

• 数据挖掘与循证医学 •

基于生物信息学和实验联合探讨熟地黄治疗 2 型糖尿病的潜在机制

任 婧^{1,2,3,4}, 卜竹林^{1,2,3,4}, 李晓芬^{1,2,3,4}, 孟祥龙^{1,2,3,4}, 张朔生^{1,2,3,4*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619

2. 山西中医药大学 中药炮制山西省重点实验室, 山西 晋中 030619

3. 山西中医药大学 中药材加工炮制传承与创新重点研究室, 山西 晋中 030619

4. 中药炮制技术传承基地 (山西中医药大学), 山西 晋中 030619

摘要: 目的 运用生物信息学、网络药理学及实验验证的方法探究熟地黄 *Rehmanniae Radix Praeparata* 治疗 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的作用机制。方法 熟地黄的水提物 ig 给予 T2DM 小鼠, 并通过超高效液相色谱-高分辨质谱 (UPLC-HRMS) 对入血及入胰腺成分进行辨识, 在瑞士目标预测数据库 (Swiss Target Prediction) 预测潜在靶点, 并与基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 中 GSE15932、GSE25724 数据集及比较毒物基因组学数据库 (Comparative Toxicogenomics Database, CTD)、人类基因数据库 (GeneCards) 取交集获取共同基因, 并在 Cytoscape 中进行聚类分析, 得到熟地黄入血和入胰腺靶点。对熟地黄入血和入胰腺的靶点取交集分析。在 ADMETab3.0 数据库中进行毒性预测、分子对接及信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA)-微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)-长链非编码核糖核酸 (long non-coding RNA, lncRNA) 互作网络分析, 运用基因和蛋白相互作用和功能数据库 (GeneMANIA) 分析主要生物功能, 并结合实时荧光定量 PCR 实验验证。结果 熟地黄可改善 T2DM 小鼠异常葡萄糖水平和糖耐量。熟地黄入血化合物 138 个, 相对应的潜在基因靶点分别为 18 个和 1 个聚类; 入胰腺化合物为 359 个, 相对应的潜在基因靶点分别为 141 个和 6 个聚类。甲状腺素转运蛋白基因 (transthyretin, TTR) 和 ATP 结合盒转运蛋白 B1 (ATP binding cassette subfamily B member 1, ABCB1) 为熟地黄入血及胰腺的交集基因靶点; 得到包含 6 个相同 miRNA 及 14 个相同 lncRNA 的 mRNA-miRNA-lncRNA 互作网络。主要生物功能涉及脂质运输和代谢、药物运输、离子和神经递质运输、血管过程及炎症反应的调节等。熟地黄可影响 T2DM 小鼠血液和胰腺中 *TTR*、*ABCB1* 的 mRNA 表达水平。结论 TTR 和 ABCB1 可被视为熟地黄治疗 T2DM 的潜在作用靶点, 为 T2DM 治疗提供依据的同时为后续深入研究熟地黄作用于 T2DM 的相关问题提供思路。

关键词: 生物信息学; 网络药理学; 2 型糖尿病; 熟地黄; 甲状腺素转运蛋白基因; ATP 结合盒转运蛋白 B1**中图分类号:** Q811.4; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)02-0566-19**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.020**Exploration of potential mechanism of *Rehmanniae Radix Praeparata* in treatment of type 2 diabetes mellitus based on bioinformatics and experiment**REN Jing^{1,2,3,4}, BU Zhulin^{1,2,3,4}, LI Xiaofen^{1,2,3,4}, MENG Xianglong^{1,2,3,4}, ZHANG Shuosheng^{1,2,3,4}

1. School of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Shanxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Processing, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

3. Key Research Laboratory of Processing and Innovation in Traditional Chinese Medicinal Materials, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

4. Traditional Chinese Medicine Processing Technology Inheritance Base (Shanxi University of Chinese Medicine), Jinzhong 030619, China

收稿日期: 2024-08-12**基金项目:** 山西省应用基础研究计划项目 (20210302124694); 中医药管理局科研课题项目 (2023ZYA2012); 山西省留学人员科技活动择优资助项目 (重点项目) (20230034); 山西省筹资金资助归国留学人员科研项目 (2023-156); 山西省教育厅项目 (2021L364); 山西中医药大学博士科研启动基金项目 (2023BK38); 山西中医药大学科技创新能力培育计划 (太行本草专项) (2022PY-TH-02)**作者简介:** 任 婧, 实验师, 主要从事制药工程、药物化学研究。E-mail: renjing@sxtcm.edu.cn***通信作者:** 张朔生, 博士生导师, 教授, 主要从事中药炮制现代研究。E-mail: zhangshuosheng@aliyun.com

Abstract: Objective To investigate the biological mechanisms of Shudihuang (*Rehmanniae Radix Praeparata*) in treating type 2 diabetes mellitus (T2DM) through bioinformatics, network pharmacology, and experimental validation. **Methods** T2DM mice were treated with an aqueous extract of *Rehmanniae Radix Praeparata* by gavage, and the components that entered the blood and pancreas were identified using ultra-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS). Potential targets were predicted in the Swiss Target Prediction database and compared with genes from the Gene Expression Omnibus (GEO) datasets GSE15932 and GSE25724, the Comparative Toxicogenomics Database (CTD), and the GeneCards database to identify common genes. The complex network analysis and visualization with Cytoscape software were performed intersection analysis of targets in the blood and pancreas. Toxicity prediction, molecular docking, and mRNA-miRNA-lncRNA interaction network analysis were conducted in the ADMETab3.0 database. The main biological functions were analyzed using the GeneMANIA database, supported by validation through real-time fluorescent quantitative PCR experiments. **Results** *Rehmanniae Radix Praeparata* significantly improved abnormal glucose levels and enhanced glucose tolerance in mice with T2DM. A total of 138 compounds were identified in the blood, with 18 corresponding potential gene targets and one cluster, while 359 compounds were identified in the pancreas, with 141 potential gene targets and six clusters. Transthyretin (TTR) and ATP binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) were identified as common gene targets in the blood and pancreas. The mRNA-miRNA-lncRNA interaction network containing six identical miRNAs and fourteen identical lncRNAs were constructed. The main biological functions involved lipid transport and metabolism, drug transport, ion and neurotransmitter transport, vascular processes, and inflammation regulation. *Rehmanniae Radix Praeparata* affected the mRNA expression levels of *TTR* and *ABCB1* in the blood and pancreas of T2DM mice. **Conclusion** TTR and ABCB1 can be considered as potential therapeutic targets for *Rehmanniae Radix Praeparata* in the treatment of T2DM, providing a basis for T2DM treatment and offering insights for further research into the role of *Rehmanniae Radix Praeparata* in T2DM-related issues.

Key words: bioinformatics; network pharmacology; type 2 diabetes mellitus; *Rehmanniae Radix Praeparata*; transthyretin; ATP binding cassette subfamily B member 1

糖尿病是以长期高血糖为主要特征的内分泌代谢性疾病,严重威胁着人类的健康与生活质量。糖尿病分为 1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM)、2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)、妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 及其他特殊类型糖尿病 4 类。其中 T2DM 是最常见的类型,占糖尿病患者的 90% 以上^[1-2]; 据国际糖尿病联合会估计,到 2045 年全球约有 7 亿人患 T2DM^[3-5]。T2DM 的主要机制是胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和胰岛素分泌相对缺乏,严重时会导致组织器官慢性进行性病变、功能减退甚至衰竭,如心血管疾病、视网膜病变、肾病、神经病变和糖尿病足等,这些并发症严重威胁到患者的生命安全^[6]。

熟地黄 *Rehmanniae Radix Praeparata* 为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根经清蒸或酒蒸得到的加工品,可用来治疗 T2DM^[7]。项目组前期研究及文献报道均表明,熟地黄中苯丙素苷类化合物如 (异) 毛蕊花糖苷、呋喃醛衍生物如 5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)、糖类化合物等在治疗 T2DM 的过程中,能够调节糖代谢相关酶如己糖激酶 (hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase-1, PFK-

1) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6PD) 等,进而影响单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 等能量及相关应激通路靶点,最终改善炎症反应和氧化应激以保护胰岛 β 细胞从而治疗 T2DM^[8-10]。

随着多组学技术的高速发展和公共数据库的广泛应用,依靠计算机及数学方法解析生物学数据的生物信息学和网络药理学方法,在流行病学筛选、疾病易感性研究、病因探索、疾病诊断和药物筛选靶点等方面展现出巨大潜力^[11]。本研究对熟地黄入血及入胰腺成分进行探究,运用生物信息学及网络药理学技术分析其治疗 T2DM 的潜在的靶点,构建熟地黄治疗 T2DM 的信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) - 微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) - 长链非编码核糖核酸 (long non-coding RNA, lncRNA) 网络,并初步进行实验验证,探讨熟地黄治疗 T2DM 的潜在机制,为 T2DM 的临床诊断和治疗提供参考。

1 材料与仪器

1.1 药物、试剂及动物

熟地黄饮片 (山西元和堂中药有限公司, 批号

220401) 经山西中医药大学张朔生教授鉴定为玄参科植物地黄 *R. glutinosa* Libosch. 干燥块根的蒸制加工品, 凭证标本存放于山西中医药大学植物标本室 (标本编号 SXTCM-Zhang-2022006)。

链脲佐菌素 (STZ, 批号 WXBC6558V, 美国 Sigma 公司); 三诺血糖仪及试纸 (批号 2J01E210813, 三诺生物传感股份有限公司); 动物总 RNA 提取试剂盒 (柱式) [批号 B518651-0100, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。

SPF 级, 雄性 C57BL/6 小鼠, 7 周龄, 体质量 18~22 g, 购买于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2019-0010。饲养条件: 温度 (23±2) °C, 相对湿度 (50±10) %, 照明条件 12 h 光照/12 h 暗循环, 自由摄食饮水, 所用小鼠实验前均适应性饲养 1 周。实验经山西中医药大学伦理委员会批准 (批准编号 2022DW087), 按《动物实验报告指南》(ARRIVE guidelines) 进行。

1.2 仪器

UHPLC Vanquish 超高效液相色谱、Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap 质谱仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司); ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 美国沃特世有限公司)。

1.3 数据库与软件

1.3.1 数据库 公共化学数据库 (Public Chemical Database, Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); 瑞士目标预测数据库 (Swiss Target Prediction, <http://www.swisstargetprediction.ch/>); 通用蛋白质资源数据库 (UniProt, <https://www.uniprot.org/>); 基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>); GeneCards-人类基因数据库 (GeneCards-The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/>, 2024.5.14 更新版本); 蛋白结构数据库 (Protein Data Bank, PDB, <http://www.rcsb.org/>); 仙桃学术 (<https://www.xiantaozi.com/>); 基因和蛋白相互作用和功能数据库 (GeneMANIA, <https://genemania.org/>); 微小 RNA 数据库 (microRNA Database, miRDB, <http://mirdb.org/>); DIANA 微 T 网络服务器数据库 (DIANA-microT web serve, DIANA-micro, <http://www.microrna.gr/microT>); 微 RNA 靶标预测和功能注释数据库 (miRWalk: Database for miRNA Target Prediction and Functional Annotations ,

miRWalk, <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>); 微 RNA 靶基因预测数据库 (miRcode: MicroRNA Target Gene Prediction Database , miRcode , <http://www.mircode.org/>); 微 RNA-靶标相互作用数据库 (starBase: A Database for MicroRNA-Target Interaction, starBase, <http://starbase.sysu.edu.cn/>); 吸收分布代谢排泄毒性属性数据库 (ADMETab3.0: ADMET Attributes Database, ADMETab3.0, <http://admetlab3.scbdd.com/>); 全自动蛋白质-配体相互作用分析网站 (Protein-Ligand Interaction Profiler, PLIP, <https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>); 比较毒物基因组学数据库 (Comparative Toxicogenomics Database, CTD, <https://ctdbase.org/>)。
1.3.2 软件 Cytoscape 3.9.0 (Cytoscape Consortium); Rstudio 4.3.2 (RStudio, Public Benefit Corporation); Pymol 2.6 (Schrödinger, Limited Liability Company); AutoDockTool-1.5.7 (Olson Laboratory); Autodock Vina (Olson Laboratory)。

