

基于网络药理学探讨四逆散治疗2型糖尿病的作用机制

毕艺鸣¹, 殷贝¹, 夏亚情², 范冠杰^{2*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006;

2. 广州中医药大学第二附属医院, 广州 510120)

[摘要] **目的:**运用网络药理学方法研究四逆散治疗2型糖尿病(T2DM)的作用机制,旨在为其基础研究及临床应用提供依据。**方法:**通过多个数据库检索并筛选四逆散中不同药物的活性成分及其与T2DM的交集靶点,通过Cytoscape分别构建药物、靶点、疾病靶点网络图;利用STRING数据库构建交集靶点的PPI网络,利用CytoNCA进行网络拓扑分析,利用Cluster Marker进行网络模块化分析,再通过ClueGO进行基因功能(GO),京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析。**结果:**四逆散中筛选得到137个活性成分,涉及T2DM靶点110个;CytoNCA分析筛选出12个关键靶点。Cluster Marker分析提示,交集靶点分别涉及4个模块,GO分析结果显示:模块一主要涉及急性炎症反应、乙酰胆碱受体信号通路等生物学过程;模块二主要涉及类固醇刺激的反应,对外源性刺激的反应等;而模块三主要参与细胞对各种营养物质的代谢反应以及对缺氧的调控反应等。KEGG分析主要与晚期糖基化终末产物及其受体通路、凋亡通路、炎症通路、细胞周期以及各种代谢通路高度相关。**结论:**四逆散治疗T2DM可能是其综合调控炎症、细胞凋亡、物质代谢等的结果。该研究不仅揭示了四逆散治疗2型糖尿病的潜在机制,还揭示了四逆散与糖尿病血管并发症、糖尿病认知障碍及恶性肿瘤的关系,为四逆散的基础研究提供方向。

[关键词] 四逆散; 2型糖尿病及其并发症; 网络药理学; 潜在作用机制

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0169-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202060

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200723.1450.028.html>

[网络出版日期] 2020-7-23 15:59

Mechanism of Sinisan in Treating Type 2 Diabetes Mellitus Based on Network Pharmacology

BI Yi-ming¹, YIN Bei¹, XIA Ya-qing², FAN Guan-jie^{2*}

(1. *The Second Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine,*

Guangzhou 510006, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine,
Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Sinisan in treating type 2 diabetes mellitus (T2DM) based on network pharmacology. **Method:** Based on electronic databases, active ingredients of Sinisan and target genes of ingredients as well as type 2 diabetes were screened out. Cytoscape software was applied to construct "herb-active ingredient-target-disease" interaction network diagram, respectively. The common genes of ingredients and disease were uploaded to the STRING database, and the protein interaction network map (PPI) was constructed. CytoNCA and Cluster Marker were used to analyze PPI, respectively. Finally, ClueGO was used to analyze gene ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment. **Result:** A total of 137 active components and 110 effective genes of Sinisan in the treatment of type 2 diabetes were screened out. Based on PPI analysis, these effective genes were divided into 4 different clusters, and 12 genes were considered as the most effective targets. GO enrichment

[收稿日期] 20200102(021)

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划项目(2015BAI04B09);广东省中医药科技创新平台建设项目(2018KT1068)

[第一作者] 毕艺鸣,在读博士,从事中医药治疗内分泌病研究,Tel:020-81887233,E-mail:451645244@qq.com

[通信作者] *范冠杰,博士,主任医师,从事中医药治疗内分泌病研究,Tel:020-81887233,E-mail:fanfanfangj@163.com

analysis showed that cluster 1 mainly involved acute inflammatory response and acetylcholine receptor signaling pathway, cluster 2 mainly involved cellular response to steroid hormone stimuli and xenobiotic stimulus, and cluster 3 was mainly engaged in the metabolism process of protein, fatty and glucose and the response to hypoxia. KEGG analysis was highly correlated with advanced glycation end products-receptor for AGE (AGE-RAGE) pathway, apoptosis pathway, inflammatory pathway, cell cycles and various metabolic pathways. **Conclusion:** Sinisan has a regulatory effect in pathogenesis and prognosis of T2DM, such as inflammation, cell apoptosis and nutrition metabolism. Moreover, its potential mechanisms on diabetic angiopathies, diabetic cognitive impairment and cancers were revealed, so as to define a direction for the fundamental research of Sinisan.

[Key words] Sinisan; type 2 diabetes and complications; network pharmacology; potential mechanism

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种常见的慢性疾病,其本质是由于胰岛素分泌受损或者胰岛素抵抗而引起的血糖水平升高,并诱发体内糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱,引发一系列临床症状的代谢性疾病。随着生活水平的提高,2型糖尿病的患病率也逐年增加,据国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)统计,2013年全球成人T2DM患者人数达3.8亿人,预计到2035年,将有6亿成人患病;我国流行病学调查也显示,2013年我国成人T2DM患病率达10.4%,2型糖尿病已经成为全球健康问题^[1-2]。现代医学治疗T2DM主要包括控制饮食、运动锻炼、口服降糖药和皮下注射胰岛素等,但其治疗机制主要集中在单成分、单靶点、单一调节方式上。因此,寻找全方位多靶点的治疗药物,是目前医学研究的热点。基于中医药具有多成分、多靶点作用等优势,将为T2DM的防治提供全新的思路。

