

基于“关键成分-潜在靶点-核心通路”交互网络的酒蒸黄连生物碱-石菖蒲挥发油配伍防治糖尿病认知功能障碍机制研究

李思颖¹, 李佳川^{1*}, 宋琴¹, 于露^{2*}, 汪窝牛¹, 王优¹

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 四川省医学科学院·四川省人民医院 呼吸与危重症医学科, 四川 成都 610072

摘要: 目的 运用网络药理学预测酒蒸黄连-石菖蒲治疗糖尿病认知功能障碍的作用机制, 并进行相关实验验证。方法 通过 TCMSP 数据库、SwissTargetPrediction 在线平台、GeneCards 数据库筛选出酒蒸黄连和石菖蒲的主要活性成分、作用靶点和疾病靶点, 借助 DAVID 6.8 数据库进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 利用 STRING 数据库和 Cystoscope 3.8.1 软件分别构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络和“药物-关键成分-潜在靶点-核心通路”网络, 预测药物防治糖尿病认知功能障碍的作用机制。建立大鼠糖尿病认知功能障碍复合模型, 给予酒蒸黄连-石菖蒲进行干预, 检测各组大鼠空腹血糖、血清胰岛素、稳态模型胰岛素抵抗指数 (homeostasis model of insulin resistance, HOMA-IR) 和胰岛素敏感指数 (insulin sensitivity index, IAI); 检测各组大鼠海马组织中乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 含量以及乙酰胆碱酯酶 (acetyl cholinesterase, AchE) 和乙酰胆碱转移酶 (choline acetyl transferase, ChAT) 活性; 采用免疫组化法测定各组大鼠海马组织中 β -淀粉样蛋白 42 (β -amyloid protein 42, A β ₄₂)、AchE 和 ChAT 蛋白表达; 采用 Western blotting 法测定各组大鼠海马组织中与糖代谢相关的胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β) 的蛋白表达及磷酸化水平, 以及与炎症反应相关的白细胞介素-1 β (interleukin-1, IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的蛋白表达, 系统观察并验证酒蒸黄连-石菖蒲治疗糖尿病认知功能障碍的作用及机制。**结果** 筛选出酒蒸黄连-石菖蒲有效活性成分 16 个, 与糖尿病认知功能障碍相关的候选靶点 84 个; KEGG 通路分析发现, 酒蒸黄连-石菖蒲可能通过作用于 PI3K-Akt 信号通路、胰岛素信号通路、胆碱能通路、糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs)-AGE 受体 (receptor of AGE, RAGE) 信号通路及炎症相关途径治疗糖尿病认知功能障碍。验证性实验结果显示, 酒蒸黄连-石菖蒲显著降低糖尿病认知功能障碍大鼠空腹血糖和 HOMA-IR ($P < 0.05$ 、 0.01), 提高 IAI ($P < 0.01$); 抑制海马组织中 A β ₄₂ 蛋白表达 ($P < 0.05$), 减少 A β 生成; 增加海马组织中 Ach 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 增加 ChAT 活性及蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低 AchE 活性及蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 上调海马组织中 IRS、PI3K、Akt 和 GSK3 β 的磷酸化水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 网络药理学预测结果和动物实验结果相呼应, 均表明酒蒸黄连-石菖蒲组可能通过调节糖代谢、改善胰岛素抵抗、抑制炎症因子表达、抗神经细胞凋亡以及调控 PI3K-Akt、AGE-RAGE、胰岛素、胆碱能等相关通路, 发挥治疗糖尿病及其并发的认知功能障碍作用。

关键词: 酒蒸黄连; 石菖蒲; 组分配伍; 糖尿病认知功能障碍; 网络药理学; PI3K-Akt; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)19-5910-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.014

Mechanism of alkaloids from wine steamed *Coptidis Rhizoma*-volatile oil from *Acori Tatarinowii Rhizoma* on prevention and treatment of diabetic cognitive impairment based on interactive network of “key components-potential targets-core pathway”

LI Si-ying¹, LI Jia-chuan¹, SONG Qin¹, YU Lu², WANG Wo-niu¹, WANG You¹

收稿日期: 2021-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302912); 西南民族大学研究生创新型科研项目 (CX2020SZ82)

作者简介: 李思颖 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。Tel: 13577846028 E-mail: 846056807@qq.com

*通信作者: 李佳川 (1984—), 男, 博士后, 副教授, 研究方向为中药及民族药物创新研究与开发。Tel: 13060003213 E-mail: ligat@163.com

于露 (1982—), 女, 硕士, 研究方向为中医药防治呼吸系统及内分泌疾病。E-mail: 244560349@qq.com

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China
2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

Abstract: Objective To predict the mechanism of wine steamed Huanglian (*Coptidis Rhizoma*)-Shichangpu (*Acori Tatarinowii Rhizoma*) by network pharmacology in the treatment of diabetic cognitive impairment, and to verify it by experiments. **Methods** TCMS database, Swiss Target Prediction database and GeneCards database were used to screen the main active components, action targets of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* and disease targets; DAVID 6.8 database was used to conducted Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis; STRING database and Cystoscope 3.8.1 software were used to build protein-protein interaction (PPI) network and “drugs-key components-potential targets-core pathways” network, predict the mechanism of drug prevention and treatment of diabetic cognitive impairment. Diabetic cognitive impairment model in rats was established, wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* were given for intervention, fasting blood glucose, serum insulin, homeostasis model of insulin resistance (HOMA-IR) and insulin sensitivity index (IAI) of rats in each group were detected; Acetylcholine (Ach) content, acetyl cholinesterase (AchE) and acetylcholine acetyl transferase (ChAT) activities in hippocampus of rats in each group were detected; Immunohistochemical method was used to determine the expressions of β -amyloid protein 42 ($A\beta_{42}$), AchE and ChAT in hippocampal of rats in each group; Western blotting was used to determine the protein expressions and phosphorylation level of insulin receptor substrate (IRS), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) related to glucose metabolism in hippocampus of rats in each group, protein expressions of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) related to inflammation, in order to observe and verify the effect and mechanism of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* in the treatment of diabetic cognitive dysfunction. **Results** A total of 16 effective active ingredients of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma*, and 84 candidate targets related to diabetic cognitive dysfunction were screened out. KEGG pathway analysis found that wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* treated diabetic cognitive dysfunction through PI3K-Akt signaling pathway, insulin signaling pathway, cholinergic pathway, advanced glycation end products (AGE)-receptor of AGE (RAGE) signaling pathway and inflammation-related pathways. The confirmatory experiment results showed that wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* significantly reduced fasting blood glucose and HOMA-IR ($P < 0.05, 0.01$) in rats with diabetic cognitive dysfunction, and increased IAI ($P < 0.01$); $A\beta_{42}$ protein expression in hippocampus was inhibited ($P < 0.05$), $A\beta$ production was reduced; Ach content in hippocampus was increased ($P < 0.05, 0.01$), ChAT activity and protein expression were increased ($P < 0.05, 0.01$), AchE activity and protein expression were decreased ($P < 0.05, 0.01$); The phosphorylation levels of IRS, PI3K, Akt and GSK3 β in hippocampus were up-regulated ($P < 0.05, 0.01$), the protein expressions of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were reduced ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The prediction results of network pharmacology correspond to the results of animal experiments, and both indicate that the components of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* may regulate glucose metabolism, improve insulin resistance, inhibit the expressions of inflammatory factors, resist neuronal apoptosis, regulate PI3K-Akt, AGE-RAGE, insulin, cholinergic and other related pathways, then play the role of treating diabetes and its concurrent cognitive dysfunction.