2 方法

本研究先期在熟地黄对 T2DM 小鼠入胰腺和血液中获得相关化合物的基础上, 对其进行靶点预测, 并通过 CTD、GeneCards、GEO 等多个数据库对熟地黄治疗 T2DM 的靶点进行筛选, 得到的基因进行分子对接及 mRNA-miRNA-lncRNA 互作网络分析; 最后进行 PCR 实验验证, 具体研究技术路线见图 1。

2.1 熟地黄水提物的制备

称取熟地黄药材 100 g, 加入 2 倍量的蒸馏水浸泡 30 min 后, 加入 8 倍量的蒸馏水, 加热回流提取 40 min, 滤过; 剩余药渣再加入 6 倍量的蒸馏水, 加热回流 40 min; 合并 2 次提取液, 减压浓缩, 得含药量为 1 g/mL 的熟地黄水提物, 于 4 °C 储存备用。

2.2 T2DM 小鼠模型制备及给药

C57BL/6 小鼠适应性饲养 1 周后, 随机抽取 8 只作为正常组, 其余小鼠 ip 100 mg/kg 造模 (每天 1 次, 连续 3 d), 并于注射后第 3、7、14 天检测空腹血糖, 稳定后空腹血糖 (fasting blood-glucose, FBG) ≥ 11.1 mmol/L 视为造模成功。将造模成功的小鼠随机分为模型组、熟地黄组 (15 g/kg^[12]) 和二甲双胍组 (250 mg/kg), 每组 8 只, ig 给药, 正常组和模型组 ig 等体积的纯净水, 连续 4 周。

给药第 25 天, 禁食 12 h 后进行口服葡萄糖耐

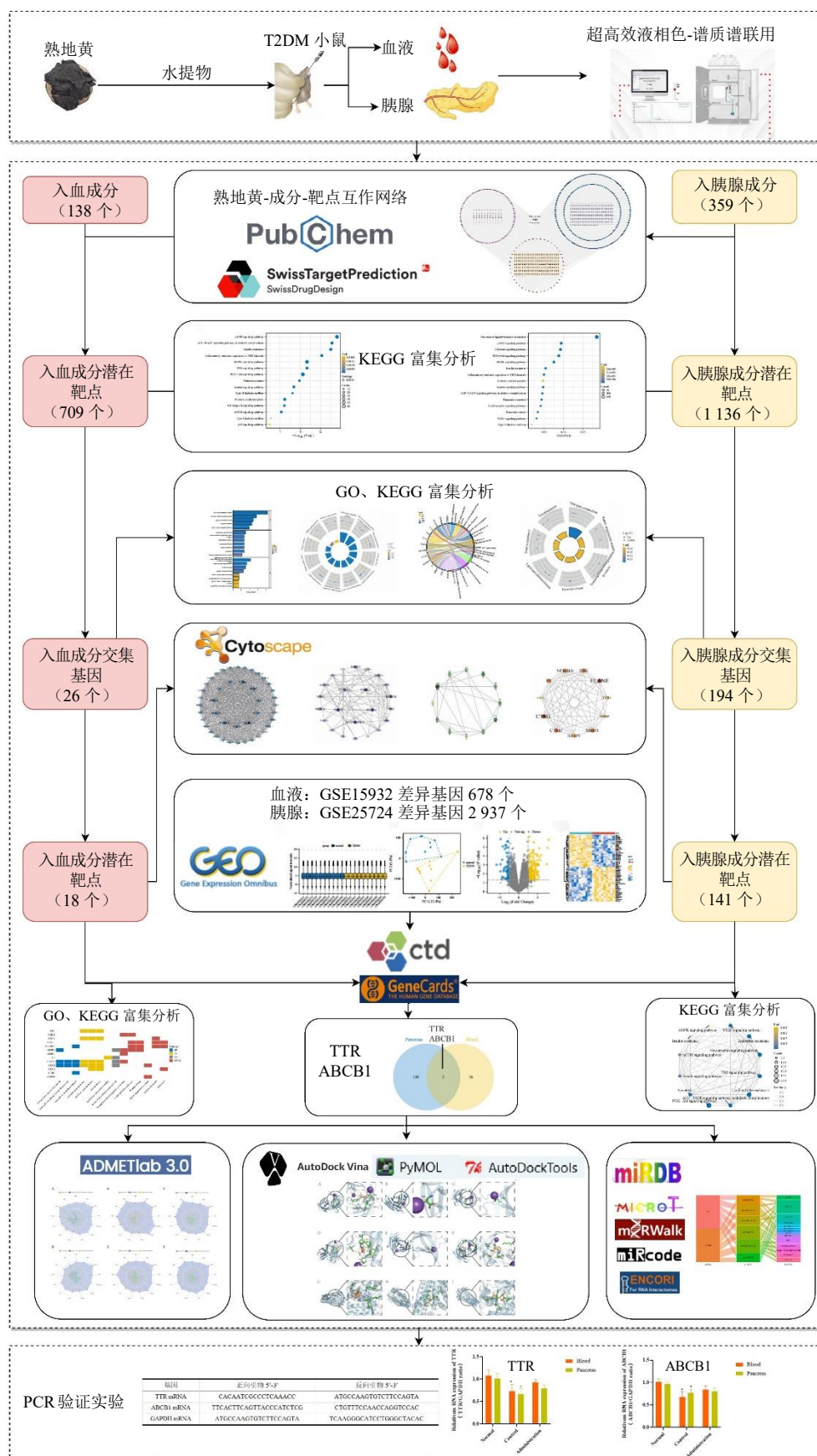


图 1 技术路线图

Fig. 1 Technology roadmap

量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT), ig 葡萄糖溶液 (2 g/kg); 在第 0、15、30、45、60、90、120 min 通过尾静脉取血, 测定血糖水平, 记录血糖水平随时间的变化情况, 采用线性梯形法计算曲线下面积 (area under the curve, AUC)。末次给药后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 2%异氟烷麻醉后, 腹主动脉取血, 4 000 r/min 离心 15 min (4 ℃), 取血清, 置于-80 ℃保存, 备用; 取小鼠胰腺-80 ℃保存, 用于后续分析。

2.3 超高效液相色谱-高分辨率质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, UHPLC-HRMS) 分析

2.3.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱; 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-0.1%甲酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0.0~17.0 min, 95%~2% A; 17.0~17.2 min, 2%~95% A; 17.2~20.0 min, 95% A; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 ℃。

2.3.2 质谱条件 Thermo Q-Exactive HFX 质谱仪, 采用正、负离子采集模式进行扫描。检测条件: 喷雾电压分别为-3 000 V 和 3 800 V; 鞘气压力为 45 arb; 辅助气压力为 20 arb; 传输毛细管温度 320 ℃; 探头加热器温度为 370 ℃; 扫描范围为 m/z 90~1 300。

参照前期方法^[13], 采用 UPLC-HRMS 方法对熟地黄、熟地黄给药前后小鼠血清及胰腺中的化学成分进行检测, 质谱数据库二级图谱 (MS²) 进行比对, 以 MS² 碎片相似度得分大于 0.7 为筛选标准。对熟地黄中含量较高成分进行鉴定, 再以给药后小鼠血清及胰腺组织中峰响应强度高于给药前 3 倍以上为筛选条件, 对比分析熟地黄给药前后 T2DM 小鼠血清及胰腺中的成分。

2.4 熟地黄在血清及胰腺的药物-化合物-靶点互作分析

将熟地黄中含有的成分以及能够进入血液和胰腺的化合物的 PubChem CID 输入到 PubChem 化合物数据库中, 剔除与 PubChem 数据库中的化合物不匹配的内容后, 获得与每种化合物对应的 SMILES 号。随后, 在 Swiss Target Prediction 数据库^[14]中预测活性化合物的靶标, 筛选可能性大于 0 的靶点, 并去除重复靶点。最后, 在 UniProt 数据库中, 物种设置为智人, 以搜索 UniProt ID 用于批量标准化并转化为基因名。使用网络映射软件 Cytoscape (3.9.0 版) 构建熟地黄进入 T2DM 小鼠

血液和胰腺的活性成分及其靶标网络, 并进行分析。网络图中节点表示熟地黄、活性成分或靶点, 边缘表示它们之间的相互作用。通过仙桃学术网站进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析的可视化。

2.5 熟地黄作用靶点同 T2DM 表型基因及差异表达基因的交集基因分析

通过 GEO 数据库检索 T2DM, 并筛选出包含疾病组和对照组 (健康人) 的数据集。所用的组织样本为血液和胰岛, 芯片测序 mRNA 的数据集为 GSE15932 (物种为人, 检测组织为外周血, T2DM 疾病 8 例, 对照组 8 例, 测序平台为 Affymetrix 公司的 GPL570 芯片平台) 和 GSE25724 (物种为人, 检测组织为胰腺, T2DM 疾病 6 例, 对照组 7 例, 测序平台为 Affymetrix 公司的 GPL96 芯片平台)。利用生物信息学数据分析服务平台仙桃学术进行样本校正、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及差异基因分析, 设定 $|\log_2 FC| \geq 0.58$ [FC 表示差异倍数 (fold change)] 及 $P < 0.05$, 从而筛选出 T2DM 在血液和胰岛中的差异基因。然后, 将熟地黄作用于血液和胰腺的靶点取交集, 并进行 GO 与 KEGG 富集分析。

在 CTD 数据库^[15] (推断分数 ≥ 1) 和 GeneCards 数据库^[16] (相关性评分 ≥ 0) 中, 对 T2DM 的疾病表型进行深入检索, 并在剔除重复项后, 整合相关的疾病靶点, 最终获得了 T2DM 的独特疾病靶点集合。

将熟地黄在血液中的靶点与胰腺中的靶点分别与 T2DM 表型基因以及 GEO 数据库中的血液和胰岛组织基因进行交集分析, 从而筛选出熟地黄在血液和胰腺中的关键作用基因, 并在仙桃学术线上分别对血液和胰腺的关键作用靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。在此基础上, 运用 Cytoscape (3.9.0 版本) 软件, 结合 MCODE 插件, 设定节点临界值 > 0.2 , 并确保子图中的每个节点至少与另外 2 个节点相连, 以此进行功能互作网络的聚类分析。

2.6 熟地黄作用血液和胰腺的核心化合物筛选及其分子对接及药物毒性预测

通过“2.5”项中得到的核心基因预测潜在的化合物, 并同入血和入胰腺成分比对; 再与构建的药物-成分-靶点互作网络度值 (degree) > 50 的化合物取交集, 并与核心基因进行分子对接。将以上筛选的化合物小分子下载 mol2 格式结构, 使用