中医学认为T2DM属于“消渴病”范畴,历代医家多认为其与肺、胃、肾密切相关,病因病机主要为燥热内盛,治疗上以“三消”分治立论。但目前临床上大多数糖尿病患者发病前后均无明显的“三消”症状,反而由于工作压力大或对自身疾病认识的不足而出现一系列情绪焦虑或低落、食欲不振、乏力等肝郁脾虚的临床表现。因此目前对于消渴的治疗不再拘泥于“三消”,越来越多医家提出“肝郁致消”的病因病机理论,认为情志失调、饮食不节等均易伤肝,引起肝失疏泄,气机逆乱,肝郁乘脾,气血失和,甚者肝郁化火灼伤肺阴,横逆犯胃并下汲肾水,或肝郁气滞痰浊内生,从而引起一系列消渴病变证^[3]。现代研究也认为,情志抑制、情绪不宁等精神因素,可影响下丘脑-垂体-肾上腺轴,导致升糖激素如肾上腺素、胰高血糖素的分泌增加,促进糖异生,降低胰岛素敏感性,从而成为糖尿病发生

发展的主要诱因^[4]。因此,现代中医认为,肝郁脾虚是消渴病发病的关键,当以疏肝健脾为治疗大法。四逆散出自《伤寒论》,由北柴胡、白芍、枳实及炙甘草4味药物组成,是治疗肝郁脾虚证的代表方。以四逆散为主方加减治疗糖尿病及其并发症的相关研究早已得到广泛报道。冯兴中教授常以疏肝健脾为基本治则,采用四逆散治疗消渴病^[5];吕仁和教授则善用四逆散加减治疗消渴病及其并发症如消渴病肾病、消渴病中风等^[6];而范冠杰教授则提出“治消之法,疏肝为要”,临证处方多以四逆散加减,均取得良效^[7]。蔡少娜等^[8]用四逆散干预T2DM患者,结果发现,四逆散降糖效果显著,能够有效改善患者空腹血糖及餐后血糖水平,并使HbA1c水平下降,同时能够改善细胞免疫功能,延缓T2DM的进展。在基础研究方面,梁绍满等^[9]认为四逆散治疗T2DM的机制可能与其调控糖尿病大鼠内分泌激素,抑制糖异生及改善胰岛素抵抗有关。但是由于四逆散成分复杂,其治疗T2DM的相关机制仍未完全明确。

网络药理学的概念最初由HOPKINS AL所提出,旨在通过系统生物学、生物网络构建与分析及其连接性与多效性等对药物的有效性、毒性、作用机制进行揭示,并指导药物的开发。由于网络药理学实现了药物、化合物、靶点、疾病之间的多向连接,从整体考虑了药物之间的相互作用,与中药复方的复杂性和作用多样性相契合,因此,网络药理学近年来被广泛用于中药复方的研究中。本研究运用网络药理学的技术和方法,对四逆散治疗T2DM的作用机制进行整体的研究,将为四逆散治疗T2DM的基础研究提供一定方向,同时使“从肝脾论治消渴”的理论在临床应用中得到进一步完善。

1 材料与方法

1.1 材料 TCMSP数据库以及BATMAN-TCM数据库均属于中药系统药理学平台,前者主要包括中药化学成分、相关的药代动力学特性以及部分对应的基因,后者则可对复方的化学成分及基因进行分析,二者结合运用可筛选出中药所有化合物成分及其对应基因靶点。GeneCards数据库,OMIM数据库以及GenCLiP 3数据库均可查找人类疾病的基因信息,三者相互补充,可全面搜索与疾病相关的基因。Uniprot数据库主要对不同数据库来源的基因名进行标准化。STRING数据库则主要用于分析蛋白之间的相互作用,挖掘核心靶点。Cytoscape除对数据进行分析与整合,还可用于数据的可视化。以上材料均是中药分子机制研究的重要工具。见表1。

表1 材料及网址

Table 1 Materials and websites

名称	网址
TCMSP数据库	http://lsp.nwu.edu.cn/tcmssp.php
BATMAN-TCM数据库	http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/
GeneCards数据库	https://www.genecards.org/
OMIM数据库	https://www.omim.org
GenCLiP 3数据库	http://ci.smu.edu.cn/genclip3/analysis.php
Uniprot数据库	http://www.uniprot.org
STRING数据库	https://string-db.org/
Cytoscape 3.7.2	https://cytoscape.org/download.html

1.2 方法

1.2.1 检索四逆散的有效成分 四逆散由北柴胡、白芍、枳实及炙甘草4味药组成。根据柴胡 *Bupleuri Radix*, 白芍 *Paeoniae Radix Alba*, 枳实 *Aurantii Fructus Immaturus*, 甘草 *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma* 在2015年版《中国药典》中的规范药材名,在TCMSP及BATMAN-TCM数据库中进行检索,得到所有可能的化合物成分,根据口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug likeness, DL)进行筛选,最终得到四逆散中所有可能的化合物成分,建立药物-化合物成分数据集。通过TCMSP及BATMAN-TCM数据库,筛选所有化合物成分的对靶点,并利用Uniprot数据库筛选出人源靶蛋白,再将靶蛋白转换为对应的靶基因,最终得到所有靶基因的官方名称,采用Cytoscape 3.7.2构建“中药-活性成分-靶点”网络图。

