

· 经典名方 ·

白虎加人参汤治疗肥胖症合并2型糖尿病的潜在活性成分及作用机制分析

谭丹妮, 向琴, 俞赞丰, 喻嵘*
(湖南中医药大学 中医学院, 长沙 410208)

[摘要] 目的:通过网络药理学结合体内实验验证,探讨白虎加人参汤治疗肥胖症合并2型糖尿病(T2DM)的潜在活性成分和作用靶点。方法:利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)分析鉴定白虎加人参汤物质基础。在ChEMBL、疗效药靶数据库(TTD)、YaTCM、DisGeNET和中药免疫肿瘤学(TCMIO)等数据库中查询活性成分作用的潜在靶点,并将这些靶点与疾病靶点取交集确定共同靶点。将共同靶点导入STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,通过cytoHubba插件确定hub基因,利用分子对接验证hub基因与白虎加人参汤中生物活性成分的结合能。同时,将共同靶点导入DAVID平台进行基因本体(GO)功能注释及京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。通过动物实验验证预测结果,将18只8周龄雄性骨骼肌胰岛素样生长因子-1受体功能缺失(MKR)小鼠高脂饮食饲养12周,制备肥胖症合并T2DM小鼠模型。随机将小鼠均分为模型组、二甲双胍组($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、白虎加人参汤组(以生药计 $27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),另设6只同龄雄性FVB小鼠作为正常组,各组小鼠给予相应药物灌胃,正常组及模型组灌胃等量蒸馏水,1次/d,连续6周。给药结束后,检测各组小鼠的体质量、Lee's指数、空腹血糖(FBG)、口服糖耐量试验(OGTT),观察附睾白色脂肪组织病理形态,并采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测附睾白色脂肪组织中hub基因mRNA的表达水平。结果:共鉴定出白虎加人参汤200种化合物,其中64种生物活性成分反向匹配到384个靶点,与肥胖症合并T2DM相关的靶点共308个。hub基因包括丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、信号转导与转录激活因子3(STAT3)、MAPK3、白细胞介素(IL)-2、Janus酪氨酸蛋白激酶1(JAK1)、核转录因子- κB p65(RELA)、雌激素受体1(ESR1)、转录因子AP-1(JUN)、MAPK14和淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK)。GO功能注释结果显示,主要富集于细胞内的胞质、胞膜和胞核等成分,且与肽丝氨酸磷酸化、蛋白质磷酸化、炎症反应等重要生物过程密切相关。在KEGG富集分析中,代谢途径、脂质与动脉粥样硬化、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)和MAPK等信号通路被明显富集。分子对接结果显示,hub基因与白虎加人参汤中的槲皮素、异甘草素、桑黄素等10种生物活性成分具有稳定的结合关系。动物实验结果显示,白虎加人参汤能够显著降低肥胖症合并T2DM小鼠的体质量、Lee's指数和FBG水平($P<0.01$),并能够改善附睾白色脂肪组织的病理变化,下调附睾白色脂肪组织中hub基因的mRNA表达($P<0.01$)。结论:该研究通过网络药理学及动物实验验证确定了白虎加人参汤中槲皮素、异甘草素、桑黄素等10种潜在活性成分,可能通过调节代谢途径、脂质与动脉粥样硬化、PI3K/Akt和MAPK等信号通路治疗肥胖症合并T2DM,为其机制与临床研究提供了重要的线索和理论基础。

[关键词] 白虎加人参汤; 2型糖尿病; 肥胖; 胰岛素抵抗; 网络药理学; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS); hub基因

[中图分类号] R22;R587.1;R28;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2024)13-0001-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20240761 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240201.1143.002>

[网络出版日期] 2024-02-01 19:27:30

Analysis of Potential Active Ingredients and Mechanism of Baihu Jia Renshentang in Treatment of Obesity Complicated with Type 2 Diabetes Mellitus

TAN Danni, XIANG Qin, YU Yunfeng, YU Rong*

(School of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[收稿日期] 2023-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金联合基金重点支持项目(U21A20411);国家自然科学基金面上项目(82074400);湖南省重点研发计划项目(2020SK2101);湖南省教育厅创新平台开放基金项目(20K094)

[第一作者] 谭丹妮,在读博士,从事仲景杂病证治及经方基础研究,E-mail:tandanni2023@163.com

[通信作者] *喻嵘,博士,教授,从事中医药防治内分泌疾病研究,E-mail:yurong@21.cn.cn

[Abstract] **Objective:** To investigate the potential active ingredients and targets of Baihu Jia Renshentang(BHJRST) for the treatment of obesity combined with type 2 diabetes mellitus(T2DM) by network pharmacology and *in vivo* experiments. **Method:** Ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS) was used to analyze and identify the material basis of BHJRST. Subsequently, potential targets for the action of the active ingredients were queried in databases such as ChEMBL, Therapeutic Target Database (TTD), YaTCM, DisGeNET and Traditional Chinese Medicine on Immuno-Oncology (TCMIO), and the shared targets were identified by taking the intersection of these targets with disease targets. The shared targets were imported into the STRING database to construct a protein-protein interaction (PPI) network, the hub genes were identified by cytoHubba plug-in, and molecular docking was used to validate the binding energy of the hub genes to the bioactive ingredients in BHJRST. Meanwhile, the shared targets were imported into the DAVID platform for gene ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. The predicted results were subsequently verified by animal experiments. Eighteen 8-week-old male skeletal muscle insulin-like growth factor-1 receptor dysfunction(MKR) mice were induced by a high-fat diet for 12 weeks in order to prepare a mouse model of obesity combined with T2DM. The mice were randomly divided into the model group, metformin group ($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and BHJRST group ($27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in raw material), and another 6 male FVB mice of the same age as the normal group. The mice in each group were given the corresponding drugs by gavage, and the normal and model groups were given the same amount of distilled water by gavage, 1 time/d for 6 consecutive weeks. At the end of administration, the body mass, Lee's index, fasting blood glucose(FBG), oral glucose tolerance test(OGTT) of mice in each group were examined, and the pathological morphology of the white adipose tissue of the epididymis was observed, and the expression of the mRNA of the hub genes in the white adipose tissue of the epididymis was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** A total of 200 bioactive components of BHJRST were identified, of which 64 bioactive components were reverse-matched to 384 targets, and a total of 308 targets were associated with obesity combined with T2DM. Hub genes included mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), MAPK3, interleukin (IL)-2, Janus kinase 1 (JAK1), nuclear transcription factor- κ B p65 (RELA), estrogen receptor 1 (ESR1), transcription factor AP-1 (JUN), MAPK14 and lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK). GO functional annotation showed that it was mainly enriched in cytoplasm, cell membrane and nucleus, and was closely related to important biological processes such as peptide serine phosphorylation, protein phosphorylation and inflammation. In KEGG enrichment analysis, metabolic pathway, lipid and atherosclerosis, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) and MAPK signal pathways were significantly enriched. The molecular docking results showed that the hub genes had a stable binding relationship with 10 bioactive components, including quercetin, isoliquiritigenin, and morin, in BHJRST. The results of animal experiments showed that BHJRST could significantly reduce body mass, Lee's index and FBG levels ($P < 0.01$) in mice with obesity combined with T2DM, improve the pathological changes of white adipose tissue, and down-regulate the mRNA expression of the hub genes in white adipose tissue of the epididymis ($P < 0.01$). **Conclusion:** In this study, 10 potentially active components such as quercetin, isoliquiritigenin, and morin in BHJRST are identified through network pharmacology and animal experiments, and it is possible to treat obesity combined with T2DM by regulating lipid and atherosclerosis, phosphatidylinositol PI3K/Akt and MAPK signal pathways, which provides important clues and theoretical basis for the study of its mechanism and clinical application.

