

基于网络药理学的葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病的效应机制

张昌林^{1,2}, 吴荣焕^{1,2}, 盛泓沁^{1,2}, 方剑锋^{3*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120; 2. 广东省中医院, 广州 510120;
3. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] **目的:**运用网络药理学分析方法探究葛根芩连汤(Gegen Qinliantang, GQT)治疗 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的潜在效应机制。**方法:**利用整合药理学平台(Computation Platform for Integrative Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, TCMIP)收集 GQT 中 4 味中药的化学成分及 T2DM 的相关靶点基因,并根据二维结构相似性特征筛选药物靶标;采用整合药理学平台在线 Cytoscape 技术构建核心靶标网络及“中药-成分-靶标-通路”多维网络;利用平台基因功能注释(Gene Ontology, GO)和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)对核心靶标进行基因功能和通路的注释分析。**结果:**共收集葛根芩连汤 234 种成分,核心靶标 175 个;其中筛选得到的 68 个活性成分与蛋白激酶 C- δ (PRKCD),葡萄糖激酶(GSK),细胞色素 C 氧化酶亚基(COX7C/COX5A/COX5B),ATP 合成酶 F1 亚基(ATP5F1A/ATP5F1C),胰岛素受体(INSR)等 22 个主要蛋白具有强相互作用,主要涉及在内分泌系统,细胞生长与死亡, FoxO 转录因子(FoxO)信号通路,脂肪细胞因子信号通路,胰岛素信号通路等多条通路。**结论:**本研究初步揭示了葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病的效应机制,其机制多与抗炎、抗氧化应激、抗胰岛 β 细胞损伤、改善糖脂代谢和并发症等相关。

[关键词] 网络药理学; 葛根芩连汤; 2 型糖尿病; 效应机制

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0179-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181934

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180712.0939.003.html>

[网络出版时间] 2018-07-12 10:56

Effective Mechanism of Gegen Qinlian Tang in Treating Type 2 Diabetes Mellitus Based on Network Pharmacology

ZHANG Chang-lin^{1,2}, WU Rong-huan^{1,2}, SHENG Hong-qin^{1,2}, FANG Jian-feng^{3*}

(1. *The Second Clinical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;*
2. *Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;*
3. *The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential mechanism of Gegen Qinlian Tang (GQT) in the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM) using network pharmacology. **Method:** Four chemical components of GQT and target genes of T2DM were collected in Computation Platform for Integrative Pharmacology of Traditional Chinese Medicine (TCMIP). The drug targets were screened out according to the Similarity of Two-Dimensional structures. The online Cytoscape technology in TCMIP was used to build the core target network and “herb-ingredient-target-pathway” network. Gene Ontology (GO) gene function combined with Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment module was used to annotate and analyze the gene function and signaling pathway of the core target. **Result:** Based on the TCMIP, 234 chemical components of GQT and 175 core targets were collected. Multi-dimensional network analysis showed that 68 active components had strong interactions

[收稿日期] 20180410(009)

[基金项目] 大学生创新创业训练计划基金项目(201810572152)

[第一作者] 张昌林,在读硕士,从事中药药理学与中药标准化研究,E-mail:zhangchanglin1125@163.com

[通信作者] *方剑锋,副教授,从事经方治疗内分泌疾病研究,Tel:020-36585579,E-mail:fjff@live.com

with protein kinase C- δ (PRKCD), glucokinase (GCK), cytochrome C oxidase subunit (COX7C/COX5A/COX5B), ATP synthase F1 subunit (ATP5F1A/ATP5F1C), insulin receptor (INSRS) and other 22 major proteins; the biological pathways mainly involved in the endocrine system, cell growth and death, FoxO signaling pathway, adipocytokine signaling pathway, insulin signaling pathway and so on. **Conclusion:** The findings preliminarily reveal the effective mechanism of GQT in treating T2DM, which is related to anti-inflammation, anti-oxidation stress, anti-insulin β cell injury, and improvement of glycolipid metabolism and complications.

[**Key words**] network pharmacology; Gegen Qinlian Tang; type 2 diabetes mellitus; effective mechanisms

糖尿病目前已是威胁人类健康最重要的非传染性疾病之一,据流行病学调查显示,2015 年全球糖尿病患者已达 4.15 亿,其中 75% 在发展中国家;预计 2040 年,全球将有近 6.42 亿糖尿病患者^[1]。在中国,糖尿病的流行情况更为严重,糖尿病患病率为 11.6%,中国成年人口中糖尿病总数达 1.13 亿^[2]。2 型糖尿病(T2DM)是一种受遗传和环境等因素影响的代谢性疾病,临床病理改变以胰岛素分泌相对不足和胰岛素抵抗为主^[3]。T2DM 临床特征以慢性糖代谢障碍为主,其慢性高血糖会给各种脏器,尤其是眼、肾、神经以及心血管造成长期损害、功能不全甚至衰竭^[4-5],进而给患者带来沉重的疾病负担,严重影响生活质量^[6]。然而目前尚无有效的治愈方法,常规通过口服降糖药和胰岛素皮下注射等方式来控制血糖^[7]。在这种情况下,探索开拓新的治疗方法显得尤为重要。糖尿病属于中医范畴里的“消渴”,几千年来中医在治疗糖尿病理论和临床实践中积累了丰富的经验,近年来,随着对 T2DM 认识和研究的不断加深,中医药在治疗 T2DM 及其慢性并发症中发挥着独特的优势。葛根芩连汤(Gegen Qinlian Tang, GQT)出自中医经典著作《伤寒论》,由葛根、黄连、黄芩、甘草 4 味药组成,具有解表清里的功效,用于治疗协热下利。全小林教授运用症、证、病结合的辨治思路,创造性将 GQT 应用于肥胖 T2DM 肠道湿热证患者治疗当中,并取得良好的疗效^[8]。因此,探究 GQT 治疗 T2DM 多靶点、多通路的效应机制,对 T2DM 中医药治疗具有重要意义。

