

## 金线莲干预 2 型糖尿病的“关键成分-潜在靶标-核心通路”网络挖掘及实验验证

朱菲<sup>1</sup>, 吴梅<sup>2</sup>, 孔向军<sup>2\*</sup>, 方莉<sup>2</sup>, 马巧群<sup>3</sup>, 陶益<sup>1\*</sup>

1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014

2. 金华市农业科学研究院, 浙江 金华 321000

3. 金华匠康金草生态农业科技有限公司, 浙江 金华 321000

**摘要:** **目的** 运用网络药理学和动物实验相结合的方法, 多维度挖掘金线莲 *Anoectochilus roxburghii* 治疗 2 型糖尿病的作用机制, 为金线莲的开发利用提供依据。**方法** 通过文献检索建立金线莲化合物数据库, 检索 Swiss Target Prediction 数据库和 Similarity ensemble approach 数据库获取金线莲化合物的作用靶标, 检索 Disgenet 和 GeneCards 数据库获得 2 型糖尿病的相关靶标。利用软件 Venny 2.1 筛选出金线莲与 2 型糖尿病的共有靶标。运用 String 数据库构建共有靶标的蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 通过 NetworkAnalyzer 工具和 MCODE 插件进行拓扑分析、基因簇分析及核心靶标的筛选。通过基因注释工具 DAVID 对核心靶标进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。采用高糖、高脂饲料诱导结合小剂量链脲佐菌素 (40 mg/kg) 一次性 ip 构建 2 型糖尿病大鼠模型, 将造模成功大鼠分为对照组、模型组、二甲双胍组和金线莲高、中、低剂量组, 持续给药 3 周, 采用酶联免疫法检测大鼠给药后血清中相应预测的 8 种靶标的水平。**结果** 从数据库中获得 80 个金线莲化学成分, 金线莲成分作用靶标与 2 型糖尿病的共有靶标有 249 个。金线莲治疗 2 型糖尿病的关键活性成分为槲皮素、异鼠李素、金线莲苷、齐墩果酸和熊果酸, 主要调控靶标包括白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、蛋白酪氨酸磷酸酶-1B (protein tyrosine phosphatase-1B, PTP-1B)、花生四烯酸-5-脂加氧酶 (arachidonic acid-5-lipoxygenase, ALOX-5)、环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、醛糖还原酶 (aldose reductase, AR)、细胞色素 P4501B1 (cytochrome P4501B1, CYP1B1)、细胞色素 P45019A1 (cytochrome P45019A1, CYP19A1) 及乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE)。动物实验结果显示, 与模型组相比, 金线莲各剂量组大鼠血清 IL-2、ALOX5、CYP1B1 和 CYP19A1 水平不同程度升高, COX-2、AR、PTP1B 和 AChE 水平不同程度降低。**结论** 金线莲可以通过减少炎症信号通路关键酶的表达, 改善胰岛素抵抗从而发挥降血糖的作用, 具有多成分、多靶标及多通路的治疗特点, 值得临床推广运用。

**关键词:** 金线莲; 网络药理学; 2 型糖尿病; 槲皮素; 异鼠李素; 金线莲苷; 齐墩果酸; 熊果酸; 白细胞介素-2; 蛋白酪氨酸磷酸酶-1B; 花生四烯酸-5-脂加氧酶; 环氧化酶-2; 醛糖还原酶; 细胞色素 P4501B1; 细胞色素 P45019A1; 乙酰胆碱酯酶  
**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)12-3720-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.018

## Network mining and experimental verification of “key components-potential targets-core pathways” of *Anoectochilus roxburghii* in intervention of type 2 diabetic mellitus

ZHU Fei<sup>1</sup>, WU Mei<sup>2</sup>, KONG Xiang-jun<sup>2</sup>, FANG Li<sup>2</sup>, MA Qiao-qun<sup>3</sup>, TAO Yi<sup>1</sup>

1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

2. Jinhua Academy of Agricultural Sciences, Jinhua 321000, China

3. Jinhua Jiang Kang Jinciao Ecological Agriculture Technology Co., Jinhua 321000, China

**Abstract: Objective** A multi-dimensional mining strategy was proposed for elucidating the action mechanism of Jinxianlian (*Anoectochilus roxburghii*) in the treatment of type 2 diabetic mellitus by using a combination of network pharmacology and animal

收稿日期: 2021-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81703701); 浙江省自然科学基金项目 (Y21H280036)

作者简介: 朱菲, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: 13340093825 E-mail: 1026332418@qq.com

\*通信作者: 陶益, 副研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为中药新药与临床药理研究。Tel: (0571)88320984 E-mail: taoyi1985@zjut.edu.cn

孔向军, 主要研究方向为作物栽培与植物保护研究。Tel: (0579)82050162 E-mail: 9826146@qq.com

experiments, which will provide a basis for the development and application of *A. roxburghii*. **Methods** The compound database of *A. roxburghii* was established by literature search, whereas the targets of the compounds were obtained by browsing the Swiss Target Prediction database and the Similarity ensemble approach database. Targets of type 2 diabetic mellitus was obtained by using Disgenet and GeneCards databases. The software Venny 2.1 was applied to screen out the shared targets of *A. roxburghii* and type 2 diabetic mellitus. String database was interrogated to construct the protein-protein interaction (PPI) network for the shared targets. Network Analyzer tool and the MCODE plug-in were employed to perform topology analysis, gene cluster analysis, and core target screening. The gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis of the core target was carried out by the gene annotation tool DAVID. Furthermore, high-sugar and high-fat feed administration and one-time intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin were implemented to induce a type 2 diabetic rat model. The rats were divided into control group, model group, metformin positive group, high dosage group, medium dosage group, and low dosage group of *A. roxburghii*. According to the predicted results of network pharmacology, enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the level of the eight predicted core targets in the serum of rats after administration. **Results** Eighty chemical components of *A. roxburghii* were collected from databases. A total of 249 shared targets of *A. roxburghii* and type 2 diabetic mellitus were identified. The key bioactive ingredients of *A. roxburghii* in the treatment of type 2 diabetic mellitus include quercetin, isorhamnetin, anoectin, oleanolic acid, and ursolic acid, which were mainly related to targets including interleukin-2 (IL-2), protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B), arachidonic acid-5-lipoxygenase (ALOX5), cyclooxygenase-2 (COX-2), aldose reductase (AR), cytochrome P4501B1(CYP1B1), cytochrome P45019A1 (CYP19A1) and acetylcholinesterase (AChE). Compared with the model group, the serum levels of IL-2, ALOX5, CYP1B1 and CYP19A1 were increased in all dosage groups of *A. roxburghii*, whereas the levels of COX-2, AR, PTP1B and AChE were reduced in all dosage groups of *A. roxburghii*. **Conclusion** *A. roxburghii* can reduce the expression of key enzymes in inflammatory signal pathways and improve insulin resistance to lower blood sugar. It owns the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway, which is worthy of clinical application.

