

参芪降糖颗粒通过多层次互作网络治疗糖尿病微循环障碍作用机制研究

王乐琪^{1,2}, 李冰冰³, 王倩^{1,2}, 支运霞³, 肖雪^{1,2}, 关永霞^{3*}, 张贵民³, 郭姣^{1,2*}

1. 广东药科大学 广东省代谢病中西医结合研究中心, 广东 广州 510006

2. 广东省代谢性疾病中医药防治重点实验室, 广东 广州 510006

3. 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276000

摘要: **目的** 基于网络药理学方法研究参芪降糖颗粒治疗糖尿病微循环障碍的潜在分子机制。**方法** 通过 GeneCards 数据库查询糖尿病肾脏病、糖尿病视网膜病变、糖尿病神经病变、糖尿病足病和糖尿病合并脑小血管病的疾病靶点, 整合为糖尿病微循环障碍疾病靶点。借助 PubChem Search 和 Swiss target prediction 在线工具得到参芪降糖颗粒药效成分治疗糖尿病微循环障碍的作用靶标, 利用 Cytoscape 3.3.0 软件构建参芪降糖颗粒化学成分-糖尿病微循环障碍作用靶标网络, 通过 STRING 数据库构建靶蛋白相互作用 (PPI) 网络, 利用 Clue GO 插件进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析。**结果** 从参芪降糖颗粒中共筛选出 85 个化学成分, 以及 10 个与糖尿病微循环障碍相关的作用靶点, 分别为 ACE、VEGFA、TNF、IL6、STAT3、ALB、PON1、PTPN22、PPARG、NOS3。经 GO 和 KEGG 通路富集分析, 发现参芪降糖颗粒治疗糖尿病微循环障碍可能参与 HIF-1 信号通路、胰岛素抵抗、AGE-RAGE 信号通路、炎症性肠病、类风湿性关节炎、肥厚性心肌病信号通路等多条信号通路。**结论** 参芪降糖颗粒治疗糖尿病微循环障碍具有多成分-多靶点-多途径的作用特点, 为进一步拓展参芪降糖颗粒的临床应用提供了借鉴和参考。

关键词: 微循环障碍; 参芪降糖颗粒; 糖尿病; 糖尿病肾脏病; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)19-4861-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.003

Mechanism of Shenqi Jiangtang Granules in treatment of diabetic microcirculation disorder based on multi-level interactive network pharmacology

WANG Le-qi^{1,2}, LI Bing-bing³, WANG Qian^{1,2}, ZHI Yun-xia³, XIAO Xue^{1,2}, GUAN Yong-xia³, ZHANG Gui-min³, GUO Jiao^{1,2}

1. Guangdong Metabolic Disease Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Key Laboratory of Metabolic Disease Prevention and Treatment of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

3. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Shenqi Jiangtang Granules (SJG) in the treatment of diabetic microcirculation disorder based on network pharmacology. **Methods** The targets of diabetic kidney disease, diabetic retinopathy, diabetic peripheral neuropathy, diabetic foot disease and small cerebral vascular disease were searched through Genecards database to be integrated as the targets of diabetic microcirculation disorder disease. The targets of SJG' active components for treatment of diabetic microcirculation disorder were screened and predicted by utilizing PubChem Search and Swiss target prediction online tool. Cytoscape 3.3.0 software was adopted to construct an active component-diabetic microcirculation disorder target network. The protein-protein interaction (PPI) network was established by using STRING database. Gene ontology (GO) biological process and Kyoto Encyclopedia of Genes and

收稿日期: 2020-01-20

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1704200); 国家重点研发计划项目 (2018YFC1704205); 国家自然科学基金重点项目 (81530102); 国家自然科学基金重点项目 (81830113)

作者简介: 王乐琪 (1993—), 女, 硕士, 从事中医药系统生物学研究。Tel: (020)39353115 E-mail: wang_leqi@163.com

***通信作者** 郭姣, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合防治糖脂代谢病研究。E-mail: gyguoyz@163.com

关永霞, 女, 高级工程师, 从事中药新产品开发与技术推广研究。E-mail: jmsgxy@163.com

Gnomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using Clue GO. **Results** A total of 85 active components of SJG and 10 targets (ACE, VEGFA, TNF, IL6, STAT3, ALB, PON1, PTPN22, PPARG and NOS3) related to diabetic microcirculation disorder were screened. Through GO and KEGG pathway enrichment analysis, it was found that the active components of SJG in the treatment of diabetic microcirculation disorder may participate in multiple signaling pathways, such as AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, HIF-1 signaling pathway, insulin resistance, hypertrophic cardiomyopathy, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, etc. **Conclusion** This study reflects the characteristics of multi-components, multi-targets and multi-pathways of SJG, which provides new ideas and clues for further research on the mechanism of SJG in the treatment of diabetic microcirculation disorder.

Key words: microcirculation disorder; Shenqi Jiangtang Granules; diabetic; diabetic kidney disease; network pharmacology; mechanism

糖尿病微循环障碍 (diabetic microcirculation disorder, DMD) 是由糖尿病相关因素导致的微循环障碍, 是糖尿病慢性并发症的发病基础, 主要表现为血流动力学异常、微血管病变和血液流变学改变, 临床上以糖尿病肾脏病 (diabetic kidney disease, DKD)、糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR)、糖尿病神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN)、糖尿病足病 (diabetic foot disease, DFD) 和糖尿病合并脑小血管病 (small cerebral vascular disease, SCVD) 为典型代表^[1]。

2017 年全球有超过 4.25 亿人受糖尿病影响, 比 2000 年糖尿病人数高出 281%, 占全球成人死亡人数的 9.9%^[2], 其中糖尿病引起的一系列微血管并发症严重影响患者的生存质量^[3]。DMD 的发病机制复杂, 目前, 研究发现其致病因素包括遗传、环境等多种因素。对于 DMD 的发病机制, 特别是多种疾病的共性发病机制, 研究尚不充分。因此, 本研究拟采用网络药理学技术初步探讨 DMD 多种表现疾病的共性核心靶点。同时, 在 DMD 的预防与治疗方面, 单一药物的治疗模式不够理想, 常采用合并用药、多种治疗手段。《糖尿病微循环障碍临床用药专家共识》也推荐了一些植物药及中药制剂用于 DMD 的治疗。中药及其复方制剂具有多成分、多途径、多靶点等特点, 在 DMD 的预防和治疗中可能具有很大的潜力。如参芪降糖颗粒 (Shenqi Jiangtang Granules, SJG), 临床上主要用于治疗 2 型糖尿病, 也用于防治 DMD, 与西药联合使用可增加临床疗效, 减少不良反应^[4-6]。但目前关于 SJG 的临床和机制研究多集中于 2 型糖尿病, 较少关注于 DMD。因此, 本研究同样采用网络药理学技术挖掘参芪降糖颗粒治疗 DMD 的潜在作用机制。

网络药理学融合了系统生物学、多向药理学和网络分析等多种技术, 通过构建“疾病-靶点-成分”

等相互作用网络, 能够多层次地阐明药物的作用机制, 具有整体性、系统性的特点, 已成为中医药领域一种重要的研究方法^[7-8]。本研究采用系统性的网络药理学方法, 把 SJG 现有物质基础研究结果进行整合, 并将已完成定性成分对应的靶点与 DMD 的疾病靶点进行匹配, 从而检索出潜在的 SJG 对治疗 DMD 的关键作用靶点和通路。此研究旨在与现有的相关研究进行相互验证, 为 SJG 治疗 DMD 的作用机制提供整体的、系统的、全面的认识, 为其作用机制的深入研究提供精准有效的研究方向, 为其临床应用提供更多可靠的研究依据。