1.2.2 T2DM靶点的获取及四逆散作用靶点的交集分析 通过GeneCards,OMIM数据库及GenCLiP 3数据库,以“type 2 diabetes mellitus”为关键词进行检索,得到疾病相关靶点,利用Excel进行合并,删除重复信息后,得到T2DM的全部靶点信息,再将获得的疾病靶点与上述中药化合物成分的靶点基因进行匹配,得到共同的基因集,即为四逆散治疗T2DM的潜在作用靶点,采用Cytoscape 3.7.2构建“活性成分-靶点-疾病”网络图。

1.2.3 PPI蛋白相互作用网络构建 通过STRING数据库对上述潜在作用靶点进行PPI蛋白相互作用网络分析,将该网络导入Cytoscape 3.7.2,利用CytoNCA进行拓扑属性分析^[10],根据中心性(degree centrality, DC),介度中心性(betweenness centrality, BC),特征向量中心性(eigenvector centrality, EC),接近中心性(closeness centrality, CC)等筛选出核心靶点和重要靶点。利用Cluster Marker对PPI网络进行模块化分析,根据结果重新构建PPI网络图。

1.2.4 GO富集分析和KEGG的通路分析 利用Cytoscape 3.7.2的ClueGO对不同模块的靶蛋白进行GO分析和KEGG信号通路分析,以“ $P < 0.05$, kappa Score=0.4”为基准进行筛选,通过Bonferroni方法进行P校正,根据P从小到大进行排序,明确不同模块参与的生物学过程,从而分析得出药物治疗疾病的可能机制。

2 结果

2.1 四逆散有效成分及作用靶点的获取 基于文献,将 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 作为筛选条件,共得到137种潜在活性成分,其中柴胡潜在活性成分17个,白芍潜在活性成分13个,枳实潜在活性成分21个,甘草潜在活性成分93个。同一化学成分可能在多种中药中存在,其中山柰酚(kaempferol)存在于柴胡、白芍及甘草中,异鼠李素(isorhamnetin)是槲皮素(queretin)的衍生物,均存在于柴胡及甘草中,丁子香萜(mairin)及谷甾醇(sitosterol)则存在于白芍及甘草中,而柚皮苷(naringenin)存在于枳实和甘草中。见图1A。

通过TCMSP及BATMAN-TCM数据库,得到柴胡对应靶点167个,白芍对应靶点61个,枳实对应靶点115个,甘草对应靶点607个,将上述靶点进行合并,去除重复并筛选出人源靶蛋白共118个,通过Cytoscape 3.7.2将活性化合物与靶点相连,得到“活性成分-靶点”网络图。该网络由232个节点和

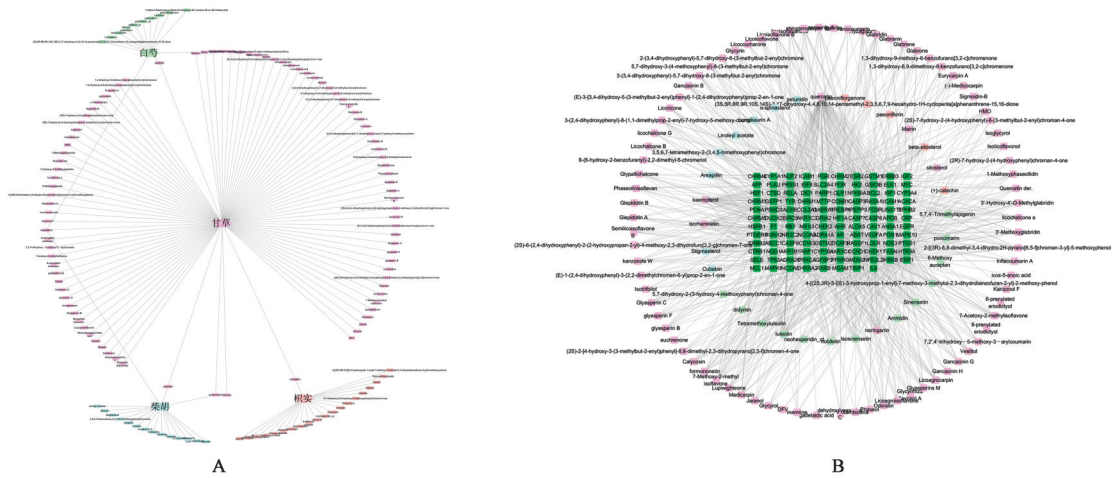


图1 四逆散活性成分(A)及“活性成分-靶点”相互作用(B)网络

Fig. 1 Network chart for active components of Sinisan(A) and active components-action targets of Sinisan(B)

876条边组成,其中节点代表中药活性化合物和相对应的靶点,边代表活性化合物和靶蛋白的相互作用关系。槲皮素对应最多的潜在靶蛋白共77个,山柰酚对应靶点68个,其他如异鼠李素,柚皮苷(naringenin),木樨草素(luteolin),川陈皮素(nobiletin), β -谷甾醇(beta-sitosterol)对应靶点也较多,分别为34,30,28,18及16个,见图1B。现代药理研究表明,槲皮素、山柰酚、异鼠李素等均是强大的生物活性化合物,在抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗糖尿病并发症等多方面作用显著^[11],这些有效成分可能是四逆散多靶点作用的重要物质基础。

2.2 T2DM与四逆散交集靶点的获取 通过检索GeneCards, OMIM及GenCLiP 3数据库,剔除重复靶点后,得到T2DM相关靶点共10 430个。将疾病相关靶点与四逆散作用靶点进行匹配,并取交集,共得到110个潜在靶点,通过Cytoscape 3.7.2构建“中药-活性成分-靶点-疾病”网络图,四逆散抗T2DM的机制可能与这110个潜在靶点有关。见图2。