Key words: wine steamed *Coptidis Rhizoma*; *Acori Tatarinowii Rhizoma*; component compatibility; diabetic cognitive impairment; network pharmacology; PI3K-Akt; inflammatory response

近年来,随着人口老龄化以及肥胖症人群日益增多,我国糖尿病患者发病率不断增加且伴有年轻化趋势,以学习记忆能力下降和认知功能损害为主的糖尿病认知功能障碍(diabetic cognitive impairment, DCI)在糖尿病患者中普遍流行,特别是老年患者更为频发,已经严重影响到人类生命健康。现代医学认为,DCI的主要病理基础为高血糖、高血脂、氧化应激、炎性反应、胰岛素信号转导途径受损、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)

生成增加、 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, $A\beta$)沉积、神经元存活信号传导通路障碍、胆碱能通路受损等^[1-2]。从中医角度看,糖尿病是由血糖水平升高等因素引起的络脉损伤疾病,又称糖络病,其中血糖升高是因、络脉损伤为果,一旦伤“络”则并发病丛生,若损伤脑络则诱发认知功能损伤,故防治以控糖为主,并全程重视络脉调畅^[3]。目前尚无治疗DCI的特效药物,西医治疗DCI主要以服用降血糖、改善IR和抗阿尔茨海默症药物为主,但疗效并不显著,而中医药讲究辨证施治、糖络同治,其

多成分、多靶点、多途径协同作用的特征在糖尿病及其并发症的防治中具有重要的意义和应用价值。

本课题组前期对酒蒸黄连-石菖蒲组分配伍规律^[4-5]及其防治 DCI 相关实验研究显示^[6-7], 酒蒸黄连-石菖蒲能够显著改善糖脂代谢紊乱、IR 和认知功能损伤, 且酒蒸黄连无论是降糖效果还是对糖脂代谢的调控作用均优于黄连生品, 该组方配伍是治疗 DCI 最好的用药体现, 既体现了中药组分配伍现代研究新模式, 又突显中医药随证炮制的用药特色。目前对于酒蒸黄连-石菖蒲组分治疗 DCI 具体作用机制的相关研究甚少。因此, 为进一步揭示酒蒸黄连-石菖蒲组分配伍机制, 本研究在文献回顾基础上, 运用现代网络药理学的分析方法^[8], 通过构建“关键成分-潜在靶点-核心通路”交互网络, 深入探讨酒蒸黄连-石菖蒲防治 DCI 的潜在作用靶点及机制, 并进行相关验证性实验, 以期揭示酒蒸黄连-石菖蒲抗 DCI 的作用机制, 为指导中医药防治糖尿病及其并发的认知障碍临床用药提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 Wister 大鼠, 7 周龄, 体质量 270~300 g, 由四川省医学科学院实验动物研究所提供, 动物许可证号 SCXK (川) 2015-030。动物于西南民族大学药学院 SPF 级动物实验室适应性饲养 1 周, 温度 (24±2) °C, 相对湿度 (55±5) %, 每 12 小时昼夜间断性照明。动物实验经西南大学药学院实验动物伦理委员会批准 (批准号 201810)。

1.2 药材

黄连 (批号 161020)、石菖蒲 (批号 161101) 购自四川德仁堂中药饮片有限公司, 经西南民族大学药学院李佳川副教授鉴定分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott. 的干燥根茎。

1.3 药品与试剂

盐酸二甲双胍片 (0.25 g/片, 批号 G0120160302) 购自北京中惠药业有限公司; 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 批号 5756) 购自美国 Sigma 公司; 血糖测定试剂盒 (批号 1209091) 购自四川迈克科技有限责任公司; 胰岛素酶联免疫分析测定试剂盒 (批号 201608) 购自美国 R&D 公司; 乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 试剂盒 (批号 20170513)、乙酰胆碱酯酶 (acetyl cholinesterase, AchE) 试剂盒 (批号 20170513) 和乙酰胆碱转移酶 (choline acetyl

transferase, ChAT) 试剂盒 (批号 20170513) 购自南京建成生物工程研究所; AchE 兔多克隆抗体 (批号 17975-1-AP)、ChAT 兔多克隆抗体 (批号 24418-1-AP)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 抗体 (批号 16806-1-AP)、IL-6 抗体 (批号 21865-1-AP)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抗体 (批号 17590-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司; A β ₄₂ 兔多克隆抗体 (批号 ab68896) 购自英国 Abcam 公司; 磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, Akt) 抗体 (批号 11054)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β) 抗体 (批号 11002)、GSK3 β 抗体 (批号 40989)、Akt 抗体 (批号 21054) 购自美国 SAB 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体 (批号 bs0295G-HRP) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 磷酸化胰岛素受体底物 (phosphorylated insulin receptor substrate, p-IRS) 抗体 (批号 2385S)、IRS 抗体 (批号 2382S)、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K) 抗体 (批号 4228S)、PI3K 抗体 (批号 4292S)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 5174S) 购自美国 CST 公司。

1.4 仪器

SN-3001 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ChemiDoc 蛋白质印迹转移装置、Image Quant 300 型凝胶分析成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); BA400 型数码三目摄像显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司)。

2 方法

2.1 酒蒸黄连生物碱组分与石菖蒲挥发油组分的制备

称取适量黄连药材, 加入 20% 黄酒浸润 2 h, 加热蒸煮 8 h, 得到酒蒸黄连炮制药材^[9]; 取炮制好的酒蒸黄连药材, 用 75% 乙醇回流提取 3 次, 1.5 h/次, 合并提取液并旋蒸回收乙醇, 用蒸馏水稀释成含生药量 1 g/mL 的溶液, 并用 D-101 大孔树脂分离纯化, 60 °C 减压真空干燥, 经 HPLC 检测, 得到总生物碱质量分数为 65.47% 的酒蒸黄连生物碱组分^[6]。

称取适量干燥石菖蒲药材, 粉碎后过筛, 加入 10 倍量蒸馏水, 采用水蒸气蒸馏法加热回流 8 h, 将收集到的挥发油组分用无水 Na₂SO₄ 脱水, 并采用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 对浅黄色挥发

油组分进行分析, 得到提取率为 1.67% 的石菖蒲挥发油组分^[6]。

根据本课题组前期研究^[5], 得到酒蒸黄连-石菖蒲组分的最佳配比为酒蒸黄连总生物碱 54.7 mg、石菖蒲挥发油 4.17 mg(以原药材计, 酒蒸黄连 0.835 g、石菖蒲 2.5 g), 即配比为 0.33 : 1。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 酒蒸黄连-石菖蒲活性成分及作用靶点的收集 在文献资料和已有的药效物质基础上^[10-11], 借助 TCMSp 数据库 (<https://tcmsp.com/tcmsp.php>) 和 TCM 数据库 (<http://tcm.cmu.edu.tw/zh-tw/>) 对“黄连”“石菖蒲”所含化学成分进行查询, 参考 TCMSp 数据库的最新使用指南, 以口服生物利用度 $\geq 20\%$ 且类药性 ≥ 0.10 为标准, 筛选出黄连和石菖蒲的活性成分, 并结合本课题组前期对酒蒸黄连生物碱各组分的 HPLC 分析及石菖蒲挥发油组分的 GC-MS 分析结果^[6], 对活性成分进行补充。利用活性成分 CAS 号, 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中检索各成分的简化分子线性格式 SMILES, 并保存。将活性成分的 SMILES 式输入到 SwissTargetPrediction 平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 得到活性成分的作用靶点。

2.2.2 疾病靶点的获取 以“糖尿病脑病”“糖尿病认知功能障碍”为关键词, 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中检索与疾病相关的靶点, 并对所得靶点进行筛选, 得到 DCI 的疾病靶点。