1 材料与方法

1.1 SJG 成分库的建立

参考现有 SJG 物质基础研究结果^[9]及课题组研究结果, 建立 SJG 成分库。使用 PubChem Search 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) 和 Scifinder 数据库 (<https://scifinder.cas.org/scifinder/>), 查询已鉴定的成分 CAS 号 (Chemical Abstracts Service, CAS) 和 Canonical SMILES 字符串 (Simplified molecular input line entry specification, SMILES)。

1.2 SJG 化学成分靶点预测

Swiss Target Prediction^[10] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 是基于所提交的小分子化合物结构, 从 2D 和 3D 结构相似性的角度, 间接预测提交小分子化合物的作用靶点。将查询到的 Canonical SMILES 字符串输入 Swiss Target Prediction 网站进行靶点对接, 获得 SJG 潜在的靶点基因, 即为化学成分作用靶点。

1.3 DMD 相关靶点预测

GeneCards 数据库^[11] (<http://www.genecards.org/>) 可以提供已知或正在探索的基因信息。以“Diabetic Kidney Disease”“Diabetic Retinopathy”“Diabetic

peripheral neuropathy” “Diabetic foot disease” 及 “Small cerebral vascular disease” 为关键词进行搜索, 以相关性分数 (Relevance score ≥ 30) 作为筛选条件。删除重复靶点, 并使用 Image GP 平台绘制韦恩图获得 DMD 相关的基因靶点信息。

1.4 网络构建

利用 Cytoscape3.3.0 软件^[12]构建 “成分-潜在靶点”网络和“成分-潜在关键靶点”网络。将 GeneCards 数据库中得到的靶点输入 String 10.0^[13]中, 把物种设定为 “Homo sapiens”, 最低相互作用阈值设置为 “medium confidence”, 其他参数保持默认设置进行操作, 并根据分析结果统计靶点关联频次获取靶点互作信息和疾病靶蛋白相互作用网络图 (PPI)。

1.5 网络分析及可视化

通过 Cytoscape 3.3.0 软件的 Clue GO 插件进行

GO 富集分析, 对潜在关键靶点进行生物过程 (biological process)、分子功能 (molecular function) 和细胞组成 (cellular component) 3 个模块的分析, 选择 KEGG 并设定 $P < 0.05$ 对潜在关键靶点进行通路分析以确定潜在关键靶点富集通路。使用 Image GP 平台以气泡图的形式呈现图富集结果。

2 结果

2.1 SJG 化学成分筛选

目前物质基础研究表明, 利用超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱联用技术鉴定出 98 个化合物, 主要包括皂苷、黄酮、木脂素等; 利用气相色谱-质谱联用技术鉴定出 86 个挥发性成分, 包括烃类、醇类、醛类、酚酸类、木脂素、脂肪酸类等。查找 184 个成分的 SMILES 字符串, 得到有 SMILES 字符串的成分有 132 个, 结果如表 1 所示。

表 1 SJG 化学成分筛选结果
Table 1 Screening results of chemical components of SJG

序号	英文名	相对分子质量	CAS 号	序号	英文名	相对分子质量	CAS 号
GC-01	2,3-entanedione	100.052	600-14-6	GC-27	1-methyl-4-(1-hydroxy-1-methylethyl) benzene	150.104	1197-01-9
GC-02	1,1-diethoxyethane aceta	118.099	105-57-7	GC-28	safranal	150.104	116-26-7
GC-03	hexanal	132.115	4744-08-5	GC-29	decanal	156.151	112-31-2
GC-04	1,1-diethoxy-propan	132.115	4744-08-5	GC-30	β -cyclocitral	152.120	432-25-7
GC-05	2-furaldehyde	96.021	98-01-1	GC-31	5-ethyl-2-methyloctane	156.188	62016-18-6
GC-06	(2E)-hexenal	98.073	6728-26-3	GC-32	4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one	192.151	6901-97-9
GC-07	1,1-diethoxy-2-methyl-propane	146.131	1741-41-9	GC-33	1,1,6-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	174.141	475-03-6
GC-08	heptanal	114.104	111-71-7	GC-34	2-methoxy-4-vinylphenol	150.068	7786-61-0
GC-09	1-(2-furanyl)-ethanone	110.037	1192-62-7	GC-35	(E,E)-2,4-decadienal	152.120	25152-84-5
GC-10	1,1-diethoxy-3-methylbutane	160.146	3842-03-3	GC-36	1,1,5-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	172.125	1000357-25-8
GC-11	2-formyl-5-methylfuran	110.037	620-02-0	GC-37	ylangene	204.188	14912-44-8
GC-12	2-pentylfuran	138.104	3777-69-3	GC-38	(-)-a-himachalene	204.188	3853-83-6
GC-13	(E,E)-2,4-heptadie	110.073	4313-03-5	GC-39	trans-calamenene	202.172	73209-42-4
GC-14	p-cymene	134.110	99-87-6	GC-40	1 β -isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,4aa,5,6,8aa-hexahydronaphthalene	204.188	20085-19-2
GC-15	2,2,6-trimethylcyclohexanone	140.120	2408-37-9	GC-41	(+)- β -himachalene	204.188	1461-03-6
GC-16	benzeneacetaldehyde	120.058	122-78-1	GC-42	(R)-cuparene	202.172	16982-00-6
GC-17	gamma-terpinene	136.125	99-85-4	GC-43	2,4-di-tert-butylphenol	206.167	96-76-4
GC-18	3,5-octadien-2-one	124.089	38284-27-4	GC-44	(+)- δ -cadinene	204.188	483-76-1
GC-19	trans-linalool oxide (furanoid)	170.248	34995-77-2	GC-45	α -calacorene	200.157	21391-99-1
GC-20	4-carene	136.089	22118-00-9	GC-46	octacosane	394.454	630-02-4
GC-21	o-isopropenyltoluene	136.089	22118-00-9	GC-47	α -corocalene	200.157	20129-39-9
GC-22	(3E,5E)-3,5-octadien-2-one	132.094	7399-49-7	GC-48	nerolidol	222.198	142-50-7
GC-23	linalool	124.089	30086-02-3				
GC-24	nonanal	142.136	124-19-6				
GC-25	2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen	152.120	432-24-6				
GC-26	(E)-2-nonenal	140.120	18829-56-6				