网络药理学结合系统生物学及计算机技术,通过对“药物-靶标-基因-疾病”相互作用网络的分析,揭示多分子药物协同作用于人体的效应机制^[9]。网络药理学技术的发展,无疑对中药及其复方治疗疾病多成分、多靶点、多通路效应机制的研究具有的作用。中药整合药理学计算平台(Computation Platform for Integrative Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, TCMIP)是以中医药大数据为基础,采用人工智能、数据建模和挖掘、网络科学等学

科的方法和技术来实现自助式服务模式,从而构建出来的网络药理学分析平台^[10]。该平台能从中草药效机制探讨、质量控制、中药临床精准用药等方面对经典名方的研究开发、临床应用提供科学依据^[11-13]。本研究借助 TCMIP,运用网络药理学分析方法系统揭示 GQT 治疗 T2DM 的潜在效应机制,为 GQT 的临床应用提供理论依据,并且为中医药经典名方药理学机制的研究提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 GQT 化学成分收集 TCMIP 依据 2015 年版《中国药典》^[14],通过文献挖掘和对相关开源性中药数据库的系统整理,收录了 400 余味常用中药材所含有的共 13 000 余种天然产物的成分信息。基于 TCMIP 收录的中药及化学成分信息,在平台中建立任务列表,于“中药信息设定项”中分别检索中药葛根、黄芩、黄连、甘草,对 4 味中药的化学成分信息进行收集,建立 GQT 化学成分数据库。

1.2 T2DM 靶标收集 TCMIP 疾病/证候数据库系统整合了 DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>)^[15], TTD (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp>)^[16], OMIM (<http://www.omim.org/>)^[17] 及 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)^[18] 等多个数据库中治疗疾病的药物种类、作用、蛋白质靶标及基因等相关信息,通过疾病或症状的关键词进行检索,可以获取治疗该疾病或症状的相关药物靶标信息。在“疾病靶标设定项”中检索 T2DM,提取治疗 T2DM 的已知药物靶标信息。

1.3 GQT 成分靶标预测 TCMIP 基于天然化合物成分二维结构相似性的特征进行药物靶标预测,采用开源性软件 OpenBable 对天然化合物成分的 MACCS 分子指纹信息进行提取,并利用 Tanimoto 系数定义的相似性算法与 FDA 获批上市的药物进行相似性打分,纳入 Score > 0.6 的药物作用靶标^[13]。为提高预测结果的可信度,本研究选取 Score > 0.8 的药物作用靶标作为 GQT 潜在效应靶标。

1.4 蛋白质相互作用网络构建及潜在分子机制分

析 GQT 潜在效应靶标与 T2DM 疾病靶标之间的蛋白质-蛋白质相互作用信息 (Protein-Protein Interaction, PPI) 的获取可通过 TCMIP 中的 PPI 数据库实现, 该数据库系统整合了 HAPPI (<http://bioinformatics.iupui.edu/HAPPI/>)^[19], OPHID (<http://ophid.utoronto.ca>)^[20], HPRD (<http://www.hprd.org/>)^[21], MINT (<http://mint.bio.uniroma2.it/mint/download.do>)^[22], DIP (<http://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/>)^[23], Reactome (<http://www.reactome.org/>)^[24], InAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>)^[25], PDZBase (<http://icb.med.cornell.edu/services/pdz/start>)^[26] 数据库中的蛋白质相互作用信息。基于 GQT 药物靶标与 T2DM 疾病靶标之间相互作用的关系, 构建中药靶标-疾病基因相互作用网络, 并计算其相关网络特征值; 以“节点连接度”“节点紧密度”及“节点介度”的中位数作为卡值, 纳入同时满足 3 个卡值的节点作为中药方剂矫正疾病失衡网络的候选靶标, 并且进一步以“节点连接度”的 2 倍中位数为卡值, 筛选出核心节点^[13], 从而构建 GQT 治疗 T2DM 核心靶标网络。

GO 分类法及通路分析法是进行基因功能分析的常用方法。GO 数据库将基因的功能以细胞组分、分子功能及生物学过程 3 大类型进行分类并在每一类别中提供描述该基因功能的分级结构, 从而使研究者能将某类型基因与该分类结构相联系并对该基因功能进行描述。通路分析则依托于已明确的生物学通路, 通过将目的基因输入通路分析软件并利用统计学知识分析, 从而预测哪些生物学通路与基因的表达变化密切相关。通过 TCMIP 关联的 GO 基因本体数据库^[27] 及 KEGG 通路数据库^[18], 可以对 GQT 治疗 T2DM 核心靶标进行基因功能和通路富集分析, 挖掘核心靶标基因或蛋白质的分子功能、细胞内定位及效应通路等信息, 并选取 P-value 排名靠前的分析结果以图表形式展示。

1.5 “中药-成分-靶标-通路”网络构建与分析 为了直观阐述 GQT 治疗二型糖尿病的潜在分子机制, 根据富集分析结果选取 P 值排名前 30 的通路, 构建 GQT “成分-靶标-通路”的多维网络结构; 并利用 TCMIP 在线的关系网络绘图技术, 实现中药成分与核心靶标相互作用关系, 核心靶标与关键通路相互作用关系的可视化。

