿病的临床疗效观察及作用机理探讨 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2012.
- [8] 崔 丽, 陶 纯. 四君子汤联合运动疗法治疗妊娠期糖尿病 42 例 [J]. 河南中医, 2015, 35(5): 1104-1106.
- [9] 张 瑞, 曹庆伟, 李爱平, 等. 基于网络药理学的黄芪抗疲劳作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1880-1889.
- [10] 熊 山, 丁晓晨. 四君子汤化学成分和药理作用研究进展 [J]. 山东医学高等专科学校学报, 2017, 39(5): 371-374.
- [11] 纪云飞, 王瑞君, 李晓波. 复方四君子汤的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 837-843.
- [12] Bi X, Gong M, Di L. Review on prescription compatibility of Shaoyao Gancao Decoction and reflection on pharmacokinetic compatibility mechanism of traditional Chinese medicine prescription based on *in vivo* drug interaction of main efficacious components [J]. *Evid-Based Compl Altern Med*, 2014, 2014: 208129.
- [13] 王春怡, 高 颖, 李 艳, 等. 黄芪散有效部位群对 II 型糖尿病大鼠肝糖原及糖异生酶的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(1): 1-7.
- [14] 陆少君, 曾伟斌, 臧林泉. 2 型糖尿病大鼠模型制备实验研究 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5): 624-628.
- [15] Cheng X R, Cui X L, Zheng Y, *et al.* Nodes and biological processes identified on the basis of network analysis in the brain of the senescence accelerated mice as an Alzheimer's disease animal model [J]. *Front Ag Neurosci*, 2013, doi: 10.3389/fnagi.2013.00065.
- [16] Gao L, Wang K X, Zhou Y Z, *et al.* Uncovering the anticancer mechanism of Kushen Injection against HCC by integrating quantitative analysis, network analysis and experimental validation [J]. *Sci Rep*, 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18325-7.
- [17] 王 梦, 张泽生, 刘 暄, 等. D-松醇复配 Mn^{2+} 对 2 型糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制的研究 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 302-307.
- [18] 王春怡, 郝梦娇, 胡方利, 等. 黄芪散有效部位群对 II 型糖尿病大鼠肝脏 AMPK/SREBP-1c 通路的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(6): 679-686.