续表 1

序号	英文名	相对分子质量	CAS 号	序号	英文名	相对分子质量	CAS 号
GC-49	dodecanoic acid	200.178	143-07-7	LC-17	gomisin J	388.454	66280-25-9
GC-50	tau-cadinol	222.198	5937-11-1	LC-18	(-)-gomisin L ₁	386.438	82425-43-2
GC-51	isopathulenol	220.183	88395-46-4	LC-19	gomisin L ₂	386.438	82425-44-3
GC-52	gamma-cadinene	204.188	39029-41-9	LC-20	gomisin O	416.464	72960-22-6
GC-53	ylangenol	220.183	41610-69-9	LC-21	quercitrin	448.380	522-12-3
GC-54	tau-murolol	222.198	19912-62-0	LC-22	astragalin	448.380	480-10-4
GC-55	α -cadinol	222.198	481-34-5	LC-23	astragaloside A	784.970	83207-58-3
GC-56	aromandendrene	204.188	489-39-4	LC-24	astragaloside I	840.990	84680-75-1
GC-57	(+)- α -longipinene	204.188	5989-08-2	LC-25	hyperoside	464.380	482-36-0
GC-58	(-)-spathulenol	220.183	77171-55-2	LC-26	rutin	664.570	153-18-4
GC-59	4- <i>epi</i> - α -acoradiene	204.188	729602-94-2	LC-27	ophiopogonin B	722.902	38971-41-4
GC-60	<i>cis</i> - α -santalol	220.183	115-71-9	LC-28	ophiopogonin C	897.054	911819-08-4
GC-61	widdrenal	218.167	470-41-7	LC-29	ophiopogonin D	855.020	945619-74-9
GC-62	(-)-isocaryophyllene	204.188	118-65-0	LC-30	ononin	430.405	486-62-4
GC-63	dehydrofukinone	218.340	19598-45-9	LC-31	formononetin	268.270	485-72-3
GC-64	2-methyl-1-nonene-3-yne	136.238	70058-00-3	LC-32	calycosin	284.267	20575-57-9
GC-65	2,5-dimethylacetophenone	148.089	2142-73-6	LC-33	pseudoginsenoside F ₁₁	801.010	69884-00-0
GC-66	farnesyl butanoate	292.240	51532-27-5	LC-34	ginsenoside F ₂	785.013	62025-49-4
GC-67	<i>n</i> -hexadecanoic acid	256.240	57-10-3	LC-35	ginsenoside F ₅	770.987	189513-26-6
GC-68	hexadecanoic acid, ethyl ester	284.272	628-97-7	LC-36	ginsenoside Rb ₁	1 109.290	41753-43-9
GC-69	heneicosane	296.344	629-94-7	LC-37	ginsenoside Rb ₂	1 079.269	11021-13-9
GC-70	(9Z,12Z)-9,12-octadecadienoic acid	280.240	60-33-3	LC-38	ginsenoside Rc	1 079.300	11021-14-0
GC-71	linoleic acid ethyl ester	308.272	544-35-4	LC-39	ginsenoside Re	947.140	52286-59-6
GC-72	9,12,15-octadecatrienoic acid	306.256	1191-41-9	LC-40	ginsenoside Rf	801.013	52286-58-5
GC-73	heptadecane	240.282	629-78-7	LC-41	ginsenoside Rg ₁	801.013	22427-39-0
LC-01	(+)-gomisin K ₂	402.487	75684-44-5	LC-42	ginsenoside Rg ₂	785.013	52286-74-5
LC-02	(3 β ,25 <i>R</i>)-14-hydroxyspirost-5-en-3-yl 6-deoxy- α - <i>L</i> -mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[β - <i>D</i> -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- β - <i>D</i> -glucopyranoside	871.016	1111088-89-1	LC-43	ginsenoside Rh ₁	638.870	63223-86-9
LC-03	pregomisin	390.500	66280-26-0	LC-44	ginsenoside Rh ₂	622.870	78214-33-2
LC-04	ginsenoside Rg ₃	785.013	14197-60-5	LC-45	ellagic acid	302.190	476-66-4
LC-05	tigloylgomisin H	500.581	66069-55-4	LC-46	notoginseng triterpenes	594.906	88105-29-7
LC-06	tigloylgomisin P	514.564	69176-51-8	LC-47	notoginsenoside Ft ₁	917.128	155683-00-4
LC-07	benzoylgomisin H	522.586	66056-23-3	LC-48	notoginsenoside R ₂	770.990	80418-25-3
LC-08	benzoylgomisin O	520.578	130783-32-3	LC-49	kaempferol	286.240	520-18-3
LC-09	epigomisin O	416.464	73036-31-4	LC-50	nicotiflorin	594.518	17650-84-9
LC-10	soyasaponin I	943.122	51330-27-9	LC-51	schisandrin	432.513	7432-28-2
LC-11	angeloylgomisin H	500.581	66056-22-2	LC-52	schisanhenol	402.470	69363-14-0
LC-12	angeloylgomisin Q	530.614	72561-28-5	LC-53	schisandrin A	416.510	61281-38-7
LC-13	angeloylisogomisin O	498.565	83864-70-4	LC-54	schisandrin B	400.460	61281-37-6
LC-14	raspberry Ketone	164.201	5471-51-2	LC-55	gomisin B	514.564	64938-51-8
LC-15	gomisin F	514.564	62956-47-2	LC-56	schisantherin D	520.527	64917-82-4
LC-16	gomisin G	536.577	62956-48-3	LC-57	schisantherin A	536.570	58546-56-8
				LC-58	isoquercitrin	464.376	21637-25-2
				LC-59	isoastragaloside I	869.044	84676-88-0

2.2 SJG 化学成分靶点预测结果

通过 Swiss Target Prediction 网站进行反向对接, 选择“Homo sapiens”, 输入化学成分的 SMILES 字符串, 得到每个成分对应的基因靶点。导出数据, 共 12 519 个成分靶点, 去重后剩余 1 130 个靶点, 用 Excel.xls 表格整理“成分-靶点”对。

2.3 疾病靶点预测结果

通过 GeneCards 数据库检索 DMD, 其中 DKD 有 356 个, DR 有 50 个, DPN 有 128 个, DFD 有 162 个, SCVD 有 288 个, 共计 984 个, 删除重复值 460 个, 共得到 524 个与 DMD 相关的基因。使用 Image GP 平台将上述筛选出来的疾病靶点基因进行匹配映射并绘制 Venn 图 (图 1), 获得 DMD 共性靶点基因 25 个 (表 2)。

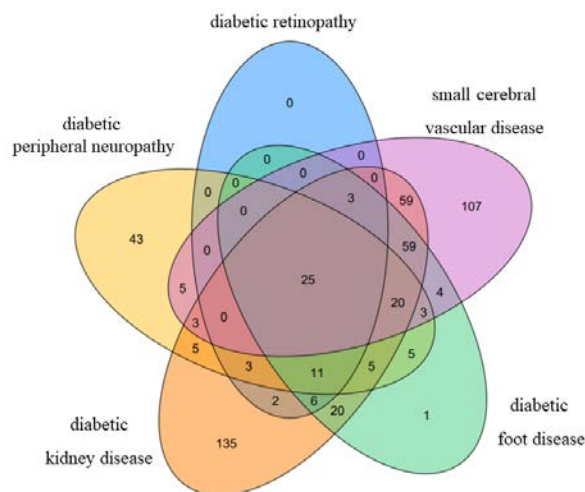


图 1 DMD 靶点基因 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of DMD targets

表 2 DMD 疾病共性靶点

Table 2 Common targets of DMD

序号	共性靶点简称	全称	Uniprot ID	中文名
1	ACE	Angiotensin I Converting Enzyme	P12821	血管紧张素转换酶
2	VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	P15692	血管内皮生长因子 A
3	TNF	Tumor Necrosis Factor	P01375	肿瘤坏死因子
4	IL6	Interleukin 6	P05231	白细胞介素 6
5	STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3	P40763	信号转导和转录激活因子 3
6	ALB	Albumin	P02768	血清白蛋白
7	PON1	Paraoxonase 1	P27169	对氧磷酶
8	PTPN22	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22	Q9Y2R2	酪氨酸蛋白磷酸酶非受体 22
9	PPARG	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma	P37231	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ
10	NOS3	Nitric Oxide Synthase 3	P29474	一氧化氮合酶 3
11	IGF1	Insulin Like Growth Factor 1	P05019	胰岛素样生长因子 1
12	INS	Insulin	P01308	胰岛素
13	LEP	Leptin	P41159	瘦素
14	ADIPOQ	Adiponectin, C1Q And Collagen Domain Containing	Q15848	脂联素
15	APOB	Apolipoprotein B	P04114	载脂蛋白 B
16	APOE	Apolipoprotein E	P02649	载脂蛋白 E
17	CRP	C-Reactive Protein	P02741	C-反应蛋白
18	IL10	Interleukin 10	P22301	白细胞介素 10
19	CCL2	C-C Motif Chemokine Ligand 2	P13500	CC 基序趋化因子 2
20	CAT	Catalase	P04040	过氧化氢酶
21	CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4	P16410	细胞毒性 T 淋巴细胞蛋白 4
22	HLA-DRB1	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-4 beta chain	P13760	HLA II 类组织相容性抗原, DRB1-4 β 链
23	EPO	Erythropoietin	P01588	促红细胞生成素
24	HFE	Homeostatic Iron Regulator	Q30201	稳态铁调节器
25	LMNA	Lamin A/C	P02545	核纤层蛋白