AutoDockTool-1.5.7 程序加氢, 计算电荷, 确定配体可旋转角键。从 PDB 数据库下载靶点基因蛋白 2 个结构, 使用 Pymol 软件除去配体, 提取结构为 PDB 格式, 对以上处理好的 2 个蛋白结构使用 AutoDockTool-1.5.7 程序去除水分子, 加氢, 计算电荷, 并保存成 pdbqt 格式。使用 Autodock Vina 对蛋白与化合物小分子进行对接, 每次蛋白-分子生成 9 个复合体构象。通过能量排序, 筛选结合自由能低于 -5 kcal/mol ($1 \text{ kcal}=4.2 \text{ kJ}$) 的构象, 并选取结合自由能最低的构象作为目标构象进行分析。对于所有目标构象使用 PLIP 网站分析分子间非共价键相互作用力, 包括氢键、疏水作用力、阳离子- π 等相互作用, 并使用 Pymol 绘制相互作用力。

在 ADMETab3.0 数据库中输入上述得到的化合物的 SMILES 号, 预测其药物代谢、分布、排泄、转运和毒性等性质。

2.7 熟地黄作用血液和胰腺的核心基因 mRNA-miRNA-lncRNA 互作网络及核心基因互作网络构建

将“2.5”项中得到的核心基因在 MicroRNA 数据库、DIANA-micro 数据库、miRWalk 数据库、miRcode 数据库及 starBase 数据库中查找其 miRNA, 两两取交集, 并用韦恩图进行可视化。将

共同的 miRNA 在 starBase 数据库中预测其 lncRNA, 并在 Cytoscape 软件中绘制核心基因的 mRNA-miRNA-lncRNA 网络图。此外, 还进一步绘制核心基因共同的 miRNA-lncRNA 关系图并进行分析。在 GeneMANIA 数据库^[17]中输入核心基因, 得到与其相关的 mRNA 及其基因互作、通路和基因共表达关系网。

2.8 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 实验验证

用动物总 RNA 提取试剂盒 (柱式) 从处于冻存状态的血清或组织中提取总 RNA, 并用 MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix 试剂盒反向转录。在推荐的热循环设置下, 使用 Applied Biosystems RT-PCR 系统 (Roche, Basel, Switzerland) 进行 qRT-PCR 分析, 步骤如下: 95°C 、10 min, 95°C 、10 s, 60°C 、60 s, 95°C 、15 s, 并进行 45 个循环。以磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算甲状腺素转运蛋白基因 (transthyretin, *TTR*) 和 ATP 结合盒转运蛋白 B1 (ATP binding cassette subfamily B member 1, *ABCB1*) mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences of PCR

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>TTR</i>	CACAATCGCCCTCAAACC	ATGCCAAGTGTCTTCCAGTA
<i>ABCB1</i>	ATGCTCTGGCCTTCTGGATGGGA	ATGGCGATCCTCTGCTTCTGCCCCAC
<i>GAPDH</i>	AGCGTCAAAGGTGGAGGGAGTGG	TCAAGGGCATCCTGGGCTACAC

2.9 统计学方法

本研究利用 R 语言中的 limma、clusterProfiler、org.Hs.eg.db 以及 ggplot2 包等进行数据处理、统计分析和结果可视化; 体征指标及 RT-PCR 实验数据采用单因素方差分析, 并采用最小显著性差异进行检验。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 GraphPad Prism 9.5.1 绘图。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 熟地黄可改善 T2DM 小鼠异常葡萄糖水平和糖耐受量

与正常组相比, 给药第 1~4 周模型组小鼠空腹血糖值显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 熟地黄组和二甲双胍组小鼠空腹血糖水平显著降低

($P < 0.01$ 、 0.001), 见图 2-A。

OGTT 试验中, 与正常组相比, 模型组小鼠注射葡萄糖 0~120 min 血糖水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组小鼠在注射葡萄糖 15、30、45、60、90 和 120 min 后, 血糖水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 见图 2-B。与正常组比较, 模型组 AUC 显著增加 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 各给药组 AUC 均显著降低 ($P < 0.001$), 见图 2-C。

3.2 熟地黄入血及胰腺组织原型成分鉴定

比较熟地黄给药后 T2DM 小鼠血清及胰腺色谱基峰图 (base peak chromatogram, BPC), 见图 3, 扣除血清及胰腺中的内源性成分, 分别得到熟地黄

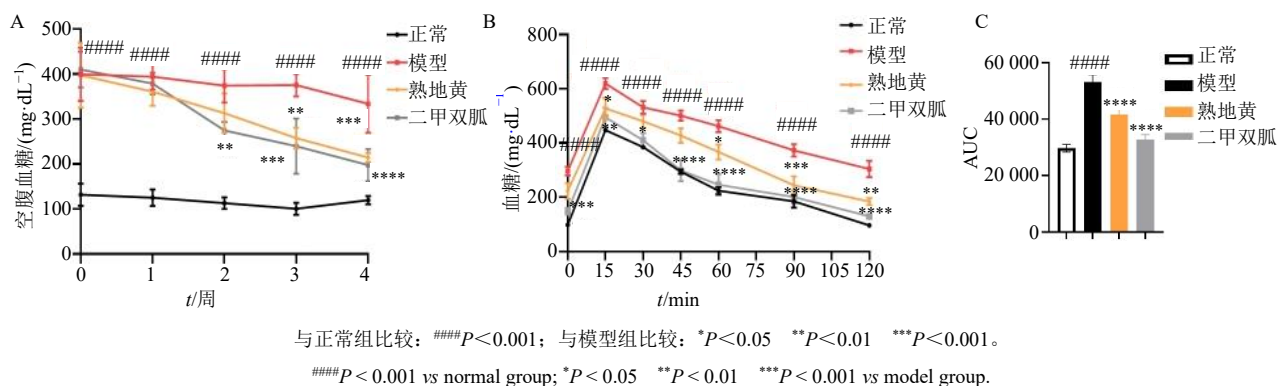
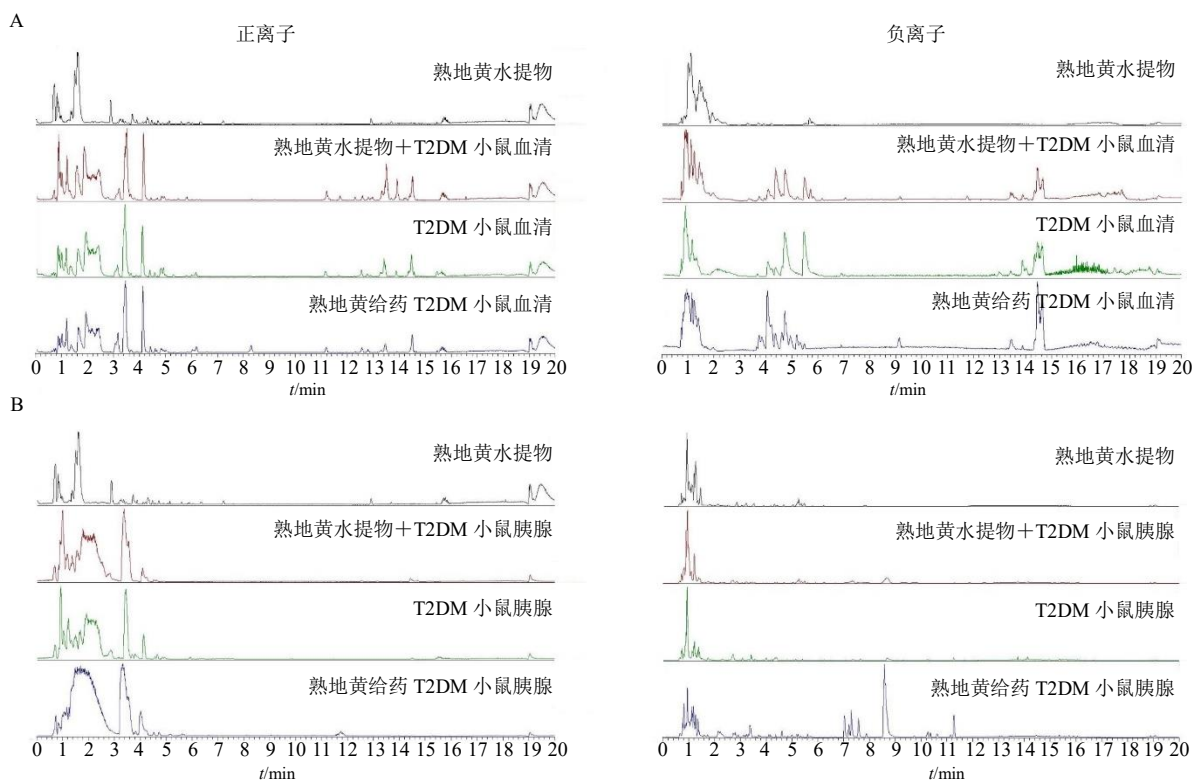


图 2 熟地黄对 T2DM 小鼠空腹血糖值 (A)、OGTT (B) 和血糖曲线下面积 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effects of *Rehmanniae Radix Praeparata* on fasting blood glucose (A), OGTT (B) and AUC (C) in T2DM mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)



A-正、负离子模式下熟地黄对 T2DM 小鼠入血成分基峰色谱图; B-正、负离子模式下熟地黄对 T2DM 小鼠入胰腺成分基峰色谱图。

A-base peak chromatogram of *Rehmanniae Radix Praeparata* on blood entry components of T2DM mice at positive and negative ion mode; B-base peak chromatogram of *Rehmanniae Radix Praeparata* on pancreas entry components of T2DM mice at positive and negative ion mode.

图 3 熟地黄对 T2DM 小鼠入血和胰腺成分基峰色谱图

Fig. 3 Base peak chromatogram of *Rehmanniae Radix Praeparata* on blood and pancreatic entry components of T2DM mice

给药后对 T2DM 小鼠的入血及胰腺化学成分, 入血成分有 142 个, 入胰腺组织成分 368 个。进一步将得到的化合物进行筛选, 去掉正、负离子模式检测重复及没有 SMILE 编号及 Pubchem CID 编号的化合物, 最终血清中有 138 个, 胰腺中有 359 个。

3.3 熟地黄在血清及胰腺的药物-化合物-靶点互作网络

将“3.2”项中得到的化合物在 Swiss Target

Prediction 数据库中预测靶标, 并在 UniProt 数据库中标准化后得到熟地黄治疗 T2DM 小鼠血液中有 709 个靶标基因, 胰腺中有 1 136 个靶标基因。对其进行网络分析, degree 值大于 50 的化合物主要是酸类、苷类、酮类等, 具体见表 2。药物-化合物-靶点网络见图 4-A, 同时进行 KEGG 富集分析 (图 4-B、C), 熟地黄入血的相关 T2DM 通路主要富集在环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate,

