

· 数据挖掘 ·

## 基于网络药理学探讨黄芪-葛根药对对 T2DM 模型大鼠 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路的调节作用

魏爽<sup>1</sup>, 李冀<sup>1</sup>, 韩东卫<sup>1</sup>, 付强<sup>1</sup>, 王晓雨<sup>1</sup>, 郝峰<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 江西中医药大学, 南昌 330000)

**[摘要]** 目的:基于网络药理学及实验验证探讨黄芪-葛根(芪葛)药对治疗 2 型糖尿病(T2DM)的作用机制。方法:借助中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)平台筛选黄芪、葛根的有效成分及靶点;于各疾病数据库中检索 T2DM 的相关靶点,提取药物与疾病的共同靶点,利用 STRING 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析并构建 PPI 网络图,并利用 Cytoscape 3.7.1 软件对关键靶点进行网络拓扑学分析。再利用 DAVID 在线工具对核心靶点进行基因本体(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析以探究其可能的分子机制。以高脂饲料喂养同链豚鼠尾静脉注射联合的方式建立糖尿病大鼠模型,分为正常组、模型组、二甲双胍组、芪葛药对高、中、低剂量组,灌胃 4 周后检测各组大鼠血清空腹血糖,空腹胰岛素(FINS),天冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),糖原,白细胞介素(IL)-6,肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 水平,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肝脏组织中胰岛素受体底物(IRS)-2,磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K),蛋白激酶 B(Akt),叉头框蛋白 O1(FoxO1)蛋白的表达。结果:网络药理学方法筛选出芪葛药对治疗 T2DM 核心靶点 131 个, Akt1, 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)1, TNF- $\alpha$ , IL-6 等较为关键;KEGG 富集分析预测该药对主要通过 PI3K/Akt 信号通路, TNF 信号通路, FoxO 信号通路等发挥降糖作用。与模型组比较,芪葛药对高、中剂量组空腹血糖及 FINS 水平均降低,糖原水平显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );芪葛药对高、中、低剂量组 AST, ALT, TG, LDL-C 显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );芪葛药对高、低剂量组 TC 水平明显降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,芪葛药对高、中剂量组 IL-6, TNF- $\alpha$  水平显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );芪葛药对高剂量组 IRS-2, Akt, p-Akt, PI3K, p-PI3K 蛋白表达升高, FoxO1 蛋白表达明显降低( $P<0.05$ )。结论:芪葛药对在治疗 T2DM 上具有多成分-多靶点-多途径的特点,可能通过 IL-6, TNF- $\alpha$  等靶点调控 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路影响胰岛素抵抗、糖原合成、糖异生、葡萄糖转运、炎症及免疫反应等过程对糖尿病进行治疗。

**[关键词]** 黄芪-葛根药对;网络药理学;磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/叉头框蛋白 O1(FoxO1)信号通路;2 型糖尿病(T2DM);白细胞介素(IL)-6;肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)05-0157-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220312

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211229.1415.002.html>

[网络出版日期] 2021-12-29 18:55

## Regulatory Effect of Herbal Pair Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix on PI3K/Akt/FoxO1 Signaling Pathway in Rats with T2DM Based on Network Pharmacology

WEI Shuang<sup>1</sup>, LI Ji<sup>1</sup>, HAN Dong-wei<sup>1</sup>, FU Qiang<sup>1</sup>, WANG Xiao-yu<sup>1</sup>, HAO Feng<sup>2\*</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of herbal pair Astragali Radix-Puerariae Lobatae

[收稿日期] 20211027(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81904090,81874426);2014 全国名老中医药专家传承工作室建设项目(2014);中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者项目;2021 江西中医药大学校基金项目(2021BSZR011)

[第一作者] 魏爽,博士,从事方剂配伍规律及药效物质基础研究,E-mail:864031535@qq.com

[通信作者] \* 郝峰,博士,副教授,从事经方方证药证研究,E-mail:380368678@qq.com

Radix (AR-PLR) against type 2 diabetes mellitus (T2DM) based on network pharmacology and experimental verification. **Method:** The active ingredients and targets of AR and PLR were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). The related targets of T2DM were retrieved from disease databases and the common targets of drugs and diseases were extracted. The protein-protein interaction (PPI) network was analyzed and constructed by STRING and the network topology of key targets was analyzed by Cytoscape 3.7.1. Then gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses of core targets were carried out by DAVID to explore its possible molecular mechanism. The T2DM model was induced in rats by the high-fat diet combined with tail intravenous injection of streptozocin. The rats were divided into a normal group, a model group, a metformin group, and high-, medium- and low-dose AR-PLR groups. After four weeks of intragastric administration, the serum levels of fasting blood sugar (FBS), fasting insulin (FINS), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) of rats in each group were measured. The protein expression of insulin receptor substrate-2 (IRS-2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), and forkhead box transcription factor O1 (FoxO1) in rat liver was detected by Western blot. **Result:** A total of 131 core targets of AR-PLR in the treatment of T2DM were screened out by network pharmacology, where Akt1, mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), TNF- $\alpha$ , and IL-6 were critical. As revealed by KEGG enrichment analysis, AR-PLR exerted the hypoglycemic effect mainly through the PI3K/Akt, TNF, and FoxO signaling pathways. Compared with the model group, the high- and medium-dose AR-PLR groups showed reduced FBS and FINS levels and increased glycogen level ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), all the AR-PLR groups showed decreased levels of AST, ALT, TG, and LDL-C ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the high- and low-dose AR-PLR groups showed decreased TC levels ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the high- and medium-dose AR-PLR groups showed reduced levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the high-dose AR-PLR group showed increased expression of IRS-2, Akt, p-Akt, PI3K, and p-PI3K, and decreased expression of FoxO1 protein ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** AR-PLR has the characteristics of multi-component, Multi-target and multi-pathway in the treatment of T2DM. This herbal pair may regulate the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway through IL-6, TNF- $\alpha$ , and other targets to affect insulin resistance, glycogen synthesis, gluconeogenesis, glucose transport, inflammation, immune response, and other processes, thereby treating T2DM.

**[Keywords]** Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix; network pharmacology; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/forkhead box transcription factor O1 (FoxO1) signaling pathway; type 2 diabetes mellitus (T2DM); interleukin-6 (IL-6); tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )

2型糖尿病(T2DM)是一种以慢性高血糖为特点的代谢性疾病,是由多种原因引起胰岛 $\beta$ 细胞功能受损造成的胰岛素分泌不足/或胰岛素抵抗(IR)引发,糖尿病患者中约95%属于此类<sup>[1]</sup>。当今时代,社会的高速发展导致人们的生活习惯及饮食结构发生巨大变化,使得T2DM发病群体低龄化的同时发病率连年攀升,也使其成为除肿瘤及心血管疾病外最为影响人类健康的慢性非传染性疾病<sup>[2]</sup>。若未及时妥善进行治疗,可诱发一系列严重并发症<sup>[3-5]</sup>,甚则导致死亡。基于本病极具威胁性及高发病率的特点,高效低/无副作用的治疗原则成为学者关注

的重点。近年来,随着临床及实验研究的发展,适用于T2DM的药物及相关靶点得以不断开发,但这些药物在有其优势的同时多存在这样或那样的不足,如胃肠道反应、肝损害、终身依赖等。