2.3.1 成分-潜在靶点网络构建 将整理好的成分-靶点对以 Excel.xls 格式导入 Cytoscape 3.3.0 软件, 设置网络风格化显示, 建立成分-靶点网络, 如图 2。由图可知, 该网络共有节点 1 262 个, 边 12 519 条, 其中 132 个节点代表 SJG 化学成分, 1 130 个节点代表与成分对应的靶点, 即潜在靶点。该网络的平均邻居节点数为 19.460。

2.3.2 疾病靶蛋白相互作用网络构建 将 DMD 共性靶点基因导入 String 数据库, 查询 DMD 靶点的相互作用关系, 进行可视化分析后获得疾病靶蛋白相互作用网络(图 3), 其节点数为 25, 边数为 212, 平均节点度为 17。同时使用 Cytoscape 3.3.0 的 Merge 功能, 将成分-靶点网络与疾病靶蛋白相互作

用网络互作网络取交集, 得到疾病与成分的 10 个共同靶点, 分别为 ACE、VEGFA、TNF、IL6、STAT3、ALB、PON1、PTPN22、PPARG、NOS3, 并展现于图 3 外圈。

2.3.3 成分-潜在关键靶点互作网络构建 将疾病靶点相互作用网络的疾病靶点和成分-潜在的成分靶点非重合靶点删除, 得到 SJG 治疗 DMD 的靶点的相互作用网络图, 再使用 Merge 功能将此网络图与成分-潜在靶点网络图取并集, 得到的 SJG 化学成分和疾病靶点的成分-潜在关键靶点互作网络图, 见图 4。由图可知, 该网络共有节点 95 个, 边 203 条, 其中 85 个节点代表 SJG 成分, 10 个节点代表潜在关键靶点。该网络的平均邻居节点数为 4.274。