表 2 交互网络分析关键化合物汇总

Table 2 Summary of key compounds for interaction network analysis

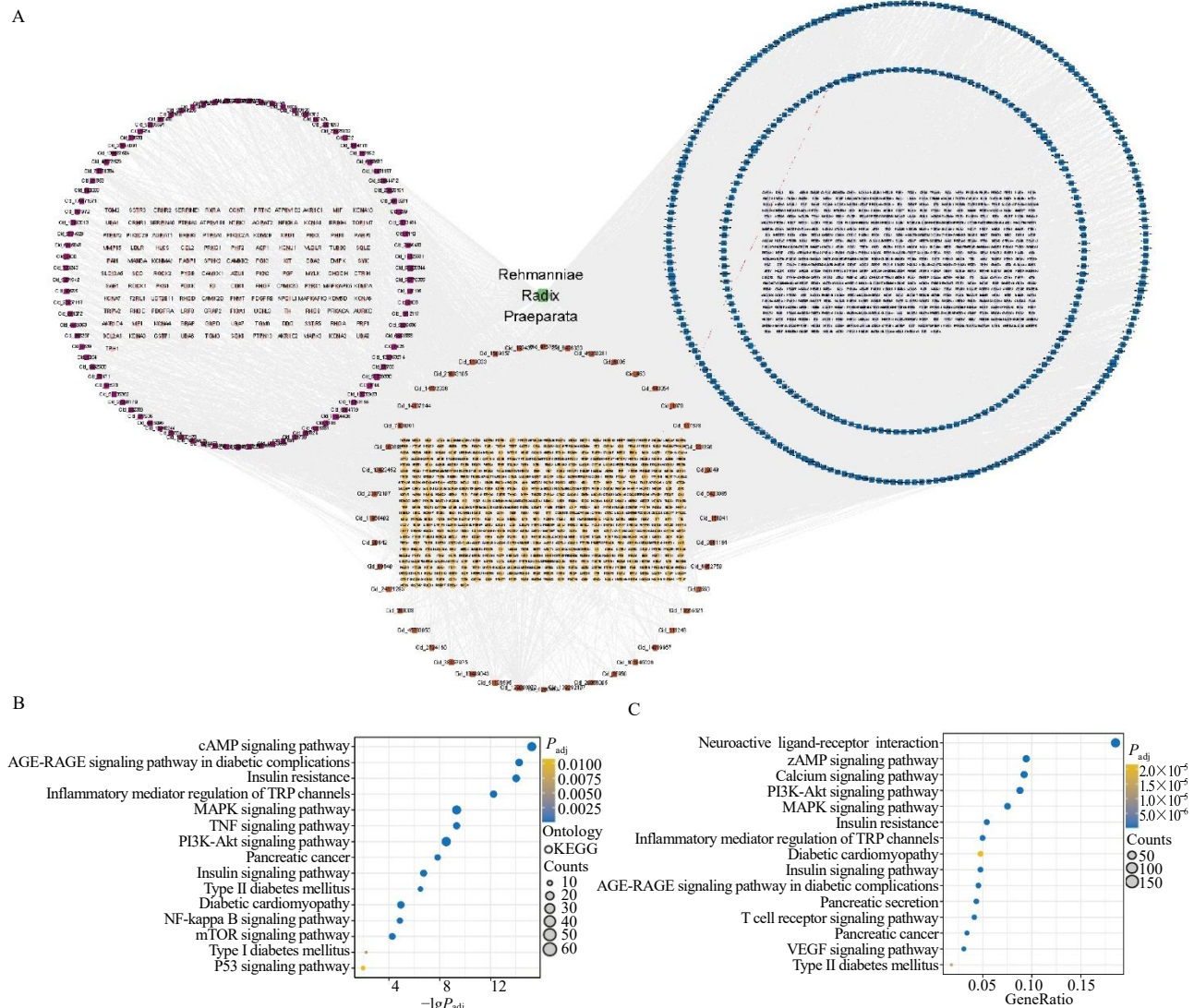
PubMed CID	化合物名称	平均最短 路径长度	中间集权	紧密性中心性	相关度	邻里连通性	多节点对 合作伙伴	辐射度	强度	拓扑系数	组织
Cid 57212901	(2R)-2-[(2R)-2,6-二氨基己酰基]氨基-3-苯丙酸	2.587 593 337	0.027 172 697	0.386 459 489	115	19.045 045 05	4	0.996 805 647	6 260 876	0.036 381 139	胰腺
Cid 56776301	(3R,9S,22S,23R)-3-羟基-17,23-环氧维拉曲曼-11-酮	2.586 444 572	0.048 755 286	0.386 631 135	115	13.035 714 29	2	0.996 807 959	5 671 836	0.024 265 553	胰腺
Cid 86280478	N-(1-氨基-3,3-二甲基-1-氧代丁-2-基)-1-戊基-1H-咪唑-3-甲酰胺	2.591 039 632	0.048 653 148	0.385 945 467	113	13.953 703 7	4	0.996 798 713	5 578 222	0.026 116 338	胰腺
Cid 91746333	6-氨基-2-[[1-(5-氧代吡咯烷-2-羰基)吡咯烷-2-羰基]氨基]己酸	2.593 337 163	0.024 864 039	0.385 603 544	109	21.783 018 87	2	0.996 794 09	6 095 514	0.041 901 248	胰腺
Cid 93606401	(2R)-2-[[[(2S,3S)-2-氨基-3-甲基戊酰基]氨基]-3-苯基丙酸	2.59 448 592 8	0.022 281 375	0.385 432 809	108	21.209 523 81	3	0.996 791 779	5 751 540	0.040 745 008	胰腺
Cid 86268508	UR-144 正戊酸	2.596 783 458	0.048 793 554	0.385 091 794	105	13.553 398 06	1	0.996 787 156	5 150 614	0.025 309 27	胰腺
Cid 53248764	2-氨基-5-氯-3-(2-乙氧基-5-氟苯基)-3H-咪唑-3-醇	2.594 485 928	0.038 658 379	0.385 432 809	105	18.438 095 24	0	0.996 791 779	5 910 162	0.035 157 45	胰腺
Cid 75528942	N ² -乙酰基-N-(2-(4-羟基苯基)乙基)- α -谷氨酰胺	2.596 783 458	0.028 768 769	0.385 091 794	103	20.145 631 07	0	0.996 787 156	5 976 650	0.038 600 063	胰腺
Cid 86178349	5-(2-甲基丙基)-3,6-二氧代-2-哌嗪丙酸	2.617 461 229	0.020 671 474	0.382 049 594	87	22.235 294 12	2	0.996 745 551	4 418 160	0.042 813 093	胰腺
Cid 102571622	3-羟基-3-甲基-5-氧代-5-[[[(2R,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-辛烷-3-基氧代-2-基]甲氧基]戊酸	2.617 461 229	0.018 431 884	0.382 049 594	85	18.176 470 59	0	0.996 745 551	3 793 646	0.034 629 981	胰腺
Cid 129361410	(3S)-3-氨基-4-[[[(1R)-1-羰基-2-(4-羟基苯基)乙基]氨基]-4-氧代丁酸	2.619 758 759	0.013 353 357	0.381 714 536	84	25.975 903 61	1	0.996 740 928	4 158 934	0.050 354 644	胰腺
Cid 129008872	(E)-3,10-二羟基-4,9-二甲基十二烷基-6-烯二酸	2.618 609 994	0.025 970 52	0.381 881 992	84	17.523 809 52	0	0.996 743 239	3 824 224	0.033 314 132	血液、 胰腺
Cid 60208841	(6,6-二甲基双环[3.1.1]庚烷-2-基)甲基 6-O-((2R,3R,4R)-3,4-二羟基-4-(羟甲基)四氢呋喃-2-基)- β -吡喃葡萄糖苷	2.636 990 235	0.011 9571 91	0.379 220 213	68	22.941 176 47	0	0.996 706 257	2 897 376	0.044 236 243	胰腺
Cid 129008965	2-[(7 α -羟基-3-氧代-5-丙-2-基-1,3a,4,5,6,7-六氢-2-苯并呋喃-4-基)-羟甲基]丙烯酸	2.640 436 531	0.017 387 192	0.378 725 256	66	21.815 384 62	1	0.996 699 323	2 845 776	0.041 966 501	胰腺
Cid 61578913	(2S,3S)-2-[[[(2R)-2-氨基丙酰基]氨基]-3-甲基戊酸	2.641 585 296	0.009 313 409	0.378 560 557	64	28.046 875 00	0	0.996 697 011	2 682 038	0.054 529 990	胰腺
Cid 71694406	2-(羟甲基)-6-[(E)-4-(1,2,4-三羟基-2,6,6-三甲基环己基)丁-3-烯-2-基]氧代烷-3,4,5-三醇	2.642 734 061	0.011 058 117	0.378 396 001	63	27.142 857 14	0	0.996 694 700	2 725 746	0.052 707 373	血液

表 2 (续)

PubMed CID	化合物名称	平均最短 路径长度	中间集权	紧密性中心性	相关度	邻里连通性	多边节点对 合作伙伴	辐射度	强度	拓扑系数	组织
Cid 94334270	(2R)-2-[[[(2R)-2-氨基-3-甲基 丁酰基]氨基]-3-(1H-咪唑- 5-基)丙酸	2.645 031 591	0.010 862 97	0.378 067 318	61	22.655 737 70	0	0.996 690 077	2 315 618	0.043 660 762	胰腺
Cid 135398690	10-甲酰基二氢叶酸	2.646 180 356	0.0140 263 62	0.377 903 191	60	27.466 666 67	0	0.996 687 766	26 30 428	0.053 360 215	胰腺
Cid 124433150	(2S)-2-[(2R)-2-氨基-4-羧基 丁酰基]氨基]-4-甲基戊酸	2.646 180 356	0.006 467 267	0.377 903 191	60	29.050 000 00	0	0.996 687 766	2 199 148	0.056 552 419	胰腺
Cid 92259189	(2R)-2-[[[(2S)-2-氨基-3-羟基 丙酰基]氨基]-3-(4-羟基苯 基)丙酸	2.648 477 886	0.008 954 552	0.377 575 363	59	27.655 172 41	1	0.996 683 143	2 160 274	0.053 740 267	胰腺
Cid 57262456	(2S)-2-[[[(2S)-2,5-二氨基-5- 氧代戊酰基]氨基]-3-甲基 丁酸	2.649 626 651	0.006 351 044	0.377 411 663	57	29.385 964 91	0	0.996 680 832	2 133 072	0.057 229 768	胰腺
Cid 113571531	(2S)-2-[(2R)-2-氨基-4-甲基 戊酰基]氨基]戊二酸	2.650 775 416	0.005 892 779	0.377 248 104	56	30.946 428 57	0	0.996 678 52	2 112 430	0.060 375 864	胰腺
Cid 56776385	1-[2-甲基-6-[(2S,3R,4S,5S,6R)- 3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)氧 杂-2-基]氧苯基]乙酮	2.650 775 416	0.010 897 527	0.377 248 104	56	22.178 571 43	0	0.996 678 52	2 036 780	0.042 698 733	血液
Cid 60208844	3-[(10S,13R,17R)-1,5,14-三羟 基-10,13-二甲基-3- [(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-三 羟基-6-甲氧基-2-基]氧基- 2,3,4,6,7,8,9,11,12,15,16,17- 十二氢-1H-环戊烷[a]菲- 17-基]-2H-呋喃-5-酮	2.651 924 182	0.018 022 266	0.377 084 687	56	23.490 909 09	1	0.996 676 209	2 246 386	0.045 344 575	血液
Cid 57509330	3,5,5-三甲基-4-[[[(2R,3R,4S, 5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟 甲基)恶烷-2-基]氧甲基] 环己-2-烯-1-酮	2.655 370 477	0.009 796 425	0.376 595 284	52	21.826 923 08	0	0.996 669 275	1 774 332	0.041 989 764	血液
Cid 65549302	(2S)-2-[(2R)-2-氨基-3-甲基 丁酰基]氨基]-4-甲基磺酰 基丁酸	2.657 668 007	0.006 849 533	0.376 269 721	50	29.860 000 00	0	0.996 664 652	1 844 148	0.058 185 484	胰腺

cAMP) 信号通路、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体 (advanced glycation end-products-receptor for advanced glycation end-products signaling pathway in diabetic complications, AGE-RAGE) 信号通路、IR、炎症介质对瞬时受体电位通道的调节、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路、胰腺癌、胰

岛素信号通路、T2DM、糖尿病性心肌病、核因子- κ 轻链增强子激活的 B 细胞信号通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路、T1DM、肿瘤蛋白 53 信号通路等; 入胰腺相关 T2DM 通路主要富集在神经活性配体-受体相互作用、cAMP 信号通路、钙信号通路、胰岛素抵抗、瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道的炎症介质调节、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、胰腺分泌、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路、T 细胞受体信号通路、胰腺癌、胰岛素信号



A-药物-化合物-靶点网络图; B-入血成分预测靶点 KEGG 分析; C-入胰腺成分预测靶点 KEGG 分析。

A-network diagram of drug-compound-target; B-KEGG analysis of prediction target for blood entry components; C-KEGG analysis of prediction target for pancreas entry components.