2 结果

2.1 GQT 中成分、疾病靶标及药物靶标预测概况 通过 TCMIP 获得 GQT 中 4 味中药共 234 种化学

成分, 其中葛根成分 33 个, 黄芩成分 54 个, 黄连成分 14 个, 甘草成分 133 个。葛根中的成分主要是异黄酮类 (isoflavone), 三萜 (triterpenoids) 及其皂苷类 (saponins), 香豆素类 (coumarins) 等, 动物研究表明葛根异黄酮促进肝脏中超氧化物歧化酶及过氧化氢酶的表达, 从而提高糖尿病小鼠抗氧化能力, 改善糖脂代谢^[28]。另外, 胰岛素抵抗与血脂异常密切相关, 研究显示葛根素 (puerarin) 可提高胰岛素敏感性, 降低血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC), 甘油三酯 (triglyceride, TG) 及低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 的含量, 从而改善脂肪细胞的胰岛素抵抗^[29]。黄芩中的成分以黄酮类及萜类为主, 还包括 β -谷甾醇 (β -sitosterol), 苯乙醇苷类化合物 (phenylethanoid glycosides) 及挥发油等。研究显示黄芩苷 (baicalin) 可能通过调节肝脏及骨骼肌丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β) 信号通路, 发挥改善血糖血脂及胰岛素水平的作用^[30]。黄连中的成分则是各种生物碱及糖苷类化合物等, 其中小檗碱 (berberine) 作为黄连中主要活性物质, 通过调节过氧化物酶体增植物激活型受体 (peroxisome proliferator activated-receptors, PPARs)/正性转录延伸因子 b (positive transcription elongation factor b, P-TEFb) 信号转导通路, 改善 T2DM 大鼠糖脂代谢紊乱^[31]; 研究还表明小檗碱能保护糖尿病大鼠周围神经, 改善糖尿病性肾病病变以及减少细胞因子对胰岛细胞的损伤效应^[32-34]。此外, 甘草中的成分有三萜皂苷 (triterpenoid saponin), 黄酮 (flavone), 生物碱 (alkaloid) 及有机酸 (organic acid) 等, 其中三萜类化合物以甘草酸 (glycyrrhizic acid) 为主, 而黄酮类化合物有甘草素 (liquiritigenin), 异甘草素 (isoliquiritigenin) 等。研究表明, 甘草酸对 T2DM 治疗具有改善胰岛素抵抗作用, 其提高血清中超氧化物歧化酶及过氧化氢酶活性, 抑制丙二醛的产生, 并且抵抗血红蛋白游离铁介导的自由基反应及血红蛋白中羰基的生成^[35]。在动物实验中, 甘草黄酮 (glycyrrhizic flavone) 对脂代谢紊乱具有显著的调节作用, 并且提高糖尿病大鼠胰岛素敏感指数, 改善胰岛素抵抗^[36]。

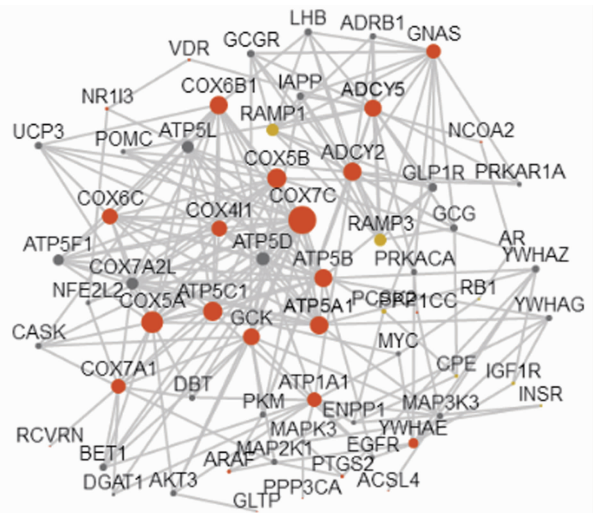
T2DM 靶标共 16 个, 包括突触结合蛋白样蛋 4 (synaptotagmin-like protein 4), 胰岛素样生长因子结合蛋白-7 (insulin-like growth factor-binding protein

7),同源 NOV 蛋白 (protein NOV homolog), 钠/葡萄糖转运蛋白 1,2 (sodium/glucose cotransporter 1,2), 神经内分泌转换酶 1,2 (neuroendocrine convertase 1,2), 羧肽酶 E (carboxypeptidase E), 胰岛素降解酶 (insulin-degrading enzyme), 胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor), 组织蛋白酶 D (cathepsin D), 视网膜母细胞瘤相关蛋白 (retinoblastoma-associated protein, insulin receptor), 受体活性修饰蛋白 1,2,3 (receptor activity-modifying protein 1,2,3)。

基于 GQT 中 4 味中药化学成分二维结构相似性特征进行药物靶标预测,选取相似性打分 Score > 0.8 的药物作用靶标作为 GQT 潜在效应靶标,其中葛根的预测靶标数量为 131 个,黄芩 524 个,黄连 87 个,甘草 360 个。进一步对两两中药间预测靶标进行分析,得出 GQT 不同中药间的共有靶标,其中葛根-黄芩共有靶标 64 个,葛根-黄连共有靶标 6 个,葛根-甘草共有靶标 28 个,黄芩-黄连共有靶标 57 个,黄芩-甘草共有靶标 75 个,黄连-甘草共有靶标 54 个;这些共有靶标的存在,是中药复方中各味药发挥协同拮抗作用的潜在效应点。