2.2.3 药物与疾病共有靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将上述药物靶点与疾病靶点上传至 Venny 2.1 平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 绘制韦恩图, 取二者的交集, 即为药物与疾病的共有靶点。为了更好地说明药物靶点与疾病靶点间的相互作用关系及核心作用靶点的挖掘, 将共有靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 获取蛋白互作信息, 将数据导入 Cytoscape 3.8.1 软件绘制 PPI 网络图, 并对 PPI 网络进行拓扑学分析。

2.2.4 富集分析 为了阐明各活性成分的作用靶点在信号通路中的作用以及明确药物的作用机制, 利用 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 对药物与疾病的共有靶点进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析, 从富集结果中选取 $P < 0.05$ 的通路, 并采用 OmicShare Tools 在线平台

(<https://www.omicshare.com/tools/>) 和 FunRich 3.1.3 软件将富集结果可视化, 进而预测酒蒸黄连-石菖蒲治疗 DCI 可能的作用机制。

2.2.5 “药物-关键成分-潜在靶点-核心通路”网络的构建 将药物活性成分及作用靶点导入 Cytoscape 3.8.1 软件, 构建“成分-靶点”网络; 利用 Cytoscape 3.8.1 软件中的 Merge 工具将“成分-靶点”网络与 PPI 网络合并, 得到“成分-靶点-疾病”网络, 计算度值、中心介度和紧密度的中位数, 选取同时大于等于这 3 个拓扑学参数中位数的节点, 进一步构建“药物-成分-靶点-疾病”核心网络。同时, 将 KEGG 富集结果中 P 值较显著的关键信号通路映射到“药物-成分-靶点-疾病”核心网络中, 得到“药物-关键成分-潜在靶点-核心通路”网络。

2.3 动物实验验证

2.3.1 DCI 模型的建立^[6]、分组与给药 随机选取 10 只大鼠作为对照组, 其余大鼠禁食 18 h, 于次日 ip STZ 溶液 (40 mg/kg), 对照组 ip 等体积 0.1 mol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液, 72 h 后检测造模组大鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 将 $FBG \geq 11.1$ mmol/L 的造模大鼠按血糖及体质量随机分为对照组、模型组、二甲双胍 (250 mg/kg) 组和酒蒸黄连-石菖蒲高、低剂量 (180、80 mg/kg) 组, 每组 10 只。二甲双胍溶于蒸馏水配制为 2.5% 的溶液, 酒蒸黄连-石菖蒲组溶于蒸馏水分别配制成质量浓度为 18、8 mg/mL 的溶液, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 24 周。称取猪油、胆固醇、猪胆酸钠和蔗糖 (2 : 1 : 0.05 : 2), 采用严平等^[12]方法制成高脂高糖乳液。实验期间除对照组外, 其余各组大鼠连续 24 周喂食高脂高糖乳液 (10 mL/kg), 且从第 20 周开始, 连续 4 周 sc D-半乳糖 (50 mg/kg) ^[6]。

2.3.2 各组大鼠 FBG 及血清胰岛素的测定 分别于给药前以及给药后第 24 周, 大鼠禁食不禁水 8 h, 给予药物 1 h 后, 尾尖取血, 测定给药前后 FBG, 计算末次给药前后的血糖变化率。

大鼠 ip 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉, 股动脉取血, 分离血清, 测定大鼠血清胰岛素 (insulin, Ins) 含量, 并根据末次给药后 FBG 和 Ins 值计算稳态模型胰岛素抵抗指数 (homeostasis model of insulin resistance, HOMA-IR) 和胰岛素敏感指数 (insulin sensitivity index, IAI)。

2.3.3 各组大鼠海马组织 A β ₄₂、AChE 和 ChAT 蛋

白表达的检测 大鼠处死后迅速取海马组织,用预冷的0.9%氯化钠溶液冲洗,拭干表面水分,于液氮中冷冻保存备用。取部分海马组织,于4%多聚甲醛中固定,经石蜡包埋、切片、脱水后,采用免疫组织化学SABC染色法进一步处理^[13],于显微镜下观察A β ₄₂、AChE和ChAT蛋白表达情况。阳性表达为浅黄或棕黄色,一般在胞质、细胞膜或细胞间质内显色,阴性表达则为蓝色。

2.3.4 各组大鼠海马组织 Ach 含量以及 AChE、ChAT 活性的检测 取各组大鼠海马组织,加入预冷的0.9%氯化钠溶液匀浆,3000 r/min离心10 min,取上清液,按试剂盒说明书测定海马组织 Ach 含量以及 AChE、ChAT 活性。

2.3.5 各组大鼠海马组织 p-IRS、IRS、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-GSK3 β 、GSK3 β 、IL-1 β 、IL-6和 TNF- α 蛋白表达的检测 取各组大鼠海马组织,按照文献方法^[14]测定大鼠海马组织中糖代谢主要途径相关的 IRS、PI3K、Akt、GSK3 β 的蛋白表达及磷酸化水平,同时测定与炎症反应相关的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达情况。

2.3.6 数据统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用单因素方差分析进行组间比较。

3 结果

3.1 网络药理分析结果

3.1.1 药物活性成分的筛选及作用靶点的预测 共得到21种活性成分,其中酒蒸黄连16种、石菖蒲5种。通过 SwissTargetPrediction 平台对活性成分进行靶点预测,去重筛选后共获得525个作用靶点。

3.1.2 疾病相关靶点的预测 利用 GeneCards 数据库检索与 DCI 疾病相关的靶点,计算相关性分数的中位数为4.55,故选取相关性分数 ≥ 4.55 的靶点,去重后得到3034个疾病相关靶点。

3.1.3 PPI 网络的构建 将药物作用靶点和 DCI 靶点取交集,得到药物与疾病共有靶点303个,提示这303个共有靶点可能是酒蒸黄连-石菖蒲治疗 DCI 的候选靶点。PPI 网络如图1所示,节点代表靶点,节点大小代表度值大小,每条边代表蛋白互作关系,网络图显示各个靶点间的关系密切,表明药物治疗疾病的作用机制复杂多样,是多个靶点之间的协同作用,并非靠单一靶点来防治疾病。借助 Cytoscape 3.8.1 软件的 MCODE 功能进行聚类分析,得到5个聚类网络,其中红色聚类网络分值最高,提示它可

能是该网络中关键靶点的聚类。

3.1.4 候选靶点通路分析 对303个候选靶点进行 KEGG 通路分析,得到 $P < 0.05$ 的信号通路共179条,主要涉及神经、血管、炎症、氧化应激、胰岛素分泌、糖脂代谢等方面。选择富集结果中 P 值较为显著的20条通路进行展示(图2),其中与 DCI 疾病进程密切相关的通路主要为 AGE-AGE 受体(receptor of AGE, RAGE)信号通路、胰岛素抵抗、神经营养信号通路、PI3K-Akt 信号通路、2型糖尿病、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路、TNF 信号通路、胰岛素信号通路、阿尔茨海默症、胆碱能通路、长时程增强、胰高血糖素信号通路、核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路、胰岛素分泌和胆固醇代谢。