中医药历史悠久,尤其在治疗属中医消渴病范畴的T2DM方面,经验丰富且无副作用,与西医药相比具有独到优势。查阅中医药典籍发现,《日华子本草》《本草经集注》《普济方》《神农本草经》《景岳全书》等著作中皆有黄芪、葛根可治疗消渴的记载。且现代药理研究同样表明,黄芪、葛根各自的主要活性成分在糖尿病模型中显示出了极佳的

降血糖,改善IR,降血脂的作用<sup>[5-11]</sup>。《证治汇补》中载有黄芪葛根汤一方,是黄芪与葛根(芪葛药对)配伍的方剂,书中言本方主要用于治疗“酒郁”,然《备急千金药方》中提出:“凡积久饮酒,未有不成消渴……”故本方当可用于消渴的治疗。临床上,马世玉等<sup>[12]</sup>将45例T2DM患者随机分为治疗组和对照组,其中治疗组在对照组基础上加用黄芪葛根汤,结果发现,治疗组总有效率为83.3%,显著高于62.8%的对照组;韩圆圆<sup>[13]</sup>将93例T2DM患者随机分为两组,对照组46例患者采用常规治疗方式,研究组47例患者在常规治疗基础上加黄芪葛根汤治疗,结果发现,两组患者治疗后血糖水平均降低,且研究组远优于对照组,同时研究组总有效率显著高于对照组。目前,研究人员发现,黄芪葛根汤能提高T2DM模型大鼠胰岛素敏感指数,降低胰岛素抵抗指数,降低瘦素及肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 水平,增加过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )mRNA表达,具有改善T2DM大鼠IR作用<sup>[14]</sup>;能显著提高大鼠脂联素水平,调控骨骼肌腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK),p38 MAPK mRNA表达,降低TNF- $\alpha$ ,白细胞介素(IL)-12,IL-15水平,影响AdipoR1/AMPK信号通路,从而有效调节糖尿病大鼠糖脂代谢紊乱、减轻炎症反应<sup>[15]</sup>;此外,黄芪-葛根配伍具有显著的调节血脂作用,能缓解高血脂引起的肝细胞脂肪变性程度并减少肝细胞脂滴积聚,其机制可能与下调小肠组织尼曼-匹克C1型类蛋白1的表达以抑制胆固醇的吸收,同时上调小肠组织三磷酸腺苷结合盒转运体G5(ABCG5)及ABCG8的表达增加胆固醇的排泄有关<sup>[16]</sup>。课题组在前期研究过程中同样发现,黄芪葛根汤具有降低血糖、改善胰岛素抵抗、改善糖脂代谢紊乱状态作用。虽然,目前对中药黄芪、葛根单独降糖机制的研究较多,且已存在少部分黄芪-葛根配伍降糖机制的相关研究,但二者配伍的降糖机制尚不十分明确,故本研究拟从网络药理学入手,通过建立“黄芪-葛根药对-靶点-通路-T2DM”网络,全方位挖掘其潜在的多种分子作用机制并将主要机制进行实验验证,以期对T2DM的病因学研究、治疗及后续深入研发提供指导与依据。

## 1 网络药理学

**1.1 “黄芪”“葛根”化学成分、靶点的筛选及药物-化合物成分-靶点网络构建** 借助 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform(TCMSP)<sup>[17]</sup>平台对黄芪、葛根的化学成分进行检索,再依据类药性(DL) $\geq 0.1$ 及口

服利用度(OB) $\geq 30\%$ <sup>[18-19]</sup>2个属性值对检索出的化学成分进行筛选同时检索出其作用靶点,并查阅相关文献对化学成分及其作用靶点进行补充。完成后,将所得靶点信息录入UniProt蛋白质数据库进行统一检索,选择物种为“Homo sapiens”,去掉重复、不规范及非人源的蛋白质靶点,将化合物的作用靶点进行规范。再借助 Cytoscape 3.7.1 网络图像化软件对筛选出的化学成分及其作用靶点进行相关网络构建。

**1.2 疾病相关靶点筛选** 以“Type two diabetes mellitus, T2DM”为关键词,于 GeneCards (<https://www.genecards.org>),在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org>),TTD (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd>),DisGeNET (<http://www.Disgenet.org/>),CTD (<http://ctdbase.org/>),PharmGkb (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmgkb/>),DiGSeE (<http://210.107.182.61/geneSearch/>),DrugBank (<https://www.drugbank.ca>)等数据库中挖掘有关T2DM的潜在靶点。合并上述各疾病数据库所获靶点、删除重复项即得到T2DM的疾病靶点。

**1.3 药物成分-疾病靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建** 为阐明黄芪-葛根药对潜在靶点与T2DM相关靶点之间的相互作用,利用R语言将疾病靶点与药物靶点取交集、使用 Venny 工具进行对比分析并绘制韦恩图。继而将得到的交集靶点上传至 STRING 11.0 平台构建 PPI 网络模型:生物种类选定“homo sapiens”,最小互相作用阈值选择“highest confidence”(>0.9),得到 PPI 网络。利用 Cytoscape 3.7.1 软件内置工具进行有效成分及靶点的网络拓扑参数分析,提取核心节点并绘制网络拓扑图。

**1.4 生物信息学基因本体(GO)分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析** 将交集靶点上传至 DAVID 数据库,进行 GO 的细胞组成(CC),生物学过程(BP),分子功能(MF)富集分析并制图;同时利用 KEGG 进行信号通路分析,根据通路富集结果获得相应的 P 值,选择 P<0.01 条件下排序前 20 的通路,然后再利用 R 语言将获得的 KEGG 通路制作成气泡图。综合预测黄芪-葛根药对治疗 T2DM 的分子作用机制。

## 2 动物模型实验验证

**2.1 材料** SPF级雄性SD大鼠80只,体质量(160 $\pm$ 20)g,购于黑龙江中医药大学实验动物中心,实验动物合格证号SYXK(黑)2018-003。实验动物架笼

饲养,自由采光,实验室保持通风良好、温度、湿度适宜。基础饲料由黑龙江中医药大学动物实验中心提供,高脂饲料由沈阳前进饲料厂提供。动物实验方案经黑龙江中医药大学动物实验伦理委员会批准(编号RL15010)。

链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司);无水柠檬酸、柠檬酸钠、无水乙醇、水合氯醛(天津市大茂化学试剂有限公司),多聚甲醛(上海雷布斯生物科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);天冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),糖原测定试剂盒及IL-6, TNF- $\alpha$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号分别为20210518, 20210524, 20210611, 20210611, 20210611, 20210609, 20210520, 20210618, 20210615);空腹胰岛素(FINS)ELISA检测试剂盒(上海创赛科技有限公司,批号AD202104);胰岛素受体底物(IRS)-2抗体,磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抗体,磷酸化(p)-PI3K抗体,蛋白激酶B(Akt)抗体,p-Akt抗体,叉头框蛋白O1(FoxO1)抗体, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)内参,辣根过氧化物酶(HRP)标记大鼠免疫球蛋白(Ig)G/HRP二抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-0173R, bs-1115R, bsm-52132R, bs-4044R, bs-1005R, bs-4972R, bs-0061R, bs-0293P-HRP);脱脂奶粉(美国BD公司);PVDF膜(美国Millipore公司)。

