

· 数据挖掘 ·

## 七味白术散对糖尿病小鼠肝脏组织PI3K/Akt信号通路的调节作用

刘仕琦<sup>1</sup>, 李冀<sup>1\*</sup>, 王艳<sup>2</sup>

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

**[摘要]** 目的:研究七味白术散对高脂饮食与链脲佐菌素(STZ)导致的糖尿病小鼠肝脏组织中磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路的影响。方法:采用网络药理学与实验药理学的方法研究七味白术散的降糖作用。通过公共数据库筛选活性成分和疾病靶点,构建成分-靶点和疾病-靶点的PPI网络,进行基因本体(GO),京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析信号通路。以高糖高脂饲料联合腹腔注射80 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>STZ建立糖尿病小鼠模型,分为正常组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、七味白术散组(七味白术散煎剂18.7 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),灌胃28 d后分析其降糖作用及对血清总胆固醇(T-CHO),空腹胰岛素(FINS)含量和血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的影响,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏组织的胰岛素受体(IR),胰岛素受体底物-1(IRS-1),PI3K和Akt蛋白和mRNA的表达。结果:网络药理学研究共筛选到36种活性成分,KEGG分析推测七味白术散可能是通过调节PI3K/Akt信号通路发挥降糖作用的。实验药理学实验表明,七味白术散组与模型小鼠相比,血糖含量、血清TNF- $\alpha$ 和T-CHO显著降低( $P<0.01$ ),FINS显著升高( $P<0.01$ )。肝脏组织的IR,IRS-1,PI3K和Akt蛋白和mRNA的表达明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论:七味白术散可下调高脂饮食和STZ导致FINS升高,其调节作用与PI3K/Akt信号通路与胰岛素的代谢效应有关。

**[关键词]**七味白术散;总胆固醇(T-CHO);空腹胰岛素(FINS);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ );磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0153-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201903

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200720.0903.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-20 11:55

## Regulatory Effect of Qiwei Baizhusan on Liver Tissue Insulin PI3K/Akt Signal Pathway in Diabetic Mice

LIU Shi-qi<sup>1</sup>, LI Ji<sup>1\*</sup>, WANG Yan<sup>2</sup>

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

2. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Qiwei Baizhusan (QWBZS) on liver insulin phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/protein kinase B(Akt) signal pathway of diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin (STZ). **Method:** The methods of network pharmacology and animal experiments were used to study the hypoglycemic effect of QWBZS. Active chemical components of the drug and disease targets selected through public databases were used to construct the protein-protein interaction network (PPIN), and gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) enrichment analysis was performed to identify relevant signal pathways *in vivo*. In the pharmacological experiment, the diabetic mice model was established through intraperitoneal injection with 80 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> STZ high-glucose, high-fat diet. The

**[收稿日期]** 20200131(006)

**[基金项目]** 2014全国名老中医药专家传承工作室建设项目(2014)

**[第一作者]** 刘仕琦,在读硕士,从事中医临床方药学研究,E-mail:liushiqitcm@163.com

**[通信作者]** \*李冀,博士,教授,博士生导师,从事方剂配伍规律及药效物质基础研究,Tel:0451-82193640,E-mail:lijihj@126.com

mice were divided into normal group (normal saline), model group (normal saline) and QWBZS group ( $18.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). After 28 days, the hypoglycemic effect of the drug and its effect on serum total cholesterol (T-CHO), fasting insulin (FINS) and serum tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were determined. Western blot and Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) were used to detect protein and mRNA expressions of insulin receptor (IR), insulin receptor substrate-1 (IRS-1), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt) in liver tissues. **Result:** A total of 36 active components in this drug were identified by network pharmacology. KEGG analysis suggested that QWBZS might play a role in reducing blood glucose by regulating PI3K Akt signal pathway. Compared with the model group, the levels of blood glucose, serum T-Cho and TNF- $\alpha$  of the intervention group were significantly lower ( $P < 0.01$ ), while the FINS of the intervention group was significantly higher ( $P < 0.01$ ). Protein and mRNA expressions of IR, IRS-1, PI3K and Akt in liver tissues of mice in QWBZS treatment group increased markedly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** QWBZS could regulate the levels of blood glucose, TNF- $\alpha$ , T-CHO, and FINS in the serum of diabetic mice induced by high-fat diet and STZ. It can improve PI3K/Akt signal pathway of diabetic mice by regulating protein and mRNA expressions of IR, IRS-1, PI3K and Akt/PKB.