**Key words:** *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.; network pharmacology; type 2 diabetic mellitus; quercetin; isorhamnetin; anoectin; oleanolic acid; ursolic acid; interleukin-2; protein tyrosine phosphatase-1B; arachidonic acid-5-lipoxygenase; cyclooxygenase-2; aldose reductase; cytochrome P4501B1; cytochrome P45019A1; acetylcholinesterase

糖尿病是一种以血糖升高和代谢紊乱为主要特征的疾病,属中医学“消渴病”范畴。其中2型糖尿病占有糖尿病患者95%左右,严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。2型糖尿病又称为非胰岛素依赖型糖尿病,多发于肥胖及中老年人,患者体内胰岛素分泌相对不足或作用效果不佳。2型糖尿病可诱发多种并发症,包括糖尿病心血管疾病、糖尿病肝病、糖尿病肾病等。临床上治疗2型糖尿病一般分为注射胰岛素和口服降糖药2种方案。然而,这2种方案的持续治疗通常会导致耐药性和明显的不良反应,甚至可引起多种心脏毒性、神经毒性等损害患者身体健康<sup>[2-3]</sup>。中药及其有效成分在2型糖尿病的防治中具有疗效稳定、不良反应少、可长期使用、通过多靶标多途径调节代谢紊乱,起到保护胰腺结构和功能的作用。因此,一些具有降血糖活性的中药越来越受到人们的关注<sup>[4]</sup>。

金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 是兰科开唇兰属多年生草本药用植物,营养成分丰富,在民间有“鸟人参”“药之王”“神草”“金草”等美誉,是我国名贵的天然药物<sup>[5]</sup>。近年来,金线莲

逐渐成为研究热点<sup>[6]</sup>。研究表明,金线莲具有多种生物活性,包括抗肿瘤<sup>[7-8]</sup>、保肝<sup>[9]</sup>、降血糖<sup>[10]</sup>、抗氧化<sup>[11]</sup>和免疫调节作用。目前,关于金线莲用于治疗2型糖尿病的具体作用机制尚未明确。网络药理学是通过将多元药理学网络映射到人类疾病-基因网络上而建立起来的。该方法将揭示与疾病相关的一些重要药物靶标。本研究首先通过文献检索的方式查找出金线莲的化学成分信息,利用网络药理学构建有效成分-疾病-靶标网络图,并进行生物学功能分析,初步预测金线莲干预2型糖尿病可能的信号通路和关键作用靶点。同时结合动物实验,对网络药理学筛选出的关键作用靶标进行初步验证,采用造模后给药治疗的方式,检测预测的相关蛋白水平,评价金线莲对2型糖尿病的干预效果,为金线莲的临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学分析

**1.1.1 化学成分数据库构建及靶标预测** 本研究首先从 PubChem 和 PubMed 等数据库中搜集金线莲所含有的化学成分,建立金线莲化学成分数据库,

使用 ChemDraw18.0 绘制化合物结构, 获取每个化学成分 SMILES 构型, 并对化学成分进行分类。通过 Swiss Target Prediction 数据库和 Similarity Ensemble Approach 数据库检索每个化学成分的作用靶标。利用 UniProt 数据库对化学成分的作用靶标的名称进行标准化处理。

**1.1.2 2 型糖尿病作用靶标的查询** GeneCards 数据库是人类基因数据库, DisGeNET 数据库是综合性的基因-疾病关联关系数据库。以“type 2 diabetes mellitus”为关键词在 GeneCards 和 DisGeNET 数据库查找 2 型糖尿病相关的作用靶标, 并删除重复的靶标。为了获得与 2 型糖尿病更加相关的靶标, 将根据得分进行中位值的筛选并且采用 UniProt 数据库对靶标进行规范化处理。

**1.1.3 蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建** 利用 Venny 2.1 获取金线莲化学成分与 2 型糖尿病的共有靶标, 并将其导入 STRING 数据库和 Cytoscape 3.8.0, 构建可视化的 PPI 网络图。并将物种设定为“Homo sapiens”, 可信度 > 0.9。

**1.1.4 拓扑分析与 MCODE 聚类分析** 采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“成分-靶标-通路-疾病”网络图, 利用插件 Network Analyzer 进行拓扑分析, 计算节点自由度、接近中心性等。通过度 (degree) 排序, 选取分值大于 2 倍平均分的基因作为关键靶标, 获得金线莲治疗 2 型糖尿病的关键靶标及关键通路。通过插件 MCODE 进行基因簇的分析以及核心靶标的筛选。

**1.1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集** 为了阐明金线莲在 2 型糖尿病治疗中的作用机制, 将金线莲与 2 型糖尿病的共有基因导入 DAVID 6.8 数据库, 限定物种为“Homo Sapiens”, 设定阈值  $P < 0.05$ , 进行 KEGG 通路富集分析和 GO 生物过程富集分析。

## 1.2 实验验证

**1.2.1 动物** 选取 SPF 级 6 周龄的健康雄性 SD 大鼠 36 只, 体质量 200~220 g, 购于上海斯莱克实验动物有限公司, 动物合格证编号: SCXK (沪) 2017-0005。将大鼠饲养在具有通风设备的饲养代谢笼中, 控制温度在 25~28 °C, 湿度 50%~60%, 自由饮水和摄食。动物实验经浙江工业大学伦理委员会批准 (批准号 20210429036)。