3.1.5 “药物-关键成分-潜在靶点-核心通路”网络的构建 网络中常用度值作为衡量节点重要性的关键指标,节点度值越大、连接的化合物或靶点越多,表明该节点越重要,则其代表的化合物或靶点越有可能在药物治疗疾病过程中发挥关键作用。“药物-关键成分-潜在靶点-核心通路”网络如图3所示,包含234个节点、2924条边,其中高于度值中位数的活性成分有16个,排序靠前的成分为小檗碱、黄连碱、小檗浸碱、巴马汀、表小檗碱、非洲防己碱、药根碱和 β -细辛醚,且在 TCMSp 查询中,这几种成分的血脑屏障透过率均大于0,良好的血脑屏障透过率为其提供了治疗脑部疾病的可能性,其中血脑屏障透过率最高的成分是 β -细辛醚,与石菖蒲开窍醒脑的功效吻合,提示以上成分可能在酒蒸黄连-石菖蒲治疗 DCI 过程中发挥重要作用。高于度值中位数的靶点有84个,结合 PPI 聚类网络,提示 AKT1、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPARG)、INSR、胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGFIR)、GSK3B、淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)、微管相关蛋白 tau(microtubule-associated protein tau, MAPT)、TNF、前列腺素 G/H 合成酶2(prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、ACHE 等靶点可能是酒蒸黄连-石菖蒲防治 DCI 的关键作用靶点,这些靶点主要参与机体的糖脂代谢、氧化应激、炎症反应、血管病变、神经元细胞调控、AGEs 增生、胰岛素信号传导及 IR 等过程,与糖尿病及其认知功能障碍密切相关。与

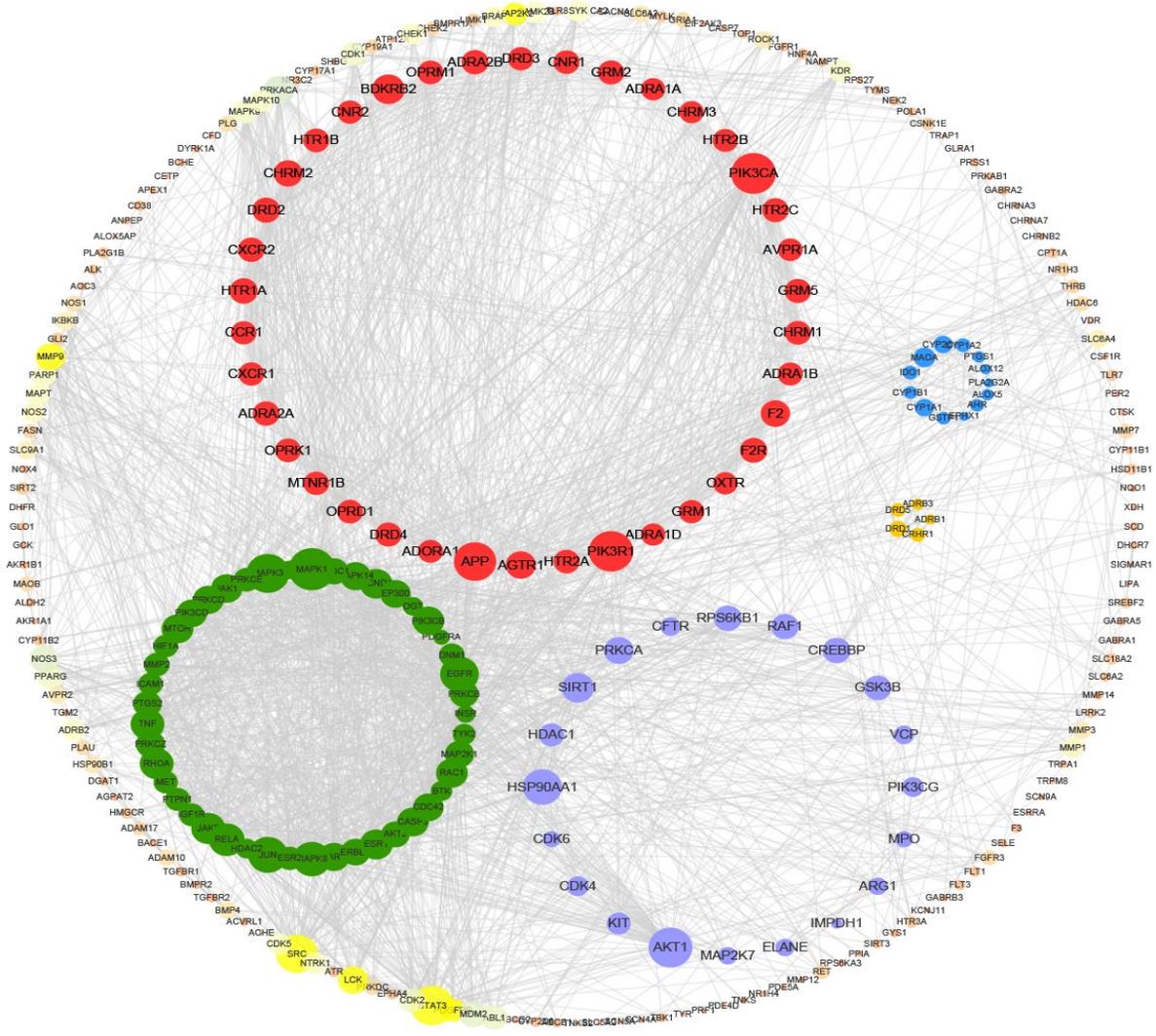


图 1 药物和疾病交集靶点的 PPI 网络

Fig. 1 PPI network of drug and disease intersection targets

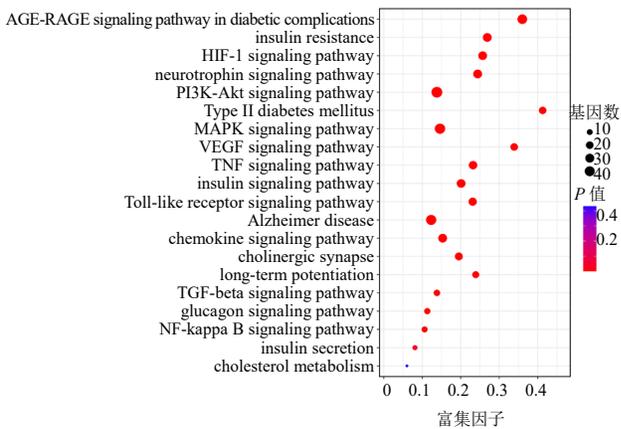


图 2 KEGG 通路富集分析 (前 20)

Fig. 2 KEGG pathway enrichment analysis (top 20)

药物关键成分、潜在靶点关联程度较高的通路为 PI3K-Akt 信号通路、胰岛素抵抗及胰岛素转导相关

途径、AGE-RAGE 信号通路、TNF 炎症通路、胆碱能通路。在预测的潜在靶点中,与 PI3K-Akt 信号通路密切相关的是 AKT1 和 GSK3B,与胰岛素抵抗及胰岛素转导相关途径密切相关的是 AKT1、GSK3B、INSR 和 IGFIR,与 AGE-RAGE 信号通路密切相关的是 GSK3B、APP 和 MAPT,与 TNF 炎症通路相关的是 TNF 和 PTGS2,与胆碱能通路密切相关的是 ACHE,提示上述靶点和通路可能是酒蒸黄连-石菖蒲组分抗 DCI 的潜在作用靶点和核心途径。“药物-关键成分-潜在靶点-核心通路”网络揭示了多个靶点可以对应同一种成分,一个靶点也可以对应多种不同的成分,且药物作用靶点分布于多条信号通路中,表明酒蒸黄连-石菖蒲组分中多个成分可作用于多个靶点并通过多条通路协同发挥治疗作用,体现了中药多成分、多靶点、多通路及整体性的特点。