[Key words] Qiwei Baizhusan (QWBZS); total cholesterol (T-CHO); fasting insulin (FINS); tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/protein kinase B(Akt) signal pathway

糖尿病属于中医消渴病范畴。中医认为消渴病的发生是多个脏腑功能失调所致。其中,脾气虚弱,运化失司是糖尿病发生的内在病理基础,脾虚是糖尿病发病之本。近代医家张锡纯言:“消渴一证,古有上、中、下之分,谓其证,皆起于中焦而极于上下”。糖尿病患者素体脾虚,气血日渐不足,病后代谢异常,脾气益虚的矛盾更加凸显,导致以脾虚为中心而出现脏腑功能失调,发生糖尿病胃肠病变。七味白术散原方载于宋代钱乙《小儿药证直诀·下卷》:“人参二钱五分,白茯苓五钱,白术(炒)五钱,藿香叶五钱,木香二钱,甘草一钱,葛根五钱(渴者加至一两)……”《医宗金鉴》将本方列为治疗消渴病的常用方剂之一。金元名医张洁古曾提出消渴病不能食而渴者,或变生中满者,七味白术散主之。“能食而渴者,白虎加人参汤。不能食而渴者,钱氏白术散倍加干葛治之,上中既平,不复传下消矣。”

七味白术散由人参片、茯苓、白术、甘草、木香、藿香、葛根7味药组成,即四君子汤加木香、藿香、甘草。功用为益气健脾、醒脾行气、振奋胃气,从根本上切中糖尿病胃肠病变“脾气虚弱”的基本病机。临床试验证实,七味白术散可有效控制脾虚型妊娠期糖尿病餐后2h血糖水平,血红蛋白及血脂水平,降低不良反应的发生,并对改善胃肠运动有明显的作<sup>[1-5]</sup>。七味白术散对糖尿病的作用机制有待进一步阐明。本研究以党参取代人参,采用网络药理学分析七味白术散对糖尿病的作用通路<sup>[6]</sup>。采用实验

药理学方法,研究七味白术散对糖尿病小鼠肝脏组织的形态学改变,对磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路的调节作用,以探讨七味白术散的降糖作用机制。

## 1 网络药理学

**1.1 活性成分筛选与靶点获取** 由TCMSP数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmspsearch.php>)筛选活性成分构建药效物质基础。通过CAS号网站(<https://www.chemsrc.com/>)查询活性成分CAS号后,导入PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取成分的SMILES结构式,输入SWISS数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中,以结构相似性阈值为定值进行筛选,获得药物成分靶点对应的基因(Gene Code)列<sup>[7]</sup>。

**1.2 疾病靶点的获取与网络构建** 在TTD数据库(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)中 Search drugs and targets by disease or ICD identifier 一栏和TCMSP数据库中 Disease name 输入糖尿病(Diabetes)获得疾病靶点<sup>[8]</sup>,选取2个数据库中共有的靶点。通过TTD数据库中 Target Info 或者 UniProt数据库将筛选的靶点转换成基因名<sup>[9]</sup>。将成分、疾病靶点导入String数据库,输出置信度0.900以上的交互关系,构建成分-靶点PPI网络、疾病-靶点PPI网络。物种原则为智人(Homo Sapiens)。

**1.3 生物通路分析** 用Cytoscape中TOOL项下的merge将两个PPI网络做交集得到成分靶点和疾病

靶点的交集网络,利用CytoNCA插件(2.1.6版本)对该网络中节点的拓扑参数进行评估分析,选择Degree $\geq$ 中位数的2倍靶点为核心靶点得到一个蛋白与蛋白相互作用的交集网络<sup>[10]</sup>。使用ClueGO插件(2.5.3版本)对核心靶点进行进行基因本体(GO)生物学过程基因功能分析,选择正确的功能、种属和图像展示方式,默认选择 $P < 0.05$ <sup>[11]</sup>,导入核心靶点进行分析,得到生物信号通路表进行分析讨论。

## 2 动物实验

### 2.1 材料

**2.1.1 动物及饲料** SPF级BALB/c小鼠,8周龄,雌雄各半,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006,实验动物质量合格证编号11400700316274。普通饲料,D12492高脂饲料,均由北京蕙特比科技有限公司提供。