750型紫外-可见分光光度计(上海仪点分析仪器有限公司);Synergy LX型全自动多功能酶标仪(美国Bio Tek公司);罗氏活力型血糖试纸及血糖仪(罗氏诊断产品有限公司);VE-180型垂直电泳槽、凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);7170型全自动生化分析仪(日本日立公司);MAX-TL型高速冷冻离心机(美国BeckMan公司);JA型电子精密天平(上海精天电子仪器有限公司);SCIENTZ-950E型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司);SW-CJ-1D型洁净工作台(江苏苏净化设备厂)。

## 2.2 方法

**2.2.1 实验药物及制备** 实验所用中药均购于北京同仁堂药房,按黄芪-葛根2:1比例称取各药加10倍量的蒸馏水,浸泡、武火煮沸、转文火煎、过滤,再加水煮沸、文火煎煮、滤液,合并2次药液,旋转蒸发仪浓缩后4℃冰箱保存备用;盐酸二甲双胍片(格华止,规格0.5 g/片,中美上海施贵宝制药有限公司,

批号ABS9845)。

**2.2.2 T2DM大鼠模型制备** 80只雄性SD大鼠适应性饲养1周后,测量大鼠血糖及体质量,按体质量及血糖双重标准随机分为正常组10只,造模组70只。其中造模组给予高脂饲料连续喂养4周,4周末禁食不禁水12 h,一次性尾静脉注射1% STZ溶液30 mg·kg<sup>-1</sup>;正常组给予基础饲料喂养,自由饮水,尾静脉注射造模组等剂量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。72 h后禁食不禁水12 h,尾静脉取血测空腹血糖(FBG),空腹血糖 $\geq 11.7$  mmol·L<sup>-1</sup>[20]即为T2DM模型复制成功。

**2.2.3 分组及给药** 造模组的70只大鼠中有3只血糖低于11.7 mmol·L<sup>-1</sup>未成功,2只死亡(考虑因血糖过高),将剩余65只成模大鼠依据体质量及血糖随机分为模型组、黄芪-葛根高、中、低剂量组、二甲双胍组,每组13只。给药剂量参照《人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表》,中剂量组为4.05 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,高剂量组为8.10 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,低剂量组为2.025 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,二甲双胍组为76.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,给药体积为10 mL·kg<sup>-1</sup>,正常组及模型组给予等体积无菌水。连续给药4周。

## 2.3 观测指标及方法

**2.3.1 大鼠FBG及生化水平** 给药前、给药期间及末次给药后于每周固定时间用血糖仪测量大鼠空腹血糖;末次给药后禁食不禁水12 h,进行相应处理后,麻醉大鼠取腹主动脉血,静置后3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径6 cm),分离血清。按照ELISA试剂盒说明书操作测定大鼠FINS水平,同时依照AST,ALT,TG,TC,LDL-C,HDL-C,糖原试剂盒说明书进行操作测定大鼠血清中各生化指标水平。

**2.3.2 ELISA检测大鼠血清IL-6, TNF- $\alpha$ 水平** 上述方法得到的血清按照ELISA试剂盒说明书步骤操作检测IL-6, TNF- $\alpha$ 水平。

**2.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏组织IRS-2, PI3K, Akt, FoxO1蛋白表达** 提取各组大鼠肝脏组织中总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。配制5×电泳液,1×转膜液,洗膜液TBST。配制10%的分离胶,上样,电泳,转膜,洗膜,5%脱脂奶粉37℃条件下封闭,加一抗,4℃过夜进行一抗孵育,TBST洗膜,加入二抗(1:7 000),室温摇床30 min后37℃孵育1 h进行二抗孵育、曝光后积分光密度计算。蛋白以 $\beta$ -actin作为内参,用Quantity one V4.6.6专业灰度分析软件对图像进行信号分析,计算每个样本蛋白的相对表达量。

**2.4 统计学分析** 所有数据用SPSS 25.0软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,大于两组资料比较且符合正态分布及方差齐性者以单因素方差分析,偏态分布的计量资料先用Kruskal-Wallis法进行组间总体比较,存在差异者继以Mann-Whitney U法进行组间两两比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学研究结果

##### 3.1.1 黄芪、葛根成分及靶点的筛选 TCMSP平台

表1 黄芪-葛根有效成分

Table 1 Astragali Radix-Puerariae Radix herb pair active ingredient

中药	MOL ID	活性成分	OB/%	DL
黄芪	MOL000211	丁子香萜	55.38	0.78
黄芪	MOL000239	熊竹素	50.83	0.29
黄芪	MOL000296	常春藤皂苷元	36.91	0.75
黄芪	MOL000033	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i> )-10,13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17 dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta [a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
黄芪	MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31
黄芪	MOL000371	3,9-二- <i>O</i> -甲基尼森香豌豆紫檀酚	53.74	0.48
黄芪	MOL000374	5'-羟基异微凸剑叶莎醇-2',5'-二- <i>O</i> -葡萄糖苷	41.72	0.69
黄芪	MOL000378	7- <i>O</i> -甲基异微凸剑叶莎醇	74.69	0.30
黄芪	MOL000379	9,10-二甲氧基紫檀烷-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷	36.74	0.92
黄芪	MOL000380	(6 <i>aR</i> ,11 <i>aR</i> )-9,10-dimethoxy-6 <i>a</i> ,11 <i>a</i> -dihydro-6 <i>H</i> -benzofurano[3,2- <i>c</i> ]chromen-3-ol	64.26	0.42
黄芪	MOL000387	联苯双酯	31.10	0.67
黄芪	MOL000398	异黄酮	109.99	0.30
黄芪	MOL000417	毛蕊异黄酮	47.75	0.24
黄芪	MOL000422	山柰酚	41.88	0.24
黄芪	MOL000433	叶酸	68.96	0.71
黄芪	MOL000438	(3 <i>R</i> )-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.67	0.26
黄芪	MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di- <i>O</i> -glucosiole	49.28	0.62
黄芪	MOL000442	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯	39.05	0.48
黄芪	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
黄芪	MOL000407	黄芪甲苷IV	46.06	0.18
黄芪	MOL000403	黄芪甲苷II	46.06	0.13
黄芪	MOL000401	黄芪甲苷I	46.79	0.11
黄芪	MOL000405	黄芪甲苷III	31.83	0.10
黄芪	-	黄芪多糖	-	-
葛根	MOL000358	$\beta$ -谷甾醇	36.91	0.75
葛根	MOL002959	3'-甲氧基大豆苷元	48.57	0.24
葛根	MOL003629	daidzein-4,7-diglucoside	47.27	0.67
黄芪、葛根	MOL000392	芒柄花黄素	69.67	0.21

筛选及文献补充,黄芪-葛根药对共有成分29个,其中黄芪25个,包括常春藤皂苷元,山柰酚,槲皮素,丁子香萜,异鼠李素,黄芪甲苷(astragaloside II, astragaloside I, astragaloside III, astragaloside IV),黄芪多糖{2-(chloromethyl)-4-(4-nitrophenyl)thiazole}等<sup>[21-23]</sup>,葛根4个,包括芒柄花黄素, $\beta$ -谷甾醇等,黄芪-葛根有效成分见表1。葛根成分作用靶点84个、黄芪成分作用靶点415个,将全部靶点规范、合并、删除重复项后共得到靶点198个。