2.2 GQT 治疗二型糖尿病核心靶标网络 利用 TCMIP 构建中药复方 GQT 治疗 T2DM 的相互作用网络,根据筛选条件获得核心靶标 175 个和相互作用关系 227 对,其中药物预测靶标 57 个,疾病靶标 9 个,其他靶标 109 个;对核心靶标共 227 对相互作用关系进行可视化处理,仅显示连接度 (degree) 值排名前 100 靶标,得到 GQT 治疗 T2DM 的候选靶标网络图,其中节点大小与连接度值成正比。见图 1。

degree 是衡量节点重要性简单而直观的指标,它是指节点的直接相邻节点的数目,其中少量连接度高的节点往往参与着重要的生命活动,发挥着关键的生物学效应^[37]。药物候选靶标中连接度较高的涉及了蛋白激酶 C- δ (protein kinase C delta, PRKCD), 葡萄糖激酶 (glucokinase, GCK), AMP 活化蛋白激酶催化亚基 $\alpha 2$ (protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2, PRKAA2), 细胞色素 C 氧化酶亚基 7C, 5A, 5B (cytochrome oxidase subunit 7C, 5A, 5B, COX7C, 5A, 5B), 腺苷酸环化酶 2 (adenylate cyclase 2, ADCY2), ATP 合成酶 F1 亚基 α, γ (ATP synthase F1 subunit alpha, ATP synthase F1 subunit gamma, ATP5F1A, ATP5F1C) 等。PKC- δ 是磷脂依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞代谢、增殖、凋亡中起到关键作用, Greene 等^[38] 发现激活



谢物和能量的产生、蛋白质磷酸化、细胞对胰岛素刺激的反应等生物过程中;在分子功能方面,涉及了蛋白激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白结合、蛋白质复合物结合及 ATP 结合等;在细胞组分,主要集中在核原形质、核浆、细胞溶质,胞液、线粒体、线粒体内膜等。这提示 GQT 治疗 T2DM 的机制与细胞凋亡、蛋白质结合、信号转导、能量代谢过程及氧化应激密切相关。据相关文献报道,人胰岛细胞凋亡水平在高血糖条件下明显升高,胰岛细胞中促凋亡基因 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 家族抗凋亡蛋白 (Bad), Bcl-2 家族保凋亡蛋白 (Bid), Bcl 家族双向调节凋亡蛋白 (Bik) 表达增加,而抗凋亡基因 Bcl-x1 水平降低^[41]。此外, T2DM 通过促进蛋白酶活化受体-4 (protease-activated receptor-4, Par-4) 分泌和核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)

的表达,诱导胰岛 β 细胞凋亡,从而导致胰岛素分泌减少^[42]。在信号转导方面,研究显示 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinases, JNK)/MAPK, 应激活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK) 和 磷 脂 酰 肌 醇 3 激 酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/Akt 等信号通路在 T2DM 胰岛素抵抗及葡萄糖代谢中发挥重要作用^[43-45]。在能量代谢过程中,线粒体功能障碍使 ATP 合成减少,导致机体能量供需失衡,从而诱发胰岛素抵抗,最终导致 T2DM 的发生^[46]。此外,研究表明持续性高血糖刺激可诱导线粒体呼吸链产生大量活性氧簇化合物,从而导致胰岛 β 细胞损伤^[47];并且活性氧簇化合物通过激活 JNK/p38 MAPK 信号通路,使下游信号因子磷酸化而阻碍胰岛素的转导,产生胰岛素抵抗效应^[48]。

表 1 GQT 治疗 T2DM 关键靶标具有的功能信息

Table 1 Functional information on core targets of Gegen Qinlian Tang in treating type 2 diabetes mellitus

ID	条目	数目	P
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	28	6.46×10^{-16}
GO:0004672	protein kinase activity	20	1.98×10^{-15}
GO:0005524	ATP binding	48	4.23×10^{-15}
GO:0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	38	6.21×10^{-15}
GO:0008134	transcription factor binding	22	1.02×10^{-14}
GO:0042493	response to drug	23	2.71×10^{-14}
GO:0007165	signal transduction	39	4.87×10^{-14}
GO:0004674	protein serine/threonine kinase activity	23	7.09×10^{-14}
GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated	27	8.87×10^{-14}
GO:0005654	nucleoplasm	64	9.45×10^{-14}
GO:0005829	cytosol	71	3.69×10^{-13}
GO:0032869	cellular response to insulin stimulus	13	5.15×10^{-13}
GO:0006468	protein phosphorylation	25	6.25×10^{-13}
GO:0005515	protein binding	125	8.37×10^{-13}
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	11	1.19×10^{-12}
GO:0005739	mitochondrion	40	1.47×10^{-12}
GO:0032403	protein complex binding	18	5.32×10^{-12}
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	23	6.69×10^{-12}
GO:0007050	cell cycle arrest	14	3.69×10^{-11}
GO:0046777	protein autophosphorylation	15	4.46×10^{-11}

通过 TCMP 中 KEGG 数据库,对 GQT 治疗 T2DM 的核心靶标进行通路富集分析,获取 P 值排名前 20 核心靶标的通路富集信息。见表 2。结果显示,内分泌系统、循环系统、细胞生长与死亡、病毒

致癌、癌症途径、乙型肝炎、非酒精性脂肪肝、神经退化性疾病、亨廷顿症、帕金森氏症、FoxO 信号通路、脂肪细胞因子信号通路、甲状腺激素信号通路、趋化因子信号通路、催产素信号通路、雌激素信号通路、

表 2 GQT 治疗 T2DM 关键靶标所参与的通路信息
Table 2 Pathway information on core targets of Gegen Qinlian Tang in treating type 2 diabetes mellitus