**2.1.2 仪器** VersaMax型光吸收型酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];BX53型荧光显微成像系统(日本Olympus公司);StepOne PULS型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂);H6-1型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂);HC-2518R型高速冷冻离心机(安徽中科中佳仪器有限公司);FR980型凝胶成像系统(上海复日科技有限公司);SW-CJ-1D型洁净工作台(江苏苏洁净化设备厂);SMA4000型微量分光光度计(Merinton Instrument, Inc);实验所用血糖试纸及血糖仪(三诺生物传感股份有限公司)。

**2.1.3 试剂** 链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号WXBC2044V);二甲苯,无水乙醇,95%乙醇(天津市大茂化学试剂有限公司,批号分别为20171215,20171219,20170201);石蜡,中性树脂胶(上海华申康复器材有限公司,批号分别为20190225,20180308);苏木素(美国Thermo Shandon United公司,批号426487);伊红染液(上海世锋生物科技有限公司,批号20180120);小鼠血清总胆固醇(T-CHO),空腹胰岛素(FINS),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )试剂盒(上海创赛科技有限公司,批号AD201904);UNIQ-10柱式trizol总RNA抽提试剂盒,羊多抗胰岛素受体(INSR),兔单抗胰岛素受体底物(IRS-1),小鼠单抗PIK3CG,小鼠单抗蛋白激酶B1(Akt1)[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为B511321, D151684, D151656, D199077, D199241];小鼠单抗 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin),辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠二

抗,HRP标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为BM0627,BA1051,BA1054);琼脂糖B,4S Red Plus核酸染色剂(美国BBI公司,批号分别为A600014, A606695);GeneRuler DNA Ladder Mix, Maxima Reverse Transcriptase(美国Thermo Scientific公司,批号分别为B300721, EP0743)。

### 2.2 方法

**2.2.1 七味白术散煎剂制备** 实验所用中药购自同仁堂,经山西中医药大学裴香萍副教授鉴定均为正品。称取各药加8倍量的水,浸泡0.5 h,置大火煮沸后,小火煎20 min,8层纱布过滤,同样的方法水煎2次,滤液,浓缩至 $1.87 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,备用。

**2.2.2 动物造模与分组** 采用高脂饲料喂养28 d后,腹腔注射 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ STZ,72 h后血糖 $\geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为建模成功<sup>[12]</sup>。实验小鼠分为3组,每组6只,正常组采用普通饲料喂养,模型组、七味白术散组高糖高脂饲料喂养,七味白术散组灌胃七味白术散煎剂 $18.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于人用剂量的2倍),给药28 d。

**2.2.3 指标测定** 记录小鼠的体质量、血糖。取血,静置0.5 h, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,得血清。用ELISA试剂盒,按照试剂盒说明书提供的方法测定小鼠血清T-CHO, FINS和TNF- $\alpha$ 含量。

**2.2.4 苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织病理学变化** 采集小鼠肝脏组织,剔除多余脂肪组织,浸入10%中性甲醛溶液中,固定至少48 h。脱水,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察。

**2.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏组织IR,IRS-1,PI3K和Akt蛋白表达** 小鼠肝脏组织提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。各样品总蛋白量为 $40 \mu\text{g}$ 。用含5%脱脂奶粉的TBST(封闭液)浸泡PVDF膜,室温摇床封闭2 h。用封闭液稀释相应的一抗( $\beta$ -actin 1:500, Akt1 1:1 000, IRS1 1:500, PIK3CG 1:500, IR 1:1 000),PVDF膜浸泡于一抗孵育液中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。用TBST稀释相应HRP标记二抗(1:5万),PVDF膜浸泡于二抗孵育液中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床孵育2 h。将ECL试剂增强液与稳定的过氧化物酶溶液按1:1混匀,滴加至PVDF膜上,反应待荧光带明显后,吸去多余的底物液,覆上保鲜膜。X光胶片压片后依次放入显影液、定影液,冲洗晾干胶片,扫描胶片,用IPP分析胶片灰度值。

**2.2.6 Real-time PCR检测肝脏组织IR,IRS-1,PI3K和Akt mRNA表达** 使用UNIQ-10柱式trizol

总 RNA 抽提试剂盒, RNA 按照 800 ng 反转 cDNA, 将 cDNA 样品稀释 10 倍作为模板上机检测。配制反应混合液, 扩增条件为 95 °C 3 min, 95 °C 3 s, 60 °C 30 s 循环。把加好样品的 96 孔板放在 ABI Stepone plus 型 Real-time PCR 仪中进行反应。使用 StepOne Software V2.3 软件分析 PCR 过程各检测样本的  $C_t$  值, 相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行计算。引物序列见表 1, 由生工生物工程(上海)股份有限公司设计。