2.3 交集靶点PPI网络的获取与分析 将2.2项下得到的交集靶点通过STRING数据库建立PPI网络,设定物种为人,阈值设为中等置信度“medium confidence=0.4”,隐藏游离点,得到PPI网络图,图中节点表示蛋白,连线表示蛋白之间的关联,四逆散与T2DM交集潜在靶点共涉及107个节点,1 053条边。进一步采用CytoNCA计算网络节点的DC, BC, CC和EC值,得到网络DC中位数为17, BC中位数为33.012, CC中位数为0.502, EC中位数为0.071。根据网络药理学筛选方法,得到重要靶点52个,其中15个核心靶点:白细胞介素-6(interleukin-

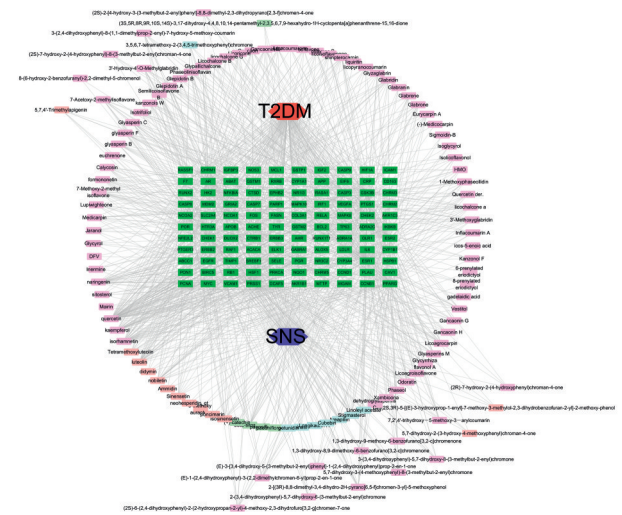


图2 四逆散“中药-化学成分-靶点-疾病”网络
Fig. 2 Network chart for “herbal medicine-component-target-disease” of Sinisan

6, IL-6), 血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA), 丝裂原活化蛋白激酶8(mitogen-activated protein Kinase 8, MAPK8), 表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR), 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3, CASP3), 癌基因MYC(MYC proto-oncogene, MYC), 雌激素受体1(estrogen receptor, ESR1), 周期蛋白D1(cyclin D1, CCND1), 癌基因FOS(Fos proto-oncogene, FOS), 受体酪氨酸激酶erbB-2(receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 isoform b, ERBB2), 雄激素受体(androgen receptor, AR), 过氧化物酶体增生激活受体 γ (peroxisome proliferative activated receptor, γ PPARG), 癌基因RELA(RELA proto-oncogene, RELA), 淀粉样肽前体蛋白基因(amyloid precursor protein, APP)及癌基因MDM2(MDM2 proto-

oncogene, MDM2), 这些靶点在 PPI 网络中有重要作用, 也是四逆散发挥作用的关键靶点。为了进一步明确 PPI 网络中不同蛋白间的关系, 利用 Cluster

Marker 进行模块化分析, 结果 107 个靶蛋白可分为 4 个模块, 模块一涉及靶蛋白 53 个, 模块二涉及 40 个, 模块三涉及 12 个, 模块四涉及 2 个。见图 3。

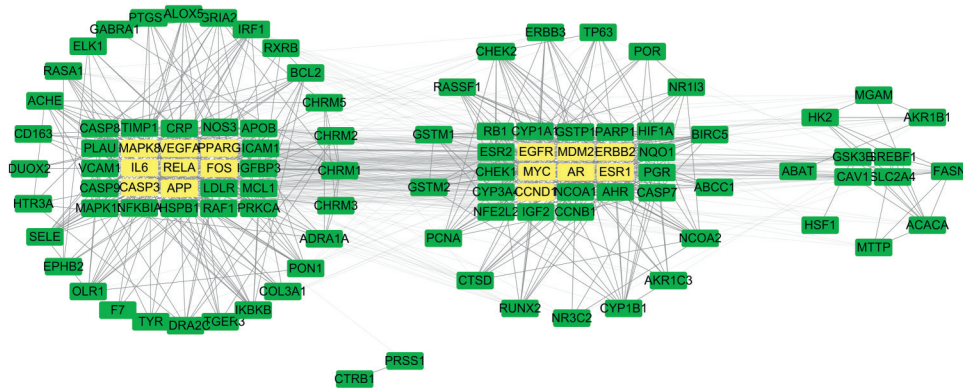


图3 交集靶点模块化分析 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of potential targets based on cluster analysis