[Keywords] Baihu Jia Renshentang; type 2 diabetes; obesity; insulin resistance; network pharmacology; ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS); hub gene

肥胖症和2型糖尿病(T2DM)是2种相关的代谢性疾病,在全球范围内迅速增长。高患病率和严重并发症使其成为了严重威胁患者健康的问题,同时给公共卫生系统带来了巨大压力^[1]。虽然目前有大量治疗糖尿病的药物可供选择,但这些药物主要用于改善胰岛素的敏感性,而大多数患者仍无法达到最佳血糖控制水平^[2]。此外,单纯的血糖控制还不足以预防长期糖尿病所引发的并发症,如视网膜病变、非酒精性脂肪肝及心脑血管疾病等^[3]。因此,寻找能够有效控制肥胖和缓解T2DM状态的药物具有重要意义。

糖尿病归属于中医学“消渴”“消瘴”“脾瘅”等范畴。气虚、阴虚、膏浊、糖毒等病理因素互为因果,共同构成了T2DM本虚标实、寒热错杂、内邪壅滞等复杂病机^[4]。近年来越来越多的研究表明,一些中医经典名方及中药单体具有良好的降糖作用^[5]。白虎加人参汤作为一首经典名方,出自汉代张仲景的《金匮要略》。《金匮要略·消渴小便不利淋病脉证并治第十三》载“渴欲饮水,口干舌燥者,白虎加人参汤主之”,将白虎加人参汤用于治疗肺胃热盛、津气两伤之证^[6]。白虎加人参汤的功效与T2DM的病机相契合,可能是一种潜在的T2DM治疗策略。此前的研究表明,白虎加人参汤具有抗糖尿病活性,能够显著促进SD大鼠胰岛细胞增殖,降低T2DM小鼠空腹血糖(FBG)浓度^[7]。然而,由于白虎加人参汤配伍结构多样且活性成分复杂,尚不明确其治疗肥胖症合并T2DM的主要活性成分和潜在靶点。

超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)结合网络药理学是一种有效的靶点研究方法,可用于鉴定药物活性成分、辨识药物靶点和途径,揭示中药配方治疗某种疾病的药理机制^[8],全面探究生物活性成分、靶点和疾病之间的相互作用。这项研究将采用UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS和网络药理学结合动物实验的方法进行研究,旨在揭示白虎加人参汤治疗肥胖症合并T2DM的潜在活性成分及作用机制。

1 材料

1.1 仪器 GA-3型血糖仪(湖南三诺生物传感股份有限公司),Pilot10-15S型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),Vanquish型超高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120型高分辨质谱仪/Heraeus Fresco17型离心机(美国赛默飞世尔科技公司),BSA124S-CW型万分之一电子天平(德国赛多

利斯公司),JXFSTPRP-24型研磨仪(上海净信科技有限公司),YM-080S型超声仪(深圳市方奥微电子有限公司),BMJ-A型生物组织包埋机(常州中威电子仪器有限公司),BA410E型三目生物显微镜(中国麦克奥迪实业集团有限公司),Light Cycler480 II型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士Roche集团有限公司)。

1.2 药物与试剂 白虎加人参汤组方为石膏(批号SAO247)、知母(批号202106150)、人参(批号210429)、炙甘草(批号210502)、粳米(批号19041004),饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,经湖南中医药大学药学院吴勇军副教授鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》规定标准。盐酸二甲双胍片(浙江亚太药业股份有限公司,国药准字H33020106,规格0.25 g/片),葡萄糖溶液(湖南科伦制药有限公司,国药准字H20058338,规格20 mL:10 g),TRIzol试剂、SYBR q PCR Master Mix试剂(瑞士Roche集团有限公司,批号分别为T9424、S5193),苏木素染液、伊红染液、中性树胶(北京索莱宝有限公司,批号分别为G1140、G1100、G8590)。

1.3 动物 SPF级雄性骨骼肌胰岛素样生长因子-1受体功能缺失(MKR)小鼠,8周龄,体质量(18±2) g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,实验许可证号SYXK(湘)2019-0009,动物质量合格证号430726210100016261。SPF级雄性FVB小鼠,8周龄,体质量(18±2) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008。所有动物饲养于湖南中医药大学SPF级实验动物中心,置于温度(24±2)℃、相对湿度(50±10)%、12 h/12 h明暗交替的环境。本研究经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会审核批准,批准号ZYFY20201229。高脂饲料含60%脂肪、20%碳水化合物、20%蛋白质,购自江苏省协同生物有限公司,配方编号D12492。