**2.2.7 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件包进行统计分析, 本实验中的指标用  $\bar{x} \pm s$  表示, 并用单因素方差检验分析处理组间差异, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学研究结果

##### 3.1.1 有效成分筛选 以 $OB\% \geq 30\%$ (甘草为 $OB\%$

表 1 PCR 引物序列及产物大小

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IR	上游 GTGGAACGGTGCTGGACA	213
	下游 CTGGAAGTGATAGTAGGGTGGC	
IRS-1	上游 CTCTACACCCGAGACGAACAC	228
	下游 AACCTGCCAGACCTCCTTG	
PI3K	上游 TCTACCCAGTGTCCAAATACCA	188
	下游 AAATGCTTCGATAGCCGTTCT	
Akt	上游 CGACCGCCTCTGCTTTGT	219
	下游 AAGTCCGTTATCTTGATGTGCC	
$\beta$ -actin	上游 GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG	174
	下游 ATGCCACAGGATTCCATACC	

$\geq 60\%$ ),  $BBB \geq 0.3$ ,  $DL \geq 0.18$  为筛选条件, 所得 36 个活性成分见表 2, 其中党参的成分有 14 个。

表 2 七味白术散 36 个活性成分

Table 2 Active components of Qiwei Baizhusan(QWBZS) powder

来源	化合物名称	来源	化合物名称
党参	$\alpha$ -spinasterol	党参	frutinone A
党参	perlolyrine	党参	taraxerol
党参	diop	党参	stigmast-7-enol
党参	ZINC03978781	党参	methyl icoso-11,14-dienoate
党参	stigmasterol	党参	glycitein
党参	7-methoxy-2-methyl isoflavone	党参	stigmast-7-enol
党参	spinasterol	党参	11-hydroxyrankinidine
茯苓	trametenolic acid	茯苓	ergosterol peroxide
茯苓	stellasterol	茯苓	eburicoic acid
白术	$\alpha$ -amyrin	白术	8 $\beta$ -ethoxyatractylenolide III
白术	24-propylcholesterol	甘草	licopyranocoumarin
甘草	glycyrol	甘草	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin
甘草	licochalcone B	甘草	shinpterocarpin
葛根	formononetin	葛根	beta-sitosterol
藜香	diop	藜香	genkwanin
藜香	5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanon	藜香	irisolidone
木香	mairin	木香	stigmasterol
木香	sitosterol	木香	benzocarbazole

**3.1.2 PPI 网络与交集网络** 以置信度为 0.7, 构建的七味白术散成分-靶点 PPI 网络见图 1。图中的节点代表靶点蛋白, 节点之间的连线表示蛋白之间的相互作用关系, 线越粗相互作用关系越强。图中每个节点内部具有不同的图案, 表示每个节点的结构不同。有的节点内部没有图案, 说明该靶点蛋白的结构还未被发现。在 STRING 数据库中输入单个基

因时, 节点的颜色为红色, 与输入的蛋白具有相互作用关系的其他蛋白根据相互作用关系的强弱显示不同的颜色。本研究中输入的是多个靶点基因, 数据库根据这些基因之间相互作用关系的强弱映射出不同的颜色。如图所示, 表皮生长因子受体(EGFR), 过氧化物合酶 2(PTGS2), 蛋白酪氨酸磷酸酶 11(PTPN11) 等节点与多个节点具有相互作用