图 4 互作网络及富集分析

Fig. 4 Interaction network and enrichment analysis

通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、T2DM、糖尿病性心肌病。

3.4 T2DM 差异基因、富集分析及其核心基因筛选

对 GEO 数据库中以血液为样本的 GSE15932 数据集进行 PCA 及差异基因分析, 得到上调基因 308 个, 下调基因 370 个 (图 5-A~D)。对组织样本为胰腺的 GSE25724 数据集进行 PCA 分析及差异基因分析, 得到上调基因 1 305 个, 下调基因 1 668 个 (图 5-E~H)。

GEO 数据库中血液样本的差异基因与实验中熟地黄入血预测靶点取交集, 得到入血关键基因 26

个, GO 分析 (图 5-I) 显示, 生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 富集主要在纺锤体极中心体、质膜外侧面的内在成分、丝氨酸水解酶活性、丝氨酸型内肽酶活性、组蛋白激酶活性、胞质分裂的正向调节、组蛋白丝氨酸磷酸化、主轴伸长、主轴中间区组成、细胞分裂的正向调节、纺锤体微管、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、对脂多糖的反应等。KEGG 分析 (图 5-J) 显示, 主要是富集在肾素-血管紧张素系统、胰岛素抵抗及脂质和动脉粥样硬化等通路。

GEO 数据库中胰腺样本的差异基因与实验中熟地黄入胰腺预测靶点取交集,得到入胰腺关键基因 194 个,GO 分析(图 5-K)显示,排名前 200 条中与 T2DM 相关的功能主要富集在对脂多糖的反应、单糖代谢过程、葡萄糖代谢过程、对胰岛素的反应、胰岛素受体信号通路、突触后特化、质膜信号受体复合物、突触后密度、氨基酸突触、突触膜、突触前结构、离子型谷氨酸受体复合物、蛋白质酪氨酸激酶活性、激素结合、肽激素结合、胰岛素受体底物结合、PI3K 活性、胰岛素样生长因子 I 结合、蛋白激酶 A 催化亚基结合等。KEGG 分析(图 5-L)显示,与 T2DM 相关的通路主要富集在 T 细胞受体信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、血脂与动脉粥样硬化、胰腺癌、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、TRP 通道的炎症介质调节、cAMP 信号通路、T2DM、胰岛素抵抗、腺苷酸单磷酸激活的蛋白激酶信号通路、糖尿病性心脏病等。

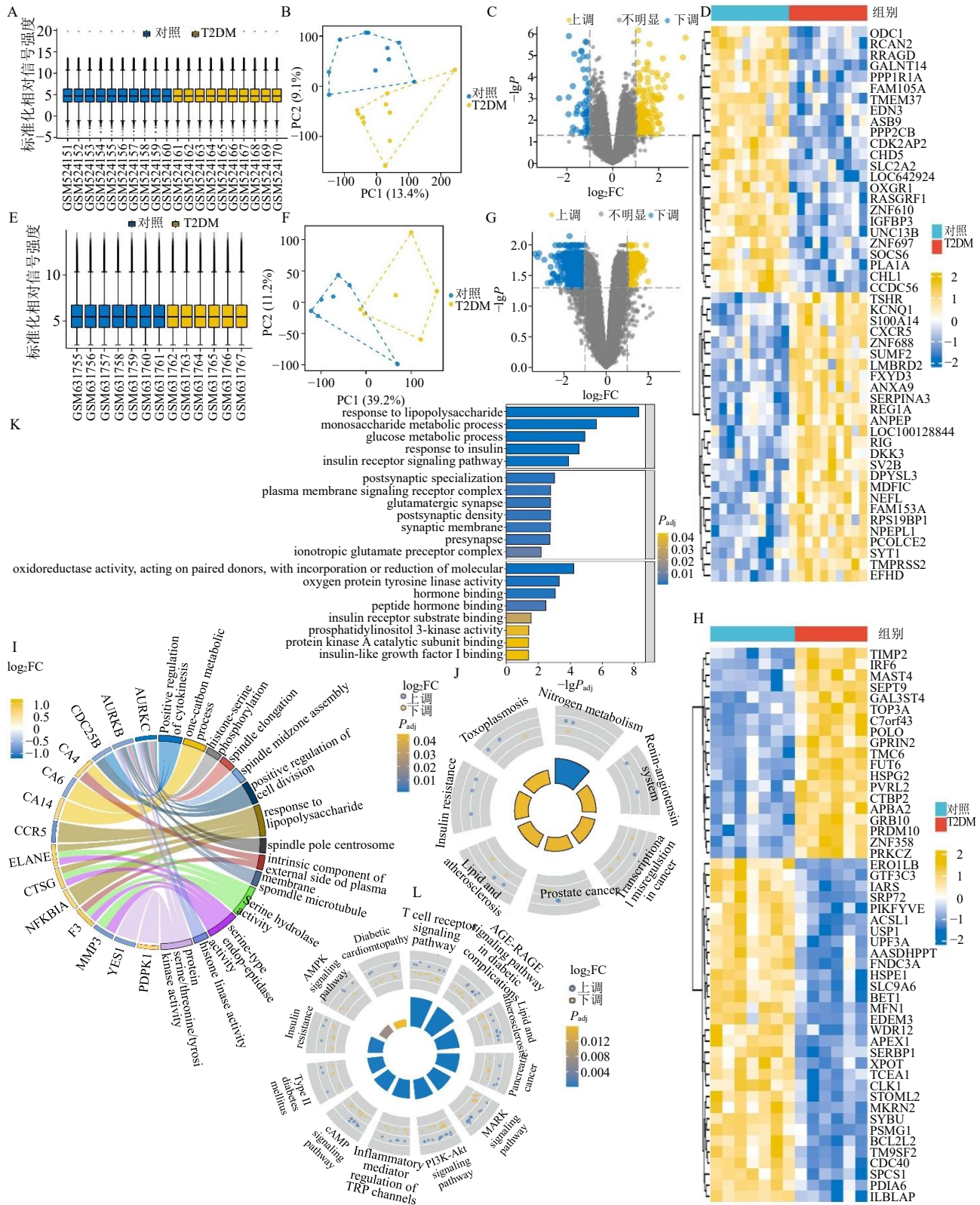
从 CTD 数据库和 GeneCards 数据库中检索到 T2DM 表型基因分别为 34 079 个和 12 660 个。将以上数据进一步分别同 CTD 数据库及 GeneCards 数据库的 T2DM 表型基因取交集,得到熟地黄入血核心基因有 18 个,GO 和 KEGG 富集分析(图 6-A)发现其主要富集在胰岛素抵抗、脂质和动脉粥样硬化、肾素-血管紧张素系统、凋亡、中性粒细胞介导的细菌杀伤、对脂多糖的反应等生物学功能和与细胞内囊泡和颗粒相关等细胞功能上。熟地黄入胰腺核心基因有 141 个,KEGG 富集分析(图 6-B)显示其主要涉及胰岛素信号、炎症、代谢、免疫反应和细胞存活等多个方面,如胰岛素信号通路、IR、PI3K-Akt 信号通路、AMPK 信号通路、mTOR 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、TNF 信号通路、VEGF 信号通路、内分泌抵抗等。此外,18 个入血核心基因在 Cytoscape 软件中利用 MOCDE 进行聚类分析得到 1 个模块(图 6-C);141 个入胰腺核心基因得到 6 个模块(图 6-D~I),具体见表 3。韦恩图得到熟地黄作用血液和胰腺的核心基因交集基因为 TTR 和 ABCB1(图 6-J)。

3.5 核心基因分子对接及化合物毒性预测

在 PDB 数据库下载 TTR 的 X-ray 晶体结构(PDB: 8W45)及 ABCB1 的 EM 晶体结(PDB: 7A69)。熟地黄治疗 T2DM 的核心基因 TTR 在血

液中的对应化学成分为 Cid 45073629;在胰腺中的对应化学成分为 Cid 86178349 和 Cid 129008965。ABCB1 在血液中对应的化学成分为 Cid 100058、Cid 111064、Cid 111248、Cid 442424 和 Cid 6708587;在胰腺中对应的化学成分为 Cid 98456、Cid 449459、Cid 688731、Cid 5284643、Cid 65549302、Cid 86280478 和 Cid 94334270。同时,熟地黄入血液与入胰腺的共同交集成分有 44 个,与上述成分共有的成分为 Cid 111248;对所有成分进行互作网络分析,前 50 个成分中与其相交的为 Cid 86280478、Cid 86178349、Cid 129008965、Cid 94334270 和 Cid 65549302,得到 6 个化合物进行下一步分析(表 4)。利用 Autodock Vina 对 TTR、ABCB1 2 个核心基因与其核心活性成分进行分子对接,并筛选最优构象,得到 9 个蛋白-活性成分对接结构,所有最优构象结合自由能均小于 -5 kcal/mol,见表 5。