2 方法

2.1 白虎加人参汤生物活性成分分析

2.1.1 白虎加人参汤冻干粉的制备 白虎加人参汤(石膏50 g、知母18 g、炙甘草6 g、粳米9 g、人参9 g),石膏用10倍体积水量浸泡2 h后先煎30 min,与其余药材混合后,加水煎煮2次,头煎50 min,二煎40 min,所加水量为药材质量5倍。所得药液用纱布过滤,合并滤液,于-80℃预冻12 h,放入真空冻干设备进行冻干(-30℃抽真空48 h,30℃

干燥24 h),制得冻干粉(得率33.15%), -20°C 冰箱储存备用。

2.1.2 白虎加人参汤样本提取 称取白虎加人参汤冻干粉100 mg,加入提取液500 μL (纯水,内标质量浓度为10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),涡旋30 s,45 Hz匀浆4 min,冰水浴超声1 h(功率250 W、频率40 kHz); -40°C 静置1 h后,将样本置于 4°C 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径8.6 cm)离心15 min;取上清,经0.22 μm 微孔滤膜过滤; -80°C 储存,待上机检测。

2.1.3 检测条件 色谱条件:ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7 μm),流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱(0~3.5 min,95%~85%A;3.5~6 min,85%~70%A;6~6.5 min,70%A;6.5~12 min,70%~30%A;12~12.5 min,30%A;12.5~18 min,30%~0%A;18~25 min,0%A;25~26 min,0%~95%A;26~30 min,95%A),进样量5 μL ,流速0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),采用多反应监测模式,正、负离子交替模式检测。护套气体流量30 arb,辅助气体流量10 arb,离子传递管温度 350°C ,汽化器温度 350°C ,MS分辨率60 000,MS/MS分辨率15 000,NCE模式下碰撞能量为16/38/42;喷雾电压5.5 kV(ESI^{+})或-4 kV(ESI^{-}),质量范围 m/z 100~1 500。

2.1.4 成分检测 取2.1.2项下样品按2.1.3项下条件检测,采用Xcalibur 2.2软件采集数据,使用Compound Discoverer 3.0软件处理,提取正、负模式的分子量、 mz_{med} 、 rt_{med} 、二级碎片和峰面积的数据矩阵,集成到Compound Discoverer 3.0软件中,将二级质谱数据与 mz_{Vault} 库进行对标,进行化合物表征,并结合文献报道进行比对,提高化合物鉴定的准确性^[9-10]。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 靶点基因收集 以“type 2 diabetes”和“obesity”为关键词在Gene Cards(<https://www.genecards.org/>)中Malacard(<https://www.malacards.org/>)模块查询肥胖症合并T2DM靶点基因。在ChEMBL(<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)、疗效药靶数据库(TTD,<http://db.idrblab.net/ttd/>)、YaTCM(<http://cadd.pharmacy.nankai.edu.cn/yatcm/home>)、DisGeNET(<http://www.disgenet.org>)、中药免疫肿瘤学数据库(TCMIO,<http://http://tcmio.xielab.net>)等数据库查询生物活性成分作用靶点,并根据吸收率和类药性对生物活性成分进行筛选,标准为人服口服吸收比 $\geq 30\%$,类药性 ≥ 0.18 。通过基迪奥生物信

息云平台(<https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/getsoft>)生成韦恩图,获取肥胖症合并T2DM与白虎加人参汤生物活性成分的共享靶基因。

2.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将获取的共享靶基因输入互作基因检索工具数据库(String,<https://www.stringdb.org/>),检索PPI网络互作数据,以TSV文件格式保存,导入cytoscape 3.5.1软件进行可视化,cytoHubba插件确定hub基因。

2.2.3 基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 将获取的共享靶基因导入DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)数据库,进行GO功能注释和KEGG通路富集分析,以错误发现率校正后的 $P<0.05$ 作为阈值,筛选富集条目,并通过基迪奥生物信息云平台(<https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/getsoft>)进行可视化。

2.3 分子对接 蛋白质3D结构从PDB(<https://www.rcsb.org/>)数据库获取。使用PyMOL 2.3.0软件将蛋白质结构中的水分子、无关蛋白链和原配体删除以备对接所用。生物活性成分3D结构文件从Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载并使用Chem3D对其进行分子力场优化,最终获得能量最低状态的最优分子结构。使用Grid板块设置分子对接范围参数,设定对接方式为半柔性对接,对接算法为拉马克遗传算法。运行Auto Dock Vina1.2.0进行分子对接,得到对接结合自由能以及对接结果。

2.4 网络药理学的动物实验验证

2.4.1 药液制备 白虎加人参汤(石膏50 g、知母18 g、炙甘草6 g、粳米9 g、人参9 g),按照2.1.1项下的煎煮方法获取滤液后,减压浓缩至含生药量2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,放置 4°C 冰箱贮存备用。

2.4.2 造模、分组及给药 18只8周龄雄性MKR小鼠,6只同龄雄性FVB小鼠,称取体质量后,给予FVB小鼠普通饮食(正常组),MKR小鼠高脂饮食(造模组),喂养12周后,测量小鼠体质量与体长,计算Lee's指数。随机选取6只正常组小鼠与造模组小鼠的Lee's指数组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),且造模组小鼠 $\text{FBG}\geq 11.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,即表示肥胖症合并T2DM小鼠模型复制成功。Lee's指数=质量(g) $^{1/3}\times 10/\text{体长}(\text{cm})$ ^[11]。按照随机数字表法将模型复制成功的造模组小鼠随机分为模型组、二甲双胍组、白虎加人参汤组,FVB小鼠作为正常组,每组6只。按体表面积等效剂量系数折算,白虎加人参汤小鼠临床等效剂量为13.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以60 kg成人

体质量计),参考本课题组前期量效关系研究基础^[12],白虎加人参汤给予相当于2倍的临床剂量 $27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,二甲双胍组给予 $0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,模型组和正常组给予等体积蒸馏水灌胃,给药体积为 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,1次/d,定时灌胃,持续6周。