**3.1.2 药物-成分-靶点网络构建与分析** 将2味中药,29个活性成分及198个靶点蛋白导入Cytoscape 3.7.1构建药物-活性成分-靶点关系网络。在药物-

活性成分-靶点相互作用的网络中,共包含221个节点和478条边,其中,红色圆形节点表示黄芪中药,绿色圆形节点表示葛根中药,黄色节点表示黄芪、

葛根二者共有成分,紫色菱形节点代表中药所含的活性成分,蓝色节点表示药物靶点,每条边表示彼此之间相互作用关系。根据 Degree 值可知槲皮素潜在靶点最多,为146个,其次是山柰酚59个潜在靶点,7-O-甲基异木糖醇39个潜在靶点, $\beta$ -谷甾醇36个潜在靶点,芒柄花黄素34个潜在靶点,表明上述活性成分可能是黄芪-葛根药对治疗疾病过程中发挥作用的关键成分。

**3.1.3 疾病靶点筛选与PPI网络构建** 在各疾病数据库中检索并删除重复项后共获得2 337个与T2DM相关靶点。疾病靶点与药物成分靶点取交集得到疾病-药物成分共同靶点131个。通过STRING 11.0在线平台对共同靶点进行分析得到的药物-疾病靶点PPI网络。继而,通过Cytoscape 3.7.1软件内置插件对PPI网络数据的分析,以Degree值为依据提取到药物-疾病基因Hithubs网络,其中排名靠前的20个核心靶点依次为AP-1转录因子(JUN),癌基因RELA(RELA),细胞肿瘤抗原p53(TP53),Akt1,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)1,TNF,IL-6,雌激素受体(ESR)1,MAPK14,癌基因FOS(FOS),癌基因MYC(MYC),MAPK8,窖蛋白(CAV)1,表皮生长因子受体(EGFR),IL-10,信号转导与转录激活因子(STAT)1,类视黄醇X受体(RXRA),低氧诱导因子1 $\alpha$ (HIF1A),IL-4,核转录因子- $\kappa$ B抑制因子 $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ ),见表2,绘制可视化网络拓扑图,其中节点越大、颜色越深(红)表明相应靶点排名越靠前;连线颜色越深(红)表明彼此之间关系越紧密。

**3.1.4 基因功能和通路富集分析** 借助DAVID 6.7数据库,将黄芪-葛根药对作用于T2DM的131个关键靶蛋白进行GO注释分析和KEGG通路分析。结果表明,黄芪-葛根药对治疗T2DM共涉及643个BP,58个CC以及117个MF。在阈值 $P < 0.01$ 条件下,筛选出靠前的GO注释结果和KEGG通路,并利用R语言进行制图。其中,BP主要是对response to drug, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, negative regulation of apoptotic process, positive regulation of transcription, DNA-templated, response to hypoxia, aging等生物过程进行调节;MF主要是对enzyme binding, identical protein binding, protein heterodimerization activity, protein binding等分子功能方面有显著作用;而在CC分析中主要是对extracellular space, membrane raft, extracellular region, cytosol, caveola等细胞组分

表2 黄芪-葛根药对治疗T2DM核心候选靶点

Table 2 Core candidate targets of Astragali Radix-Puerariae Radix herb pair for treatment of T2DM

靶点	度值	中介中心性	邻近中心性	邻近连接性
JUN	35	0.08	0.49	15.43
RELA	32	0.05	0.48	15.84
TP53	32	0.10	0.46	13.09
Akt1	31	0.10	0.47	11.65
MAPK1	31	0.11	0.48	14.55
TNF	28	0.09	0.47	14.57
IL-6	24	0.06	0.45	14.79
ESR1	23	0.05	0.44	15.57
MAPK14	23	0.03	0.45	17.57
FOS	23	0.04	0.45	16.70
MYC	20	0.02	0.45	18.50
MAPK8	19	0.03	0.43	14.68
CAV1	18	0.06	0.45	11.00
EGFR	18	0.07	0.43	14.06
IL-10	17	0.03	0.39	12.41
STAT1	16	0.03	0.45	17.88
RXRA	16	0.10	0.44	13.38
HIF1A	15	0.01	0.43	20.53
IL-4	15	0.05	0.40	16.53
I $\kappa$ B $\alpha$	15	0.01	0.43	19.27

有显著作用。KEGG通路富集分析结果表明,黄芪-葛根药对治疗T2DM共涉及通路125条,其中,富集潜在靶基因较多的通路有PI3K/Akt信号通路,肿瘤坏死因子信号通路,MAPK信号通路,FoxO信号通路等,前20条通路具体见表3,提示黄芪-葛根药对可能主要通过上述信号通路发挥治疗作用。

### 3.2 黄芪-葛根药对对糖尿病大鼠的作用

**3.2.1 各组大鼠FBG, FINS水平比较** 与正常组相比,模型组大鼠空腹血糖、胰岛素水平均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,高、中剂量组空腹血糖、胰岛素水平均降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且与二甲双胍组比较差异无统计学意义,低剂量组空腹血糖、胰岛素水平降低,但差异无统计学意义,见表4,表明黄芪-葛根药对水煎剂具有较好的降低血糖、改善胰岛素水平作用。

**3.2.2 各组大鼠肝功、血脂水平比较** 与正常组相比,模型组大鼠AST,ALT水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组相比,高、中、低剂量组AST,ALT水平显著降低( $P < 0.01$ )且与二甲双胍组无统计学差异,见表5。

表3 黄芪-葛根治疗T2DM靶点KEGG信号通路富集分析(前20)

Table 3 Enrichment analysis of KEGG signal pathway in Astragali Radix-Puerariae Radix herb pair in treatment of T2DM (top 20)

信号通路	靶点数/个	P	富集值	错误发现率
PI3K/Akt signaling pathway	32	$1.91 \times 10^{-14}$	5.19	$1.56 \times 10^{-13}$
TNF signaling pathway	24	$2.51 \times 10^{-19}$	12.54	$8.19 \times 10^{-18}$
MAPK signaling pathway	23	$3.94 \times 10^{-10}$	5.08	$1.17 \times 10^{-9}$
HTLV-I infection	23	$4.25 \times 10^{-10}$	5.06	$1.23 \times 10^{-9}$
focal adhesion	22	$5.26 \times 10^{-11}$	5.97	$2.06 \times 10^{-10}$
HIF-1 signaling pathway	21	$1.29 \times 10^{-16}$	12.23	$2.53 \times 10^{-15}$
osteoclast differentiation	20	$8.74 \times 10^{-13}$	8.54	$4.76 \times 10^{-12}$
FoxO signaling pathway	20	$1.33 \times 10^{-12}$	8.35	$6.51 \times 10^{-12}$
T cell receptor signaling pathway	19	$7.68 \times 10^{-14}$	10.63	$5.37 \times 10^{-13}$
Toll-like receptor signaling pathway	19	$2.22 \times 10^{-13}$	10.02	$1.28 \times 10^{-12}$
Ras signaling pathway	17	$2.02 \times 10^{-6}$	4.21	$3.24 \times 10^{-6}$
sphingolipid signaling pathway	16	$2.24 \times 10^{-9}$	7.46	$6.10 \times 10^{-9}$
ErbB signaling pathway	15	$2.61 \times 10^{-10}$	9.64	$8.35 \times 10^{-10}$
Thyroid hormone signaling pathway	15	$1.13 \times 10^{-8}$	7.29	$2.60 \times 10^{-8}$
VEGF signaling pathway	14	$2.88 \times 10^{-11}$	12.84	$1.27 \times 10^{-10}$
apoptosis	14	$3.59 \times 10^{-11}$	12.63	$1.47 \times 10^{-10}$
NF- $\kappa$ B signaling pathway	14	$3.05 \times 10^{-9}$	9.00	$7.86 \times 10^{-9}$
rheumatoid arthritis	14	$3.52 \times 10^{-9}$	8.90	$8.63 \times 10^{-9}$
insulin resistance	14	$4.48 \times 10^{-8}$	7.25	$8.79 \times 10^{-8}$
neurotrophin signaling pathway	14	$1.59 \times 10^{-7}$	6.52	$2.89 \times 10^{-7}$