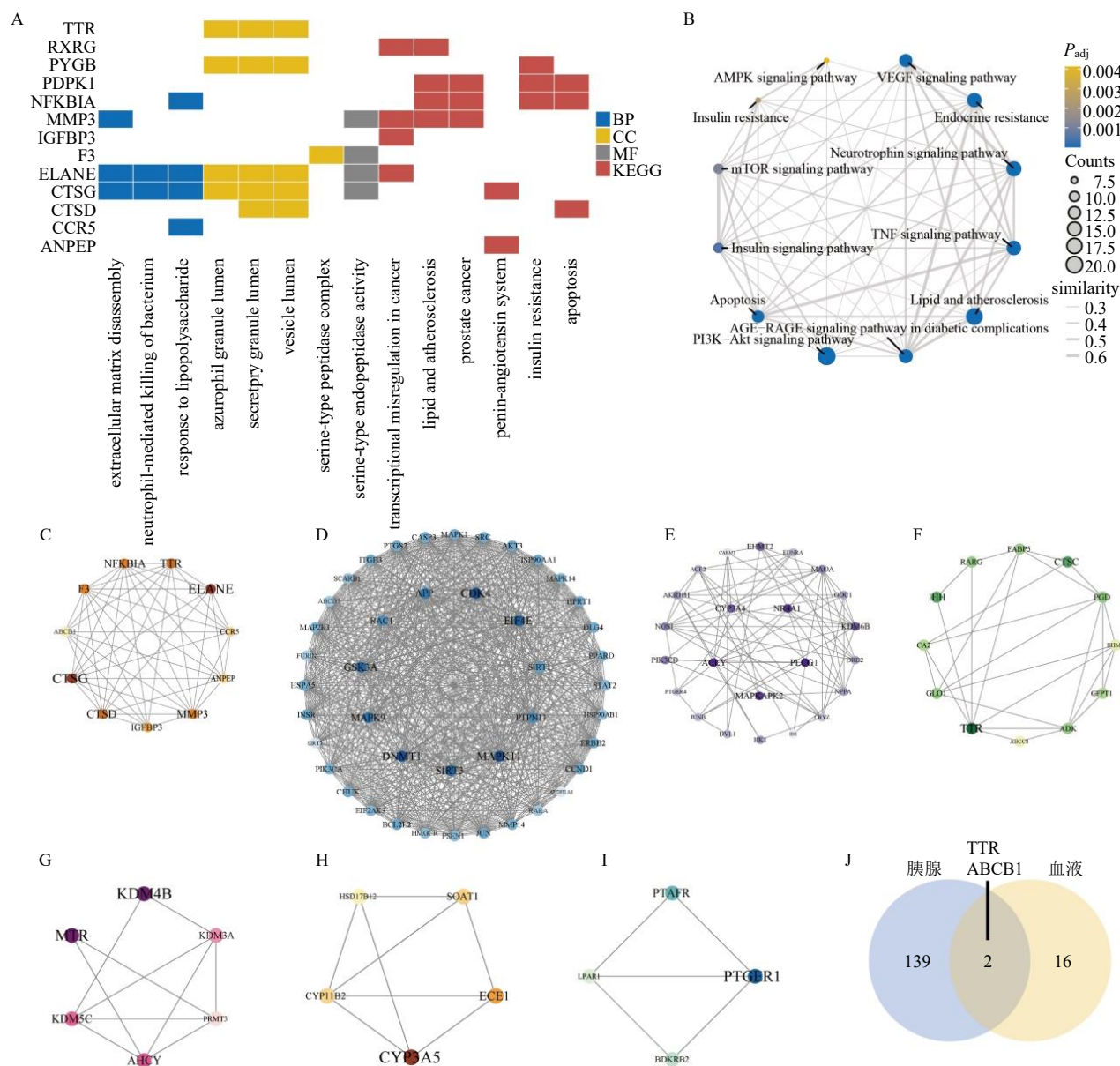
通过 PLIP 网站对 9 个构象进行分子间相互作用力分析,并使用 Pymol 可视化,如图 7-A 所示,在 TTR 的结合口袋附近,TTR 的氨基酸 98B、99B、100B、101B、103B、105B 及 114A 与熟地黄中 α,β -葡萄糖辛酸 γ -内酯能形成氢键,且其金属钠离子与氨基酸 99A 形成金属络合。如图 7-B 所示,在 TTR 结合位点附近,其氨基酸的 D99 与 (2S)-2-[[[(2R)-2-氨基-3-甲基丁酰基]氨基]-4-甲基磺酰基丁酸形成金属络合。如图 7-C 所示,TTR 的 D99 与 5-(2-甲基丙基)-3,6-二氧化-2-哌嗪丙酸以金属络合方式进行连接。如图 7-D 所示,TTR 口袋部位的氨基酸 85A、99B、103B 和 114A 同 N-(1-氨基-3,3-二甲基-1-氧代丁-2-基)-1-戊基-1H-吡啶-3-甲酰胺以氢键相连接,且在氨基酸 87A、105B、114A、122B 和 124B 同该成分形成疏水作用力,氨基酸 99A、99B 与其以金属络合方式连接。如图 7-E 所示,TTR 的位点 99A 与 (2R)-2-[[[(2R)-2-氨基-3-甲基丁酰基]氨基]-3-(1H-咪唑-5-基)丙酸以金属络合方式相互作用。如图 7-F 所示,TTR 的氨基酸 29A、31A、74A、89A 及 90A 与 2-[(7 α -羟基-3-氧代-5-丙-2-基-1,3a,4,5,6,7-六氢-2-苯并呋喃-4-基)-羟甲基]丙烯酸以氢键相互作用,氨基酸 74A 与其形成疏水作用力,且在氨基酸 35B、90A 处形成盐桥作用,在 99A 处形成金属络合。对于 ABCB1 如图 7-G 所示,其口袋位点的氨基酸 376A、379A、442A、459A 和 461A 与 α,β -葡萄糖辛酸 γ -内酯形成氢键相连接。如图 7-H 所示,N-



A、E-GSE15932、GSE25724 样本校正；B、F-GSE15932、GSE25724 主成分分析；C、G-GSE15932、GSE25724 差异分析火山图；D、H-GSE15932、GSE25724 差异分析热图；I、J-GSE15932 与入血成分潜在靶点的 GO 和 KEGG 分析；K、L-GSE25724 与入胰腺成分潜在靶点的 GO 和 KEGG 分析。A, E-correction of GSE15932 and GSE25724; B, F-PCA of GSE15932 and GSE25724; C, G-volcano map of GSE15932 and GSE25724 differential analysis; D, H-heat map of GSE15932 and GSE25724 differential analysis; I, J-GO and KEGG enrichment analysis of GSE15932 and potential targets of blood entry components; K, L-GO and KEGG enrichment analysis of GSE25724 and potential targets of pancreatic entry components.

图 5 GEO 数据差异分析及与潜在成分靶点的富集分析

Fig. 5 Difference analysis of data in GEO and enrichment analysis of potential component targets



A-入血核心基因 GO、KEGG 分析热图; B-入胰腺核心基因 KEGG 网络图; C-入血核心基因的 Cytoscape 聚类; D~I-入胰腺核心基因的 Cytoscape 聚类; J-胰腺及血液交集基因韦恩图。

A-GO and KEGG analysis heat map of entering blood core genes; B-KEGG network map of entering pancreatic core gene; C-Cytoscape clustering of entering blood core gene; D-I-Cytoscape cluster of entering pancreatic core gene; J-Venn map of pancreas and blood intersection gene.

图 6 MCODE 模块聚类分析及交集基因韦恩图

Fig. 6 Cluster analysis of MCODE modules and Venn map of intersection genes

(1-氨基-3,3-二甲基-1-氧代丁-2-基)-1-戊基-1*H*-吡啶-3-甲酰胺和 ABCB1 的氨基酸 773A、838A 形成氢键连接,与氨基酸 232A、299A、302A、303A、343A 及 991A 形成疏水作用力,且和氨基酸 770A 以 π -堆积相互作用。如图 7-I 所示,2-[(7 α -羟基-3-氧代-5-丙-2-基-1,3a,4,5,6,7-六氢-2-苯并呋喃-4-基)-羟甲基]丙烯酸与 ABCB1 的氨基酸在 261A、

262A 及 263A 形成氢键连接,在氨基酸 262A、801A 形成疏水作用力,在氨基酸 262A 处以盐桥形式相连接。

6 个化合物在 ADMETab3.0 数据库中对其进行药物的物理化学性质、药物化学形状及代谢、分布、排泄、转运和毒性预测(图 8-A~F),表明化合物在适合剂量使用时有较好的安全性。

表 3 MCODE 模块聚类分析结果
Table 3 Result of cluster analysis by MCODE

位置	分组	评分 (密度-节点)	节点	边	基因
血液	1	9.600	11	48	IGFBP3, TTR, ANPEP, CTSG, CTSD, MMP3, ELANE, F3, NFKB1A, ABCB1, CCR5
胰腺	1	38.190	43	802	DNMT1, EIF2AK3, PIK3CA, GSK3A, RAC1, INSR, FURIN, MAP2K1, ABCB1, SCARB1, ITGB3, CDK4, MAPK1, SRC, HSP90AA1, HPRT1, DLG4, EIF4E, SIRT1, HSP90AB1, MAPK11, ALDH1A1, RARA, JUN, PSEN1, HMGCR, BCL2L2, MAPK9, CHUK, SIRT2, HSPA5, APP, PTGS2, CASP3, AKT3, MAPK14, PPARD, STAT2, ERBB2, PTPN11, CCND1, SIRT3, MMP14
	2	6.818	23	75	DVL1, JUNB, PTGER4, PIK3CD, NOS1, AKR1B1, ACE2, CARM1, ACLY, CYP3A4, EHMT2, EDNRA, MAOA, ODC1, NR4A1, PLCG1, KDM6B, MAPKAPK2, DRD2, NPPA, CRYZ, IDE, HK1
	3	4.727	12	26	ABCC8, GLO1, IHH, ADK, FABP5, BHMT, CTSC, CA2, TTR, GFPT1, RARG, PGD
	4	4.000	6	10	KDM5C, KDM3A, KDM4B, PRMT3, AHCY, MTR
	5	4.000	5	8	HSD17B12, CYP11B2, ECE1, SOAT1, CYP3A5
	6	3.333	4	5	PTAFR, BDKRB2, LPAR1, PTGER1

表 4 分子对接化合物
Table 4 Molecular docking compounds

PubChem CID	化合物名称	类别	检测位置	相对分子质量	分子式	规范 SMILES 式
Cid 111248	α,β -葡萄糖辛酸 γ -内酯	γ -丁内酯	胰腺和血液	238.19	C ₈ H ₁₄ O ₈	C(C(C(C(C(C(C(=O)O)O)O)O)O)O)O)O
Cid 65549302	(2S)-2-[(2R)-2-氨基-3-甲基丁酰基]氨基-4-甲基磺酰基丁酸	羧酸及其衍生物	仅进入胰腺	248.34	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	CC(C)C(C(=O)NC(CCSC)C(=O)O)N
Cid 86178349	5-(2-甲基丙基)-3,6-二氧代-2-哌嗪丙酸	羧酸及其衍生物	仅进入胰腺	242.27	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₄	CC(C)CC1C(=O)NC(C(=O)N1)CCC(=O)O
Cid 86280478	N-(1-氨基-3,3-二甲基-1-氧代丁-2-基)-1-戊基-1H-吡唑-3-甲酰胺	羧酸及其衍生物	仅进入胰腺	344.50	C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₂	CCCCCN1C=CC=CC=C2C(=N1)C(=O)NC(C(=O)N)C(C)C
Cid 94334270	(2R)-2-[(2R)-2-氨基-3-甲基丁酰基]氨基-3-(1H-咪唑-5-基)丙酸	羧酸及其衍生物	仅进入胰腺	254.29	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₃	CC(C)C(C(=O)NC(CC1=CN=CN1)C(=O)O)N
Cid 129008965	2-[(7 α -羟基-3-氧代-5-丙-2-基-1,3a,4,5,6,7-六氢-2-苯并咪唑-4-基)-羟基]丙烯酸	异戊二烯脂质	仅进入胰腺	298.33	C ₁₅ H ₂₂ O ₆	CC(C)C1CCC2(COC(=O)C2C1C(C(=C)C(=O)O)O)O

3.6 核心基因 mRNA-miRNA-lncRNA 网络构建及核心基因功能预测

在这 5 个数据库中，取两两数据库中 miRNA 的交集，得到 TTR 及 ABCB1 的 miRNA 结果（图 9-A、B）。TTR 预测的 miRNA 有 27 个，ABCB1 预测的 miRNA 有 114 个；而 TTR-miRNA 所对应的