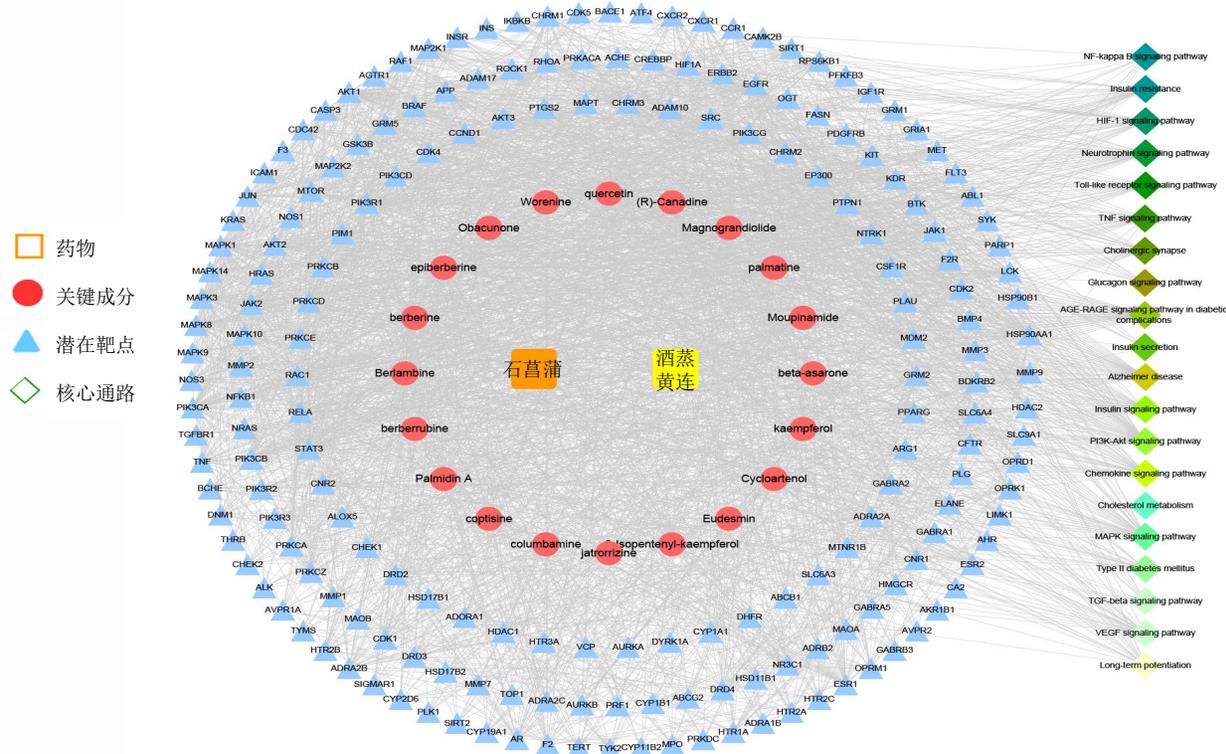


图3 “药物-关键成分-潜在靶点-核心通路”网络

Fig. 3 “Drug-key components-potential targets-core pathway” network

3.2 动物实验验证结果

3.2.1 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠 FBG 的影响 大鼠 ip STZ 72 h 后, 均出现多饮、多食、多尿的典型高血糖症状, 连续喂食高脂高糖乳液后, 模型组大鼠出现日益消瘦、体质量下降、皮毛稀疏、大便便溏等情况, 且 Morris 水迷宫实验显示模型组大鼠逃避潜伏期较对照组明显延长^[6], 上述均表明 DCI 模型建立成功; 给予药物后, 上述症状均有所改善。如表 1 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠 ip 小剂量 STZ 后 FBG 明显增高 ($P < 0.01$), 随着高脂高糖饲料不断摄入, 大鼠 FBG 略有升高后开始稳定, 并保持高血糖状态。酒蒸黄连-石菖蒲显著降低 DCI 大

鼠 FBG ($P < 0.05$ 、0.01), 降糖率最高达到 38.49%。

3.2.2 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠血清 Ins 及相关抵抗指数的影响 如表 2 所示, 与对照组相比, 模型组血清 Ins 含量明显降低 ($P < 0.01$), HOMA-IR 显著升高 ($P < 0.01$), IAI 显著下降 ($P < 0.01$), 表明 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗模型制备成功。与模型组相比, 给药 24 周后, 酒蒸黄连-石菖蒲高剂量组大鼠 HOMA-IR 显著降低 ($P < 0.01$), IAI 显著升高 ($P < 0.01$), 但对血清 Ins 含量无显著影响, 表明酒蒸黄连-石菖蒲能够有效改善 2 型糖尿病大鼠 IR, 使胰岛 β 细胞功能恢复正常, 提高机体对胰岛素的敏感性。

表 1 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on FBG in DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FBG/(mmol·L ⁻¹)		血糖变化率/%
		给药前	给药后 24 周	
对照	—	6.53 ± 0.42	6.28 ± 0.51	-3.83
模型	—	27.83 ± 3.25 ^{##}	26.66 ± 3.01 ^{##}	-4.92
二甲双胍	250	27.97 ± 4.02	13.62 ± 2.12 ^{**}	-45.94
酒蒸黄连-石菖蒲	180	28.06 ± 3.48	17.66 ± 3.28 ^{**}	-38.49
	80	28.91 ± 3.77	21.54 ± 2.02 [*]	-25.49

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

表2 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠血清 Ins 及相关抵抗指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on serum Ins and related resistance index in DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Ins/(mU·L ⁻¹)	HOMA-IR	IAI/(×10 ⁻²)
对照	—	9.054±0.103	2.527±0.374	1.759±0.113
模型	—	7.806±0.276 ^{##}	9.231±1.411 ^{##}	0.487±0.072 ^{##}
二甲双胍	250	8.467±0.182	5.246±0.984 ^{**}	0.847±0.115 ^{**}
酒蒸黄连-石菖蒲	180	7.941±0.297	6.233±0.872 ^{**}	0.713±0.081 ^{**}
	80	7.874±0.223	7.578±1.117	0.590±0.107

3.2.3 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠海马组织中 Aβ₄₂ 蛋白表达的影响 Aβ 在脑内大量聚集产生神经毒性而损伤脑组织,影响学习记忆能力,在认知障碍的病程进展中发挥主要作用。如图 4 和表 3 所示,与对照组相比,模型组海马组织中 Aβ₄₂ 蛋白阳性表达明显升高 (P<0.01);与模型组相比,酒蒸黄连-石菖蒲组海马组织 Aβ₄₂ 蛋白阳性表达显著降

低 (P<0.05),表明酒蒸黄连-石菖蒲可减少 Aβ 的生成,从而保护神经元并改善认知功能损伤。

3.2.4 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠海马组织胆碱能通路相关生化指标的影响 如表 4、图 5 和表 5 所示,与对照组相比,模型组海马组织中 Ach 含量显著降低 (P<0.01),ChAT 活性及蛋白表达均显著下降 (P<0.01),AchE 活性及蛋白表达明显升高

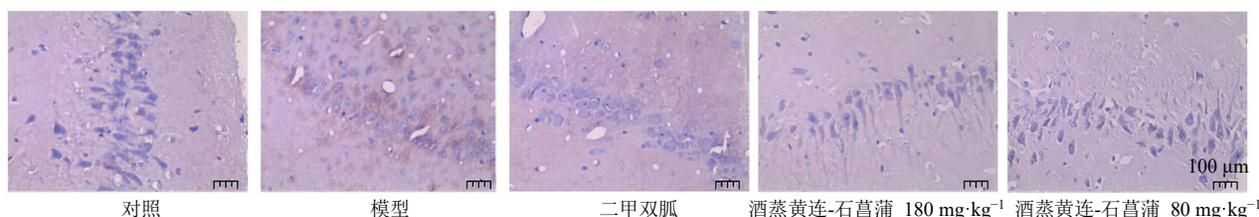


图4 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠海马组织中 Aβ₄₂ 蛋白表达的影响 (×400)

Fig. 4 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on Aβ₄₂ protein expression in hippocampus of DCI rats (×400)