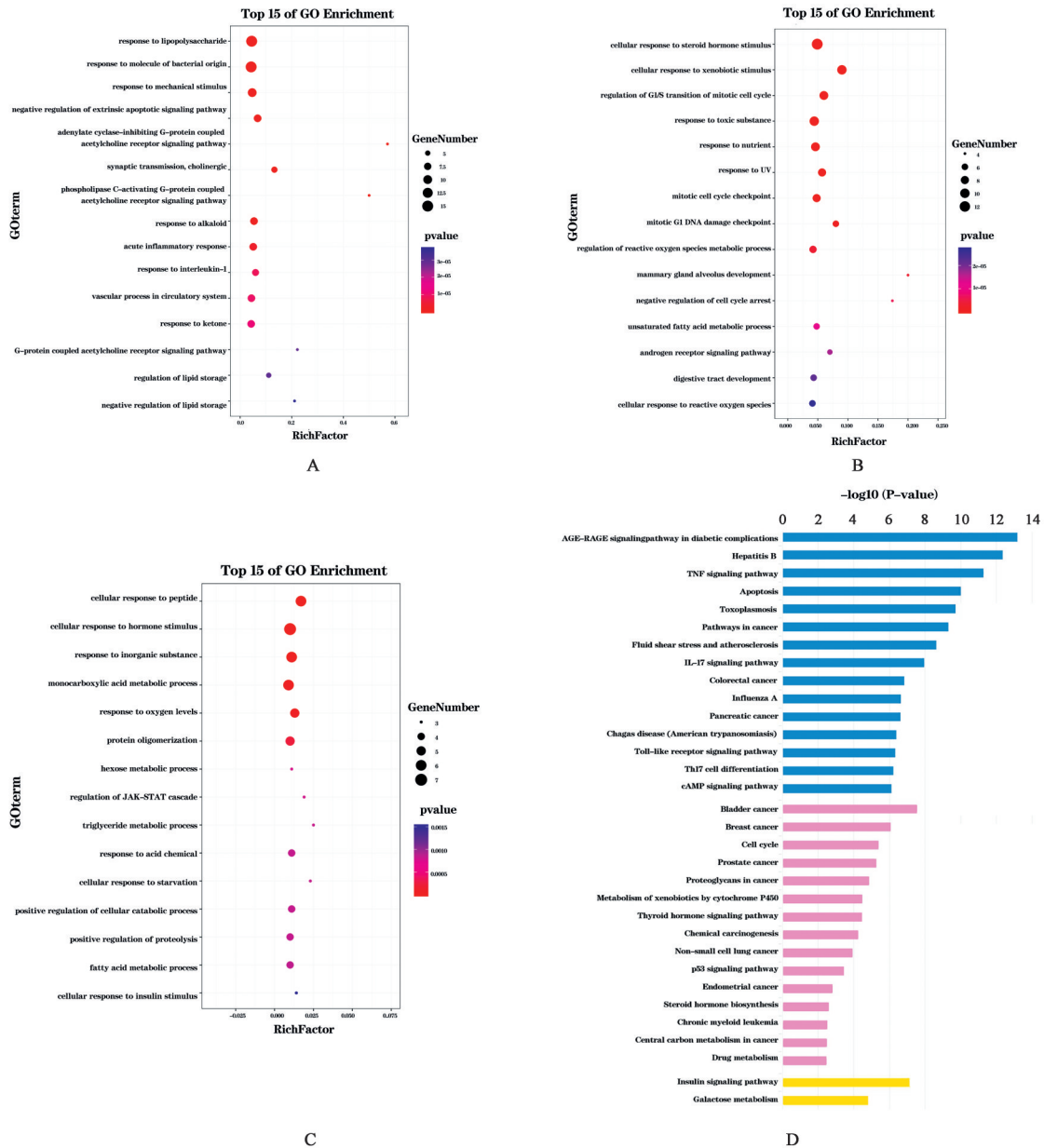
2.4 GO 富集分析与 KEGG 分析 为了明确不同模块蛋白的生物学功能, 利用 ClueGO 对不同模块蛋白进行 GO 富集分析及 KEGG 分析。GO 分析中 P 代表富集程度, 横坐标代表富集基因数。模块一共获得 46 个功能富集, 主要涉及细胞凋亡的调控反应 (extrinsic apoptotic signaling pathway) 以及急性炎症反应 (acute inflammatory response), 并与磷脂酶 C 激活 G 蛋白偶联乙酰胆碱受体信号途径 (phospholipase C-activating G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway) 的调控有关, 见图 4A; 模块二共获得 47 个功能富集, 主要与类固醇激素刺激的细胞反应 (cellular response to steroid hormone stimulus) 以及细胞有丝分裂周期 (regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle) 等有关, 见图 4B; 模块三则获得 20 个功能富集, 主要涉及各种营养物质的代谢反应, 包括对体内一元羧酸 (monocarboxylic acid), 己糖 (hexose), 甘油三酯 (triglyceride) 等的分解和合成代谢过程以及对胰岛素刺激的反应 (cellular response to insulin stimulus) 等, 见图 4C。模块四靶点较少, 结果显示未富集。KEGG 富集分析结果提示, 模块一主要包括糖尿病并发症中的糖化终末产物及其受体信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications), 细胞凋亡 (Apoptosis) 等通路; 模块二则主要涉及各种肿瘤及细胞周期等通路, 包括膀胱癌 (bladder cancer), 乳腺癌 (breast cancer), 细胞周期 (cell cycle) 等通路; 模块三则与胰岛素信号通路 (insulin signaling pathway) 及半乳糖代谢通路 (galactose metabolism) 有关, 见图 4D。