2.4.3 样本采集 给药结束后,各组小鼠禁食不禁水12 h过夜,乙醚麻醉,迅速打开腹腔,分离出小鼠附睾白色脂肪组织,立即放入液氮中保存。

2.4.4 一般情况观察 实验过程中测量各组小鼠体质量、体长,观察摄食饮水情况。

2.4.5 FBG检测 75%乙醇消毒小鼠尾静脉,使用一次性采血针快速刺破,从尾根向尾尖挤压按摩采取血液,血糖试纸接触血液,读取血糖值。

2.4.6 口服糖耐量试验(OGTT) 禁食不禁水12 h,给予每只小鼠20%葡萄糖溶液 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,采取小鼠尾静脉血液,用血糖试纸分别检测小鼠灌胃0、30、60、120 min后的血糖值,并计算OGTT时间-血糖曲线的曲线下面积(AUC)。

2.4.7 苏木素-伊红(HE)染色法观察附睾白色脂肪组织病理改变 石蜡包埋切片,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水后,进行HE染色。经75%乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察,使用Image J 1.52软件对脂肪细胞进行图像采集与分析。

2.4.8 Real-time PCR检测附睾白色脂肪组织中hub基因mRNA的表达 按TRIzol试剂盒说明书提取附睾白色脂肪组织总RNA,在260 nm与280 nm处测其吸光度 A ,计算总RNA浓度和纯度,以组织总RNA为模板进行逆转录为cDNA。采用Real-time PCR检测丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1)、信号转导与转录调控因子3(STAT3)、MAPK3、白细胞介素-2(IL-2)、Janus激酶1(JAK1)、细胞核转录因子- κ B p65(RELA)、雌激素受体1(ESR1)、转录因子AP-1(JUN)、MAPK14和淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK)的mRNA表达水平,具体扩增程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min、 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性20 s、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火20 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共40个循环,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量方法计算。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,引物由北京擎科生物科技合成,序列见表1。

2.5 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,计量资料结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。满足正态性者,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用最小明显性差异法检验;不满足正态性资料用Kruskal-Wallis秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
MAPK1	上游GGTTGTTCCCAAATGCTGACT	84
	下游CAACTTCAATCCTCTTGTGAGGG	
STAT3	上游CAATACCATTGACCTGCCGAT	109
	下游GAGCGACTCAAACTGCCCT	
MAPK3	上游AGTCTCTGCCCTCGAAAACCA	124
	下游TCCTCTACTGTGATGCGCTTG	
IL-2	上游GAAACTCCCCAGGATGCTCA	99
	下游CGCAGAGGTCCAAGTTCATCT	
JAK1	上游GAGCTGCACCGACTTTGACAAC	118
	下游GTAGCGGCCCTTCTGTACCTCA	
RELA	上游TAGCCAGCGAATCCAGACCAACA	115
	下游TGGGTCCCGCACTGTCACCT	
ESR1	上游AGACGCTCTTGAACCAGCAG	121
	下游GAGGCTTTGGTGTGAAGGGT	
JUN	上游CGACCTTCTACGACGATGCCCTCA	112
	下游TCGCCCAGGTTCAAGGTCATGCT	
MAPK14	上游CTCATTAACAGGATGCCAAGCC	131
	下游AGCATCTTCTCCAGTAGGTCTG	
LCK	上游TGACGATCTCGGGGATCATGG	230
	下游ACTGTGCAGGGCGATAACC	
GAPDH	上游GCGACTTCAACAGCAACTCCC	122
	下游CACCTGTTGCTGTAGCCGTA	

3 结果

3.1 白虎加人参汤的生物活性成分及作用靶点

按照2.1.3项下检测条件对白虎加人参汤冻干粉进行检测,得到中药提取物正、负离子流图,见增强出版附加材料。通过对采集到的质谱数据进行结构表征,共鉴定出200种生物活性成分,包括黄酮类(53)、萜类(38)、酚类(28)、苯丙素类(27)、生物碱(24)、氨基酸衍生物(7)、脂肪酰类(5)、有机酸及其衍生物(5)及其他类化合物(13),见增强出版附加材料。对化合物进行靶点反向匹配,获得共计64种生物活性成分所对应的384个靶点。在这些靶点中,匹配数最多的前10种生物活性成分分别是槲皮素(203)、异甘草素(60)、桑黄素(54)、鹰嘴豆芽素A(54)、金合欢素(47)、 α -亚麻酸(43)、苏木素(38)、芒柄花黄素(33)、氧化白藜芦醇(30)和氧海罂粟碱(27),见表2。结果表明,上述成分可能在治疗肥胖症合并T2DM的白虎加人参汤中发挥着主导作用。

3.2 网络药理学分析

3.2.1 白虎加人参汤治疗肥胖症合并T2DM的生物活性成分及hub基因 将上述获取的靶点与来自

表2 白虎加人参汤“top10生物活性成分-靶点”匹配信息
Table 2 Matching information of top10 bioactive ingredients-targets of Baihu Jia Renshentang(BHJRST)

序号	化合物	人体口服吸收比/%	类药性	靶点数
1	槲皮素	52.23	0.27	203
2	异甘草素	79.07	0.22	60
3	桑黄素	53.80	0.27	54
4	鹰嘴豆芽素A	90.58	0.30	54
5	金合欢素	87.64	0.30	47
6	α -亚麻酸	87.30	0.46	43
7	苏木素	61.51	0.32	38
8	芒柄花黄素	100.00	0.26	33
9	氧化白藜芦醇	70.52	0.19	30
10	氧海罂粟碱	100.00	0.57	27

Gene Card 数据库的肥胖症合并 T2DM 疾病靶点进行交叉,得到 308 个共同靶点。构建的靶基因 PPI 网络包含 308 个节点和 5 856 条边,平均度值为 37.08,蓝色和红色分别代表最高和最低节度值。cytoHubba 插件筛选出 MAPK1、STAT3、MAPK3、IL-2、JAK1、RELA、ESR1、JUN、MAPK14 和 LCK 等 10 个 hub 基因,其构建的 PPI 网络含有 45 条边。构建的“top10 生物活性成分-作用靶点”互作网络,包含 282 个节点和 589 条边,表明白虎加人参汤前 10 种生物活性成分可以作用于 282 个靶点,占总共同靶点数的 91.56%。根据软件桥接功能可以获取每个生物活性成分和靶基因的作用关系,如鹰嘴豆芽素 A、金合欢素、 α -亚麻酸和芒柄花黄素与 MAPK1、STAT1、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 等靶点有较密切的联系,见增强出版附加材料。