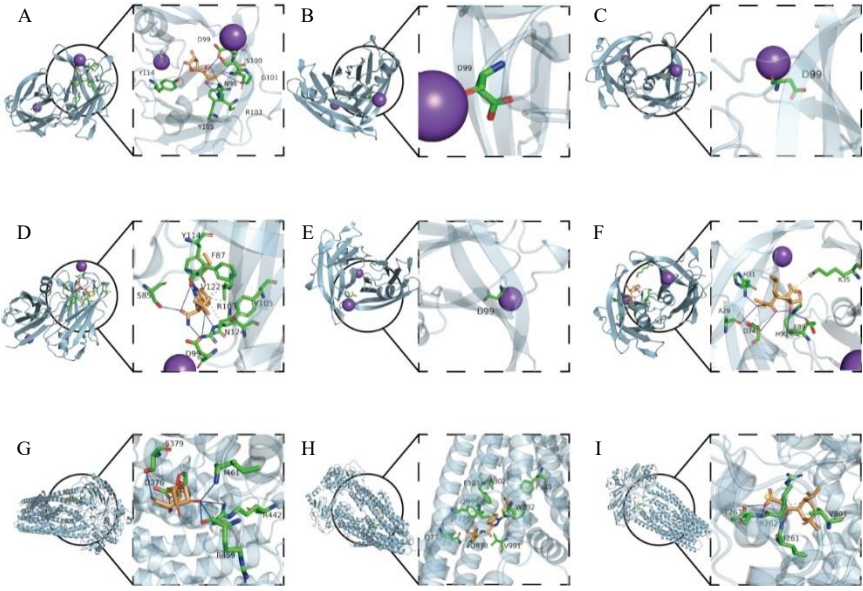
lncRNA 有 35 个，ABCB1-miRNA 对应的 lncRNA 有 72 个，其各自构建 mRNA-miRNA-lncRNA 互作网络（图 9-C、D）。TTR 与 ABCB1 共有的 miRNA 有 6 个，共有的 lncRNA 有 14 个，其交互网络见图 9-E。同时，在 GeneMANIA 数据库中，对 TTR 及 ABCB1 的基因及其相互作用的基因进行了功能分

表 5 分子对接自由能
Table 5 Affinity energy in molecular docking

化合物	亲和自由能/(kcal·mol ⁻¹)	
	TTR	ABCB1
Cid 111248	-6.6	-5.0
Cid 65549302	-5.4	—
Cid 86178349	-6.4	—
Cid 86280478	-6.5	-7.7
Cid 94334270	-5.8	—
Cid 129008965	-5.5	-6.5

析(图 9-F),结果显示其在脂质运输和代谢、药物运输、离子和神经递质运输、血管过程及炎症反应的调节等方面与 T2DM 密切相关。同时,血液及胰腺组织 PCR 结果也验证 TTR 及 ABCB1 是治疗 T2DM 的潜在靶点。

运用 qRT-PCR 检测 TTR 及 ABCB1 在 T2DM 小鼠胰腺及血液中的 mRNA 表达水平,结果显示,TTR 及 ABCB1 基因在模型组表达显著下降($P<0.05$),经熟地黄给药后的血液及胰腺中其 mRNA 表达呈上升趋势(图 10)。



A~F-TTR 分别与化合物 Cid 111248、Cid 65549302、Cid 86178349、Cid 86280478、Cid 94334270 及 Cid 129008965 分子对接图; G~I: ABCB1 分别与化合物 Cid 111248、Cid 86280478 及 Cid129008965 分子对接图。

A—F-molecular docking diagram of TTR with compounds Cid 111248, Cid 65549302, Cid 86178349, Cid 86280478, Cid 94334270 and Cid 129008965, respectively; G—I-molecular docking diagram of ABCB1 with compounds Cid 111248, Cid 86280478 and Cid 129008965, respectively.

图 7 TTR、ABCB1 与筛选化合物分子对接图

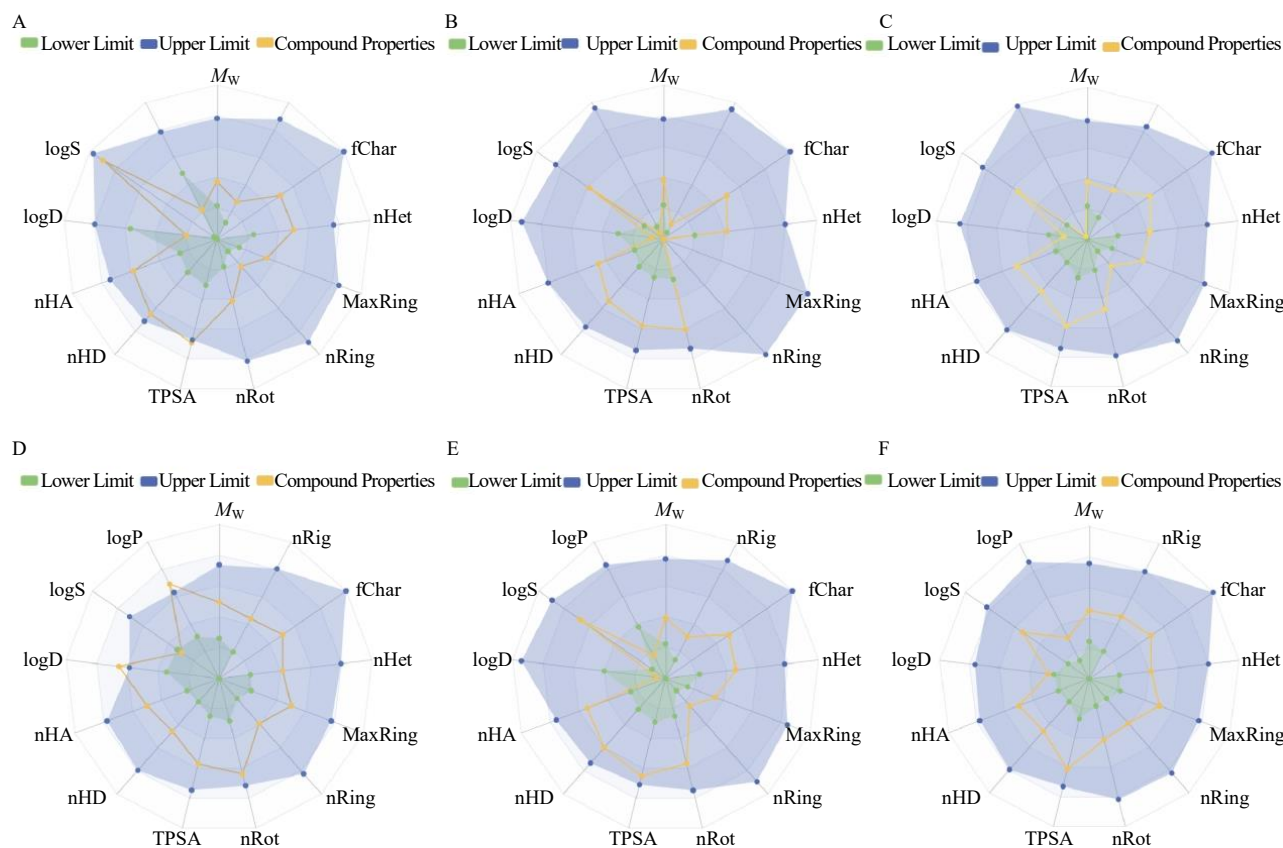
Fig. 7 Molecular docking diagram of TTR and ABCB1 with screened compounds

4 讨论

熟地黄属补益类中药,具有补血滋阴、益精填髓等功效,其糠醛类、多糖类等多种成分被广泛用于治疗由肝肾阴虚引起的 T2DM 及其他慢性代谢类疾病^[18];熟地黄的多糖成分在 STZ 诱导的糖尿病小鼠模型中显示出降血糖、调血脂和抗血管炎症的作用^[19],且能显著降低糖尿病小鼠的血糖、总胆固醇、三酰甘油和低密度脂蛋白胆固醇水平,同时增加高密度脂蛋白胆固醇和胰岛素水平,熟地黄能够通过 AMPK 介导 NF- κ B/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization

domain-like receptor protein 3, NLRP3) 信号通路改善 T2DM 小鼠的能量代谢及抗炎功效^[12]。研究表明熟地黄有效成分及其各种配伍方剂均对 T2DM 的治疗如改善胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞功能受损、氧化应激、炎症反应以及肠道菌群失衡等机制上具有显著疗效^[20]。然而熟地黄治疗 T2DM 的具体成分及 mRNA 调控网络机制尚需深入研究。

目前,随着人工智能时代的发展,网络药理学和生物信息学在中医药领域的广泛应用使其成为一门跨学科的新兴领域^[21]。近年来,这 2 个学科在中药药效研究、机制阐明、靶点预测、安全性评价、药物



A-Cid 111248; B-Cid 65549302; C-Cid 86178349; D-Cid 86280478; E-Cid 94334270; F-Cid 129008965.

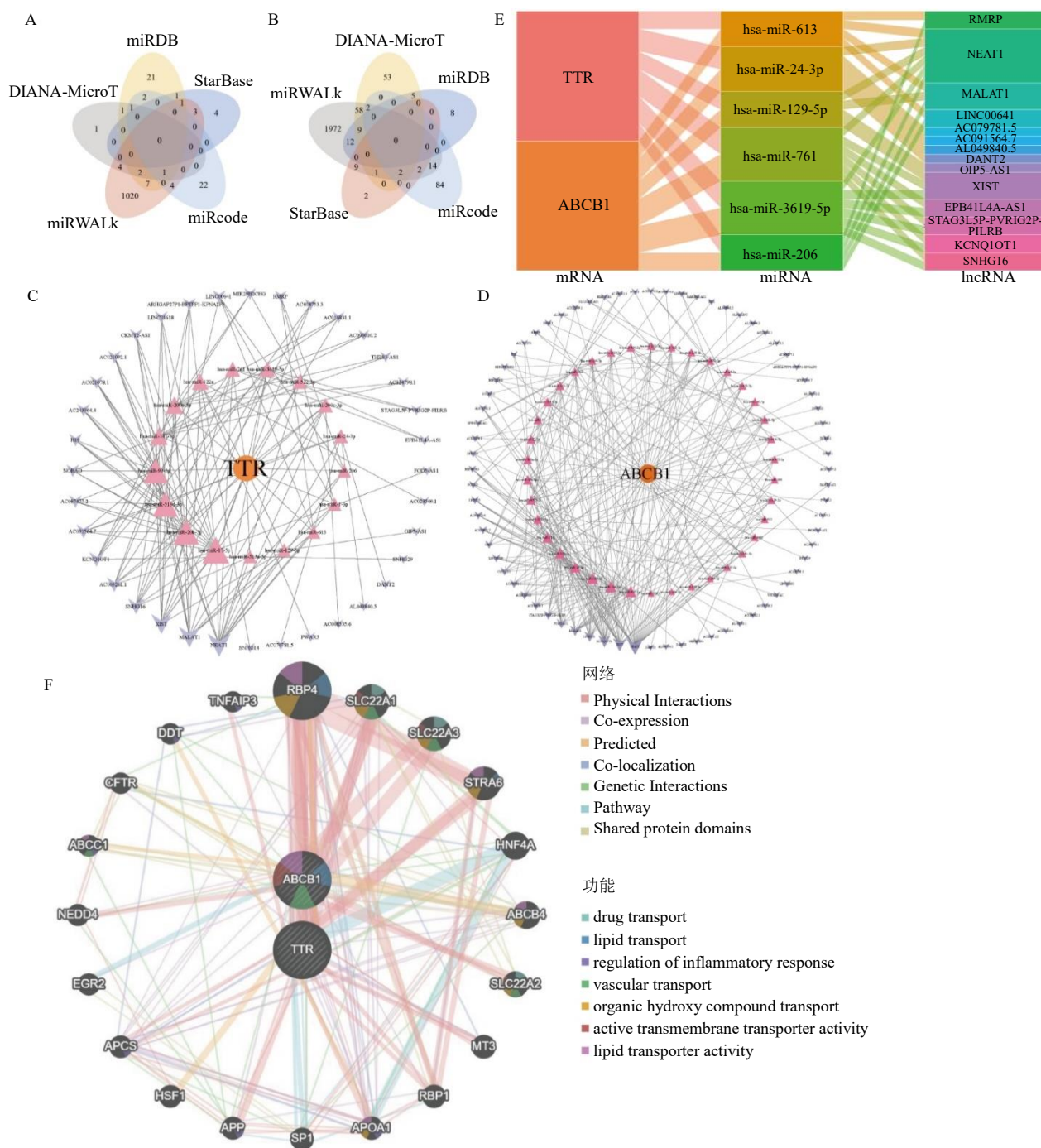
图 8 6 个化合物 ADME 模拟
Fig. 8 ADME simulations of six compounds