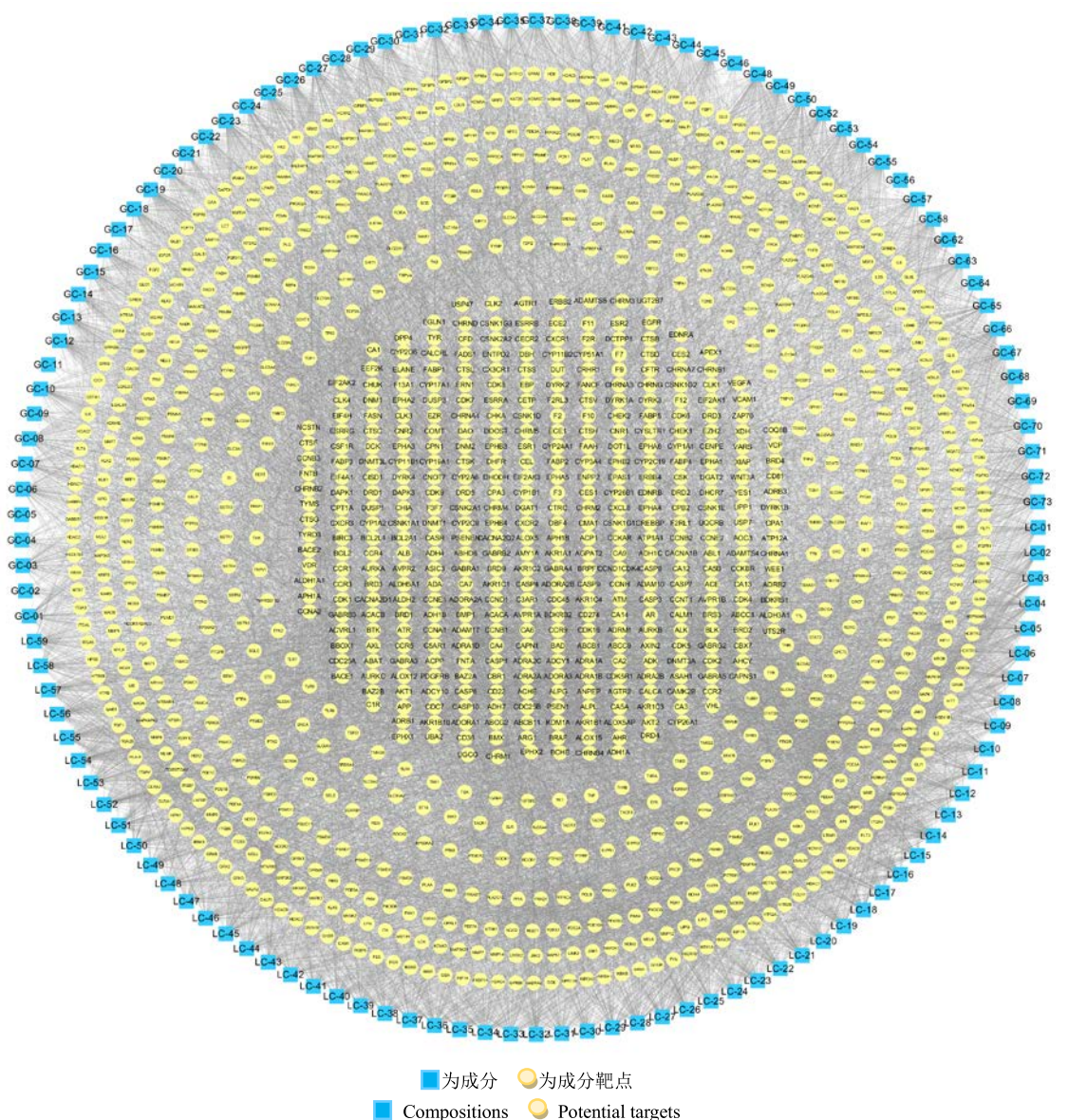


图 2 成分-潜在靶点网络图

Fig. 2 Interaction network diagram of compositions-potential targets

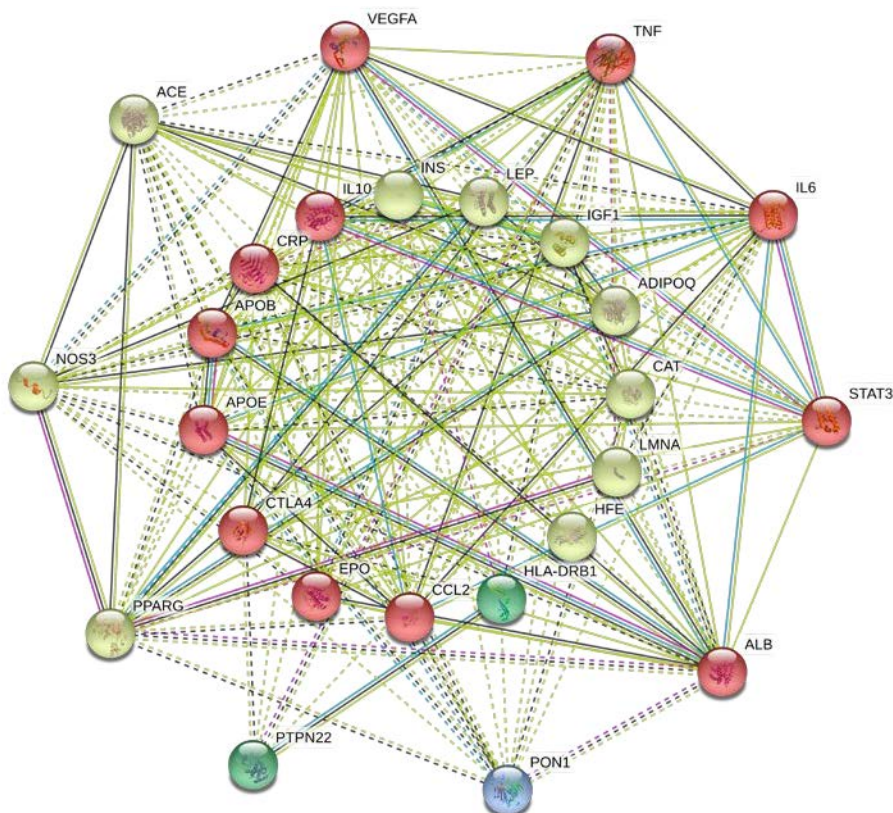


图 3 疾病靶蛋白相互作用网络

Fig. 3 Protein-protein interaction network

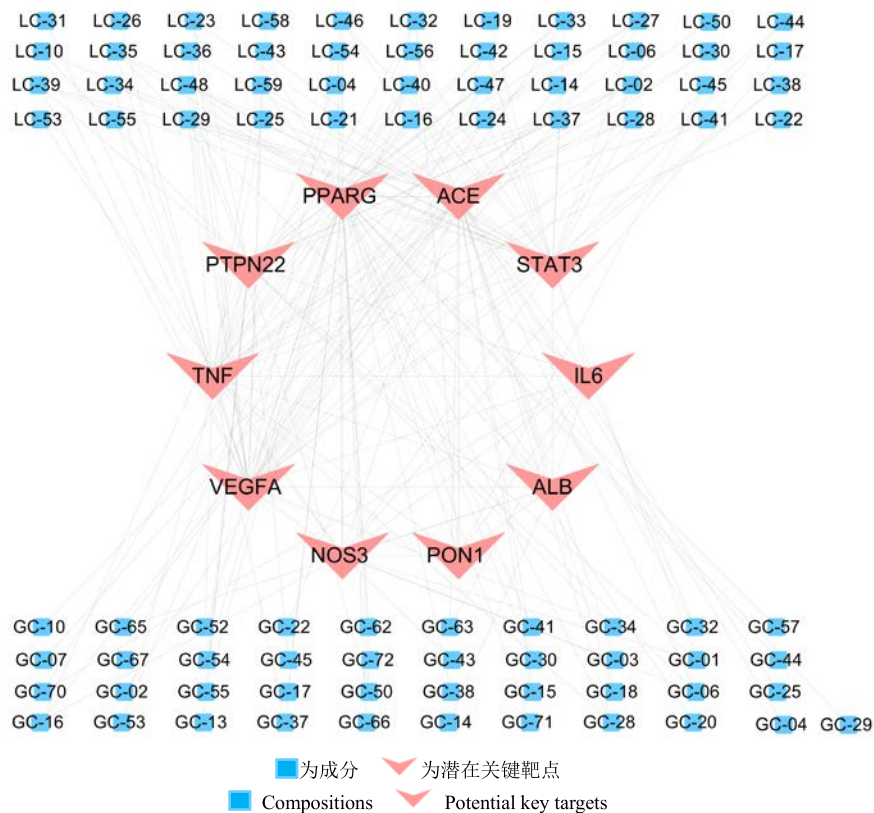


图 4 成分-潜在关键靶点互作网络图

Fig. 4 Interaction network diagram of compositions-potential key targets

2.4 潜在关键靶点基因的生物功能及通路分析

GO 分析结果表明, SJG 的 10 个潜在关键靶点基因能够调控 23 个生物过程, 包括 Toll 样受体 7 信号通路的调控 (regulation of toll-like receptor 7 signaling pathway)、嗜碱细胞趋化作用 (basophil chemotaxis)、对抗原刺激的慢性炎症反应的正调控 (positive regulation of chronic inflammatory response to antigenic stimulus)、冠状静脉形态发生 (coronary vein morphogenesis)、过氧化氢生物合成过程的负调控 (negative regulation of hydrogen peroxide biosynthetic process)、 β 干扰素分泌 (interferon-beta secretion)、调节干扰素分泌 (regulation of interferon-beta secretion)、白细胞黏附于动脉内皮细胞 (leukocyte adhesion to arterial endothelial cell)、k63

连接泛素化蛋白的阳性调控 (positive regulation of protein K63-linked ubiquitination)、蛋白激酶 D 信号的调控 (regulation of protein kinase D signaling)、血液微粒形成的正调控 (positive regulation of blood microparticle formation) 等 (图 5), 提示 SJG 在治疗 DMD 中是可以通过参与调控多种生物学过程而发挥作用。

KEGG 通路富集分析表明, SJG 的关键基因靶点富集的通路主要包括 6 条, 分别为糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、胰岛素抵抗 (insulin resistance)、肥厚性心肌病 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM)、炎症性肠病 (inflammatory

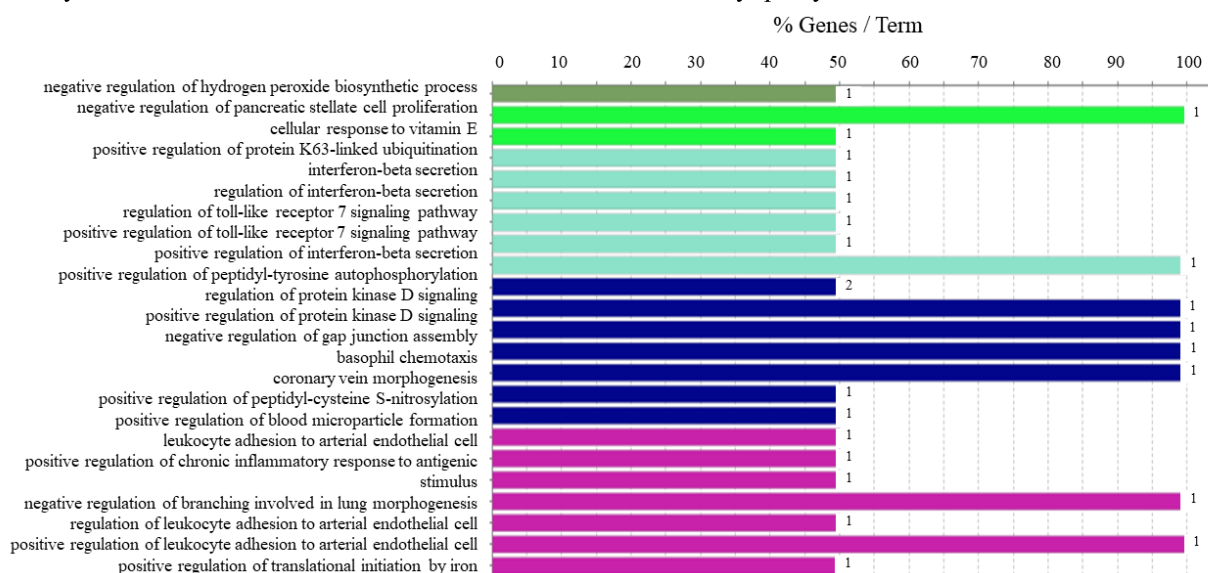


图 5 SJG 治疗 DMD 关键潜在靶点的 GO 生物学过程富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis on GO biological processes of key potential targets from ingredients of SJG for treatment of DMD