**1.2.2 药材** 金线莲由金华匠康金草生态农业科技有限公司提供, 经浙江工业大学药学院王平教授鉴定为兰科植物金线莲 *A. roxburghii* (Wall.) Lindl. 干燥全草。

**1.2.3 药品与试剂** 盐酸二甲双胍片 (0.5 g/片, 国药准字 H20023370, 批号 ABW2015) 购自中美上海施贵宝制药有限公司; 链脲佐菌素购自美国 Sigma 公司, 批号 S0130-1g; 柠檬酸盐缓冲液购自福建飞净生物科技有限公司, 批号 20210602; 多聚甲醛购自上海麦克林生化科技有限公司, 批号 C10232385; 高糖高脂饲料 (基础饲料 58.8%、猪油 20%、糖 20%、胆固醇 1%、胆盐 0.2%) 购自南京盛民科研动物养殖场。ELISA 检测试剂盒均购自于赫澎 (上海) 生物科技有限公司, 胰岛素试剂盒批号为 202109, 靶标试剂盒批号均为 202110。

**1.2.4 仪器** 集热式恒温加热磁力搅拌器 (上海力辰邦西仪器科技有限公司); 超声波清洗机 (昆山式超声仪器有限公司); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); GA-3 型血糖仪 (三诺生物传感股份有限公司); 全自动生化分析仪 LWC400 (深圳蓝韵医疗器械); 球磨仪 (上海净信科技有限公司)。

**1.2.5 2 型糖尿病模型的构建** 高糖、高脂饲料饲养大鼠 8 周后, 禁食 12 h, 除对照组外, 其他各组大鼠 ip 0.1 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.5) 配制的 40 mg/kg 链脲佐菌素, 同时, 对照组大鼠 ip 同等剂量 0.1 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.5) [11-13]。1 周后禁食 12 h, 检测空腹血糖 (fasting blood sugar, FBG), 若 FBG 连续 2 次  $\geq 11.1$  mmol/L, 同时伴有饮、多食、多尿症状的大鼠, 即视为造模成功。

### 1.2.6 溶液的配制

(1) 金线莲提取液的配制: 取金线莲干粉末 (过 60 目筛) 50 g, 液料比为 20:1, 提取溶剂为蒸馏水, 于水浴 100 °C 的条件下回流提取 1 h, 减压抽滤并收集滤液<sup>[4]</sup>, 重复以上步骤再提取 1 次, 2 次的滤液合并后于 70 °C 的条件下减压旋转蒸发至 222 mL, 即为金线莲高浓度提取液; 提取液中、低浓度分别为高浓度提取液的 1/2 和 1/4。金线莲提取液直接 ig 给药。通过 HPLC-UV 测定, 金线莲高浓度水提液中金线莲苷、水仙苷、芦丁、阿魏酸及山奈素质量分数分别为 13.49%、0.30%、0.10%、0.04% 和 0.02%。

(2) 阳性药物的配制: 将去除包衣的盐酸二甲双胍片投入球磨仪研磨成粉末, 0.70 g 盐酸二甲双胍粉末溶于 80 mL 蒸馏水中, 振荡摇匀, 制成盐酸

二甲双胍混悬液，储存于 4 °C 冰箱备用。

**1.2.7 分组与给药** 健康雄性 SD 大鼠使用普通饲料适应性饲养 1 周后，分 6 个组，每组 6 只，分别为对照组、模型组、二甲双胍（阳性对照，70 mg/kg）组及金线莲高、中、低剂量组。金线莲给药剂量按照人临床使用剂量 0.071 4 g/kg 换算为大鼠用量 0.45 g/kg，此剂量为金线莲低剂量组给药量，金线莲中、高剂量组给药剂量分别为 0.9、1.8 g/kg。造模成功后按照 8 mL/kg 的给药体积连续 ig 3 周，对照组和模型组给予等量的生理盐水，并于第 7、14 和 21 天称体质量和测定 FBG。在整个实验周期内，每天观察大鼠的基本状况。

**1.2.8 靶标的验证** 金线莲干预 3 周后各组大鼠禁食不禁水过夜，ig 10% 戊巴比妥钠（3.5 mL/kg）进行麻醉<sup>[15]</sup>。钝性分离腹主动脉后，用含肝素钠抗凝剂的采血管采集血液，3000 r/min 离心 10 min，分离得到血清。按照相应 ELISA 试剂盒要求，检测血清中各靶标的水平。

**1.2.9 胰岛素水平的测定** 金线莲干预 3 周后，取大鼠血清适量采用酶联免疫法检测胰岛素水平。

**1.2.10 病理学检查** 取胰腺组织用 4% 多聚甲醛溶液固定，石蜡包埋、切片，采用常规苏木精-伊红染色，在光学显微镜观察并拍照分析。

**1.2.11 统计学分析** 应用 SPSS 20.0 统计学分析软件进行数据处理，数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较满足方差齐性时采用单因素方差分析，不满足方差齐性时采用非参数检验， $P < 0.05$  代表具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 PPI 网络的构建与分析** 通过文献数据库收集整理共获得金线莲 80 种化学成分，其中黄酮类 25 个，有机酸和挥发性化合物 25 个，三萜类 10 个，生物碱和核苷类 7 个，甾体类 7 个，糖苷类化合物 6 个。通过 Swiss Target Prediction 数据库和 Similarity ensemble approach 数据库筛选获得金线莲化学成分 860 个靶标。利用 GeneCards 和 DisGENET 数据库筛选获得 1323 个 2 型糖尿病相关的基因。利用 Venny 2.1 得到 249 个共有靶标，见图 1。将得到的 249 个共同靶标导入 STRING 平台构建 PPI 网络图，将生物种类设定为“Homo sapiens”，选取最低相互作用阈值大于 0.9 的靶标，得到 PPI 网络图，见图 2。该网络图中共有 249 个节点和 989 条边，平均度值为 7.94。

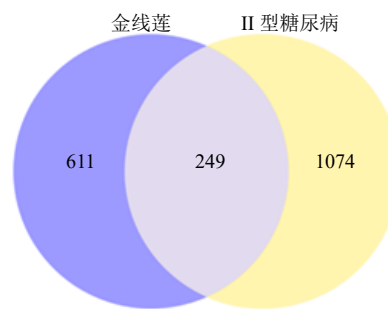


图 1 金线莲与 2 型糖尿病靶标交集韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of targets of *A. roxburghii* and type 2 diabetic mellitus