3.2.2 白虎加人参汤治疗肥胖症合并 T2DM 的 GO 功能注释和 KEGG 富集分析 GO 功能注释共富集到 596 个条目,包括 289 个生物过程条目,107 个细胞成分条目,以及 200 个分子功能条目。在生物学过程(BP)中,肽丝氨酸磷酸化、蛋白质磷酸化、炎症反应、细胞凋亡和信号转导等过程被显著富集;在

细胞组分(CC)中,胞质、胞膜和胞核等成分被显著富集;在分子功能(MF)中,蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、ATP 结合和蛋白质结合等功能被显著富集。KEGG 分析共富集到 186 条通路。在这些丰富的通路中,代谢途径、脂质与动脉粥样硬化、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)和 MAPK 等途径被显著富集。结果表明,白虎加人参汤缓解肥胖症合并 T2DM 的作用可能与调控炎症反应和糖脂代谢密切相关。

3.3 分子对接验证 对 3.2.1 中 top10 生物活性成分和 hub 靶基因蛋白进行 100 次分子对接。当结合能 $<0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时 ($1 \text{ kcal}\approx 4.186 \text{ kJ}$),表示受体与配体可以自发地结合而无需外部能量,当结合能 $<-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时,说明结合情况优异,结合能 $<-7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 则表示结合作用强烈。对接结果显示,鹰嘴豆芽素 A 与 ESR1 蛋白、苏木素与 IL-2 蛋白、氧海罂粟碱与 JAK1 和 MAPK3 蛋白、芒柄花黄素与 JUN 蛋白、槲皮素与 LCK、MAPK1 和 RELA 蛋白、异甘草素与 MAPK14 蛋白、桑黄素与 STAT3 蛋白之间的作用力类型丰富且数量可观,结合能均 $<-6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,说明上述生物活性成分与蛋白的结合作用强烈,两者的结合很有可能发挥相应的药效作用,见增强出版附加材料。

3.4 动物实验验证

3.4.1 高脂饮食对 MKR 小鼠体质量、Lee's 指数和 FBG 的影响 高脂饮食干预 12 周后,与正常组比较,造模组小鼠体质量从第 4 周开始显著增加 ($P<0.01$); Lee's 指数也相应增高 ($P<0.01$)。在第 12 周,与正常组比较,造模组 MKR 小鼠的 FBG 值显著升高 ($P<0.01$)。结果表明,长期高脂饮食干预 MKR 小鼠,可以成功复制肥胖症合并 T2DM 疾病模型。见表 3。

3.4.2 白虎加人参汤对肥胖症合并 T2DM 小鼠体质量、Lee's 指数和 FBG 的影响 与正常组比较,模型组小鼠体质量、Lee's 指数和 FBG 显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较,给药组小鼠的体质量在治疗 6 周后显著下降 ($P<0.01$),Lee's 指数也相应减

表3 高脂饮食对 MKR 小鼠体质量、Lee's 指数和 FBG 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Effect of high-fat diet on body mass, Lee's index and FBG in MKR mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体质量/g				Lee's 指数	FBG/mm $\text{ol}\cdot\text{L}^{-1}$
	喂养 0 周	喂养 4 周	喂养 8 周	喂养 12 周		
正常组	19.97 $\pm$ 0.48	21.10 $\pm$ 0.92	22.63 $\pm$ 1.03	22.50 $\pm$ 0.76	3.09 $\pm$ 0.06	4.00 $\pm$ 0.63
造模组	19.97 $\pm$ 0.50	23.13 $\pm$ 0.82 ¹⁾	28.35 $\pm$ 1.40 ¹⁾	32.23 $\pm$ 1.72 ¹⁾	3.37 $\pm$ 0.08 ¹⁾	15.62 $\pm$ 2.35 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$

小($P<0.05$, $P<0.01$), FBG 水平显著降低($P<0.01$), 但白虎加人参汤下降幅度不及二甲双胍。见表4。

表4 白虎加人参汤对肥胖症合并 T2DM 小鼠体重、Lee's 指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 4 Effect of BHJRST on body mass and Lee's index in mice with obesity combined with T2DM ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	体重/g				Lee's 指数	FBG / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
		治疗前	治疗2周	治疗4周	治疗6周		
正常组		22.50±0.76	21.53±1.70	20.93±1.17	19.30±0.81	2.89±0.03	5.02±1.01
模型组		30.62±2.17 ¹⁾	31.80±2.65 ¹⁾	30.72±3.30 ¹⁾	30.70±3.54 ¹⁾	3.31±0.14 ¹⁾	17.85±3.96 ¹⁾
二甲双胍组	0.2	32.45±1.98	29.48±1.27 ²⁾	27.57±1.44 ²⁾	25.42±1.51 ³⁾	3.04±0.11 ³⁾	7.48±0.82 ³⁾
白虎加人参汤组	27	33.48±2.34	30.12±1.00	28.28±1.75	26.93±1.07 ³⁾	3.16±0.07 ²⁾	8.77±1.16 ³⁾