通过结果分析, 结合 T2DM 的生理病理过程, 四逆散的作用途径主要涉及炎症反应、细胞凋亡以及物质代谢三个过程。其中, 炎症及细胞凋亡相关靶点主要集中在模块一, 物质代谢相关靶点主要集中在模块三。模块二的靶点集中在细胞增殖与细胞周期等方面, 且功能富集主要与恶性肿瘤有关, 这表明糖尿病与恶性肿瘤的发生存在一定内在关系。此外, 富集程度最高的糖尿病并发症中的糖化终末产物及其受体信号通路在调控细胞炎症、氧化应激损伤等方面起重要作用, 并与糖尿病并发症的发生发展密切相关。以上结果表明, 四逆散不仅通过调控多种生物学过程参与到 T2DM 的治疗中, 同时与 T2DM 并发症的发生发展有一定联系, 这体现了中药治疗疾病多层次、全方位的作用优势和特点。

3 讨论

T2DM 是一种常见的代谢性疾病, 与心脑血管疾病、肿瘤等的发生发展关系密切, 其发病机制复杂且尚不完全明确。中医药认识 T2DM 历史悠久, 治疗有效, 但由于 T2DM 基础研究周期长, 发病机制多及中药成分不明等局限, T2DM 的中医药研究进展缓慢, 利用网络药理学与中医药整体观念的共通之处, 对四逆散治疗 T2DM 的潜在机制进行阐释, 为临床应用四逆散治疗 T2DM 提供科学依据。

本研究通过对四逆散进行网络药理学分析, 筛选出四逆散有效活性成分 137 种, 得到药物-疾病交集靶点共 110 个。其中, 各药物之间均存在相同成分及作用靶点, 山柰酚、异鼠李素、槲皮素、木犀草素、柚皮苷、川陈皮素及 β -谷甾醇等对应靶点较多,



A. 模块一 GO; B. 模块二 GO; C. 模块三 GO; D. 交集靶点模块的 KEGG
图 4 生物过程富集分析

Fig. 4 Potential targets of cluster1

而基于本研究生物信息学分析,得到 IL-6, VEGFA, MAPK8 等治疗 T2DM 的核心靶点以及相关通路,这些靶点及通路不仅是 T2DM 病理过程的关键,同时也是四逆散治疗 T2DM 的关键所在,而槲皮素、山柰酚和异鼠李素等可能作用于关键靶点及通路,是四逆散治疗 T2DM 的重要物质基础。

本研究结果提示,四逆散治疗 T2DM 的作用,可能是其对细胞凋亡、增殖、炎症、代谢等多种生物学过程的整体调控,通过抑制炎症及凋亡通路,改善代谢及调控胰岛素信号通路等增强胰岛 β 细胞的功能,提高组织对胰岛素的敏感性,发挥降糖作用,

这与前期四逆散药效学研究结果相一致。许多实验研究已证实, MAPK8, MYC, CASP3 与胰岛 β 细胞凋亡有关,而槲皮素、柚皮苷具有抑制 MAPK8 活性的作用,已经被认为是 MAPK8 天然的抑制剂;槲皮素还能直接抑制 CASP3 的表达,从而保护胰岛细胞^[12-14]。全身慢性炎症反应可加重胰岛素抵抗,这是糖尿病发生发展的重要原因。IL-6 与 RELA 是体内重要的致炎因子,IL-6 主要由脂肪组织分泌,同时也是体内炎症通路 NF- κ B (RELA 基因所编码的蛋白 p65 是 NF- κ B 的亚基之一)的激活因子之一,其浓度与糖耐量降低和胰岛素抵抗成正相关^[15],而四逆

散具有强大的抗炎能力,能够显著抑制IL-6, TNF- α 等炎症因子的分泌,改善脂肪组织炎症及胰岛素抵抗状态,直接增强胰岛素的敏感性;木樨草素则通过靶向作用于NF- κ B炎症通路发挥降糖作用^[16-17]。四逆散及其重要成分不仅能改善胰岛素抵抗状态,还对体内代谢紊乱及氧化应激反应具有一定调控作用,PPAR- γ 主要由PPARG基因编码,是一种由脂肪酸及其衍生物激活核激素受体,其可调节肝脏及骨骼肌的脂质代谢,促进脂肪细胞分化,增加脂肪组织对葡萄糖的摄取,而作为四逆散中的重要成分,山柰酚、木樨草素等已经被证实通过该途径改善葡萄糖代谢,直接降低血糖浓度^[11];山柰酚、异鼠李素及槲皮素还可提高骨骼肌和脂肪组织中葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, GLUT4)和AMP依赖性蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)活性,促进组织对葡萄糖的利用,增强胰岛素敏感性,该机制与二甲双胍(用于治疗T2DM的一线药物)具有相似之处^[18-19];柚皮苷及川陈皮素则由于其强大的抗氧化能力,对能量消耗和脂质代谢具有促进作用,对肥胖、高脂血症具有显著作用^[20]。T2DM的病理机制除了与上述因素有关外,还与内分泌轴紊乱有关。本研究认为四逆散可通过调控细胞对类固醇激素的反应干预T2DM的进展,据报道^[9],四逆散可作用于11 β -羟基类固醇脱氢酶I型(11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β -HSD1)和糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR),影响糖尿病大鼠内分泌功能,控制糖尿病大鼠体质量增长,并具有降低空腹及随机血糖的作用。此外,AR, ESR1作为类固醇受体,已经被证实与胰岛 β 细胞的凋亡及功能障碍有关,本研究也提示二者均是四逆散治疗T2DM的核心靶点,但目前尚缺乏相应的实验研究,这值得进一步深入和探讨^[21]。