bowel disease, IBD)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 等 (图 6), 显示 SJG 的有效活性成分靶点存在于不同的通路, 与 DMD 关系密切, 能以此协同发挥治疗 DMD 作用。同时 SJG 的潜在关键靶点基因分布于不同的 DMD 通路上, 提示这些富集的 DMD 通路可作为未来研究 SJG 药对治疗 DMD 疗效的重要方向。

3 讨论

中医学认为糖尿病属于“消渴”“脾瘅”“消瘅”“肾消”等范畴; 微循环障碍与“络病”密切相关。糖尿病日久, 容易出现以下 2 种病机转变, 一则气阴两虚, 阴损及阳, 引起阴阳俱虚; 二则久病入络, 脉络失养, 引起络脉受损。糖尿病虽以阴虚为本,

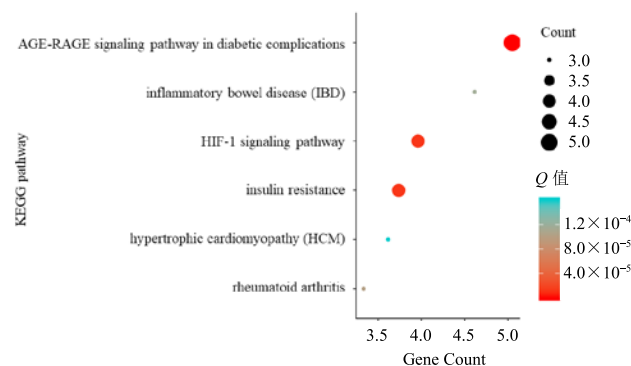


图 6 SJG 治疗 DMD 关键潜在靶点的 KEGG 代谢通路富集分析

Fig. 6 Enrichment analysis on KEGG pathways of key potential targets from main active ingredients of SJG for treatment of DMD

燥热为标,但病程日久会涉及多脏腑,出现阴阳互损,气血津液输布障碍,脉不得濡养进而引起络脉系统的损伤。正是基于糖尿病慢性并发症与络病的关系,益气养阴法在 DMD 治疗中具有重要的指导意义。SJG 适于 2 型糖尿病气阴两虚证,在中医防治 DMD 的临床实践中具有广泛的运用。方中以人参、黄芪为君药,具有补气升阳、扶阳益阴的功效;臣以生地、麦冬、天花粉清热育阴,生津润燥;佐以枸杞子、五味子、覆盆子补肾摄精,肝肾两益;使以山药、茯苓、泽泻健脾养胃,固肾渗湿,三焦并理。因此,为推动 SJG 治疗 DMD 的机制研究,本研究结合网络药理学对其进行解释和探讨。

3.1 DMD 共性靶点基因

糖尿病慢性并发症包括大血管病变和微循环障碍,发病初期多出现微循环障碍,发病隐匿,不易察觉,以累及心、脑、肾、眼底等生命器官为特点,是糖尿病防治的重点和难点。早期发现和治疗 DMD,对延缓糖尿病并发症的发生发展,改善患者生命质量有重要意义。目前,对于微循环障碍在糖尿病慢性并发症发生发展中的作用及机制多局限于单一发病部位,考虑到糖尿病慢性并发症为一系列多器官同时损伤性疾病,因此笔者以期通过整合以糖尿病肾脏病、糖尿病视网膜病变、糖尿病神经病变、糖尿病足和糖尿病合并脑小血管病为代表的 DMD 疾病靶点,进而挖掘 DMD 的 25 个共性靶点。

ACE 能够将血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II,导致血管收缩、血压升高;ACE 抑制剂常被用于糖尿病肾病的一级预防,能有效的扩张肾小球微血管,并减少微血管阻力。VEGFA 和 PON1 在血管发生和内皮细胞生长中扮演重要作用,PON1 能够增加血管通透性,造成组织缺血和新生血管生成,参与糖尿病微血管并发症的多项进程,包括糖尿病性视网膜病、糖尿病肾病终末期和糖尿病周围神经病变^[14]。Liu 等^[15]发现,糖尿病模型小鼠胰岛内皮细胞线粒体肿胀且排列紊乱,经过胰岛素治疗后,能够抑制 PECAM-1 和 VEGF-A 的表达,恢复糖尿病微血管舒缩的功能。同时,炎症反应作为糖尿病的核心病机之一,不仅可以通过引起胰岛素抵抗而导致糖尿病的发生,并且在高血糖的条件下反向刺激糖尿病的长期并发症。脂肪组织不仅是炎症的主要制造者,也是糖尿病炎症过程的目标,尤其是腹部的白色脂肪组织是产生细胞因子和许多其他参与炎症途径的生物活性物质的场所,其中包括 TNF- α 、IL-1、IL-6、

IL-10、瘦素、血管紧张素、血清白蛋白、脂联素等^[16]。脂联素是重要的脂肪因子参与控制脂肪代谢和胰岛素敏感性,通过刺激肝脏和骨骼肌中的 AMPK 磷酸化和活化,负调节 TNF- α 在肝脏和巨噬细胞中的表达,增强葡萄糖利用和脂肪酸燃烧,具有直接的抗糖尿病、动脉粥样硬化和抗炎活性^[17]。因此,VEGFA 和 PON1、TNF、IL-6 等作为 DMD 的潜在共性靶点基因,在 DMD 的发生、发展过程中共同发挥着复杂的生物学功能。

3.2 SJG 治疗循环障碍疾病潜在活性成分探讨

前期研究发现,SJG 对糖尿病引起的心、肾、眼底等器官损伤和微循环障碍具有保护和治疗作用,其机制可能与清除过氧化物、增加器官血流量、改善血液流变学和血管内皮功能有关。因此,本研究运用网络药理学的方法,能够间接预测 SJG 治疗 DMD 的活性成分和直接/间接靶点,以期为其有效成分筛选和作用机制的研究提供参考。本研究发现 SJG 中人参皂苷、黄芪甲苷、麦冬素 B、三七总皂苷、五味子醇甲等成分与多个微循环障碍疾病靶点相关,提示这些化学成分很可能发挥了治疗微循环障碍的作用,值得进一步深入探讨。

相关研究表明,人参皂苷 Rg₁ 可以通过在糖尿病视网膜病变早期激活的 IRS-1/Akt/GSK3 β 信号传导来预防 RGCs 的过度磷酸化 tau 诱导的突触神经变性^[18];CAI HA 等通过体外实验发现,人参皂苷 Rg₁ 通过调节 miR-23a 调节内皮细胞的血管生成,能够促进糖尿病足溃疡的伤口闭合和愈合^[19];人参皂苷可改善 2 型糖尿病大鼠的血糖和脂质代谢,降低血糖水平和胰岛素抵抗指数;并且人参皂苷 Rb₁ 和人参多糖共同使用时,能够发挥协同效应,调整整体肠道微生物菌群并促进粪便 β -D-葡萄糖苷酶活性,可以作为潜在的抗糖尿病药物开发,为糖尿病视网膜病变的神经保护提供治疗策略^[20]。