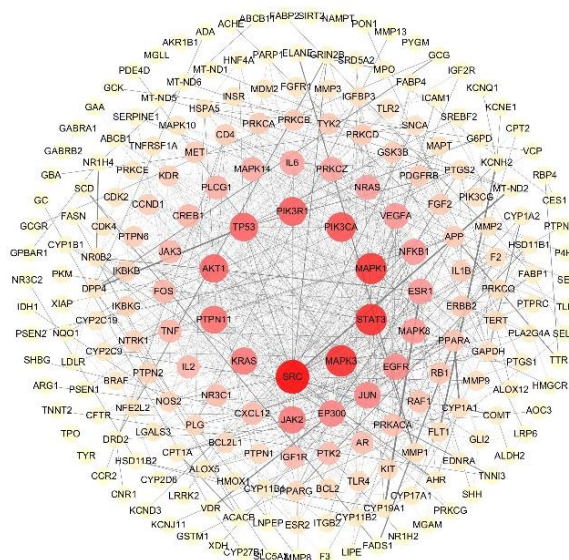


图 2 金线莲治疗 2 型糖尿病靶标的 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of *A. roxburghii* related type 2 diabetic mellitus targets

2.1.2 “化学成分-疾病-通路-靶标”网络图的构建 利用 Cytoscape 3.8.0 软件绘制“化学成分-疾病-通路-靶标”网络图。如图 3 所示，紫色为化学成分，粉色为 2 型糖尿病靶标，蓝色为最显著的前 20 条通路，红色为疾病即 2 型糖尿病。通过 Network Analyzer 工具进行拓扑分析，通过度值排序，选取分值大于 2 倍平均分的基因作为关键靶标，总共筛选出 32 个关键靶标，前 10 个靶标如图 4 所示。金线莲对 2 型糖尿病治疗作用主要与花生四烯酸-5-脂加氧酶（arachidonic acid-5-lipoxygenase，ALOX5）、乙酰胆碱酯酶

（acetylcholinesterase，AChE）、醛糖还原酶（aldose reductase，AR）、细胞色素 P45019A1（cytochrome P45019A1，CYP19A1）、细胞色素 P4501B1（cytochrome P4501B1，CYP1B1）、蛋白酪氨酸磷酸酶-1B（protein tyrosine phosphatase 1B，PTP1B）、环氧酶-2（cyclooxygenase-2，COX-2）、白细胞介素-2（interleukin-2，IL-2）等作用靶标有关。对其进行网络拓扑分析，节点度值排名前 5 的化合物如图 5 所示，分别为槲皮素、异鼠李素、金线莲苷、齐墩果酸和熊果酸，节点度较高的化合物是金线莲发挥 2 型糖尿病治疗作用的关键成分。

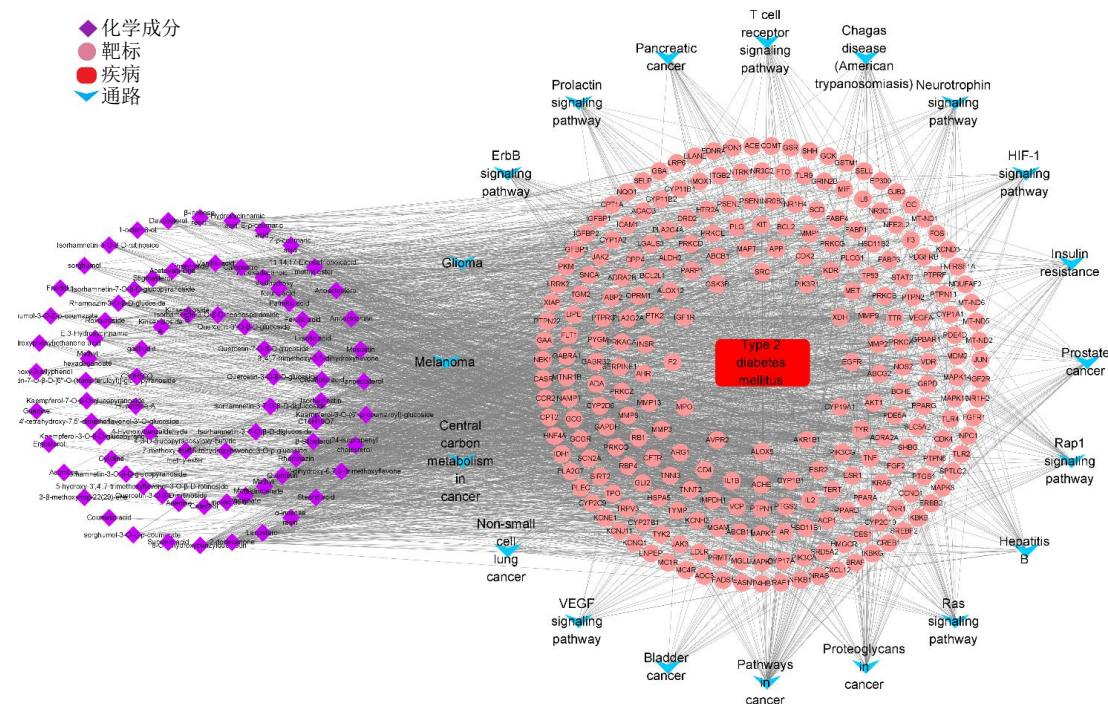


图 3 金线莲“化学成分-疾病-通路-靶标”网络图

Fig. 3 Network diagram of “composition-disease-pathway-target” of *A. roxburghii*

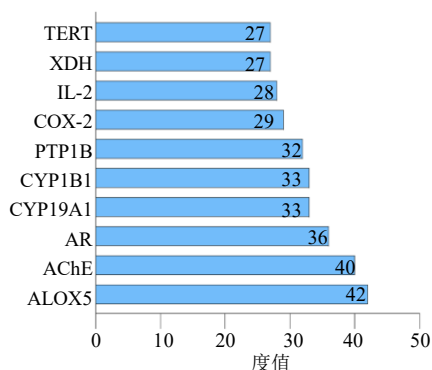


图 4 排名前 10 的靶标及其度值

Fig. 4 Top 10 targets and their degrees

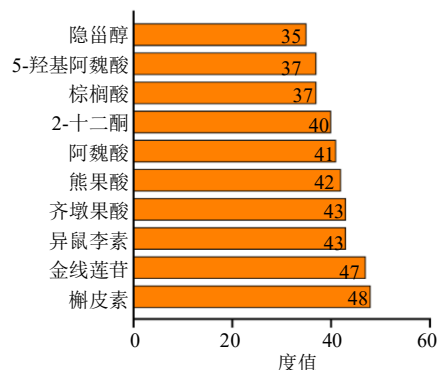


图 5 排名前 10 的化合物及其度值

Fig. 5 Top 10 compounds and their degrees

**2.1.3 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析**  
 将 249 个交集靶标导入 DAVID 6.8 数据库, 进行 GO 富集分析, 筛选  $P < 0.05$  的条目, 总共富集到 349 条生物过程相关、86 条细胞组成相关和 165 条分子功能相关的条目。如图 6 所示, 生物学过程相关的条目主要包括 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、凋亡的负调控、蛋白质磷酸化、对药物的反应、基因表达的正调控、蛋白质磷酸化、对药物的反应、基因表达的正调控等。细胞组成相关的条目涉及细胞质膜、细胞质溶胶、胞外分泌体、细胞膜、细胞外间隙等。分