表4 黄芪-葛根药对对大鼠FBG, FINS的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effects of Astragali Radix-Puerariae Radix herb pair on FBG and FINS in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	FBG/mmol·L <sup>-1</sup>	FINS/mU·L <sup>-1</sup>
正常		10	5.90±0.36	11.07±1.85
模型		13	19.70±2.22 <sup>1)</sup>	30.43±3.95 <sup>1)</sup>
二甲双胍	76.5×10 <sup>-3</sup>	13	10.41±3.51 <sup>4)</sup>	17.33±4.19 <sup>3)</sup>
黄芪-葛根	8.10	13	9.50±1.56 <sup>4)</sup>	18.80±4.73 <sup>3)</sup>
	4.05	13	11.08±4.79 <sup>4)</sup>	22.91±3.57 <sup>4)</sup>
	2.025	13	13.76±5.09	26.78±3.20

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01,<sup>2)</sup>P<0.05;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.01,<sup>4)</sup>P<0.05(表5~9同)。

表5 黄芪-葛根药对对大鼠AST, ALT的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effects of Astragali Radix-Puerariae Radix herb pair on AST and ALT in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	AST	ALT
正常		10	32.68±4.22	48.98±5.28
模型		13	72.49±1.57 <sup>1)</sup>	86.51±1.12 <sup>1)</sup>
二甲双胍	76.5×10 <sup>-3</sup>	13	37.80±2.64 <sup>3)</sup>	50.09±1.86 <sup>3)</sup>
黄芪-葛根	8.10	13	42.34±4.27 <sup>3)</sup>	53.54±3.08 <sup>3)</sup>
	4.05	13	45.21±7.76 <sup>3)</sup>	54.03±6.34 <sup>3)</sup>
	2.025	13	50.81±5.22 <sup>3)</sup>	56.42±2.58 <sup>3)</sup>

与正常组相比,模型组 TC, TG 水平显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组相比,高、低剂量组 TC 水平明显降低 ( $P<0.05$ )且与二甲双胍组比较差异无统计学意义,中剂量组 TC 水平降低,但差异无统计学意义;与模型组相比,高、中、低剂量组 TG 水平显著降低 ( $P<0.01$ )且与二甲双胍组差异无统计学意义。与正常组相比,模型组 HDL-C 水平明显降低 ( $P<0.01$ );与模型组相比,各给药组 HDL-C 水平升

高,但差异无统计学意义。与正常组相比,模型组 LDL-C 水平明显升高 ( $P<0.01$ );与模型组相比,高、中、低剂量组 LDL-C 水平明显降低 ( $P<0.05$ )且与二甲双胍组相比差异无统计学意义;与正常组相比,模型组糖原明显降低 ( $P<0.01$ );与模型组相比,高、中剂量组糖原显著升高 ( $P<0.01$ )且与二甲双胍组相比差异无统计学意义,低剂量糖原水平升高,但差异无统计学意义,见表6。

表6 黄芪-葛根药对对大鼠 TC, TG, HDL-C, LDL-C, 糖原的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 6 Effects of Astragali Radix-Puerariae Radix herb pair on TC, TG, HDL-C, LDL-C and glycogen in rats ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	TC/mmol·L <sup>-1</sup>	TG/mmol·L <sup>-1</sup>	HDL-C/mmol·L <sup>-1</sup>	LDL-C/mmol·L <sup>-1</sup>	糖原/mg·g <sup>-1</sup>
正常		10	0.10±0.06	0.95±0.25	0.90±0.14	0.45±0.04	13.81±0.13
模型		13	0.16±0.08 <sup>1)</sup>	2.99±0.08 <sup>1)</sup>	0.30±0.15 <sup>1)</sup>	1.55±0.15 <sup>1)</sup>	6.26±0.11 <sup>1)</sup>
二甲双胍	76.5×10 <sup>-3</sup>	13	0.12±0.60 <sup>4)</sup>	0.69±0.07 <sup>3)</sup>	0.72±0.08	0.53±0.24 <sup>4)</sup>	10.64±0.33 <sup>3)</sup>
黄芪-葛根	8.10	13	0.10±0.14 <sup>4)</sup>	0.90±0.02 <sup>3)</sup>	0.73±0.16	0.82±0.18 <sup>4)</sup>	9.92±1.34 <sup>3)</sup>
	4.05	13	0.13±0.06	0.64±0.07 <sup>3)</sup>	0.51±0.18	0.91±0.11 <sup>4)</sup>	8.54±0.95 <sup>3)</sup>
	2.025	13	0.12±0.04 <sup>4)</sup>	1.60±0.15 <sup>3)</sup>	0.40±0.02	0.98±0.10 <sup>4)</sup>	7.68±0.75

3.2.3 各组大鼠 IL-6, TNF-α 含量比较 与正常组相比,模型组大鼠 IL-6, TNF-α 水平显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组相比,高、中剂量组 IL-6, TNF-α 水

平明显降低 ( $P<0.05, P<0.01$ )且与二甲双胍组相比差异无统计学意义,黄芪-葛根药对对大鼠 IL-6, TNF-α 的影响见表7。

表7 黄芪-葛根药对对大鼠 IL-6, TNF-α 的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 7 Effects of Astragali Radix-Puerariae Radix herb pair on IL-6 and TNF-α in rats ( $\bar{x}\pm s$ )

ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	IL-6	TNF-α
正常		10	79.90±13.73	119.12±20.86
模型		13	140.95±14.54 <sup>2)</sup>	265.00±31.67 <sup>2)</sup>
二甲双胍	76.5×10 <sup>-3</sup>	13	92.20±15.77 <sup>3)</sup>	146.78±29.43 <sup>3)</sup>
黄芪-葛根	8.10	13	99.58±10.58 <sup>3)</sup>	180.52±32.73 <sup>3)</sup>
	4.05	13	112.98±4.75 <sup>4)</sup>	198.16±24.03 <sup>4)</sup>
	2.025	13	125.36±11.52	209.94±34.23

3.2.4 各组大鼠肝脏组织中 IRS-2, PI3K, Akt, FoxO1 蛋白表达结果比较 与正常组相比,模型组 IRS-2, Akt, p-Akt, p-PI3K 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ );与模型组相比,高剂量组蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ),且与二甲双胍组比较差异无统计学意义,中、低剂量组水平升高,但差异无统计学差异。与正常组相比,模型组 PI3K 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ );与模型组相比,高、中剂量组蛋白表达明显升高 ( $P<0.05$ )且与二甲双胍组差异无统计学意义,低剂量组水平升高,但差异无统计学差异。与正常组相比,模型组 FoxO1 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ );与模型组相比,高剂量组蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )且与二甲双胍组差异无统计学差异;中低剂量组表达降低,但差异无统计学差异。见