关系,这些靶点可能是七味白术散发挥作用的关键靶点。

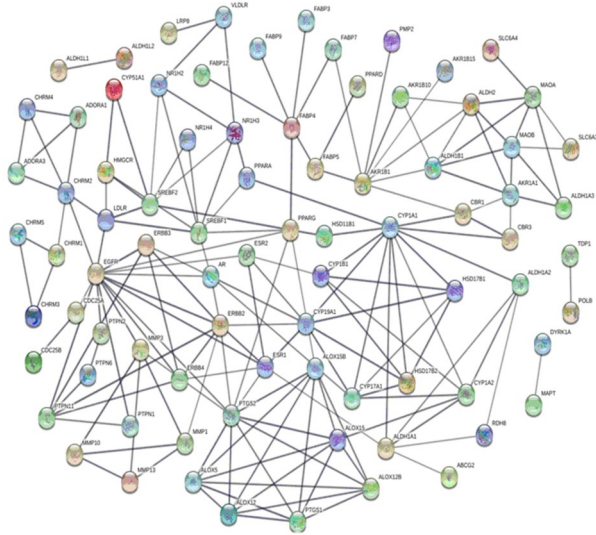


图1 七味白术散成分-靶点PPI网络  
Fig.1 Component -target PPI network of QWBZS

图2网络表示与糖尿病有关的靶点蛋白之间的相互作用关系,节点之间不同颜色的连线表示相互作用类型,节点之间的连线为粉色和青色代表蛋白之间已知的相互作用关系,红色、绿色和蓝色的连线代表数据预测的相互作用关系,其他颜色代表其他的相互作用类型。图中糖原磷酸化酶(PYGM)和麦芽糖化酶(MGAM)之间的连线较多,说明这两种酶为糖尿病比较重要的靶点。甘油三酯酰基转移酶1(DGAT1)节点与较多靶点蛋白具有相互作用,可能在糖尿病的发病及治疗中起着重要的作用。

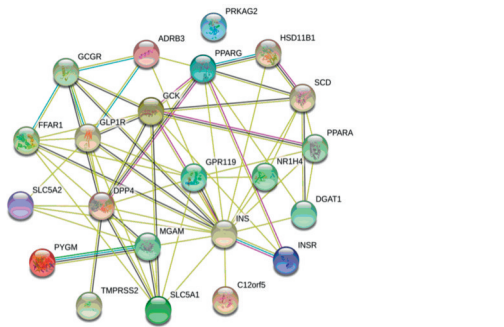


图2 糖尿病-靶点PPI网络  
Fig.2 Diabetes-target PPI network

设定筛选范围为 degree≥28,获得129个核心靶点的PPI网络,见图3。其中黄色节点表示输入的七味白术散靶点蛋白与糖尿病靶点蛋白的交集,蓝色节点表示七味白术散作用于治疗糖尿病的潜在靶点蛋白。该网络中的靶点蛋白很有可能是七味白

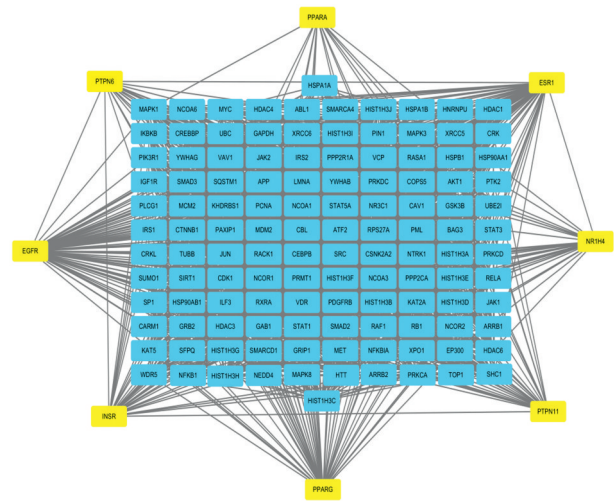


图3 核心靶点PPI网络  
Fig.3 Core target PPI network

术散发挥降糖作用的关键靶点,也可能是与糖尿病的发病和治疗有关的靶点蛋白。

3.1.3 GO分析和KEGG分析 将以 degree≥28 为标准筛选得到的核心靶点的基因输入 DAVID 数据库中进行 GO 分析和 KEGG 分析,GO 富集分析得到 525 条生物过程,KEGG 分析得到相关的 110 条信号通路,论文展示 Count≥20 的分析结果,见表 3,4。

GO 功能富集主要集中在与 RNA 聚合酶 II 启动子的转录正调节、负调节;凋亡过程的负调节;细胞增殖和凋亡、信号转导以及蛋白质的磷酸化等生物过程。这些基本生物学过程和功能体现了七味白术散活性成分调节对应靶基因和具体通路的生物学过程。

KEGG 分析得出七味白术散可能是通过调节 PI3K/Akt, MAPK, 甲状腺激素,神经营养因子等信号通路发挥降糖作用的。

### 3.2 七味白术散对糖尿病小鼠的作用

3.2.1 对糖尿病小鼠血糖相关指标的影响 与正常组比较,在给药前模型组与七味白术散组血糖明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),说明模型组与七味白术散组实验动物造模成功;与模型组比较,给药后七味白术散组血糖含量显著降低( $P<0.01$ ),表明七味白术散煎剂具有降低血糖作用,见表 5。与正常组比较,模型组 TNF- $\alpha$ , T-CHO 显著升高( $P<0.01$ ),FINS 显著降低( $P<0.01$ )。在给药 28 d 后;与模型组比较,七味白术散可显著降低 TNF- $\alpha$ , T-CHO( $P<0.01$ ),显著升高 FINS( $P<0.01$ ),见表 6。