编号	条目	数目	P
#	endocrine system	63	1.05×10^{-23}
#	endocrine and metabolic diseases	33	2.65×10^{-17}
hsa04919	thyroid hormone signaling pathway	23	1.97×10^{-15}
hsa04932	non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	25	4.83×10^{-15}
hsa04920	adipocytokine signaling pathway	18	1.34×10^{-14}
#	cell growth and death	33	4.33×10^{-14}
#	neurodegenerative diseases	35	4.69×10^{-14}
hsa05200	pathways in cancer	34	6.64×10^{-14}
hsa04921	oxytocin signaling pathway	24	1.51×10^{-13}
hsa05161	hepatitis B	23	2.00×10^{-13}
#	circulatory system	30	2.17×10^{-13}
hsa05016	huntington's disease	25	4.65×10^{-13}
#	signal transduction	75	1.15×10^{-12}
hsa05012	parkinson's disease	22	1.15×10^{-12}
hsa04068	FoxO signaling pathway	21	2.32×10^{-12}
hsa05203	viral carcinogenesis	25	7.00×10^{-12}
hsa04062	chemokine signaling pathway	24	7.20×10^{-12}
hsa04915	estrogen signaling pathway	18	9.76×10^{-12}
hsa05215	prostate cancer	17	1.40×10^{-11}
hsa04910	insulin signaling pathway	20	6.14×10^{-11}

注:#表示对应条目的编号。

胰岛素信号通路等多条途径相关。

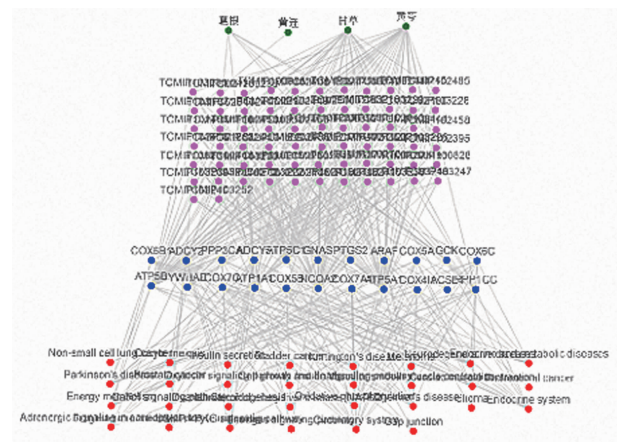
T2DM 是一种表现为胰岛素水平相对不足的代谢障碍性疾病,临床上 T2DM 常见慢性并发症以大血管并发症和微血管并发症为主,包括了心血管疾病、下肢动脉病变、糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变及周围神经病变等^[49-51]。临床研究表明,非酒精性脂肪肝与 T2DM 密切相关,两者均存在胰岛素抵抗的病理现象,非酒精性脂肪肝可能是 T2DM 发展中独立风险之一^[52]。此外,国内一项流行病学调查显示,T2DM 的发病机制也与乙型肝炎相关,其可能原因是乙肝病毒导致的肝功能损伤使肝脏糖代谢异常^[53]。在信号通路研究方面,FoxO 信号通路、脂肪细胞因子信号通路、甲状腺激素信号通路、雌激素信号通路及胰岛素信号通路都与 T2DM 的发病及病理变化息息相关。研究表明 FoxO 信号通路具有调节肝糖异生和脂肪代谢等生物学作用,FoxO1 蛋白通过负调节作用抑制胰岛素敏感相关基因的表达,从而降低机体胰岛素的敏感性^[54];此外,FoxO1 的表

达量升高可能是胰岛 β 细胞损伤的机制之一,FoxO1 通过 Mst1 因子及内质网应激反应对胰岛 β 细胞的凋亡进行调控^[55-56]。脂肪细胞分泌的细胞因子,在脂肪的代谢及维系机体能量平衡中具有重要调节作用,并且与多种代谢紊乱性疾病发生发展密切相关。研究指出,肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 与胰岛素抵抗呈显著相关的关系^[57];机体瘦素水平的下降可引起胰岛素抵抗的发生^[58];脂联素具有抗胰岛素抵抗的作用,通过调节 AMPK 信号通路,提高机体对胰岛素的敏感性^[59]。甲状腺激素水平的变化与 T2DM 的发生密切相关,一方面甲状腺激素通过促进葡萄糖转运体 2 的表达诱导肝脏糖异生,另一方面调节糖原分解基因的表达,促进糖原的分解^[60]。性激素的变化亦对 T2DM 的发病起重要作用,研究发现,雌二醇对胰岛细胞具有保护作用,胰岛细胞中雌激素受体激活后,能有效抑制细胞内酯积累,减轻其对胰岛 β 细胞的损伤^[61-62]。胰岛素信号转导的异常是 T2DM 发生发展的关键因素,其中 PI3K/PKB 通路及 MAPK 通路是胰岛素信号转导的主要通路,发挥着调节血糖平衡和细胞能量代谢的作用^[44,63]。

2.4 “中药-成分-靶标-通路”网络分析 TCMIP 将 GQT 治疗 T2DM 的复杂作用机制以多维网络的形式,从中药、活性成分、核心靶点及效应通路 4 个层次展现。网络分析发现 GQT 治疗具有多靶点、多途径的特点;方剂中 68 个活性成分主要通过蛋白激酶 C- δ 、葡萄糖激酶、细胞色素 C 氧化酶亚基、ATP 合成酶 F1 亚基、受体活性修饰蛋白、胰岛素样生长因子 1 受体、胰岛素受体、脯氨酸等靶标发挥作用;进一步富集分析表明,GQT 具有维持 T2DM 能量代谢平衡、改善胰岛细胞凋亡情况、降低并发症的发生及调控相关信号转导等功能,其主要通过内分泌系统,循环系统,细胞生长与死亡,FoxO 信号通路、脂肪细胞因子信号通路、甲状腺激素信号通路、雌激素信号通路、胰岛素信号通路等多条效应通路发挥药效作用。见图 2。