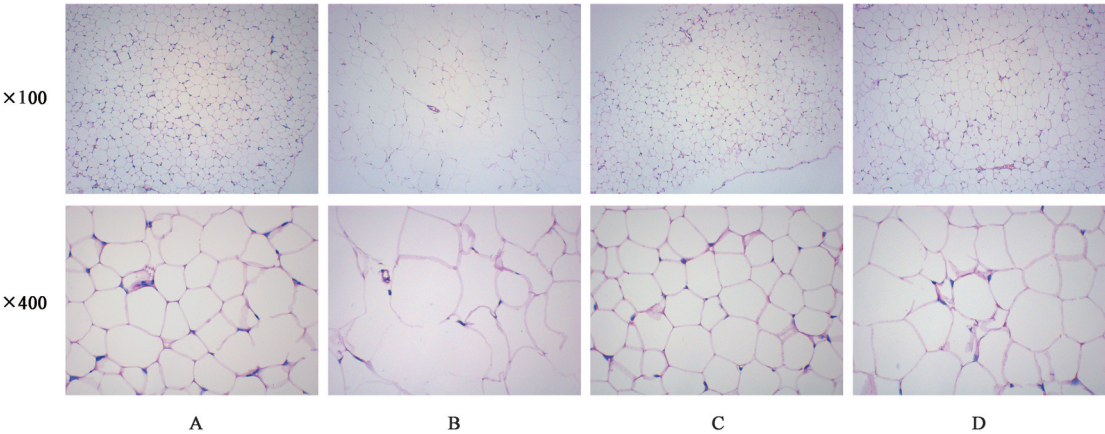
注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ (表5-表6同)

3.4.3 白虎加人参汤对肥胖症合并 T2DM 小鼠 OGTT 的影响 各组小鼠经葡萄糖灌胃后,血糖浓度持续升高。与正常组比较,模型组小鼠在葡萄糖溶液灌胃 30 min 后,血糖浓度达到峰值,并且 OGTT-AUC 显著增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,二甲双胍组和白虎加人参汤组小鼠在葡萄糖溶液灌胃后 30~60 min,其血糖浓度达到峰值,且显著低于模型组小鼠的血糖峰值($P<0.01$);在灌胃后的 120 min 内,给药组的血糖浓度和 OGTT-AUC 均显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),表明白虎加人参汤可以抑制小鼠口服葡萄糖负荷后的血糖上升。见表5。

表5 白虎加人参汤对肥胖症合并 T2DM 小鼠 OGTT 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 5 Effect of BHJRST on OGTT in mice with obesity combined with T2DM ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	FBG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$				OGTT-AUC / $\text{mmol}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$
		0 min	30 min	60 min	120 min	
正常组		4.52±0.70	7.23±0.89	5.97±1.42	3.47±0.51	10.95±1.77
模型组		15.37±4.00 ¹⁾	22.97±4.98 ¹⁾	22.07±2.90 ¹⁾	19.90±5.01 ¹⁾	41.83±7.38 ¹⁾
二甲双胍组	0.2	6.60±1.58 ³⁾	14.62±3.01 ³⁾	14.47±3.28 ³⁾	9.12±1.64 ³⁾	24.37±3.55 ³⁾
白虎加人参汤组	27	8.22±0.79 ³⁾	15.13±3.43 ³⁾	15.50±3.79 ³⁾	11.33±1.70 ³⁾	26.91±5.22 ³⁾

3.4.4 白虎加人参汤对肥胖症合并 T2DM 小鼠白色脂肪组织病理的影响 正常组小鼠的脂肪细胞结构清晰,大小均匀。与正常组比较,模型组脂肪细胞结构混乱,大小不一,存在细胞内脂质溢出和细胞膜破裂现象,细胞个数减少,平均面积约为正常组的 2.6 倍;与模型组比较,白虎加人参汤组和二甲双胍组的小鼠白色脂肪组织未出现明显的脂肪细胞膜破裂和细胞内脂质溢出,结构较为完整,脂肪细胞平均面积的增加被逆转($P<0.01$),但白虎加人参汤的效果不及二甲双胍。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.二甲双胍组;D.白虎加人参汤组

图1 白虎加人参汤对肥胖症合并 T2DM 小鼠白色脂肪组织病理的影响 (HE)
Fig. 1 Effect of BHJRST on white adipose tissue pathology in mice with obesity combined with T2DM (HE)

3.4.5 白虎加人参汤对肥胖症合并 T2DM 小鼠白色脂肪组织 hub 基因 mRNA 水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠各 hub 基因 mRNA 的相对表达水

平均显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,白虎加人参汤组小鼠各 hub 基因 mRNA 的表达水平均显著下降($P<0.01$)。见表 6。

表 6 白虎加人参汤对肥胖症合并 T2DM 小鼠白色脂肪组织 hub 基因 mRNA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of BHJRST on mRNA levels of hub genes in epididymal white adipose tissue of mice with obesity combined with T2DM ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MAPK1	MAPK3	MAPK14	STAT3	JUN
正常组		1.12±0.30	0.97±0.16	1.17±0.23	1.00±0.21	0.85±0.14
模型组		10.87±0.88 ¹⁾	9.25±0.72 ¹⁾	10.35±0.92 ¹⁾	10.84±0.78 ¹⁾	6.73±0.55 ¹⁾
二甲双胍组	0.2	4.88±1.86 ³⁾	4.99±0.62 ³⁾	5.19±0.70 ³⁾	5.36±1.49 ³⁾	3.83±0.76 ³⁾
白虎加人参汤组	27	5.69±0.79 ³⁾	5.00±1.31 ³⁾	5.90±0.83 ³⁾	5.92±1.06 ³⁾	4.13±0.94 ³⁾

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JAK1	RELA	IL-2	LCK	ERS1
正常组		1.18±0.55	1.30±0.28	1.12±0.10	1.13±0.27	1.12±0.17
模型组		8.20±1.43 ¹⁾	9.24±0.89 ¹⁾	16.35±1.97 ¹⁾	7.63±0.76 ¹⁾	9.98±1.12 ¹⁾
二甲双胍组	0.2	3.85±0.72 ³⁾	5.45±0.16 ³⁾	9.83±0.87 ³⁾	4.43±0.37 ³⁾	5.56±1.47 ³⁾
白虎加人参汤组	27	4.60±0.88 ³⁾	4.64±1.49 ³⁾	7.18±1.35 ³⁾	4.97±0.88 ³⁾	4.96±0.19 ³⁾