3.2.2 对糖尿病小鼠肝脏组织形态的影响 小鼠肝脏组织切片于光学显微镜下观察,比较不同组别的肝脏组织形态的情况,正常组未见异常,为丰富的紫红色糖原颗粒。模型组胞质量少量紫红色糖

表 3 GO 分析结果

Table 3 Analysis results of GO

Term	Count	C/%
Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	50	38.8
transcription, DNA-templated	36	27.9
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	34	26.4
negative regulation of apoptotic process	30	23.3
positive regulation of transcription, DNA-templated	29	22.5
signal transduction	28	21.7
regulation of transcription, DNA-templated	28	21.7
negative regulation of transcription, DNA-templated	26	20.2
viral process	24	18.6
apoptotic process	22	17.1

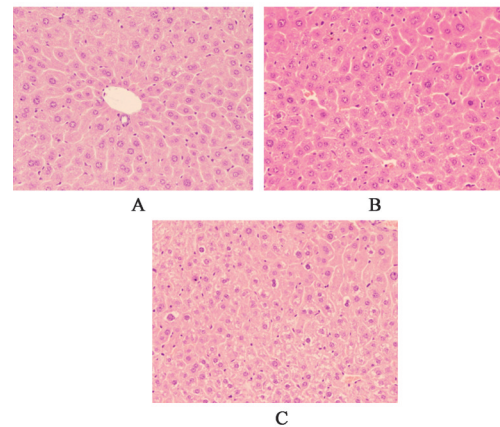
注: C 表示 Count/核心靶点×100%(表 4 同)。

表 4 KEGG 通路分析结果

Table 4 Analysis results of KEGG pathway

Term	Count	C/%
PI3K/Akt signaling pathway	30	23.3
MAPK signaling pathway	24	18.6
thyroid hormone signaling pathway	23	17.8
neurotrophin signaling pathway	23	17.8
chemokine signaling pathway	23	17.8
ErbB signaling pathway	22	17.1
Ras signaling pathway	22	17.1
FoxO signaling pathway	21	16.3

原颗粒, 中度肝细胞糖原沉积。七味白术散组与模型组比较, 紫红色糖原颗粒丰富, 中度肝细胞核周围浆淡染, 细胞脂肪样变较轻。见图 4。



A. 正常组; B. 模型组; C. 七味白术散组

图 4 七味白术散对糖尿病小鼠肝脏组织形态病理改变的影响 (HE, ×200)

Fig. 4 Effect of QWBZ on histopathological changes on the liver of diabetes mice (HE, ×200)

表 5 七味白术散对糖尿病小鼠体质量、血糖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of QWBZ on weight and blood sugar in diabetes mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	血糖/mmol·L <sup>-1</sup>		体质量/g	
		给药前	给药后	给药前	给药后
正常	-	6.22±1.07	6.03±0.72	30.20±1.27	30.57±1.11
模型	-	11.50±2.97 <sup>2)</sup>	14.26±1.39 <sup>2)</sup>	27.30±3.26	26.85±2.19 <sup>2)</sup>
七味白术散	18.7	12.08±1.34 <sup>1)</sup>	7.47±2.76 <sup>4)</sup>	27.80±2.59	27.33±3.86

注: 与正常组比较 <sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01; 与模型组比较 <sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01(表 6~8 同)。

表 6 七味白术散对糖尿病小鼠血清 T-CHO, FINS, TNF-α 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 6 Effect of Qiweisan on serum T-CHO, FINS and TNF-α in diabetes mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	T-CHO/μmol·L <sup>-1</sup>	FINS/pmol·L <sup>-1</sup>	TNF-α/ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	258.78±18.80	47.94±2.07	405.93±37.74
模型	-	378.93±18.87 <sup>2)</sup>	35.90±0.87 <sup>2)</sup>	561.32±20.94 <sup>2)</sup>
七味白术散	18.7	336.66±13.69 <sup>4)</sup>	42.20±1.28 <sup>4)</sup>	506.65±16.84 <sup>4)</sup>