子功能相关的条目主要集中于相同蛋白质结合、蛋白质同源二聚化活性、酶结合、蛋白质激酶活性、血红素结合、蛋白酪氨酸激酶活性等方面。

KEGG 通路富集分析结果如图 7 所示, 具有显著意义 ( $P < 0.05$ ) 的通路共 139 条, 主要与 Ras 信号通路、胰岛素抵抗信号通路、低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF-1) 信号通路、催乳素信号通路、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路和 T 细胞受体信号

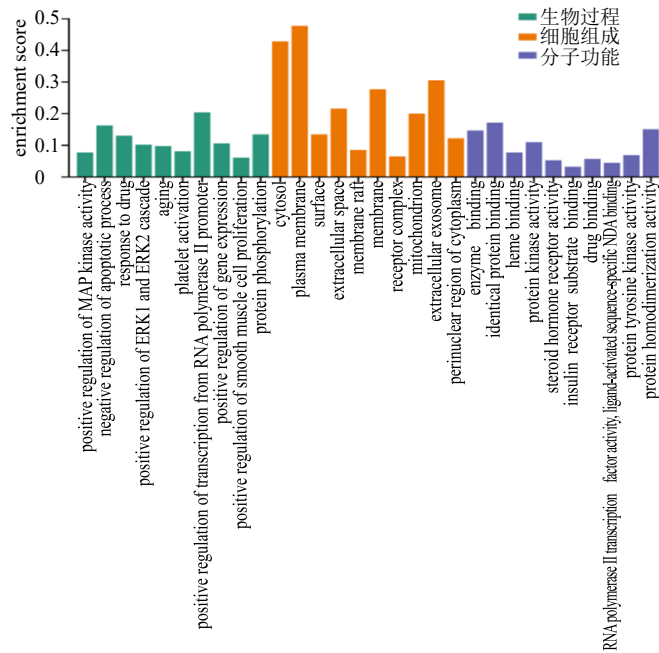


图 6 GO 功能富集分析

Fig. 6 GO function enrichment analysis

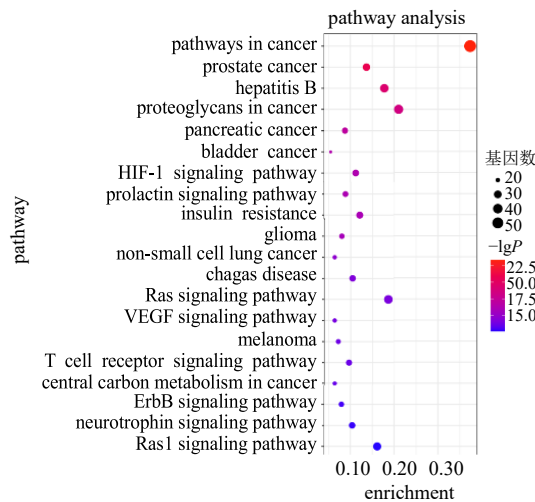


图 7 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis

通路等方面有关。

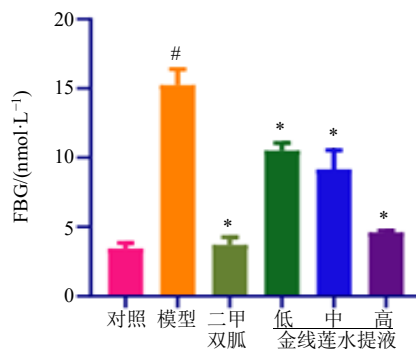
## 2.2 实验验证

**2.2.1 一般状态观察** 糖尿病的典型症状包括多饮、多食和消瘦。造模后，与对照组相比，其他组大鼠饮水量和进食量明显增加，懒动。给药期间，金线莲各剂量组饮水量较模型组减少，但比对照组增多；进食量较模型组减少，但与对照组相比增多；精神状态较模型组大有好转。各组间体质量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.2.2 降血糖作用** 血糖是衡量金线莲对2型糖尿病大鼠治疗作用的基础指标。各组大鼠ig 3周后，利用血糖仪测定每只大鼠的FBG值。如图8所示，模型组大鼠FBG平均值达到15.0 mmol/L，表明造模成功；与模型组大鼠相比，二甲双胍组与金线莲各剂量组大鼠FBG值均显著下降 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.3 胰岛素水平** 如图9所示，ig 3周后，与对照组相比，模型组大鼠血清胰岛素水平显著性升高 ( $P < 0.05$ )；与模型组相比，二甲双胍组与金线莲各剂量组大鼠胰岛素水平均显著下降 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.4 胰腺组织病理学变化** 如图10所示，与对照组比较，模型组大鼠的胰腺细胞排列紊乱，腺泡分布松散，胰岛细胞坏死明显。然而在二甲双胍组和金线莲各剂量组治疗3周后，胞浆均匀无空泡，胰岛结构变得更为清晰且边界清楚，细胞核较清晰，但胰岛细胞轻微坏死，程度较对照组严重。



与对照组比较: # $P < 0.05$  与模型组比较: \* $P < 0.05$ , 图9、11同  
# $P < 0.05$  vs control group \* $P < 0.05$  vs model group, same as fig. 9 and 11

图8 给药3周后各组大鼠FBG ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 8 FBG of rats in each group three weeks after administration ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

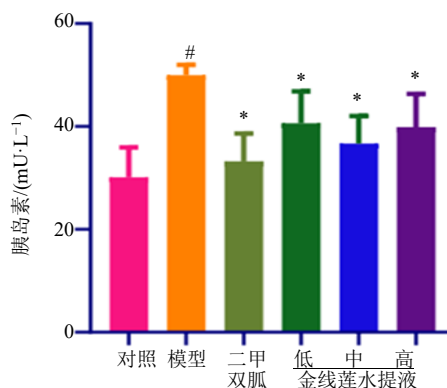


图9 给药3周后各组大鼠血清胰岛素水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 9 Serum insulin level of rats in each group three weeks after administration ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