黄芪甲苷是黄芪中提取的主要活性成分之一,为评判黄芪质量优劣的标志物,黄芪甲苷能够增加一氧化氮产生和表达,提高超氧化物歧化酶的活性,通过减少氧化应激和钙蛋白酶-1 来改善糖尿病大鼠内皮功能障碍^[21]。此外,黄芪甲苷对糖尿病肾病的保护作用可能与通过下调 p-PERK、ATF4 和 CHOP 的表达来抑制内质网应激诱导的细胞凋亡有关^[22];人参皂苷 Rg₁ 和黄芪甲苷 IV 的组合可以通过减少氧化应激和抑制 TGF- β 1/Smads 信号级联来潜在地防治糖尿病肾病^[23]。

麦冬素 B 是一种从麦冬根中提取的甾体苷和活性化合物麦冬皂苷,能够逆转了高脂饮食诱导的肠道菌群失调,降低了厚壁菌/拟杆菌比值和内毒素携带的变形杆菌水平,改善了代谢综合征,具有抗炎、调脂的作用^[24-25]。三七皂苷可能是治疗糖尿病肾病的潜在治疗药物,能够抑制由氧化应激引起的细胞凋亡和肾纤维化而对糖尿病肾病发挥保护作用。三七皂苷能够通过启动 Wnt/ β -连环蛋白和 PI3K/AKT/GSK3 β 信号途径,正向调节 miR-29a,从而减轻 TNF- α 刺激的大鼠原代胰岛 β 细胞的凋亡^[26];同时,通过促进细胞核因子红细胞 2 相关因子 2 (Nrf2) 和血红素加氧酶-1 (HO-1) 表达,以消除诱导细胞凋亡和转化生长因子 β 信号传导的 ROS^[27]。五味子醇甲是一种来自五味子的木脂素, Jung 等^[28]发现,五味子醇甲能够激活 AMPK 途径并改善高脂饮食诱导的肝脏脂肪变性,增强乙酰辅酶 A 羧化酶和 Akt 的磷酸化,促进了葡萄糖摄取和线粒体和脂肪酸氧化基因的表达,具有抗高血糖作用。

本研究通过网络药理学预测出 SJG 治疗 DMD 的主要活性成分,与目前大量药理学研究实验结果相吻合,后期可根据潜在起作用的药效成分进行进一步处方优化或纯化精制,为 SJG 有效成分筛选提供参考。

3.3 SJG 治疗 DMD 分子机制

3.3.1 AGE-RAGE 信号通路 晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 是在衰老和高血糖病理条件,通过蛋白质、脂质和核酸的非酶促糖化和氧化产生的复杂化合物组。晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end, RAGE) 是 AGEs 的主要受体,属于免疫球蛋白超家族。AGE/RAGE 信号传导引发涉及 NADPH 氧化酶、蛋白激酶 C 和 MAPK 的多种细胞内信号通路的激活,然后导致 NF- κ B 促进炎症介质 (IL-1、IL-6 和 TNF- α) 的释放以及多种动脉粥样硬化相关基因 (VCAM-1、VEGF 和 RAGE) 的表达。此外, JAK-STAT 介导的和 PI3K-Akt 依赖性途径通过 RAGE 诱导, RAGE 分别参与细胞增殖和凋亡。在高血糖和钙化条件下, AGE/RAGE 信号通过 PKC、p38 MAPK、TGF- β 、NF κ B 和 ERK1/2 信号传导途径严重影响细胞和全身反应以增加骨基质蛋白,并激活 Nox-1 和降低 SOD-1 的表达来增加氧化应激以促进糖尿病介导的血管钙化^[29]。目前,对 AGE/RAGE 信号通路级联作用是 DMD 的研究热点,能够为糖

尿病介导的血管钙化机制研究提供参考。

3.3.2 胰岛素抵抗 胰岛素抵抗是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄取和利用的效率下降,机体代偿性的分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症,以维持血糖的稳定。胰岛素抵抗易导致代谢综合征和 2 型糖尿病,其机制包括以下几种:①通过丝氨酸/苏氨酸激酶 (如 JNK1 和 IK κ B) 和蛋白激酶 C 增加胰岛素受体底物 (IRS) 蛋白的磷酸化;②通过 mTOR 信号通路增加 IRS-1 蛋白酶体降解;③降低信号分子 (包括 PI3K 和 AKT) 的活化;④磷酸酶 (包括 PTP、PTEN 和 PP2A) 的活性增加。同时,氧化应激、线粒体功能障碍、细胞内脂质衍生物 (二酰基甘油和神经酰胺) 的积累和炎症 (通过 IL-6 和 TNFA) 都会引起胰岛素抵抗。相关研究表明,胰岛素抵抗不仅会导致 2 型糖尿病患者血液中血糖的变化,而且会产生多种行为和代谢效应,减少血脑屏障的胰岛素转运,导致线粒体功能障碍,ROS 过量产生和神经炎症,进而损害海马的认知和神经功能,导致脑小血管疾病^[30-31]。

3.3.3 HIF-1 信号通路 缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 是由缺氧激活的转录因子家族,由 3 个 α -亚基 (HIF1 α 、HIF2 α 和 HIF3 α) 和 1 个 β -亚基组成,是一种调节氧稳态的转录因子,在缺氧条件下充当许多缺氧诱导基因的主要调节因子。通过调节氧依赖性信号传导级联和随后的反应,缺氧诱导因子及其蛋白家族感知并响应向心脏进行氧输送,可改善缺血性疾病和心肌梗死代谢的变化^[32],并在代谢控制中起主要作用,影响代谢性疾病,如肥胖、2 型糖尿病和非酒精性脂肪性肝等^[33]。相关研究表明,通过抑制 HIF-1 α 的表达能够间接降低糖尿病视网膜膜中炎症因子的水平,如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ,同时抑制 HIF-1 α 也可抑制 VEGF 表达,并减少血管生成,进而改善在糖尿病导致的视网膜功能障碍,对糖尿病视网膜膜病变的发病机制及治疗具有借鉴意义^[34-35]。

3.3.4 Toll 样受体信号通路 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 是负责检测微生物病原体并产生先天免疫应答的模式识别受体。TLR 对病原体识别主要通过诱导炎症因子的产生和共刺激分子的上调,进而引起先天免疫的快速激活。糖尿病性视网膜病变是 2 型糖尿病的继发性微血管并发症之一,持续性炎症和新血管形成受损是 DR 发展的重要因素。Toll 样受体 4 作为先天免疫的关键介质,其基因的

多态性显示与糖尿病中炎症反应受损有关^[35]。Xu 等^[36]发现, TLR4 基因中的 rs1927914 和 rs1927911 单核苷酸多态性与 2 型糖尿病相关, 并且 rs1927914 与汉族人群中 DR 的易感性相关。