本研究还发现,四逆散除可能参与T2DM的治疗外,还对T2DM的并发症具有潜在的疗效。糖尿病并发症中的糖化终末产物及其受体信号通路是本研究中富集程度最显著的通路,该通路主要涉及MAPKs, NF- κ B, TNF等多个细胞内信号转导通路,同时参与VEGFA, EGFR等核心靶点的调控,这些通路及靶点的共同作用可能是引发糖尿病并发症的可能机制。①四逆散与糖尿病血管病变,糖化终末产物与体内受体结合,不仅促进细胞内氧化应激反应,还通过促进炎症因子如IL-6等释放,损伤内皮细胞,引起VEGFA, EGFR, ERBB2等表达异常,

这与糖尿病血管功能障碍有关,是糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病神经病变和糖尿病心脏病发病的主要原因^[22-24]。糖尿病并发症中的糖化终末产物及其受体信号通路是四逆散作用的关键靶点,文献显示,四逆散中多种成分具有抗氧化、抗炎的作用,可通过作用于NF- κ B通路的IL-6, RELA, VEGFA, CASP3等靶点以及MAPK通路的MAPK8, FOS等靶点,改善微血管功能障碍,延缓糖尿病血管并发症的发生^[25-27]。②四逆散与糖尿病认知功能障碍,胆碱能系统受损、糖化终末产物及慢性炎症浸润、胰岛素/胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)信号异常在糖尿病引起的认知障碍中起重要作用^[28-29]。四逆散对乙酰胆碱这类神经递质及相关调控通路具有影响,乙酰胆碱水平的升高,有助于减少糖尿病大鼠大脑组织淀粉样蛋白的沉积,改善糖尿病认知功能障碍,四逆散的主要成分 β -谷甾醇、槲皮素均已被证实具有胆碱酯酶抑制作用, β -谷甾醇还能通过ESR1, GSK3B等靶点抑制脂质过氧化,提高小鼠学习记忆能力^[30-31];糖化终末产物及其诱发的氧化应激反应及慢性炎症反应可通过影响APP蛋白向大脑的转运,参与糖尿病认知功能障碍的发病,而四逆散对炎症相关通路具有显著的抑制作用,包括直接抑制TNF通路, Toll样受体通路, IL-17信号通路或间接作用于PPAR γ 信号通路,从而阻断炎症级联反应,减少糖基化终末产物的生成,延缓糖尿病认知功能障碍的发生^[32];本研究还提示四逆散可能通过调控胰岛素信号转导通路,作用于GSK3B, APP等靶点,减少淀粉样蛋白的沉积及Tau蛋白的过度磷酸化^[33],与上述途径共同发挥对糖尿病认知功能障碍的综合治疗作用。③四逆散与恶性肿瘤,值得注意的是,本研究还揭示了四逆散与多种恶性肿瘤如膀胱癌、乳腺癌、前列腺癌等的关系,并提示四逆散可能通过MAPK通路, p53通路, AGE-RAGE通路下游的FOS, CCND1, MDM2等癌基因以及VEGFA, EGFR, ERBB2等靶基因,调控细胞周期,从调节细胞有丝分裂过程以及血管新生的角度,干预恶性肿瘤的增殖和转移。而大量研究表明,许多因素包括高血糖,胰岛素抵抗,高胰岛素血症、脂肪因子及炎症因子均可导致T2DM环境中恶性肿瘤的发展和死亡风险增加^[34],四逆散可能调控细胞凋亡途径以及炎症因子的分泌,改善肿瘤微环境,进而对恶性肿瘤的发展起一定抑制作用。

综上所述,本次网络药理学研究分析结果显

示,四逆散治疗T2DM的作用机制,可能与改变四逆散及T2DM交集靶基因的表达有关,多种活性化合物通过影响胰岛素信号转导通路、炎症通路、凋亡通路等改善葡萄糖稳态、胰岛素抵抗、胰岛素释放缺陷以及脂肪组织的炎症,延缓T2DM的发展。另外,本研究还提示四逆散可能与糖尿病并发症如血管并发症、认知障碍及恶性肿瘤相关,但是查阅相关文献,此方面的研究仍较少,这可为后续四逆散的基础研究提供方向,还为扩展四逆散的临床应用提供新思路。

[参考文献]

[1] 贾伟平,陆菊明,纪立农,等. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中国实用内科杂志,2018,38(4):292-344.

[2] GUARIGUATA L, WHITING D R, HAMBLETON I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014,103(2):137-149.

[3] 刘晓琦. 从肝脾论治2型糖尿病的研究概况[J]. 中国民间疗法,2019,27(7):101-103.

[4] 周珺. 2型糖尿病患者HPA轴功能的临床研究及药物治疗新途径的实验性探索[D]. 兰州:兰州大学,2011.

[5] 李凯,冯兴中. 冯兴中教授治疗2型糖尿病经验[J]. 中华中医药杂志,2015,30(8):2805-2807.

[6] 杨晓晖. 吕仁和教授运用加味四逆散治疗消渴病并发症经验[J]. 中医函授通讯,1995(4):32-34.

[7] 林玉平,范冠杰. 范冠杰教授运用疏肝药串治疗消渴的经验[J]. 时珍国医国药,2014,25(11):2779-2780.

[8] 蔡少娜,陈文艺,曾志安,等. 四逆散治疗2型糖尿病的研究[J]. 内蒙古中医药,2019,38(1):2-3.

[9] 梁绍满,邓小敏. 四逆散对2型糖尿病大鼠血糖、11 β HSD1及GR的影响[J]. 光明中医,2016,31(19):2799-2803.