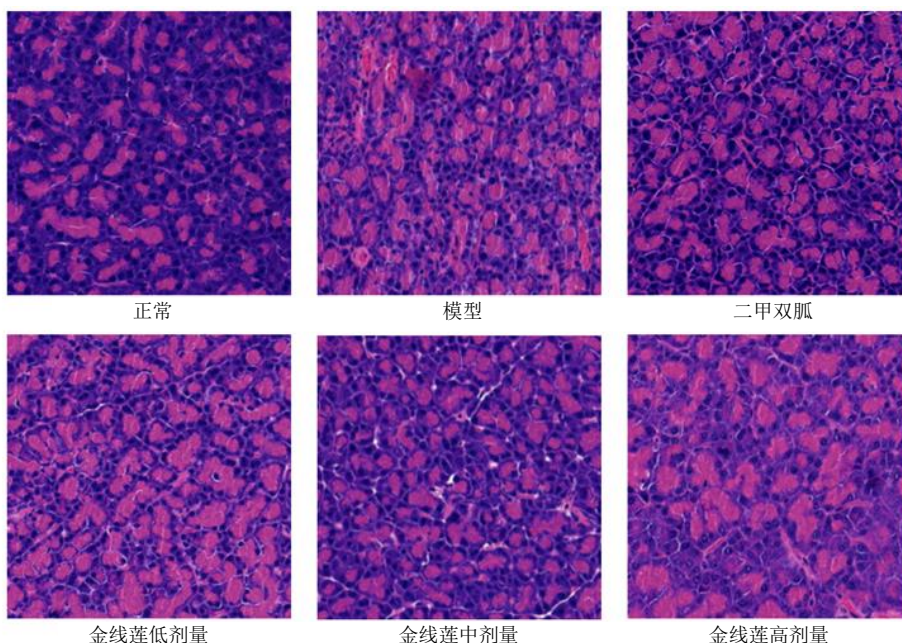


图10 胰腺组织HE染色 (×200)

Fig. 10 HE staining of pancreatic tissues (× 200)

**2.2.5 靶标的验证** 根据网络药理学的预测结果, 金线莲对 2 型糖尿病的治疗作用与 ALOX5、AChE、AR、CYP19A1、CYP1B1、PTP1B、COX-2 及 IL-2 等靶标有关。为了验证该预测结果, 采用酶联免疫法检测大鼠血清中 8 种预测靶标水平, 结果如图 11 所示。与对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-2、ALOX5、CYP1B1 和 CYP19A1 水平均显著降低 ( $P<0.05$ ), 而 COX-2、PTP1B 和 AR 水平显著升高 ( $P<0.05$ )。与模型组比较, 二甲双胍组

大鼠血清中 IL-2、ALOX5、CYP1B1 和 CYP19A1 水平均显著升高 ( $P<0.05$ ), AChE、COX-2 和 AR 水平显著降低 ( $P<0.05$ )。金线莲低剂量组大鼠血清 COX-2 和 PTP1B 水平显著降低 ( $P<0.05$ ); 中剂量组大鼠血清 IL-2、ALOX5、CYP1B1 和 CYP19A1 水平显著升高 ( $P<0.05$ ), COX-2、PTP1B、AChE 和 AR 水平显著降低 ( $P<0.05$ ); 高剂量组 ALOX5、CYP1B1 和 CYP19A1 水平显著升高 ( $P<0.05$ ), AChE 水平显著降低 ( $P<0.05$ )。

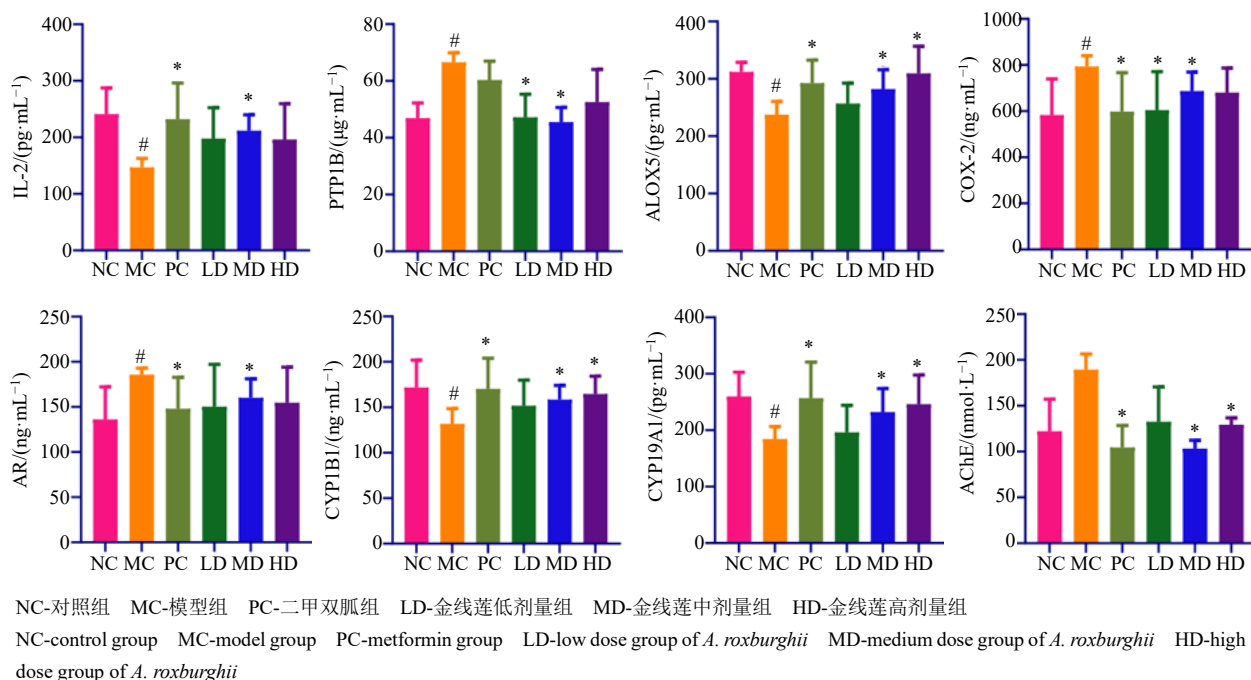


图 11 各组大鼠血清中 8 种靶标水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 11 Serum levels of eight targets of rat in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3 讨论