4 讨论

本研究发现,白虎加人参汤中有 64 种生物活性成分与肥胖症合并 T2DM 密切相关,主要包括槲皮素、异甘草素、桑黄素、鹰嘴豆芽素 A、金合欢素、 α -亚麻酸、苏木素、芒柄花黄素、氧化白藜芦醇和氧海罂粟碱等。其中,槲皮素、异甘草素、金合欢素、桑黄素、鹰嘴豆芽素 A、 α -亚麻酸被报道与糖代谢调控有关。适量槲皮素被认为具有抑制胰腺铁沉积和胰岛 β 细胞铁死亡及抗氧化和抗炎的作用,是治疗糖尿病及其并发症的潜在化合物^[13]。异甘草素也被报道为一类对糖尿病有显著抗糖作用的黄酮类化合物,其主要通过激活磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) 和抑制哺乳动物雷帕霉素 C1 靶点调控多重葡萄糖相关代谢过程的平衡动态^[14]。金合欢素可以通过增加细胞质中的游离钙,介导钙调素依赖蛋白激酶 II (CaMK II)、AMPK 和蛋白激酶 C α (PKC α) 的磷酸化,以及促进葡萄糖转运蛋白 4 向细胞表面易位增加,从而提升 L6 肌细胞葡萄糖摄取能力^[15]。桑黄素,作为一种有效的抗氧化剂,可以通过激活核因子 E₂ 相关因子 2 (Nrf2)/抗氧化反应元件 (ARE) 途径,减轻氧化应激诱导的胰岛 β 细胞 DNA 损伤,提升葡萄糖刺激下的胰岛素分泌水平^[16]。此外,该化合物还具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制作用^[17]。研究显示,鹰嘴豆芽素 A 能调节肾小管上皮细胞核转录因子- κ B (NF- κ B)/NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 轴的凋亡级联反应,使糖尿病大鼠恢复糖化血红蛋白和糖代谢酶活性,并对糖尿病肾病有一定的预防作用^[18-19]。血清 α -亚麻酸与糖耐量异常人群的 FBG 和葡萄糖负荷后的血糖值呈负相关^[20],还

参与调节奶牛脂肪组织胰岛素敏感性及血浆 IL-6、IL-17 α 的浓度^[21]。此外,芒柄花素和氧海罂粟碱也被报道与肥胖症合并 T2DM 存在着一些潜在联系。芒柄花素对糖尿病肾纤维化具有抑制作用,且与沉默调节蛋白 1 (SIRT1) 表达及 Nrf2/ARE 通路的激活密切相关^[22]。氧海罂粟碱是植物生物碱蓝谷氨酸的衍生物,被证实是一种钙通道阻滞剂,具有强大的抗炎作用,能够抑制 Toll 样受体介导急慢性炎症反应^[23-24]。由此证明,白虎加人参汤含有多种缓解肥胖症合并 T2DM 的药效物质基础。

GO 功能注释和 KEGG 富集结果提示,多数靶点在代谢途径、MAPK 和 PI3K/Akt 等信号通路中富集,网络拓扑分析进一步发现 MAPK1、MAPK14、MAPK3、RELA、JAK1、STAT3、JUN、LCK、ESR1、IL-2 等是上述信号通路中的枢纽分子。由此推测,白虎加人参汤可能通过调控上述枢纽分子在脂肪细胞中的表达,发挥抗肥胖和糖尿病作用,而这一假设在体内实验中得到验证。既往研究指出,来自 Akt、蛋白激酶 C ζ (PKC ζ)、P70 核糖体蛋白 S6 激酶与 MAPK 级联得到的负反馈信息,会导致丝氨酸的磷酸化和胰岛素受体信号通路的失活,从而影响糖酵解^[25-26]。同样,也有研究证实,JNK、细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 和 p38 MAPK 是炎症引发胰岛素抵抗的核心介质^[27]。而本研究发现,槲皮素、异甘草素和氧海罂粟碱与 MAPK1、MAPK14 和 MAPK3 之间存在着良好的结合关系,且在高脂饮食诱导的肥胖症合并 T2DM 小鼠模型中,MAPK1、MAPK14 和 MAPK3 的表达均上调,而白虎加人参汤则能显著降低其表达。由此证实了抑制 MAPK

信号过度活化是缓解肥胖症合并T2DM小鼠糖代谢紊乱和炎症表现的关键通路。此外,有研究指出,NF- κ B可以通过NF- κ B抑制因子激酶(IKK)介导的胰岛素受体底物1或胰岛素受体丝氨酸的磷酸化,从而抑制酪氨酸磷酸化和下游信号转导,参与胰岛素抵抗^[28]。RELA作为NF- κ B家族的重要成员,翻译后可精准调控NF- κ B转录活性,而该分子在肥胖症合并T2DM小鼠的白色脂肪组织中表现出增强活性,且与白虎加人参汤中的槲皮素强烈结合。另外,JAK/STAT轴的激活可诱导蚊皮激素基因L2与果蝇胰岛素样肽竞争结合胰岛素受体^[29]。而在肥胖症和T2DM中,JAK/STAT轴的级联主要对STAT1、STAT3和STAT5蛋白分子起作用^[30],并通过激活信号传导抑制因子3以诱导胰岛素抵抗和炎症反应^[31]。这也与本研究结果一致,在肥胖症合并T2DM小鼠中,白虎加人参汤显著逆转了JAK1和STAT3 mRNA的转录水平,并能与其活性成分氧海罂粟碱和桑黄素稳定结合。由此可见,白虎加人参汤可能通过多靶点、多途径来缓解肥胖症合并T2DM。