再利用和药物设计等方面取得了重要的进展^[22]。Pan 等^[23]利用网络药理学研究发现黄连汤对 T2DM 的治疗效果；何涛等^[24]也发现了黄连阿胶汤治疗 T2DM 的临床效果；Wang 等^[25]运用生物信息学和网络药理学分析了 T2DM 与阿尔茨海默症的共同发病机制。网络药理学和生物信息学在中医药领域的应用，逐步构建了药物-疾病-靶点-通路共同协作模块的分析方式^[26]，能够更加高效地分析中药配方中多种化合物的协调治疗机制，能够进一步解读中药药效的应用规律及网络调控规律^[27]。

本研究借鉴上述成熟的研究实例，将熟地黄入血及胰腺的主要成分经过化合物-靶点预测并富集分析，其主要富集在 cAMP 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、IR、TRP 通道的炎症介质调节、胰岛素信号通路及 T2DM 等众多与 T2DM 相关的通路。且进一步在 GEO 数据库中对其转录组学分析得到的差异基因进行富集分析，主要富集在 DM 并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、血脂与动脉粥样硬化、MAPK 信号通路、PI3K-Akt

信号通路、TRP 通道的炎症介质调节、cAMP 信号通路、T2DM、IR、AMPK 信号通路等。二者均有较高的重叠性，进一步表明熟地黄有一定调节 T2DM 相关通路的能力。且利用 Cytoscape 软件的 MOCDE 模块聚类分析得到核心基因，并发现熟地黄入血和胰腺的核心基因取交集后得到 TTR 和 ABCB1，这 2 个基因同入血及胰腺较高相关性成分进行分子对接结合自由能均小于 -5 kcal/mol，具有较好的结合亲和力，有助于进一步深入研究熟地黄活性成分治疗 T2DM 的作用靶点机制。且 TTR 及 ABCB1 和 miRNA、lncRNA 构成的互作网络也可以有助于后续研究其在 T2DM 中的 mRNA 与非编码 RNA 相关性。

研究表明 TTR 可以延长人胰腺中 β 细胞产生的胰岛淀粉样蛋白多肽蛋白 (islet amyloid polypeptide protein, IAPP) 的形成，其介导的抑制 IAPP 形成机制可能是预防 T2DM 发病的潜在靶点^[28]。Westermarck 等^[29]研究发现 T2DM 患者的胰岛有更多的 TTR 反应性胰岛细胞的特异性表达，对



A-TTR 在 5 个数据库预测 miRNA 韦恩图; B-ABCB1 在 5 个数据库预测 miRNA 韦恩图; C-TTR-miRNA-lncRNA 网络图; D-ABCB1-miRNA-lncRNA 网络图; E-TTR 及 ABCB1 共同 miRNA 及 lncRNA 网络图; F-TTR 及 ABCB1 功能及网络分析。

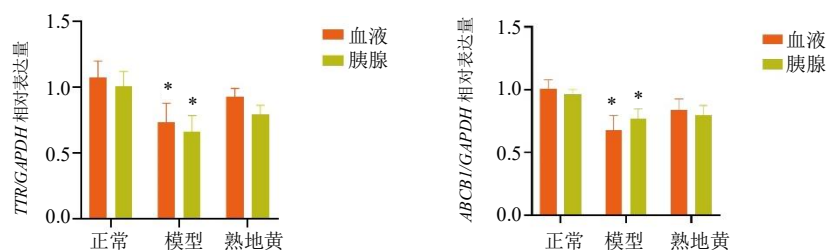
A-TTR predicted miRNA Venn maps in five databases; B-ABCB1 predicted miRNA Venn maps in five databases; C-network diagram of TTR-miRNA-lncRNA; D-network diagram of ABCB1-miRNA-lncRNA; E-network diagram of TTR and ABCB1 common miRNA and lncRNA; F-functions and network analysis of TTR and ABCB1.

图 9 TTR 及 ABCB1 基因功能分析及 mRNA-miRNA-lncRNA 网络

Fig. 9 Functional analysis of TTR and ABCB1 and network of mRNA-miRNA-lncRNA

T2DM 的治疗是潜在的靶点。ABCB1 的单核苷酸多态性对 T2DM 和血脂有一定影响,研究表明 ABCB1

的不同变体对 T2DM 和脂质的多效性作用可能通过不同的途径起作用^[30],且其在西洛他唑等药物对



A-T2DM 小鼠血液和胰腺中 *TTR* mRNA 表达水平; B-T2DM 小鼠血液和胰腺中 *ABCB1* mRNA 表达水平; 与正常组比较: * $P < 0.05$ 。

A-*TTR* mRNA expression levels in blood and pancreas of T2DM mice; B-*ABCB1* mRNA expression level in blood and pancreas of T2DM mice; * $P < 0.05$ vs normal group.

图 10 T2DM 小鼠血液和胰腺中 *TTR* 及 *ABCB1* 的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 10 *TTR* and *ABCB1* mRNA expression level in blood and pancreas of T2DM mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

T2DM 患者的治疗中是一重要的作用靶点^[31]。本研究也同样证实 *TTR* 与 *ABCB1* 是熟地黄对 T2DM 的潜在治疗靶点。然而受实验样本数量限制, 未进行深入的表达量的相关研究。

5 结论

本研究通过生物信息学、网络药理学及实验联合研究了熟地黄对 T2DM 的“中药-化合物-靶点网络”, 初步得出熟地黄作用 T2DM 的潜在靶点和 mRNA-miRNA-lncRNA 网络, 为深入研究熟地黄治疗 T2DM 生物效应机制提供依据, 且为其他中药和复方治疗疾病的其作用机制的现代研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lopes A, Roque F, Morgado S, *et al.* Behavioral sciences in the optimization of pharmacological and non-pharmacological therapy for type 2 diabetes [J]. *Behav Sci*, 2021, 11(11): 153.
- [2] Luo J Q, Shu Y, Zhang W. Editorial: Pharmacogenomics and pharmacomicrobiomics in type 2 diabetes mellitus (T2DM) [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1287807.
- [3] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, *et al.* Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157: 107843.
- [4] Dascalu A M, Serban D, Tanasescu D, *et al.* The value of white cell inflammatory biomarkers as potential predictors for diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus (T2DM) [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(8): 2106.
- [5] Cui K, Li Z Z. Identification and analysis of type 2 diabetes-mellitus-associated autophagy-related genes [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1164112.
- [6] 乔岩, 郑利涛, 李金林. 基于数据挖掘的疾病并发症发

现方法研究: 以 2 型糖尿病为例 [J]. 数学的实践与认识, 2024, 54(6): 23-30.

- [7] Gong W, Zhang N D, Cheng G, *et al.* *Rehmannia glutinosa* libosch extracts prevent bone loss and architectural deterioration and enhance osteoblastic bone formation by regulating the IGF-1/PI3K/mTOR pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 3964.
- [8] 孟祥龙, 刘晓琴, 宁晨旭, 等. 生、熟地黄通过 AMPK 介导 NF- κ B/NLRP3 信号通路改善高脂饲料并链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的作用机制差异性研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5627-5640.
- [9] 闫京宁, 刘晓琴, 孟祥龙, 等. 生、熟地黄对高脂饲料并链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病小鼠胰脏蛋白质组学与自噬差异性干预研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1535-1545.
- [10] Meng X L, Liu X Q, Tan J Y, *et al.* From Xiaoke to diabetes mellitus: A review of the research progress in traditional Chinese medicine for diabetes mellitus treatment [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 75.
- [11] 张鼎, 赵亚双. 生物信息学在分子流行病学中的应用 [J]. 中华疾病控制杂志, 2021, 25(1): 20-24.
- [12] 闫京宁, 刘晓琴, 孟祥龙, 等. 生、熟地黄对高脂饲料并链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病小鼠胰脏蛋白质组学与自噬差异性干预研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1535-1545.
- [13] Meng X L, Ma J N, Kang A N, *et al.* A novel approach based on metabolomics coupled with intestinal flora analysis and network pharmacology to explain the mechanisms of action of bekhogainsam decoction in the improvement of symptoms of streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 633.
- [14] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of

- protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [15] Mattingly C J, Colby G T, Forrest J N, *et al.* The comparative toxicogenomics database (CTD) [J]. *Environ Health Perspect*, 2003, 111(6): 793-795.
- [16] Barshir R, Fishilevich S, Iny-Stein T, *et al.* GeneCaRNA: A comprehensive gene-centric database of human non-coding RNAs in the GeneCards suite [J]. *J Mol Biol*, 2021, 433(11): 166913.
- [17] Warde-Farley D, Donaldson S L, Comes O, *et al.* The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: W214-W220.
- [18] 葛楠, 闫广利, 孙晖, 等. 熟地黄药效物质基础研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 292-302.
- [19] Zhou J, Xu G, Yan J Y, *et al.* *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) DC. polysaccharide ameliorates hyperglycemia, hyperlipemia and vascular inflammation in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 229-238.
- [20] 田文国, 刘毅, 盖晓红, 等. 地黄治疗 2 型糖尿病作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(23): 7575-7584.
- [21] Zhang P, Zhang D F, Zhou W A, *et al.* Network pharmacology: Towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine [J]. *Brief Bioinform*, 2023, 25(1): bbad518.
- [22] Zhao L, Zhang H, Li N, *et al.* Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309: 116306.
- [23] Pan L L, Li Z Z, Wang Y F, *et al.* Network pharmacology and metabolomics study on the intervention of traditional Chinese medicine Huanglian Decoction in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112842.
- [24] 何涛, 刘传鑫, 李文鲜, 等. Meta 分析桥接网络药理学的黄连阿胶汤治疗 2 型糖尿病临床疗效评价及潜在作用机制初探 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5798-5813.
- [25] Wang Y Z, Meng L, Zhuang Q S, *et al.* Screening traditional Chinese medicine combination for cotreatment of Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus by network pharmacology [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 80(2): 787-797.
- [26] 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4789-4797.
- [27] 高晟玮, 贾福运, 谷旭放, 等. 基于生物信息学探讨复方丹参滴丸改善阿司匹林抵抗的潜在机制 [J]. 中草药, 2024, 55(14): 4824-4835.
- [28] Wasana Jayaweera S, Surano S, Pettersson N, *et al.* Mechanisms of transthyretin inhibition of IAPP amyloid formation [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(3): 411.
- [29] Westermark G T, Westermark P. Transthyretin and amyloid in the islets of Langerhans in type-2 diabetes [J]. *Exp Diabetes Res*, 2008, 2008: 429274.
- [30] Wu J H, Wang X W, Chen H B, *et al.* Type 2 diabetes risk and lipid metabolism related to the pleiotropic effects of an *ABCB1* variant: A Chinese family-based cohort study [J]. *Metabolites*, 2022, 12(9): 875.
- [31] Jeong Y H, Tantry U S, Park Y, *et al.* Pharmacodynamic effect of cilostazol plus standard clopidogrel versus double-dose clopidogrel in patients with type 2 diabetes undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(11): 2194-2197.

[责任编辑 潘明佳]