[10] MALLIK M K. An attempt to understand glioma stem cell biology through centrality analysis of a protein interaction network[J]. J Theor Biol, 2018, 438(7):78-91.

[11] AI-ISHAQ R K, ABOTALEB M, KUBATKA P, et al. Flavonoids and their anti-diabetic effects: cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels [J]. Biomolecules, 2019, 9(9):430-465.

[12] PRAUSE M, MAYER C M, BRORSSON C, et al. JNK1 deficient insulin-producing cells are protected against Interleukin-1beta-Induced Apoptosis associated with abrogated Myc expression[J]. Exp Diabetes Res,

2016,2016:1312705.

[13] HIEROLD J, BAEK S, RIEGER R, et al. Design, Synthesis, and biological evaluation of quercetagenin analogues as JNK1 inhibitors[J]. Chemistry, 2015, 21(47):16887-16894.

[14] ADEBIYI A O, ADEBIYI O O, OWIRA P M. Naringin mitigates cardiac hypertrophy by reducing oxidative stress and Inactivating c-Jun nuclear Kinase-1 protein in type I diabetes [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2016, 67(2):136-144.

[15] FATHY S A, MOHAMED M R, ALI M, et al. Influence of IL-6, IL-10, IFN-gamma and TNF-alpha genetic variants on susceptibility to diabetic kidney disease in type 2 diabetes mellitus patients [J]. Biomarkers, 2019, 24(1):43-55.

[16] DING L, JIN D, CHEN X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR gamma transcriptional activity in adipocytes [J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(10):941-947.

[17] CHENG F, MA C, WANG X, et al. Effect of traditional Chinese medicine formula Sinisan on chronic restraint stress-induced nonalcoholic fatty liver disease: a rat study[J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):203-213.

[18] JIANG H, YAMASHITA Y, NAKAMURA A, et al. Quercetin and its metabolite isorhamnetin promote glucose uptake through different signalling pathways in myotubes[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):2690-2705.

[19] CAMAFORTE N, SALDANHA L L, VAREDA P, et al. Hypoglycaemic activity of *Bauhinia holophylla* through GSK3- β inhibition and glycogenesis activation [J]. Pharm Biol, 2019, 57(1):269-279.

[20] BURKE A C, SUTHERLAND B G, TELFORD D E, et al. Intervention with citrus flavonoids reverses obesity and improves metabolic syndrome and atherosclerosis in obese Ldlr (-/-) mice [J]. J Lipid Res, 2018, 59(9):1714-1728.

[21] YANG Y, WANG Y, ZHOU K, et al. Constructing regulatory networks to identify biomarkers for insulin resistance[J]. Gene, 2014, 539(1):68-74.

[22] LUO Y, LUO J, PENG H. Associations between genetic polymorphisms in the VEGFA, ACE, and SOD2 genes and susceptibility to diabetic nephropathy in the Han Chinese [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2019, 23(9):644-651.

[23] ANTUNES H P, TEIXO R, CARVALHO J A, et al. Diabetes mellitus and prostate cancer metabolism: Is there a relationship? [J]. Arch Ital Urol Androl, 2018,

- 90(3):184-190.
- [24] BENTER I F, SARKHOU F, Al-KHALDI A T, et al. The dual targeting of EGFR and ErbB2 with the inhibitor Lapatinib corrects high glucose-induced apoptosis and vascular dysfunction by opposing multiple diabetes-induced signaling changes [J]. *J Drug Target*, 2015, 23(6):506-518.
- [25] SUCHAL K, MALIK S, KHAN S I, et al. Molecular Pathways involved in the amelioration of myocardial injury in diabetic rats by kaempferol[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5):1001-1018.
- [26] WU Y, ZHANG Q, ZHANG R. Kaempferol targets estrogen-related receptor alpha and suppresses the angiogenesis of human retinal endothelial cells under high glucose conditions [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6):5576-5582.
- [27] CHEN P, SHI Q, XU X, et al. Quercetin suppresses NF-kappaB and MCP-1 expression in a high glucose-induced human mesangial cell proliferation model[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(1):119-125.
- [28] STRANAHAN A M, HAO S, DEY A, et al. Blood-brain barrier breakdown promotes macrophage infiltration and cognitive impairment in leptin receptor-deficient mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(12):2108-2121.
- [29] TUMMINIA A, VINCIGUERRA F, PARISI M, et al. Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease: role of insulin signalling and therapeutic implications [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11):3306-3323.
- [30] SHI C, WU F, ZHU X C, et al. Incorporation of beta-sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation via estrogen receptor-mediated PI3K/GSK3beta signaling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(3):2538-2544.
- [31] BHUTADA P, MUNDHADA Y, BANSOD K, et al. Ameliorative effect of quercetin on memory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2010, 94(3):293-302.
- [32] SIMO R, CIUDIN A, SIMO-SERVAT O, et al. Cognitive impairment and dementia: a new emerging complication of type 2 diabetes-The diabetologist's perspective[J]. *Acta Diabetol*, 2017, 54(5):417-424.
- [33] W Y, MA J, LIU Z, et al. Effect of naringenin on brain insulin signaling and cognitive functions in ICV-STZ induced dementia model of rats[J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(5):741-751.
- [34] SHLOMAI G, NEEL B, LEROITH D, et al. Type 2 Diabetes mellitus and cancer: the role of pharmacotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(35):4261-4269.

[责任编辑 顾雪竹]