表3 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠海马组织中 Aβ₄₂ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on Aβ₄₂ protein expression in hippocampus of DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	A 值
对照	—	0.182 8±0.006 1
模型	—	0.248 7±0.008 6 ^{##}
二甲双胍	250	0.199 0±0.007 8 [*]
酒蒸黄连-石菖蒲	180	0.202 9±0.006 0 [*]
	80	0.209 1±0.007 5 [*]

(P<0.01),表明高糖高脂状态使 AchE 和 ChAT 2 个关键酶受到影响,导致 Ach 合成受到抑制,进一步引发认知功能损伤。与模型组相比,酒蒸黄连-石菖蒲各剂量组 Ach 含量显著升高 (P<0.05、0.01),ChAT 活性及蛋白表达均显著升高 (P<0.05、0.01),AchE 活性明显降低 (P<0.05、0.01);酒蒸黄连-石菖蒲高剂量组 AchE 蛋白表达明显降低 (P<0.01),表明酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠脑组织中的 Ach 合成有一定促进作用,可通过增强胆碱能信号通路来改善认知功能障碍。

表4 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠海马组织中 Ach 含量以及 AchE、ChAT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on Ach content, AchE and ChAT activities in hippocampus of DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Ach/(μg·mg ⁻¹)	AchE/(U·mg ⁻¹)	ChAT/(U·g ⁻¹)
对照	—	182.72±12.17	2.532±0.529	164.72±10.61
模型	—	119.23±10.65 ^{##}	5.297±0.664 ^{##}	82.33±9.87 ^{##}
二甲双胍	250	145.94±15.61 [*]	3.746±0.351 ^{**}	105.81±7.43 [*]
酒蒸黄连-石菖蒲	180	155.16±13.84 ^{**}	3.225±0.421 ^{**}	121.64±10.31 ^{**}
	80	136.27±16.74 [*]	4.071±0.472 [*]	103.24±9.61 [*]

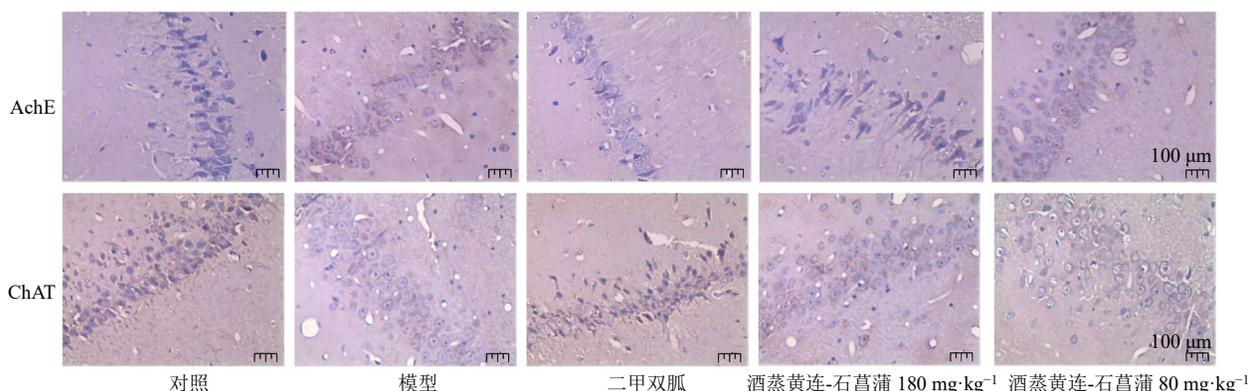


图 5 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠海马组织中 AchE 和 ChAT 蛋白表达的影响 (×400)

Fig. 5 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on AchE and ChAT protein expressions in hippocampus of DCI rats (×400)

表 5 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠海马组织中 AchE 和 ChAT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on AchE and ChAT protein expressions in hippocampus of DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	A 值	
		AchE	ChAT
对照	—	0.167 9±0.009 0	0.214 3±0.002 0
模型	—	0.231 5±0.010 8 ^{##}	0.182 7±0.003 4 ^{##}
二甲双胍	250	0.169 6±0.008 6 ^{**}	0.209 1±0.002 6 ^{**}
酒蒸黄连-石菖蒲	180	0.178 1±0.006 5 ^{**}	0.208 6±0.001 9 ^{**}
	80	0.213 5±0.010 6	0.210 0±0.001 3 ^{**}

3.2.5 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠海马组织 IRS、PI3K、Akt、GSK3β 蛋白表达及磷酸化水平的影响 如图 6 和表 6、7 所示, 与对照组相比, 模型组海马组织中 IRS、PI3K、Akt、GSK3β 蛋白表达无明显变化, 但上述指标的磷酸化水平明显下降 ($P < 0.01$), 提示受损的 IRS/PI3K/Akt 胰岛素信号传导和 GSK3β 的过度激活均参与 2 型糖尿病诱导的认知障碍过程。与模型组相比, 酒蒸黄连-石菖蒲各剂量组海马组织中 Akt 和 GSK3β 的

磷酸化水平均显著升高 ($P < 0.01$), 酒蒸黄连-石菖蒲高剂量组 IRS 和 PI3K 的磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05、0.01$), 提示药物能通过增强 GSK3β 在 Ser9 的磷酸化水平, 进而抑制 GSK3β 过度活化。以上结果表明, 酒蒸黄连-石菖蒲组分一方面通过抑制 GSK3β 活性来增加糖原合成, 调节糖代谢; 另一方面通过调节 IRS/PI3K/Akt 信号通路来纠正脑内胰岛素的抵抗, 减少 Aβ 的沉积, 改善认知功能障碍。

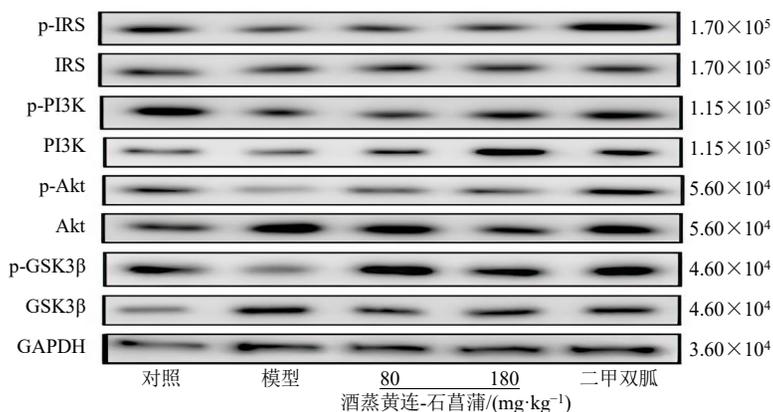


图 6 酒蒸黄连-石菖蒲对 DCI 大鼠海马组织 IRS、PI3K、Akt 和 GSK3β 蛋白表达及磷酸化水平的影响

Fig. 6 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on IRS, PI3K, Akt, GSK3β protein expressions and phosphorylation levels in hippocampus of DCI rats

表6 酒蒸黄连-石菖蒲对DCI大鼠海马组织IRS、PI3K、Akt和GSK3β蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on IRS, PI3K, Akt, GSK3β protein expressions in hippocampus of DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		IRS/GAPDH	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	GSK3β/GAPDH
对照	—	1.000	1.000	1.000	1.000
模型	—	0.943±0.089	1.010±0.158	1.033±0.183	1.117±0.261
二甲双胍	250	0.925±0.098	1.038±0.230	1.032±0.362	1.067±0.253
酒蒸黄连-石菖蒲	180	0.906±0.118	0.990±0.113	0.964±0.127	1.121±0.309
	80	0.960±0.160	0.969±0.027	1.096±0.283	1.054±0.137