**3.2.3 对糖尿病小鼠 IR, IRS-1, PI3K 和 Akt 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组小鼠肝脏 IR, IRS-1, PI3K 和 Akt 蛋白表达明显降低 ( $P<0.05$ ,

$P<0.01$ );与模型组比较,七味白术散组小鼠肝脏上述蛋白表达明显升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表 7。

表 7 七味白术散对糖尿病小鼠肝脏组织 IR, IRS-1, PI3K 和 Akt 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 7 Effect of QWBZS on protein expression on liver tissue IR, IRS-1, PI3K and Akt in diabetes mice( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IR	IRS-1	PI3K	Akt
正常	-	0.62±0.18	0.53±0.17	0.51±0.08	0.75±0.12
模型	-	0.20±0.06 <sup>2)</sup>	0.16±0.07 <sup>2)</sup>	0.39±0.62 <sup>1)</sup>	0.64±0.00 <sup>2)</sup>
七味白术散	18.7	0.43±0.18 <sup>3)</sup>	0.34±0.12 <sup>4)</sup>	0.48±0.05 <sup>3)</sup>	0.60±0.00 <sup>4)</sup>

**3.2.4 对糖尿病小鼠 IR, IRS-1, PI3K 和 Akt 的 mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组小鼠肝脏 IR, IRS-1 和 PI3K mRNA 表达明显降低 ( $P<0.05$ ,

$P<0.01$ );与模型组比较,七味白术散组小鼠肝脏 IR, IRS-1, PI3K 和 Akt mRNA 表达明显升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表 8。

表 8 七味白术散对糖尿病小鼠肝脏 IR, IRS-1, PI3K 和 Akt mRNA 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 8 Effect of QWBZS on mRNA expression on liver tissue IR, IRS-1, PI3K and Akt in diabetes mice( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IR	IRS-1	PI3K	Akt
正常	-	1.03±0.03	1.18±0.19	0.10±0.05	1.08±0.09
模型	-	0.76±0.04 <sup>2)</sup>	0.79±0.06 <sup>2)</sup>	0.88±0.05 <sup>1)</sup>	1.02±0.02
七味白术散	18.7	1.41±0.07 <sup>4)</sup>	1.55±0.11 <sup>4)</sup>	0.96±0.05 <sup>1)</sup>	1.39±0.23 <sup>3)</sup>

#### 4 讨论

历代文献记载的消渴病,与西医学的糖尿病基本上是一致的。中医学认为消渴的发生与饮食有关,如《黄帝内经·素问·奇病论篇》所述:“此肥美之所发也,此人必数食甘美而多肥也,肥者令人内热,甘者令人中满,故其气上溢,转为消渴”。“消渴”之病机关键在于中焦,若脾胃失和,斡旋襄赞无能,则五脏六腑、四肢百骸失其滋养,百病丛生。故“胃强脾弱”才是“消渴”一病之肯綮<sup>[13]</sup>。故“清胃热,健脾运”才是治疗消渴之纲纪。以“七味白术散”施治可切中病机。

七味白术散以健脾为主,方中人参、茯苓、炒白术均有补中益气健脾的疗效;藿香叶、木香可正不正之气;兼行气止痛;葛根有利于生津止渴;甘草为中药配伍中的使药。诸药合用,起到健脾生津、行气和胃的功效。全方有补有运有升有降,调节中焦气机全身得养。

总胆固醇是合成胆汁酸等的重要原料,肝脏是其合成和贮存的主要器官。模型组总胆固醇较正常组升高,结合肝脏切片 HE 染色结果,推测与高脂饮食导致的肝脏脂肪样变损伤肝功能有关。七味白术散组总胆固醇较模型组显著降低,说明七味白术散具有下调总胆固醇的作用。

胰岛素有促进全身组织对葡萄糖的摄取和利

用的作用,通过抑制糖原的分解和糖原异生,起到降低血糖。TNF- $\alpha$ 是具有促炎反应的一种免疫调节因子,与胰岛素抵抗的产生关系密切,可导致胰岛素抵抗的产生<sup>[14]</sup>。