3.4 中医药防治微循环障碍具有较好的优势

在中医整体观念的基本思想和辨证论治具体原则的指导下, 中医药防治微循环障碍展现出较好的优势。一方面, 中药复方在治疗上强调阴阳平衡, 整体调节, 在改善胰腺功能的过程中起到双向调节作用——降糖的同时避免低血糖; 其降血糖虽然不如西药作用快, 但其重在调理, 对改善血脂、血黏度、微循环、抗氧化等都有较好作用。另一方面, 根据患者不同的体质和病征, 重视辨证施治, 坚持个体化治疗原则, 可充分发挥中药复方综合调控机体功能方面的优势。中药复方通过多渠道、多环节、多靶点对疾病进行干预, 其各组分的协同作用也逐步成分当前研究的热点之一。

综上所述, 本研究通过网络药理学的方法与发现 SJG 中的主要药效成分可通过 ACE、VEGFA、TNF、IL6、STAT3、ALB、PON1、PTPN22、PPARG、NOS3 等多个靶点参与, HIF-1 信号通路、胰岛素抵抗、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路等信号通路, 初步清晰地阐述了 SJG 的主要药效成分及其作用靶点和相关通路在 DMD 治疗中具有重要的研究价值, 不仅与当前的相关研究相互验证, 还为更多的基础研究及临床研究提供了能更加深入研究思路和研究方向。

参考文献

- [1] Avogaro A, Fadini G P. Microvascular complications in diabetes: A growing concern for cardiologists [J]. *Int J Cardiol*, 2019, 291(1): 29-35.
- [2] 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(1): 271-281.
- [3] Wu T, Qiao S, Shi C, et al. Metabolomics window into diabetic complications [J]. *J Diabetes Investig*, 2018, 9(2): 244-255.
- [4] 赵能江, 杨叔禹, 李 博. 参芪降糖颗粒治疗 2 型糖尿病临床应用专家共识 [J]. *中草药*, 2020, 51(17): 4383-4387.
- [5] 王海焱, 刘铜华. 参芪降糖颗粒治疗糖尿病肾病 Meta 分析 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2015, 17(12): 2608-2613.
- [6] 裘静英, 董志春, 王 璟. 参芪降糖颗粒联合阿托伐他汀对 2 型糖尿病合并代谢综合征胰岛 β 细胞功能、胰岛素抵抗和血管内皮细胞功能的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 7(1): 1725-1728.
- [7] 解 静, 高 杉, 李 琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [8] Wang Y L, Cui T, Li Y Z, et al. Prediction of quality markers of traditional Chinese medicines based on network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 349-356.
- [9] 张 慧, 张晓静, 姜慧洁, 等. UPLC-Q-TOF MS/MS 法分析参芪降糖颗粒化学成分 [J]. *中成药*, 2017, 39(10): 2101-2108.
- [10] Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [11] Li Y H, Yu C Y, Li X X, et al. Therapeutic target database update 2018: Enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1121-1127.
- [12] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [13] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [14] Sahebkar A, Hernandez-aguilera A, Abello D, et al. Systematic review and meta-analysis deciphering the impact of fibrates on paraoxonase-1 status [J]. *Metabolism*, 2016, 65(5): 609-622.
- [15] Liu M, Zhang X, Li A, et al. Insulin treatment restores islet microvascular vasomotion function in diabetic mice [J]. *J Diabetes*, 2017, 9(10): 958-971.
- [16] Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha T E, et al. Diabetes mellitus and inflammation [J]. *Curr Diab Rep*, 2013, 13(3): 435-444.
- [17] Sargolzaei J, Chamani E, Kazemi T, et al. The role of adiponectin and adipolin as anti-inflammatory adipokines in the formation of macrophage foam cells and their association with cardiovascular diseases [J]. *Clin Biochem*, 2018, 54(1): 1-10.
- [18] Ying Y, Zhang Y L, Ma C J, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg₁ against hyperphosphorylated Tau-induced diabetic retinal neurodegeneration via activation of IRS-1/Akt/GSK3 β signaling [J]. *J Agric*

- Food Chem*, 2019, 66(1): 1-13.
- [19] Cai H A, Huang L, Zheng L J, *et al.* Ginsenoside (Rg-1) promoted the wound closure of diabetic foot ulcer through iNOS elevation via miR-23a/IRF-1 axis [J]. *Life Sci*, 2019, 46(36): 1-10.
- [20] Li J, Li R, Li N, *et al.* Mechanism of antidiabetic and synergistic effects of ginseng polysaccharide and ginsenoside Rb₁ on diabetic rat model [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 158(1): 451-460.
- [21] Nie Q, Zhu L, Zhang L, *et al.* Astragaloside IV protects against hyperglycemia-induced vascular endothelial dysfunction by inhibiting oxidative stress and Calpain-1 activation [J]. *Life Sci*, 2019, 46(32): 1-8.
- [22] Ju Y, Su Y, Chen Q, *et al.* Protective effects of astragaloside IV on endoplasmic reticulum stress-induced renal tubular epithelial cells apoptosis in type 2 diabetic nephropathy rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109(1): 84-92.
- [23] Du N, Xu Z, Gao M, *et al.* Combination of ginsenoside Rg₁ and astragaloside IV reduces oxidative stress and inhibits TGF-beta1/Smads signaling cascade on renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12(1): 3517-3524.
- [24] Anlu W, Dongcheng C, He Z, *et al.* Using herbal medicine to target the “microbiota-metabolism-immunity” axis as possible therapy for cardiovascular disease [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142(1): 205-222.
- [25] Chen S, Li X, Liu L, *et al.* Ophiopogonin D alleviates high-fat diet-induced metabolic syndrome and changes the structure of gut microbiota in mice [J]. *FASEB J*, 2018, 32(3): 1139-1153.
- [26] Chen X, Wei R, Jin T, *et al.* Notoginsenoside R₁ alleviates TNF-alpha-induced pancreatic beta-cell Min6 apoptosis and dysfunction through up-regulation of miR-29a [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2379-2388.
- [27] Zhang B, Zhang X, Zhang C, *et al.* Notoginsenoside R₁ protects db/db mice against diabetic nephropathy via upregulation of Nrf2-mediated HO-1 expression [J]. *Molecules*, 2019, 24(2): 247-265.
- [28] Jung D Y, Kim J H, Lee H, *et al.* Antidiabetic effect of gomisins N via activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(3/4): 587-593.
- [29] Kay A M, Simpson C L. The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification [J]. *J Diabetes Res*, 2016, 115(10): 1-8.
- [30] Zhao X, Han Q, Gang X, *et al.* Altered brain metabolites in patients with diabetes mellitus and related complications - evidence from (1)H MRS study [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(5): 1-9.
- [31] Grillo C A, Woodruff J L, Macht V A, *et al.* Insulin resistance and hippocampal dysfunction: Disentangling peripheral and brain causes from consequences [J]. *Exp Neurol*, 2019, 318(1): 71-77.
- [32] Sousa Fialho M D L, Abd Jamil A H, Stannard G A, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 signalling, metabolism and its therapeutic potential in cardiovascular disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(4): 831-843.
- [33] Gonzalez F J, Xie C, Jiang C. The role of hypoxia-inducible factors in metabolic diseases [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 15(1): 21-32.
- [34] Gao X, Li Y, Wang H, *et al.* Inhibition of HIF-1alpha decreases expression of pro-inflammatory IL-6 and TNF-alpha in diabetic retinopathy [J]. *Acta Ophthalmol*, 2017, 95(8): e746-750.
- [35] Zhang D, Lv F L, Wang G H. Effects of HIF-1alpha on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(16): 5071-5076.
- [36] Xu Y, Jiang Z, Huang J, *et al.* The association between toll-like receptor 4 polymorphisms and diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes [J]. *Br J Ophthalmol*, 2015, 99(9): 1301-1305.