表7 酒蒸黄连-石菖蒲对DCI大鼠海马组织IRS、PI3K、Akt和GSK3β磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on IRS, PI3K, Akt, GSK3β phosphorylation levels in hippocampus of DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		p-IRS/GAPDH	p-PI3K/GAPDH	p-Akt/GAPDH	p-GSK3β/GAPDH
对照	—	1.000	1.000	1.000	1.000
模型	—	0.392±0.025 ^{##}	0.252±0.017 ^{##}	0.288±0.015 ^{##}	0.261±0.016 ^{##}
二甲双胍	250	1.518±0.129 ^{**}	0.554±0.049 ^{**}	1.148±0.016 ^{**}	0.948±0.030 ^{**}
酒蒸黄连-石菖蒲	180	0.573±0.066 [*]	0.497±0.075 ^{**}	0.491±0.047 ^{**}	0.899±0.064 ^{**}
	80	0.469±0.071	0.274±0.055	0.471±0.023 ^{**}	0.801±0.087 ^{**}

3.2.6 酒蒸黄连-石菖蒲对DCI大鼠海马组织炎症相关因子蛋白表达的影响 如图7和表8所示,与对照组相比,模型组海马组织中IL-1β、IL-6及TNF-α蛋白表达水平显著升高(P<0.01),表明长期而持续的高脂高糖状态容易造成大鼠脑组织的炎症反应,甚至出现其介导的氧化应激,进而造成神经元损伤,最终损害认知功能。与模型组相比,酒蒸黄连-石菖蒲组海马组织中IL-1β、IL-6及TNF-α蛋白表达水平显著降低(P<0.05、0.01),表明酒蒸黄连-石菖蒲可以通过抑制炎症因子表达,保护神经元并改善认知障碍。

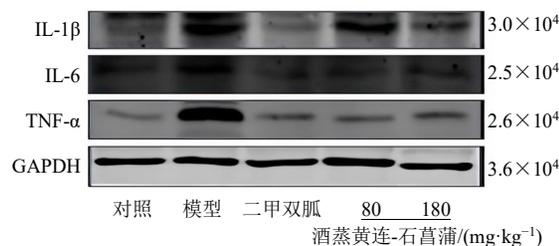


图7 酒蒸黄连-石菖蒲对DCI大鼠海马组织中IL-1β、IL-6及TNF-α蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on IL-1β, IL-6 and TNF-α protein expressions in hippocampus of DCI rats

表8 酒蒸黄连-石菖蒲对DCI大鼠海马组织IL-1β、IL-6及TNF-α蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Effect of wine steamed *Coptidis Rhizoma-Acori Tatarinowii Rhizoma* on IL-1β, IL-6 and TNF-α protein expressions in hippocampus of DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		IL-1β/GAPDH	IL-6/GAPDH	TNF-α/GAPDH
对照	—	1.000	1.000	1.000
模型	—	1.258±0.032 ^{##}	1.164±0.058 ^{##}	1.988±0.058 ^{##}
二甲双胍	250	0.911±0.054 ^{**}	0.101±0.087	1.132±0.041 ^{**}
酒蒸黄连-石菖蒲	180	0.965±0.036 [*]	0.979±0.027 [*]	1.079±0.038 ^{**}
	80	1.072±0.022 [*]	0.989±0.036 [*]	1.069±0.062 ^{**}

4 讨论

长期且持续的高血糖状态使糖尿病患者体内多种组织和器官处于一种“中毒状态”。中医学认为,当人体气阴两虚、脾失健运时,升清降浊失司、气机壅滞、内生浊邪、结滞脉络、胶着不去则极易化热致毒邪;若浊毒久日不清,蕴积在体内而产生多种损害脏腑的病理物质,或与瘀血、痰浊相缠,浊毒入络毒损脏腑而引发多种并发症^[15]。这种“由浊

致毒”的过程是糖尿病发生发展的关键,若不及时控制,浊毒瘀血进入脑部,αβ、炎症因子、过量凝血酶和自由基等“毒邪”聚集致使神经元、脑络、脑髓等结构受损,脑中气血阴阳失衡,脑主神明功能失常,影响学习记忆能力和认知功能,最终导致痴呆。因此,DCI的核心病机是“毒损脑络”,治疗的根本法则是“解毒通络”^[16]。黄连用于“止消渴”历史悠久^[9],在现代药理学研究中,其显示出良好

的降血糖、改善 IR、调节糖脂代谢紊乱等作用，能够有效减弱毒邪对“脑络”的损害，起到“解毒”作用，且酒蒸黄连疗效优于生黄连。“毒损脑络”病位在脑，而石菖蒲具有开窍豁痰、醒神益智等功效，可作为配伍组方中引药入脑的药物，且药理学研究表明，石菖蒲不仅能够抗衰老、抗氧化和调血脂，还具有益智护脑、提高学习记忆能力和改善认知功能的作用，减少神经元损伤和神经细胞凋亡，起到保护神经系统的作用^[17]。由此可见，酒蒸黄连-石菖蒲组方配伍是治疗 DCI 的特色方药，不仅从多层次、多途径综合发挥疗效，还与中医“解毒通络”的治疗方法相符。

在“药物-关键成分-潜在靶点-核心通路”网络筛选出的活性成分中，药理作用较强的小檗碱^[18-19]、黄连碱^[20]、表小檗碱^[20]、巴马汀^[21]和 β -细辛醚^[22-23] 等成分可能是酒蒸黄连-石菖蒲组分防治 DCI 的潜在药效物质，其中小檗碱、黄连碱、巴马汀和表小檗碱属黄连生物碱成分， β -细辛醚是石菖蒲的主要成分。以上成分均表现出较强的调节血糖、血脂水平，改善 IR 及氧化应激，减少 A β 沉积，抑制神经元细胞凋亡和神经元损伤，抗认知障碍的作用，这些药理作用为酒蒸黄连-石菖蒲配伍治疗 DCI 提供了坚实的理论依据。在预测的潜在作用靶点中，AKT1、GSK3B、PPARG、INSR、IGFIR、APP、MAPT、TNF、PTGS2、ACHE 这几个靶点分布于酒蒸黄连和石菖蒲的活性成分中，涉及糖脂代谢、炎症反应、神经元细胞调控、AGEs 增生、胰岛素信号传导及 IR 等过程，与糖尿病及其并发的认知功能障碍密切相关。

本研究预测的信号通路中，与酒蒸黄连-石菖蒲关键成分及潜在靶点关联度最高的通路是 PI3K-Akt 信号通路，其次是胰岛素抵抗及胰岛素转导途径、AGE-RAGE 信号通路、炎症相关通路及胆碱能通路。PI3K-Akt 信号通路被胰岛素激活后，一方面通过磷酸化 GSK3 β 增加糖原合成，促进机体对葡萄糖的摄取和利用，调控血糖水平来改善 IR；另一方面能够有效抑制神经元损伤和神经细胞凋亡，有利于学习、记忆能力的调控^[24-25]，对糖尿病及其认知功能障碍起到预防和治疗作用。胰岛素转导途径损伤或发生 IR，大脑中 Ins 缺乏，不仅影响脑内葡萄糖代谢，还会造成学习记忆活动细胞和认知功能损害，最终导致神经元退行性病变并加速认知功能的下降^[26]。AGE-RAGE 信号通路能够增强神