3 讨论

T2DM 是以代谢紊乱和慢性并发症为临床表现的内分泌疾病,其发生与遗传、生活习惯、生物化学、体态和环境等多种因素相关;T2DM 的发病机制主要涉及胰岛 β 细胞功能紊乱、胰岛素抵抗、炎症反应和氧化应激反应。本研究通过 TCMIP V1.0 版本筛选出 GQT 治疗 T2DM 核心靶点,并对靶点进行 GO 基因功能分析和 KEGG 通路富集,结合网络药理学



绿色代表中药,紫色代表成分,蓝色代表核心靶标,红色代表通路

图 2 GQT 中药-核心成分-关键靶标-效应通路多维网络

Fig. 2 "Chinese Herbal Medicine-Core component-Core Target-effective Pathway" Multidimensional Network of Gegen Qinliantang

技术分析 GQT 治疗 T2DM 的分子效应机制。研究发现 GQT 中 68 种成分具有治疗 T2DM 的潜在活性(如葛根素、黄芩苷、小檗碱和阿魏酸等),其可能作用于蛋白激酶 C- δ 、葡萄糖激酶,细胞色素 C 氧化酶亚基,ATP 合成酶 F1 亚基,受体活性修饰蛋白,胰岛素样生长因子 1 受体,胰岛素受体,脯氨酸等靶标;此外研究亦表明 GQT 可能通过调节不同途径起到治疗 T2DM 的作用,主要涉及内分泌系统,循环系统,细胞生长与死亡,癌症途径,乙型肝炎,非酒精性脂肪肝,神经退化性疾病,帕金森氏症,FoxO 信号通路,脂肪细胞因子信号通路,甲状腺激素信号通路,趋化因子信号通路,催产素信号通路,雌激素信号通路,胰岛素信号通路。

GQT 出自张仲景的《伤寒论》,具有解表清里的功效。仝小林教授依据异病同治的理念,创新性地将 GQT 应用于肥胖 T2DM 肠道湿热证的治疗当中,基础实验与临床试验皆葛根苓芍汤有效地降低血糖水平,并且具有一定的量效关系^[64-65]。近年来研究人员从炎症、氧化应激、糖脂代谢、脂肪细胞因子和胰岛素抵抗等多方面探究 GQT 治疗 T2DM 糖尿病可能的机制。王焯等^[66]在 T2DM 肥胖大鼠模型中发现,GQT 能显著降低 TNF- α , IL-6 的表达,改善 C 反应蛋白水平,提高胰岛素敏感指数,这提示 GQT 通过调控低度炎症反应细胞因子的表达发挥降血糖作用。李津等^[67]从氧化应激方面揭示 GQT 调节糖脂代谢的作用,在 GQT 中、高剂量组,大鼠体内 SOD 活性升高而 MDA 含量降低,空腹血糖及甘油三酯等指标得到良好的改善。T2DM 的病理变化常常伴随脂类代谢的紊乱,赵瑛等^[68]发现 GQT 能有效降

低 T2DM 甘油三酯、游离脂肪酸、低密度脂蛋白胆固醇的含量以及大鼠腹腔内脂肪与体质量的比值,提高高密度脂蛋白胆固醇和总胆固醇含量,从而改善 T2DM 大鼠脂类代谢紊乱。此外,GQT 通过调节胰岛素抵抗 HepG2 细胞色氨酸、泛氨酸以及腺嘌呤的量提高糖代谢的作用^[69]。脂肪细胞因子脂联素在 T2DM 发生发展中起关键作用,具有调节糖脂代谢;在动物实验中,GQT 能促进脂联素 mRNA 的表达,提高脂联素蛋白水平,从而降低空腹血糖^[70]。胰岛素抵抗则是 T2DM 的重要发病机制,研究表明胰岛素抵抗与机体炎症、脂类代谢紊乱及胰岛 β 细胞功能损伤等密切相关,改善胰岛素抵抗是治疗 T2DM 的关键^[71]。罗新新等^[72]在体内和体外实验中均发现,GQT 可激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ),上调脂联素和葡萄糖转运蛋白 4 的表达,从而增强机体葡萄糖摄取能力和脂肪细胞胰岛素敏感性,改善 T2DM 的胰岛素抵抗。

GQT 各成分协同配伍,作用于不同靶标和通路,从多方面发挥其治疗 T2DM 的药理作用。基于本研究网络预测分析的结果,结合文献数据挖掘,推测 GQT 可能从以下几方面发挥治疗 T2DM 的作用。①参与 NF- κ B, PI3K/Akt, MAPK, FoxO 等炎症信号通路,调节 TNF- α , IL-6 等炎症因子,改善胰岛素抵抗效应。②通过提高抗氧化能力,降低机体活性氧化物的积累,改善线粒体功能障碍,从而维持机体能量代谢平衡。③参与甲状腺激素,趋化因子, GCK, 脂肪细胞因子等通路的调控,从而调节糖脂代谢。④通过基因调控、抗炎抗氧化等生物学途径抑制胰岛 β 细胞功能损伤,维持胰岛素信号转导的正常。⑤参与循环系统、癌症途径、神经退行性疾病、乙型肝炎和非酒精性脂肪肝等,改善 T2DM 慢性并发症及降低相关危险因素。

本研究基于整合药理学预测出 GQT 治疗 T2DM 的潜在效应机制,为该经典名方进一步的实验研究和临床应用提供思路和参考,并且为中药方剂效应机制的研究提供一种新的研究方法。然而整合药理学的研究方法是以数据研究为基础,尚存在一定的局限性;数据的全面与否、成分筛选标准和靶标预测方法等都会对研究结果的准确性产生影响。此外,应用中药方剂治疗疾病,讲究辨证施治及方药“君臣佐使”的配伍规律,本研究尚未对 T2DM “证”做进一步探究,且未考虑药物组成剂量以及药物混合煎煮过程中化学成分的改变,因此整合

药理学预测分析的结果仍需通过进一步实验验证。

[参考文献]

[1] Ogurtsova K, Da R F J, HUANG Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 128:40-50.