表8,图1。

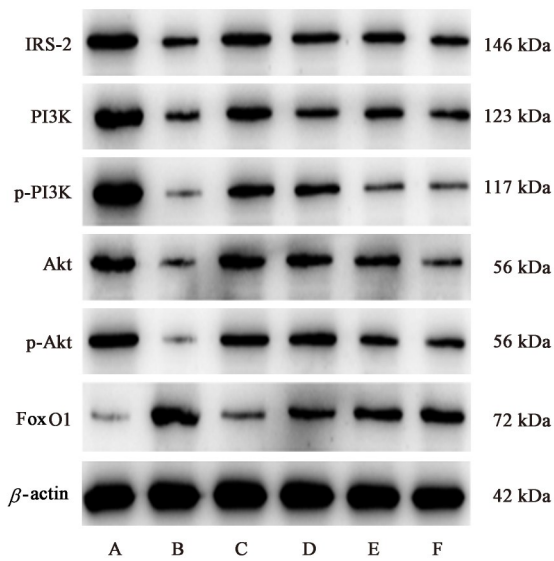
#### 4 讨论

T2DM 属中医“消渴”范畴,消渴的发生与多个脏腑功能失调相关,其中,以脾最为密切,如《灵枢》所云:“脾脉微小为消渴”“脾脆则善病消瘵易伤”,张锡纯所言:“消渴古虽有上中下之分,其证皆起于中焦而极于上下,中焦病而累及脾,脾气不能散精达肺则津液少,不能通调水道,则小便无节,是以渴而多饮多尿。”故脾虚不散精,元气不升,清气下陷乃消渴病基本病机,故治疗当以“健脾益气升阳”为纲。黄芪葛根汤中黄芪补气健脾,升阳举陷,治消渴;葛根升清止渴、升阳举陷,二者相合,益气升阳,可补脾气之不足、升举阳气,恢复津液输布以治消

表 8 黄芪-葛根药对对大鼠肝脏组织中 IRS-2, PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, FoxO1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 8 Effects of Astragali Radix-Puerariae Radix herb pair on IRS-2, PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, FoxO1 protein expression in rat liver tissues ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	IRS-2/ $\beta$ -actin	PI3K/ $\beta$ -actin	p-PI3K/ $\beta$ -actin	Akt/ $\beta$ -actin	p-Akt/ $\beta$ -actin	FoxO1/ $\beta$ -actin
正常		10	1.14±0.01	1.40±0.06	1.63±0.06	1.32±0.09	1.02±0.01	0.54±0.06
模型		13	0.53±0.02 <sup>2)</sup>	0.76±0.05 <sup>2)</sup>	0.54±0.04 <sup>2)</sup>	0.70±0.06 <sup>2)</sup>	0.35±0.05 <sup>2)</sup>	1.10±0.05 <sup>2)</sup>
二甲双胍	76.5×10 <sup>-3</sup>	13	0.95±0.02 <sup>4)</sup>	1.09±0.06 <sup>4)</sup>	1.26±0.08 <sup>4)</sup>	1.27±0.09 <sup>4)</sup>	0.90±0.03 <sup>4)</sup>	0.70±0.05 <sup>4)</sup>
黄芪-葛根	8.10	13	0.81±0.01 <sup>4)</sup>	0.89±0.06 <sup>4)</sup>	0.93±0.04 <sup>4)</sup>	1.07±0.10 <sup>4)</sup>	0.78±0.01 <sup>4)</sup>	0.66±0.03 <sup>4)</sup>
	4.05	13	0.77±0.04	0.90±0.04	0.62±0.08 <sup>4)</sup>	0.97±0.03	0.68±0.02	0.92±0.01
	2.025	13	0.58±0.03	0.74±0.03	0.50±0.03	0.54±0.03	0.54±0.03	1.03±0.03



A. 正常组; B. 模型组; C. 二甲双胍组; D-F. 黄芪葛根高、中、低剂量组

图 1 各组大鼠相关蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoretic of rat related protein expression level in each group

渴, 切中病机。本研究通过网络药理学方法对黄芪-葛根药对治疗 T2DM 的作用机制进行探究, 发现同一活性成分可调节多个作用靶点、多个活性成分又可对同一靶点起作用, 活性成分与靶点蛋白间复杂的相互作用关系体现了该药对多成分、多靶点综合调治 T2DM 的作用特点。

观察成分分析结果可知, 槲皮素, 山柰酚,  $\beta$ -谷甾醇, 芒柄花黄素等是该药对发挥治疗 T2DM 作用的主要化学成分。槲皮素和山柰酚均是天然的黄酮类化合物, 有研究表明, 山柰酚、槲皮素的降糖、降脂效果极佳, 功能与消渴丸相当<sup>[24]</sup>。研究发现, 以槲皮素干预后的 T2DM 模型大鼠的葡萄糖耐量明显得到改善, 槲皮素可通过改善胰岛功能、抑制氧化应激反应发挥治疗 T2DM 作用<sup>[25]</sup>。山柰酚具有降血糖、降血脂、降低胰岛素抵抗指数、改善 IR 等

作用<sup>[26]</sup>, 其可通过抑制 T 细胞活性, 调节 Th1/Th2 失衡状态, 发挥保护胰岛  $\beta$  细胞功能; 通过逆转葡萄糖转运蛋白 4 和腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 的表达受损达到改善血糖和周围组织对胰岛素敏感性的作用<sup>[27-28]</sup>; 此外, 其还能抑制 IRS-1 及 I $\kappa$ B 激酶的磷酸化, 降低 TNF- $\alpha$ , IL-6 水平, 抑制炎症反应, 治疗胰岛素信号缺陷引发的 IR<sup>[29]</sup>。在降血糖方面,  $\beta$ -谷甾醇作用与二甲双胍相似, 可降低 T2DM 大鼠血糖, 其能通过降低肠道对葡萄糖的吸收、加速糖原分解、糖酵解、糖原异生等过程, 降低血糖水平, 使高胰岛素水平恢复正常<sup>[30]</sup>。

靶点分析结果发现, JUN, RELA, TP53, Akt1, MAPK1, TNF- $\alpha$ , IL-6, ESR1 等发挥主要作用。有研究表明, IL-6 及 TNF- $\alpha$  与 IR, 糖原合成分解关系密切<sup>[31]</sup>。TNF- $\alpha$ , IL-6 等炎症因子可通过多途径阻碍胰岛素介导的糖脂转运, 从而诱发 IR<sup>[32-33]</sup>, 降低靶器官对胰岛素敏感性<sup>[34]</sup>。IL-6 主要通过促进 IRS-1 的 Ser 位点磷酸化、抑制 Tyr 位点磷酸化, 影响胰岛素信号传导; 抑制运转葡萄糖蛋白活性以阻碍胰岛素信号传导<sup>[35]</sup>; 降低脂联素、瘦素水平, 影响 IRS 酪氨酸磷酸化, 使胰岛素信号传导受损; 促进脂肪分解, 增加游离脂肪酸 (FFA) 水平, 降低胰岛素靶组织 InsR 数目, 干扰糖脂代谢; 激活细胞因子信号抑制物活性, 影响胰岛素的信号传导等几个方面诱发机体出现 IR<sup>[36]</sup>。WALLENIUS 等<sup>[31]</sup>通过研究发现, IL-6 可增加信号转导与转录激活因子 3 酪氨酸磷酸化, 降低 PI-3 活性, 使葡萄糖摄取减少, 糖原和脂质的合成减少。TNF- $\alpha$  诱发 IR 的机制主要包括促进 Ser/Thr 激酶表达, 阻碍胰岛素信号传导; 促进 IRS 的 Ser 磷酸化, 抑制 INSR 和 IRS-1 的 Tyr 磷酸化; 降低转运葡萄糖相关蛋白水平, 抑制胰岛素介导的葡萄糖跨膜转运; 加速脂肪分解, 升高 FFA 水平, 降低靶组织 INSR 数目, 干扰胰岛素信号传递; 增强升糖激素的作用, 阻断胰岛素信号传导; 促进 IL-6 分泌,