2 型糖尿病是一种以高血糖和胰岛素抵抗为主要特征的复杂代谢紊乱疾病, 对肾脏和肝脏等器官系统都有影响, 严重威胁人类健康与寿命<sup>[16]</sup>。目前, 2 型糖尿病多发、高发且越来越年轻化, 及早干预是降低并发症和致死率的关键。中药在 2 型糖尿病的治疗方面有着显著的疗效和优势, 亟待守正创新和传承发展。

网络药理学技术在药物与疾病之间的关系研究以及疾病靶标和途径的预测方面应用越来越多。在药物设计和开发中, 网络药理学不仅可以多维度地阐明药物的作用机制、预测新的药理作用的同时也可以降低药物发现的成本<sup>[17-18]</sup>。通过网络药理学的预测发现, 金线莲治疗 2 型糖尿病的关键活性成分

为金线莲苷、槲皮素、异鼠李素、齐墩果酸、熊果酸等。槲皮素具有促进胰腺干细胞再生和胰岛细胞分化的作用, 通过其抗氧化、抗炎和抗凋亡活性来保护胰腺细胞免受损伤, 并调节与葡萄糖代谢相关的酶活性来降低血糖, 增加对胰岛素的敏感性<sup>[19-20]</sup>。异鼠李素的自由基清除活性, 主要通过 3 种主要的抗氧化途径实现: 氢原子转移、单电子转移随后质子转移和顺序质子丢失电子转移<sup>[21]</sup>。金线莲苷具有调节酶促抗氧化剂的活性、清除自由基和降低 NO 的含量, 减少对胰岛 β 细胞的刺激且改善其功能<sup>[22]</sup>。金线莲苷通过调节基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-组织抑制剂金属蛋白酶 (tissue inhibitor metalloproteinase, TIMP) 的平衡来维持血管结构的动态平衡, 恢复血管内皮细胞结构,



有利于生物活性物质的正常分泌<sup>[23]</sup>。熊果酸的化学结构为 $\alpha$ -香树脂醇型五环三萜类,可以将血糖酵解为其他糖代谢产物并且减少葡萄糖的吸收,可能的作用途径为促进葡萄糖激酶 mRNA 表达、提高糖代谢关键酶葡萄糖激酶的含量和抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性等;保护胰腺 $\beta$ 细胞并刺激胰岛分泌胰岛素;抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 1 $\beta$ 和激动胰岛素受体 TGR5,加快体内葡萄糖的摄取和利用速率<sup>[24-25]</sup>。齐墩果酸可以降低细胞内 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 $\alpha$ -胰液淀粉酶的活性来调节外源葡萄糖的吸收,同时抑制糖原分解限速酶-糖原磷酸化酶的活性,减少内源性葡萄糖的生成和糖原的分解。除此之外,齐墩果酸还可以通过 TGR5 途径刺激胰岛 $\beta$ 细胞释放胰岛素,从而起到改善胰岛素抵抗的作用<sup>[26-27]</sup>。另有研究显示,金线莲多糖也具有降血糖作用<sup>[28]</sup>。

高血糖可促使细胞膜糖基化,破坏粒细胞结构,限制其免疫功能,吞噬杀菌力减低,延缓淋巴细胞的分裂,导致辅助性 T 细胞的减少。IL-2 主要是由辅助性 T 细胞产生,高血糖导致 IL-2 分泌减少<sup>[29]</sup>。金线莲各剂量组的血糖水平显著下降,IL-2 水平也回归正常。PTP1B 对胰岛素传导过程具有负调节作用。当发生胰岛素抵抗时,PTP1B 的表达水平显著增强,促使胰岛素受体及受体底物酪氨酸磷酸化,阻断胰岛素的降血糖作用<sup>[30]</sup>。金线莲给药后 PTP1B 水平恢复正常。ALOX5 是花生四烯酸代谢途径中的关键酶之一。研究表明,花生四烯酸具有降低糖尿病大鼠血糖、提高机体抗氧化能力的功效<sup>[31]</sup>。模型组大鼠 ALOX5 水平降低,花生四烯酸的分解代谢受到抑制,表明模型组大鼠体内花生四烯酸的代偿性积累。金线莲给药后 ALOX5 水平恢复正常。COX-2 作为炎症反应的关键酶,过度表达能降低机体对胰岛素的敏感性,减少胰岛细胞对葡萄糖的利用<sup>[32]</sup>。金线莲给药后能显著降低血清 COX-2 水平。AR 是体内多元醇代谢途径的主要酶,可以催化葡萄糖产生大量的山梨醇。由于山梨醇不易透过细胞膜,山梨醇在细胞间质大量堆积,这将对机体健康造成严重问题,如糖尿病和肾脏损伤等<sup>[33]</sup>。因此,抑制 AR 的活性可以减少山梨醇的产生,降低患糖尿病的风险。模型组的 AR 水平显著升高,而金线莲给药后 AR 水平回归正常。

2 型糖尿病与氧化应激机制有着密不可分的关系。CYP1B1 具有抑制内皮细胞氧化应激反应的作用。抑制 CYP1B1 的活性能降低氧化应激水平和阻

碍 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号转导,而 JNK 信号通路在氧化应激中是至关重要的<sup>[34]</sup>。模型组 CYP1B1 水平下降,而金线莲给药后 CYP1B1 水平恢复正常水平。糖代谢与 CYP450 酶家族基因的多态性密切相关。CYP19A1 基因与性激素、雌激素以及芳香化酶的活性有关,其可能通过影响雌激素水平起到降血糖的作用<sup>[35]</sup>。模型组 CYP19A1 水平下降,而金线莲给药后恢复正常。

AChE 具有诱导血管内皮细胞依赖性舒张的作用,然而 AChE 的过度表达可使血管内皮细胞受损。许多动物实验证实胰岛素抵抗与内皮细胞功能紊乱相关,当内皮细胞功能发生紊乱时,机体内游离脂肪酸水平升高,胰岛素信号转导通路受阻,胰岛素无法及时对葡萄糖分解利用。模型组 AChE 水平升高,而金线莲给药后 AChE 水平恢复正常。