经毒性，不仅产生糖毒性，抑制 Ins 分泌，加剧氧化应激和炎症反应，损伤神经细胞；还能促使 A β 生成，催化 Tau 蛋白磷酸化，加速痴呆和 DCI 的发生^[27-28]。现代医学认为，长期高血糖状态引起的炎症反应不仅导致 IR，还会促进 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎因子表达致使多种组织器官受损，如引发脑神经受损及病变，进而认知能力逐渐下降，最终引发认知功能障碍^[29-30]。胆碱能通路是空间学习记忆的重要部位，其中神经递质 Ach 与学习记忆关系最为密切，脑内 Ach 含量增加可促进神经元发育和神经再生，有效改善认知功能损伤、调节学习记忆能力等神经退行性疾病^[31]。由以上推测，酒蒸黄连-石菖蒲组分可能通过调控 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路及相关炎症通路，改善 IR、胰岛素途径受损及胆碱能通路受损，调节机体 Ins 水平，增加糖原合成来降低血糖，减少 A β 沉积，缓解神经元损伤，抑制神经细胞凋亡，最终达到治疗 DCI 的目的。

同时，为了验证上述分析结果，通过建立大鼠 DCI 复合模型进行实验研究，结果表明，酒蒸黄连-石菖蒲组分对 DCI 大鼠降糖效果显著，能够有效抑制大鼠血清 HOMA-IR、升高 IAI，表明药物通过调节糖代谢、提高机体对胰岛素的反应性和敏感性等多个环节来改善 IR。酒蒸黄连-石菖蒲能够显著增加 DCI 大鼠海马组织中 Ach 含量、ChAT 活性及蛋白表达，降低 AchE 含量及蛋白表达，表明药物通过调控胆碱能通路，促进脑组织中 Ach 合成来改善认知障碍。酒蒸黄连-石菖蒲能够有效抑制 DCI 大鼠脑内 A β ₄₂ 蛋白表达，上调 IRS、PI3K、Akt、GSK3 β 蛋白的磷酸化水平，通过 IRS/PI3K/Akt 信号通路来改善脑中 IR，调节糖代谢，增加糖原合成，减少 A β 聚集，保护神经元，修复认知功能损伤。同时，酒蒸黄连-石菖蒲组分能够显著抑制脑组织中炎症因子 IL-1、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平，表明药物通过缓解机体炎症反应，抑制炎症因子释放，从而达到改善 IR、保护神经元和调控认知功能的目的。

综上所述，本研究基于“关键成分-潜在靶点-核心通路”网络探究酒蒸黄连-石菖蒲对糖尿病及其认知功能障碍的作用机制，结合动物实验发现酒蒸黄连-石菖蒲可以通过多种有效成分作用于多个靶点来改善 IR，调控胰岛素相关信号通路、PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、胆碱能通路等多种生物过程，同时抑制炎症反应和神经细胞凋亡，

进而发挥整体治疗 DCI 的作用。本研究不仅为临床运用酒蒸黄连-石菖蒲组分治疗糖尿病及其并发的认知功能障碍提供了理论依据,也为中药复方多成分、多靶点、多途径协同作用治疗复杂疾病的机制研究提供了方法参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈莲珍, 李林, 王育琴. 糖尿病认知功能障碍发病机制研究的进展 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2005, 7(3): 213-214.
- [2] 谢福军, 杨峨. 糖尿病合并认知障碍的发病机制研究进展 [J]. 中国全科医学, 2011, 14(9): 929-931.
- [3] 郑玉娇, 苟筱雯, 逢冰, 等. “糖络病”学说及其诊疗要点发微 [J]. 中医杂志, 2019, 60(22): 1920-1923.
- [4] 龙怡, 李佳川, 赵兴冉. 黄连-石菖蒲抗糖尿病认知功能障碍的组方配伍研究 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2013, 39(4): 516-519.
- [5] 陶梦敏, 李佳川. 基线等比增减设计优选“酒蒸黄连-石菖蒲”组分抗糖尿病认知障碍实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(6): 133-138.
- [6] 陶梦敏. “酒蒸黄连-石菖蒲”组分抗糖尿病认知功能障碍配伍规律研究 [D]. 成都: 西南民族大学, 2019.
- [7] 李佳川, 顾健, 赵兴冉. 黄连-石菖蒲药对改善糖尿病小鼠认知功能障碍 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 132-134.
- [8] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [9] 李佳川. 基于本草知识的酒蒸黄连“止消渴”系统研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [10] 赖先荣, 周邦华, 杜明胜, 等. 6种黄连饮片中6种生物碱的 RP-HPLC 含量测定及与“治消渴”药效学的谱-效关系分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4579-4586.
- [11] 卢圆圆. 石菖蒲化学成分及药理活性研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [12] 严平, 李佳川, 邵君傲, 等. “酒蒸黄连-石菖蒲”组分配伍对实验性糖尿病认知障碍大鼠脂质代谢的影响 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2015, 41(5): 561-565.
- [13] 赵小明, 李光千, 殷树仪, 等. 大鼠心内神经节胆碱乙酰转移酶阳性神经元: 免疫组织化学法研究 [J]. 四川解剖学杂志, 2001, 9(2): 106.
- [14] 杨思思. 胰岛素信号 PI3K/AKT 对饮食诱导 IR 大鼠海马内 A β 42 沉积作用的探讨 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [15] 吴深涛, 阎冬雪, 李步满. 由浊转毒与 DM 糖、脂毒性 [A] // 第十次全国中医糖尿病大会论文集 [C]. 厦门: 中华中医药学会糖尿病分会, 2007: 102-105.
- [16] 宋福印, 王永炎, 黄启福. 试论毒损脑络与糖尿病性脑病 [J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(5): 7-8.
- [17] 邵福平, 田蕾, 田妹, 等. 中药石菖蒲的研究进展 [J]. 中医导报, 2018, 24(22): 65-69.
- [18] 马冬影, 刘继平, 吉薇薇, 等. 小檗碱对糖尿病脑病大鼠海马组织氧化应激及 BDNF 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 39-41.
- [19] 斯琴高娃, 包勒朝鲁, 李敏, 等. 黄连中小檗碱药理活性的研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(1): 49-52.
- [20] 马航, 胡懋然, 邹宗尧, 等. 黄连生物碱降糖作用研究及构效关系初探 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(11): 1575-1579.
- [21] 陈红英. 黄连化学成分分离及其降糖活性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [22] 李志强. β -细辛醚对 AD 大鼠学习记忆的影响及血管保护机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2010.
- [23] 聂慧. 石菖蒲活性成分对 APP/PS 转基因小鼠学习记忆及 Clusterin 神经保护途径的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [24] 李斌, 范源, 李鑫. 基于 PI3K/Akt 信号通路的中药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展 [J]. 中成药, 2017, 39(1): 151-154.
- [25] 高洋洋, 赵志英. PI3K/Akt 信号通路及神经损伤的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(16): 3121-3125.
- [26] 郭蕾蕾, 田国庆. 胰岛素及胰岛素抵抗与糖尿病认知功能障碍 [J]. 中国康复理论与实践, 2012, 18(5): 433-435.
- [27] 陈方, 胡朦, 杜贯涛, 等. 2 型糖尿病认知障碍发生机制研究进展 [J]. 神经药理学报, 2013, 3(3): 27-33.
- [28] 宋登华, 孙家忠, 王进. 晚期糖基化终末产物在 2 型糖尿病认知功能障碍患者血清中的表达及临床意义 [J]. 现代医学, 2016, 44(10): 1461-1463.
- [29] 颜薇, 陈秋. 2 型糖尿病/胰岛素抵抗炎症机制的浅析 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2299-2300.
- [30] 郑琼. 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗、炎症状态与认知功能障碍关系的初步观察 [J]. 药物生物技术, 2019, 26(6): 525-528.
- [31] Heysieattalab S, Sadeghi L. Effects of delphinidin on pathophysiological signs of nucleus basalis of meynert lesioned rats as animal model of Alzheimer disease [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(7): 1636-1646.

[责任编辑 李亚楠]