综上所述,白虎加人参汤中含有槲皮素、异甘草素、桑黄素、鹰嘴豆芽素A、金合欢素、 α -亚麻酸、苏木素、芒柄花黄素、氧化白藜芦醇和氧海罂粟碱等多种药效物质成分,并通过调控MAPK1、STAT3、MAPK3、IL-2、JAK1、RELA、ESR1、JUN、MAPK14和LCK等多靶点,发挥抗肥胖症合并T2DM的作用,为进一步探索白虎加人参汤的治疗机制提供了重要的线索和理论基础。然而,本研究仍存在一定局限性,白虎加人参汤对肥胖症合并T2DM疗效背后的确切机制仍未得到验证,这将是课题组后续研究的重点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] PILLON N J, LOOS R, MARSHALL S M, et al. Metabolic consequences of obesity and type 2 diabetes: Balancing genes and environment for personalized care[J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1530-1544.
- [2] LIPSKA K J, KRUMHOLZ H, SOONES T, et al. Polypharmacy in the aging patient: A review of glycemic control in older adults with type 2 diabetes[J]. *JAMA*, 2016, 315(10): 1034-1045.
- [3] GREGG E W, SATTAR N, ALI M K. The changing face of diabetes complications[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016, 4(6): 537-547.
- [4] 喻嵘. 紧扣糖尿病病机辨病辨证结合诊治[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(3): 267-269.
- [5] 侯金丽, 王萍, 张彦琼, 等. 基于数据挖掘和整合药理学的马齿苋治疗糖尿病的处方发现及分子机制探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(24): 1-10.
- [6] 范永升, 姜德友. 金匱要略[M]. 5版. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 573.
- [7] 杨金伟, 马志辉, 赵灿, 等. 白虎加人参汤含药血浆对高糖环境下SD大鼠胰岛细胞增殖、凋亡及氧化应激水平的影响[J]. *中医杂志*, 2019, 60(22): 1951-1956.
- [8] WU J, ZHENG S, ZHANG F, et al. Qualitative analysis of drug-containing plasma and its application to quantitative analysis and pharmacokinetic study of Zexie decoction using UPLC-MS/MS[J]. *Front Chem*, 2022, 10: 815886.
- [9] FU S, CHENG R, DENG Z, et al. Qualitative analysis of chemical components in Lianhua Qingwen capsule by HPLC-Q Exactive-Orbitrap-MS coupled with GC-MS[J]. *J Pharm Anal*, 2021, 11(6): 709-716.
- [10] 林丽华, 孟晓伟, 李家荣, 等. 基于血清药物化学和网络药理学的泽漆抗慢阻肺药效物质基础分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(14): 150-156.
- [11] BERNARDIS L L, PATTERSON B D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions[J]. *J Endocrinol*, 1968, 40(4): 527-528.
- [12] 刘旭, 钟国威, 刘天晟, 等. 白虎加人参汤对MKR转基因2型糖尿病小鼠创面感染的作用[J]. *中草药*, 2022, 53(10): 3032-3043.
- [13] LI D, JIANG C, MEI G, et al. Quercetin alleviates ferroptosis of pancreatic β cells in type 2 diabetes[J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 2954.
- [14] YANG L, WANG D, ZHANG Z, et al. Isoliquiritigenin alleviates diabetic symptoms via activating AMPK and inhibiting mTORC1 signaling in diet-induced diabetic mice[J]. *Phytomedicine*, 2022, 98: 153950.
- [15] KWON E B, KANG M J, RYU H W, et al. Acacetin enhances glucose uptake through insulin-independent GLUT4 translocation in L6 myotubes [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153178.
- [16] VANITHA P, SENTHILKUMAR S, DORNADULA S, et al. Morin activates the Nrf2-ARE pathway and reduces oxidative stress-induced DNA damage in pancreatic beta cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 801: 9-18.
- [17] ZENG L, ZHANG G, LIAO Y, et al. Inhibitory mechanism of morin on α -glucosidase and its anti-glycation properties[J]. *Food Funct*, 2016, 7(9): 3953-

- 3963.
- [18] RAM C, GAIROLA S, VERMA S, et al. Biochanin A ameliorates nephropathy in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats: Effects on NF- κ B/NLRP3 axis, pyroptosis, and fibrosis [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(5):1052.
- [19] HARINI R, EZHUMALAI M, PUGALENDI K V. Antihyperglycemic effect of biochanin A, a soy isoflavone, on streptozotocin-diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 676(1/3):89-94.
- [20] CABOUT M, ALSSEMA M, NIJPELS G, et al. Circulating linoleic acid and alpha-linolenic acid and glucose metabolism: the Hoorn Study [J]. *Eur J Nutr*, 2017, 56(6):2171-2180.
- [21] KRA G, DADDAM J R, MOALLEM U, et al. Alpha-linolenic acid modulates systemic and adipose tissue-specific insulin sensitivity, inflammation, and the endocannabinoid system in dairy cows [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):5280.
- [22] ZHUANG K, JIANG X, LIU R, et al. Formononetin activates the Nrf2/ARE signaling pathway via Sirt1 to improve diabetic renal fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:616378.
- [23] ZHONG G, LONG H, CHEN F, et al. Oxoglucine mediates Ca^{2+} influx and activates autophagy to alleviate osteoarthritis through the TRPV5/calmodulin/CAMK- II pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(15):2931-2947.
- [24] REMICHKOVA M, DIMITROVA P, PHILIPOV S, et al. Toll-like receptor-mediated anti-inflammatory action of glaucine and oxoglucine [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(7):411-414.
- [25] YUAN Y, FAN S, SHU L, et al. Exploration the mechanism of doxorubicin-induced heart failure in rats by integration of proteomics and metabolomics data [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11(12):600561.
- [26] 高佳馨, 王建波, 薛亚楠, 等. 基于 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路探讨七味白术散对糖尿病脑病大鼠认知功能障碍的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(3):10-17.
- [27] PAL M, FEBBRAIO M A, LANCASTER G I. The roles of c-Jun NH₂-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance [J]. *J Physiol*, 2016, 594(2):267-279.
- [28] XU M, XUE H, KONG L, et al. Smilax china L. Polyphenols improves insulin resistance and obesity in high-fat diet-induced mice through IRS/Akt-AMPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2023, 78(2):299-306.
- [29] MENG Q, XU Y, LI Y, et al. Novel studies on *Drosophila melanogaster* model reveal the roles of JNK-Jak/STAT axis and intestinal microbiota in insulin resistance [J]. *J Drug Target*, 2023, 31(3):261-268.
- [30] MYERS M G, LEIBEL R L, SEELEY R J, et al. Obesity and leptin resistance: Distinguishing cause from effect [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(11):643-651.
- [31] ASHMAWY A I, EL-ABHAR H S, ABDALLAH D M, et al. Chloroquine modulates the sulforaphane anti-obesity mechanisms in a high-fat diet model: Role of JAK-2/STAT-3/SOCS-3 pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 927:175066.

[责任编辑 李嘉麟]