综上所述,金线莲可以通过减少炎症信号通路关键酶的表达、改善胰岛素抵抗从而发挥降血糖的作用,可用于开发抗糖尿病新药。本研究体现了金线莲多成分、多通路、多靶标的作用特征,对明确金线莲治疗 2 型糖尿病的作用机制具有重要意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Boughton C K, Tripyla A, Hartnell S, et al. Fully automated closed-loop glucose control compared with standard insulin therapy in adults with type 2 diabetes requiring dialysis: An open-label, randomized crossover trial [J]. *Nat Med*, 2021, 27(8): 1471-1476.
- [2] Spracklen C N, Horikoshi M, Kim Y J, et al. Identification of type 2 diabetes loci in 433, 540 East Asian individuals [J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 240-245.
- [3] Saxena A R, Gorman D N, Esquejo R M, et al. Danuglipron (PF-06882961) in type 2 diabetes: A randomized, placebo-controlled, multiple ascending-dose phase 1 trial [J]. *Nat Med*, 2021, 27(6): 1079-1087.
- [4] Donath M Y. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: Time to start [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(6): 465-476.
- [5] Ye S Y, Shao Q S, Zhang A L. *Anoectochilus roxburghii*: A review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 209: 184-202.
- [6] Liu Y T, Tang T T, Duan S Q, et al. The purification, structural characterization and antidiabetic activity of a polysaccharide from *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Food Funct*, 2020, 11(4): 3730-3740.
- [7] Cui S C, Yu J, Zhang X H, et al. Antihyperglycemic and antioxidant activity of water extract from *Anoectochilus*

- roxburghii in experimental diabetes [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65(5): 485-488.
- [8] Zeng B Y, Su M H, Chen Q X, *et al.* Protective effect of a polysaccharide from *Anoectochilus roxburghii* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 200: 124-135.
- [9] Yu X L, Lin S E, Zhang J Q, *et al.* Purification of polysaccharide from artificially cultivated *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. by high-speed counter current chromatography and its antitumor activity [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(22): 4338-4346.
- [10] Zeng B Y, Su M H, Chen Q X, *et al.* Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 153: 391-398.
- [11] Gao H S, Ding L L, Liu R, *et al.* Characterization of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide and its therapeutic effect on type 2 diabetic mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 179: 259-269.
- [12] Xu M J, Shao Q S, Ye S Y, *et al.* Simultaneous extraction and identification of phenolic compounds in *Anoectochilus roxburghii* using microwave-assisted extraction combined with UPLC-Q-TOF-MS/MS and their antioxidant activities [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1474.
- [13] 何超群, 杨婷媛, 王连艳, 等. SD大鼠II型糖尿病模型的建立与评价 [J]. *过程工程学报*, 2015, 15(3): 501-505.
- [14] 马娟. 金线莲 (*Anoectochilus roxburghii*) 提取物保肝护肝作用及其物质基础研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- [15] 任蓁, 代培方, 刘悦, 等. 益气养阴方对2型糖尿病大鼠脂代谢的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(7): 57-65.
- [16] Ribon V, Johnson J H, Camp H S, *et al.* Thiazolidinediones and insulin resistance: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25): 14751-14756.
- [17] 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.
- [18] Zhang G B, Li Q Y, Chen Q L, *et al.* Network pharmacology: A new approach for Chinese herbal medicine research [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 621423.
- [19] Abdelkader N F, Eitah H E, Maklad Y A, *et al.* New combination therapy of gliclazide and quercetin for protection against STZ-induced diabetic rats [J]. *Life Sci*, 2020, 247: 117458.
- [20] Oyedemi S O, Nwaogu G, Chukwuma C I, *et al.* Quercetin modulates hyperglycemia by improving the pancreatic antioxidant status and enzymes activities linked with glucose metabolism in type 2 diabetes model of rats: In silico studies of molecular interaction of quercetin with hexokinase and catalase [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(2): e13127.
- [21] Thong N M, Vo Q V, Huyen T L, *et al.* Theoretical study for exploring the diglycoside substituent effect on the antioxidative capability of isorhamnetin extracted from *Anoectochilus roxburghii* [J]. *ACS Omega*, 2019, 4(12): 14996-15003.
- [22] Liu Z L, Liu Q, Xiao B, *et al.* The vascular protective properties of kinsenoside isolated from *Anoectochilus roxburghii* under high glucose condition [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86: 163-170.
- [23] Zhang Y H, Cai J Y, Ruan H L, *et al.* Antihyperglycemic activity of kinsenoside, a high yielding constituent from *Anoectochilus roxburghii* in streptozotocin diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 114(2): 141-145.
- [24] 石亚静, 张欢, 李云翠, 等. 熊果酸对糖尿病大鼠一般表征和糖脂代谢的影响 [J]. *中国执业药师*, 2016, 13(7): 25-30.
- [25] 吴淑艳. 熊果酸对胰岛素抵抗大鼠糖、脂代谢及肝脏葡萄糖激酶的影响 [D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [26] 徐立, 王冲. 齐墩果酸抗糖尿病的研究进展与展望 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(8): 228-234.
- [27] Kumar D P, Rajagopal S, Mahavadi S, *et al.* Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(3): 600-605.
- [28] 俞晓玲, 姜文倩, 游晨, 等. 金线莲多糖的药理作用及其机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(5): 1117-1121.
- [29] 蔡镇, 冷玉杰, 张跃斌, 等. 五味子煎剂对2型糖尿病患者血清IL-2及IL-6水平的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(21): 4084-4086, 4131.
- [30] 胡波, 许珏, 陈忠诚, 等. 2型糖尿病患者IL-2, IL-6及TNF- $\alpha$ 水平检测 [J]. *广东医学*, 2006, 27(5): 735-737.
- [31] 金开山, 秦文浩, 施辉, 等. 花生四烯酸对糖尿病大鼠糖化血清蛋白、丙二醛和总抗氧化能力的影响 [J]. *南通大学学报: 医学版*, 2005, 25(4): 241-243.
- [32] 陆天阳. 环氧化酶-2基因多态性与2型糖尿病的相关性研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(21): 2569-2571.
- [33] 吴巧敏, 金雅美, 倪海洋. 山柰酚对2型糖尿病大鼠慢性并发症相关因子的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(12): 1806-1809.
- [34] 田亚涛, 吴昭焯, 毛雯靖, 等. CYP1B1敲除对小鼠2型糖尿病认知功能损害的影响 [J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2017, 38(3): 376-380.
- [35] 李鑫, 黄琦, 马荣, 等. 回汉族中老年人芳香化酶基因多态性与糖代谢的关联性研究 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2019, 40(2): 317-322.