减弱瘦素、脂联素产生,抑制IRS酪氨酸磷酸化以损害胰岛素信号通路等<sup>[37]</sup>。IL-6, TNF- $\alpha$ 作为细胞因子,亦可参加多种炎症与免疫反应并可触发氧化应激反应,诱导胰岛 $\beta$ 细胞凋亡。JUN是连接炎症和IR的信号分子,可在高糖状态下被激活,诱发炎症反应及促进炎症因子释放,增强相关凋亡基因的转录活性,导致胰岛细胞受损<sup>[38]</sup>,而敲除糖尿病小鼠JUN基因后,小鼠血糖明显降低、胰岛素信号传导增强<sup>[39]</sup>。TP53在糖尿病发展中有重要作用<sup>[40]</sup>,能调节葡萄糖转运蛋白、改善IR达到抑制糖尿病发生的作用,还可直接干预糖酵解和糖异生过程来影响葡萄糖水平<sup>[41]</sup>。ESR1被激活后具有调节肝细胞因子和肝细胞生长因子受体作用,从而可改善肝脂肪变性和IR;丝氨酸/苏氨酸激酶Akt1是PI3K/Akt信号通路上的关键蛋白,其活性减弱与IR的发生有关,现已证实,Akt1在多个胰岛素敏感组织中均有表达,可促进转运葡萄糖转运体的表达,提高葡萄糖利用率,具有调节血糖作用。

KEGG富集结果显示,PI3K/Akt signaling pathway, TNF signaling pathway, MAPK signaling pathway, FoxO signaling pathway等是较为显著的通路。其中,PI3K/Akt信号通路可能是黄芪-葛根药对发挥降糖作用的最主要通路,该信号通路是胰岛素效应信号传导的主要途径,载有胰岛素调控细胞代谢所必需的关键蛋白<sup>[42-43]</sup>。胰岛素与胰岛素受体结合后,激活酪氨酸蛋白激酶(PTK),磷酸化IRS-2酪氨酸残基,p-IRS-2可与PI3K结合,催化4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)生成磷脂酰肌醇3(PIP3),PIP3以第二信使角色激活Akt,继而对包括FoxO1在内的一系列下游蛋白进行调控以促进糖原合成、促进葡萄糖转运、抑制糖异生、改善IR,最终使血糖降低<sup>[44]</sup>。叉头框转录因子家族成员FoxO1是PI3K/Akt信号通路的下游因子,在肝脏中参与极低密度脂蛋白合成、调节糖异生途径,从而对机体糖脂代谢产生影响<sup>[45]</sup>。MAPK信号通路是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶通路,与IR及高脂血症都有着密切的联系<sup>[46]</sup>。

通过网络药理学分析,黄芪-葛根药对治疗T2DM的主要作用机制在于槲皮素,山柰酚, $\beta$ -谷甾醇等活性成分通过Akt1,MAPK1, TNF- $\alpha$ , IL-6等靶点对PI3K/Akt,肿瘤坏死因子, FoxO等信号通路进行调控以影响机体糖异生、糖原合成及分解、炎症反应及IR、胰岛 $\beta$ 细胞损伤等过程。基于此预测结果,进一步以动物模型对其进行实验验证。选择作

用显著的IL-6, TNF- $\alpha$ 蛋白及PI3K/Akt/FoxO1信号通路进行检测。

首先,在药效学方面,黄芪-葛根药对可降低T2DM模型大鼠AST, ALT, TC, TG, LDL-C水平,升高糖原含量,降低空腹血糖及胰岛素水平,表明该药对确有降血糖、治疗T2DM功效。指标检测结果可见黄芪-葛根药对可显著降低大鼠IL-6, TNF- $\alpha$ 水平及FoxO1蛋白表达,提高IRS-2, Akt, p-Akt, PI3K, p-PI3K蛋白表达。表明黄芪-葛根药对的活性成分可能是通过调节IL-6, TNF- $\alpha$ 因子,激活PI3K/Akt/FoxO1信号通,从而减少肝脏糖异生作用、增加肝糖原合成、抑制炎症反应、改善IR及胰岛 $\beta$ 细胞损伤等发挥降糖作用的。

综上所述,本研究基于网络药理学研究方法,构建“药物-成分-靶点-疾病”网络,从多成分-多靶点-多途径角度对黄芪-葛根药对治疗T2DM的作用机制进行探析。继而以实验对所预测机制中最主要的进行检验,结果表明黄芪-葛根药对可降低血清IL-6, TNF- $\alpha$ 水平,调节PI3K/Akt/FoxO1信号通路,干预IR,糖原合成,糖异生,胰岛 $\beta$ 细胞,炎症反应等过程,从而降低糖尿病大鼠血糖水平,起到治疗作用。本实验结果验证了网络药理学预测结果,为T2DM的病因学研究、黄芪-葛根配伍对T2DM的治疗及后续深入研发提供指导与依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 杨春,刘仲栋,宋轶,等. 中医药调节肠道菌群干预2型糖尿病的研究进展[J]. 山西中医药大学学报, 2021, 22(4): 298-301.
- [2] NIU J, XU G, JIANG S, et al. *In vitro* antioxidant activities and anti-diabetic effect of a polysaccharide from *Schisandra sphenanthera* in rats with type 2 diabetes [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 94 (Pt A): 154-160.
- [3] AZMI S, PETROPOULOS I N, FERDOUSI M, et al. An update on the diagnosis and treatment of diabetic somatic and autonomic neuropathy [J]. *F1000Res*, 2019, 2(15): 186.
- [4] CUSI K, SANYAL A J, ZHANG S, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) prevalence and its metabolic associations in patients with type 1 diabetes and type 2 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2017, 19(11): 1630-1634.
- [5] 张洪敏,曹世杰,邱峰,等. 葛根和葛根素治疗糖尿病及并发症的研究进展[J]. 天津中医药大学学报,