PI3K/Akt 信号通路是胰岛素效应信号传导的主要途径<sup>[15-16]</sup>。KEGG 分析表明七味白术散可能是通过调节 PI3K/Akt 等信号通路发挥降糖作用的,为验证网络药理学的预测,本实验选取 PI3K/Akt 信号通路进行验证。对该信号通路上的 IR, IRS-1, PI3K, Akt 蛋白和 mRNA 的表达进行检测,结果表明七味白术散可能是通过调节 IR, IRS-1, PI3K, Akt 蛋白和 mRNA 的表达影响胰岛素分泌,达到治疗糖尿病的作用。

PI3K/Akt 信号通路与胰岛素的代谢效应高度相关。胰岛素与细胞表面胰岛素受体结合,激活酪氨酸蛋白激酶(PTK),导致胰岛素受体底物 1, 2 (IRS-1, IRS-2)酪氨酸残基磷酸化,被磷酸化的 IRS 结合磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K) p85 调节亚单位,催化 p110 而激活 PI3K,增强 PI3K 活性,使 Akt 丝氨酸残基磷酸化。被激活的 Akt 从质膜上释放出来,转移到细胞质、线粒体和细胞核内,磷酸化各种底物,从而调节糖原合成、糖异生和葡萄糖吸收,从而引发生物效应<sup>[17-18]</sup>。

综上所述,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、多通路阐释七味白术散治疗糖尿病的作用机制,实验药理学结果说明七味白术散可通过PI3K/Akt信号通路降低血清TNF- $\alpha$ , T-CHO并升高FINS,从而降低糖尿病小鼠的血糖水平,起到治疗作用。通过药理学实验结果验证了网络药理学预测结果,为深入研究七味白术散的降糖机制提供了基础。

[参考文献]

[1] 梁耐鹏,张晓娥. 用七味白术散对脾虚型妊娠期糖尿病患者进行治疗的效果探析[J]. 当代医药论丛, 2016,14(11):16-18.

[2] 冯利霞,王立红,徐颖华,等. 七味白术散联合胰岛素泵短期强化干预治疗脾虚型妊娠期糖尿病临床疗效及对母婴结局的影响[J]. 中医药导报, 2014, 20(15):78-80.

[3] 司徒嵩瑜,张晓静. 七味白术散治疗脾虚型妊娠期糖尿病疗效观察[J]. 新中医, 2013, 45(12):100-102.

[4] 易靖茹,谢纲,易引君. 七味白术散治疗妊娠糖尿病64例临床观察[J]. 中医药导报, 2014, 20(1):120-121.

[5] 林德嫦,韦桥兰,谢碧柳. 七味白术散治疗脾虚型妊娠期糖尿病的临床分析[J]. 中医临床研究, 2019, 11(16):104-106.

[6] 白明,刘保松,彭孟凡,等. 基于数据挖掘和网络药理学的2型糖尿病用药规律及机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9):182-188.

[7] 刘夫艳,唐德才,谭喜莹. 黄芪-莜术药对基于网络药理学的抗大肠癌分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13):176-185.

[8] CHEN L D, CAO Y, ZHANG H, et al. Network pharmacology-based strategy for predicting active ingredients and potential targets of Yangxinshi tablet

for treating heart failure[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 2(19):359-368.

[9] 齐心畅. 基于网络药理学的复方中药止颤粉治疗帕金森病作用机制研究[D]. 吉林:吉林大学, 2018.

[10] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11):682-690.

[11] 刘璐,徐士欣,张军平,等. 基于网络药理学方法探讨四妙勇安汤治疗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(3):572-578, 773-775.

[12] 郭胜男,刘洪斌,李东华,等. 番石榴叶总黄酮对糖尿病小鼠肝脏葡萄糖代谢及胰岛素信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4):166-170.

[13] 方为民. 七味白术散加减治疗消渴体会[J]. 黔南民族医专学报, 2014, 27(2):106-108.

[14] LIU D L, CHU S F, LI H L, et al. Relationship between free fatty acid spectrum, blood stasis score, and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes[J]. World J Tradit Chin Med, 2018, 4(1):28-35.

[15] 宋紫临,吴丽丽,秦灵灵,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.

[16] 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.

[17] KARA G, CIFCIBASI E, KARSIDAG K, et al. Short term effects of periodontal therapy on inflammatory markers in patients with type-2 diabetes[J]. Saudi Med J, 2015, 36(4):469-476.

[18] 戴冰,吴沁璇,肖子曾,等. 六味地黄汤及其水提醇溶部位对2型糖尿病模型大鼠脂肪组织中PI3K/Akt信号通路的影响[J]. 中成药, 2016, 38(2):428-430.

[责任编辑 周冰冰]