[2] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. *JAMA*, 2013, 310(9):948-959.

[3] American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(Suppl 1):S11-S24.

[4] ZHANG L, WANG X, GU X J, et al. Integrated therapy of traditional Chinese and Western medicine for BPH with diabetes mellitus: clinical observation of 52 cases [J]. *Natl J Androl*, 2011, 17(6):568-570.

[5] ZHANG X P, ZHOU X Z, HUANG H K, et al. Topic model for Chinese medicine diagnosis and prescription regularities analysis: case on diabetes [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(4):307-313.

[6] Seto S W, YANG G Y, Kiat H, et al. Diabetes mellitus, cognitive impairment, and traditional Chinese medicine [J]. *Int J Endocrinol*, 2015, doi:10.1155/2015/810439.

[7] Chamberlain J J, Herman W H, Leal S, et al. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes: synopsis of the 2017 American diabetes association standards of medical care in diabetes [J]. *Ann Intern Med*, 2017, 166(8):572-578.

[8] 赵林华, 连凤梅, 姬航宇, 等. 仝小林教授运用不同剂量葛根芩连汤治疗2型糖尿病验案 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4):249-251.

[9] PAN J H. New paradigm for drug discovery based on network pharmacology [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2009, 28(10):721-726.

[10] 许海玉, 杨洪军. 整合药理学: 中药现代研究新模式 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(3):357-362.

[11] 马艳, 张迎春, 陶野, 等. 基于整合药理学策略的元胡止痛方研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(6):1048-1054.

[12] YIN Q, WANG P, ZHANG A, et al. Ultra-performance LC-ESI/quadrupole-TOF MS for rapid analysis of chemical constituents of Shaoyao-Gancao decoction [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(7):1238-1246.

[13] 许海玉, 刘振明, 付岩, 等. 中药整合药理学计算平台的开发与应用 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42

(18):3633-3638.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

[15] Wishart D S, Knox C, GUO A C, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue):D901-D906.

[16] ZHU F, SHI Z, QIN C, et al. Therapeutic target database update 2012: a resource for facilitating target-oriented drug discovery [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(Database issue):D1128-D1136.

[17] Hamosh A, Scott A F, Amberger J, et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(1):514-517.

[18] Wixon J, Kell D. The Kyoto encyclopedia of genes and genomes-KEGG [J]. *Yeast*, 2000, 17(1):48-55.

[19] CHEN J Y, Mamidipalli S, HUAN T. HAPPI: an online database of comprehensive human annotated and predicted protein interactions [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(S1):S16.

[20] Brown K R, Jurisica I. Online predicted human interaction database [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9):2076-2082.

[21] Keshava Prasad T S, Goel R, Kandasamy K, et al. Human protein reference database-2009 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue):D767-D772.

[22] Ceol A, Aryamontri A C, Licata L, et al. MINT, the molecular interaction database: 2009 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 40(Database issue):D572.

[23] Lehne B, Schlitt T. Protein-protein interaction databases: keeping up with growing interactomes [J]. *Hum Genomics*, 2009, 3(3):291-297.

[24] D'Eustachio P. Reactome knowledgebase of human biological pathways and processes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1):D619-D622.

[25] Aranda B, Achuthan P, Alamfaruque Y, et al. The IntAct molecular interaction database in 2010 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(Database issue):D841-D846.

[26] Beuming T, Skrabanek L, Niv M Y, et al. PDZBase: a protein-protein interaction database for PDZ-domains [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(6):827-828.

[27] Jr D G, Sherman B T, Hosack D A, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. [J]. *Genome Biol*, 2002, 4(5):P3.