- 2019,38(6):607-615.
- [ 6 ] 谢秀英,沙雯君,雷涛,等. 中医药通过调节肝糖异生从脾论治糖尿病研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2021,55(5):94-101.
- [ 7 ] FANG P H, YU M, ZHANG L, et al. Baicalin against obesity and insulin resistance through activation of Akt/AS160/GLUT4 pathway [J]. Mol Cell Endocrinol, 2017,448:77-86.
- [ 8 ] WANG T, JIANG H M, CAO S J, et al. Baicalin and its metabolites suppresses gluconeogenesis through activation of AMPK or Akt in insulin resistant HepG-2 cells[J]. Eur J Med Chem, 2017, 141:92-100.
- [ 9 ] DU Q, ZHANG S H, LI A Y, et al. Astragaloside IV inhibits adipose lipolysis and reduces hepatic glucose production via Akt dependent PDE3B expression in HFD-Fed mice[J]. Front Physiol, 2018,9:9-15.
- [10] PRASAIN J K, PENG N, RAJBHANDARI R, et al. The Chinese Pueraria root extract (*Pueraria lobata*) ameliorates impaired glucose and lipid metabolism in obese mice[J]. Phytomedicine, 2012,20(1):17-23.
- [11] JUNG H W, KANG A N, KANG S Y, et al. The root extract of *Pueraria lobata* and its main compound, puerarin, prevent obesity by increasing the energy metabolism in skeletal muscle [J]. Nutrients, 2017, 9(1):33-45.
- [12] 马世玉,程凤丽. 黄芪葛根汤辅助治疗2型糖尿病疗效观察及对胰岛素抵抗的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017,27(3):206-208.
- [13] 韩圆圆. 黄芪葛根汤辅助治疗2型糖尿病的作用研究[J]. 中国医药指南, 2019,17(35):184-185.
- [14] 王春怡,李卫民,高英. 黄芪葛根汤对2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及PPAR- $\gamma$  mRNA表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(5):162-165.
- [15] 于小桐,范颖,李新,等. 基于AdipoR1/AMPK通路探讨黄芪葛根汤有效组分配伍对糖尿病大鼠糖脂代谢及炎症反应影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020,22(2):42-45.
- [16] 周遵明,谭梅傲,彭冲,等. 黄芪葛根汤对高脂血症大鼠的降血脂作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2021,32(7):945-951.
- [17] RU J L, LI P, WANG J A, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Cheminformatics, 2014,6(1):13.
- [18] XU X. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13:6964-6982.
- [19] TAO W Y, XU X, WANG X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal Radix Curcumae formula for application to cardiovascular disease [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145:1-10.
- [20] 李雨庭. 黄连温胆汤中黄连最佳剂量对T2DM大鼠肝脏脂代谢PPAR $\alpha$ -LXR $\alpha$ -ABCA1信号通路的影响[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2018.
- [21] 李嘉丽,杨泽虹,杨良俊,等. 黄芪-莪术对胃癌前病变作用机制的网络药理学分析[J]. 中药新药与临床药理, 2019,30(12):1434-1441.
- [22] 徐婷,麦葭沂,向俊,等. “黄芪-当归”药对主要活性成分的网络药理学研究[J]. 中药材, 2017, 40(9):2195-2201.
- [23] 刘洋,杜婧,沈颜红. 10种药用黄芪属植物化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(18):222-234.
- [24] 张家瑞. 槲皮苷和山柰酚对糖尿病小鼠血糖及血脂水平的影响[J]. 现代食品科技, 2013,29(3):459.
- [25] 李文雯,钟大鹏,张卫,等. 槲皮素对糖尿病大鼠胰岛 $\beta$ 细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. 广西医科大学学报, 2021,38(2):298.
- [26] 刘贵波,刘跃光,孙成,等. 山柰酚对2型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2012,16(9):3.
- [27] 张茁,孙文,刘铜华,等. 山柰酚对2型糖尿病小鼠骨骼肌PI3K-Akt-GLUT4信号通路的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016,18(7):1139-1143.
- [28] ALKHALIDY H, MOORE W, ZHANG Y, et al. Small molecule kaempferol promotes insulin sensitivity and preserved pancreatic beta-cell mass in middle-aged obese diabetic mice [J]. J Diabetes Res, 2015, 5(7):32984.
- [29] LUO C, YANG H, TANG C, et al. Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- $\kappa$ B signal in type 2diabetic rats [J]. Int Immunopharmacol, 2015,28(1):744.
- [30] PONNULAKSHMI R, SHYAMALADEVI B, VIJAYALAKSHMI P, et al. Insilico and *in vivo* analysis to identify theantidiabetic activity of beta sitosterol in adipose tissue of high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic experimental rats [J]. Toxicol Mech Method, 2019,29(4):276-290.
- [31] WALLENIUS V, WALLENIUS K, AHRÉN B, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity[J]. Nat Med. ,2002,8(1):75-79.
- [32] LEINONEN E, HURT-CAMEJO E, WIKLUND O, et al. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion

- molecules in type2 diabetes[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 166(2):387-394.
- [33] 农天雷,曾鸿毅. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 与 DM2 的关系[J]. *放射免疫学杂志*, 2011, 24(2):140-141.
- [34] 陆亚. 血清 CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 与 2 型糖尿病胰岛素抵抗及血脂水平的相关性研究[J]. *牡丹江医学院学报*, 2015, 36(5):47.
- [35] 李伟,张龙江,林汉华,等. 重组人白细胞介素 6 对 SW872 脂肪细胞葡萄糖代谢和胰岛素敏感性的影响及其机制[J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(8):576.
- [36] ROTTER V, N AGAEV I, SMITH U. Interleukin-6 induces insulin resistance in 3T3-L adipocyte and is like IL-8 and TNF-alpha over-expressed in human fat cells from insulin-resistant subjects[J]. *J. Biol Chem*, 2003, 278(46):45777-45784.
- [37] BLOOMGARDEN Z T. Inflammation and insulin resistance[J]. *Diabetes Care*, 2013, 26(5):1619.
- [38] 罗新新,刘玲,吴文明,等. 基于网络药理学和分子对接探讨葛根-丹参药对治疗 2 型糖尿病作用机制研究[J]. *江西医药*, 2020, 55(9):1157-1162.
- [39] 杨金伟,喻嵘,吴勇军,等. 基于网络药理学探讨肾气丸干预 2 型糖尿病分子机制及关键作用通路的验证[J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44(1):60-68.
- [40] MINAMINO T, ORIMO M, SHIMIZU I, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the Regulation of insulin resistance [J]. *Nat Med*, 2009, 15 (9) : 1082-1087.
- [41] KUNG C P, MURPHY M E. The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes [J]. *J Endocrinol*, 2016, 231(2):R61-R75.
- [42] 宋紫临,吴丽丽,秦玲玲,等. PI3K/Akt 信号通路与糖尿病的研究进展[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2019, 21(6):1264-1269.
- [43] 吴薇,杨晶晶,万毅刚,等. 慢性肾脏病胰岛素抵抗的发病机制、治疗策略及中药的干预作用[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(1):49-55.
- [44] 王恩芳,刘曙玮. 番茄红素通过激活 PI3K/Akt 信号通路对 2 型糖尿病小鼠治疗机制研究[J]. *实用糖尿病杂志*, 2015, 11(5):35-37.
- [45] 谢秀英,沙雯君,雷涛,等. 中医药通过调节肝糖异生从脾论治糖尿病研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2021, 55(5):1007-1334.
- [46] SRIWIJITKAMOL A, CHRIST-ROBERTS C, BERRIA R, et al. Reduced skeletal muscle inhibitor of kappaB beta content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training[J]. *Diabetes*, 2006, 55(3):760-767.

[责任编辑 顾雪竹]