[28] 王兰, 蓝璟, 龚频, 等. 葛根异黄酮降血糖活性及作

- 用机制的研究[J]. 食品科技, 2017, 42(3): 223-226.
- [29] 韩会民, 王树国. 葛根素治疗非胰岛素依赖型糖尿病患者胰岛素抵抗的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(2):117-119.
- [30] 刘娅群. 黄芩苷对2型糖尿病糖脂代谢的影响及机制研究[D]. 南京:东南大学, 2017.
- [31] 周吉银. 小檗碱降糖调脂作用与PPARs/P-TEFb信号转导通路的关系[D]. 重庆:第三军医大学, 2008.
- [32] 应懿. 黄连生物碱的提取及其对实验性糖尿病周围神经病变和糖尿病肌病的保护作用及机制研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2007.
- [33] 任妍林, 王定坤, 董慧, 等. 小檗碱治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3):438-442.
- [34] Kim E K, Kwon K B, HAN M J, et al. Coptidis rhizoma extract protects against cytokine-induced death of pancreatic beta-cells through suppression of NF-kappaB activation[J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(2): 149-59.
- [35] SEN S, ROY M, Chakraborti A S. Ameliorative effects of glycyrrhizin on streptozotocin-induced diabetes in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(2):287-296.
- [36] 赵海燕, 王勇, 马永平, 等. 甘草黄酮对2型糖尿病大鼠高血糖、高血脂的抑制作用[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(17):2573-2578.
- [37] Subudhi A K, Boopathi P A, Pandey I, et al. Disease specific modules and hub genes for intervention strategies: a co-expression network based approach for *Plasmodium falciparum*, clinical isolates [J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 35:96-108.
- [38] Greene M W, Morrice N, Garofalo R S, et al. Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase Cdelta[J]. *Biochem J*, 2004, 378(1):105-116.
- [39] Zelent D, Najafi H, Odili S, et al. Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas [J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(P1):306-310.
- [40] 赵瑛, 李文亭. 葛根芩连汤与其有效部位群对实验性代谢综合征大鼠胰岛素受体的影响[C]//首届国际中西医结合内分泌代谢病学术大会暨糖尿病论坛. 北京, 2008:77-78.
- [41] Federici M, Hribal M, Perego L, et al. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program[J]. *Diabetes*, 2001, 50(6):1290-1301.
- [42] 吴绮楠. Par-4在2型糖尿病胰岛β细胞凋亡中的机制研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2016.
- [43] Hirosumi J, Tuneman G, CHANG L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance [J]. *Nature*, 2002, 420(6913):333-336.
- [44] Fujishiro M, Gotoh Y, Katagiri H, et al. Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(3):487-497.
- [45] Biddinger S B, Kahn C R. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68(68):123-158.
- [46] Warren B E, LOU P H, Lucchinetti E, et al. Early mitochondrial dysfunction in glycolytic muscle, but not oxidative muscle, of the fructose-fed insulin-resistant rat [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(6): E658-E667.
- [47] Robertson R P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(41): 42351-42354.
- [48] GAO D, NONG S, HUANG X, et al. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(39):29965-29973.
- [49] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(10):447-498.
- [50] Yamagishi S. Cardiovascular disease in recent onset diabetes mellitus [J]. *J Cardiol*, 2011, 57(3): 257-262.
- [51] Charles M, Ejksjaer N, Witte D R, et al. Prevalence of neuropathy and peripheral arterial disease and the impact of treatment in people with screen-detected type 2 diabetes: the ADDITION-denmark study[J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(10):2244-2249.
- [52] Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(4):634-642.
- [53] 张蕙彦. 慢性乙型肝炎病人2型糖尿病流行情况调查与相关因素分析[J]. 中国卫生产业, 2014, 11(33):56-57.
- [54] ZHANG X Q, XU C F, YU C H, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 30(7):1768-1776.
- [55] Ardestani A, Paroni F, Azizi Z, et al. MST1 is a novel regulator of apoptosis in pancreatic beta-cells [J]. *Nat*

- Med, 2014, 20(4):385-397.
- [56] Eizirik D L, Miani M, Cardozo A K. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation [J]. Diabetologia, 2013, 56(2):234-241.
- [57] Hivert M F, Sullivan L M, Fox C S, et al. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor- α with insulin resistance [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(8):3165-3172.
- [58] Benomar Y, Naour N, Aubourg A, et al. Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism[J]. Endocrinology, 2006, 147(5):2550-2556.
- [59] Sell H, Dietze-Schroeder D, Eckardt K, et al. Cytokine secretion by human adipocytes is differentially regulated by adiponectin, AICAR, and troglitazone[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(3):700-706.
- [60] Rezzonico J, Niepomniszcze H, Rezzonico M, et al. The association of insulin resistance with subclinical thyrotoxicosis[J]. Thyroid, 2011, 12(5):264.
- [61] May C L, CHU K, MIN H, et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(24):9232-9237.
- [62] Tiano J P, Delghingarouaugusto V, May C L, et al. Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents β cell failure in rodent models of type 2 diabetes [J]. J Clin Invest, 2011, 121(8):3331-3342.
- [63] Nolte L A, HAN D H, HANSEN P A, et al. A peroxovanadium compound stimulates muscle glucose transport as powerfully as insulin and contractions combined [J]. Diabetes, 2003, 52(8):1918-1925.
- [64] TONG X L, ZHAO L H, LIAN F M, et al. Clinical observations on the dose-effect relationship of gegen qin lian decoction on 54 out-patients with type 2 diabetes [J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(1):56-59.
- [65] 刘玉晖,王跃生,王颖怡,等. 葛根芩连汤整方剂量变化治疗糖尿病大鼠的量效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12):258-261.
- [66] 王焯,朱向东. 葛根芩连汤对2型糖尿病ZDF大鼠CRP, TNF- α , IL-6的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21):130-134.
- [67] 李津,高铁祥,宋强,等. 葛根芩连汤对2型糖尿病大鼠降糖降脂作用机理初探[J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(3):7-9.
- [68] 赵瑛,李文亭,孟晓红,等. 葛根芩连汤与其有效部位群对代谢综合征大鼠作用的比较[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(4):7-10.
- [69] 陈瑶,徐国良,李冰涛,等. 葛根芩连汤含药血清对IR-HepG2细胞糖代谢调控关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10):156-160.
- [70] ZHANG C H, XU G L, LIU Y H, et al. Anti-diabetic activities of Gegen Qinliantang in high-fat diet combined with streptozotocin-induced diabetic rats and in 3T3-L1 adipocytes [J]. Phytomedicine, 2013, 20(3/4):221-229.
- [71] Kahn S E, Hull R L, Utzschneider K M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. Nature, 2006, 444(7121):840-846.
- [72] 罗新新,朱水兰,李冰涛,等. 葛根芩连汤激活PPAR γ 上调脂联素和GLUT4表达改善脂肪胰岛抵抗[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23):4641-4648.

[责任编辑 周冰冰]