

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学探讨加味桃核承气汤治疗 2 型糖尿病的作用机制

许强¹, 黄宏羽¹, 郑美思¹, 朱章志^{2*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510006;
2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] **目的:** 基于网络药理学方法研究加味桃核承气汤干预 2 型糖尿病的潜在作用靶点。**方法:** 基于 TCMSp 数据库及 Uniprot 数据库筛选出加味桃核承气汤有效成分及靶点基因。通过 GeneCards 数据库及 OMIM 数据库筛选出 2 型糖尿病的靶点基因,并用 Cytoscape 软件构建“活性成分-靶点”相互作用网络图。将有效成分靶标与疾病靶标上传到 STRING 数据库,构建蛋白互作网络图(PPI),并计算其特征值,使用 R 语言对得到的 PPI 进行核心基因的筛选。最后,运用 R 语言对关键靶点进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。**结果:** 预测得到加味桃核承气汤治疗 2 型糖尿病的有效成分 155 个及共作有效靶点 106 个。有效成分中度值较高的为槲皮素(querعتin),山柰酚(kaempferol)及异鼠李素(isorhamnetin),作用靶点中度值较高的为雌激素受体(ESR1),过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPARG)与雄激素受体(AR)。PPI 网络中核心基因为表皮生长因子受体(EGFR)及 ESR1 等;GO 富集分析显示会影响基因的转录、核受体活性及激素的受体结合、神经递质等;KEGG 通路富集分析显示流体剪切应力和动脉粥样硬化通路为显著性最高的通路,其次为晚期糖基化终末产物及其受体通路。**结论:** 通过网络药理学的方法预测加味桃核承气汤防治 2 型糖尿病的关键作用靶点及相关通路,结果提示此方剂具有多靶点、多通路等复杂机制,不仅表明加味桃核承气汤具有降糖的作用,而且其还具有抗炎、改善胰岛素抵抗、调节脂代谢等生物学功能。

[关键词] 加味桃核承气汤; 2 型糖尿病; 网络药理学; 潜在靶点

[中图分类号] R2-0;R289;R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0166-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192141

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190717.1705.014.html>

[网络出版时间] 2019-07-18 15:51

Mechanism of Modified Taohe Chengqitang in Treating Type 2 Diabetes Mellitus Based on Network Pharmacology

XU Qiang¹, HUANG Hong-yu¹, ZHENG Mei-si¹, ZHU Zhang-zhi^{2*}

(1. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To study the potential therapeutic targets of modified Taohe Chengqitang for type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology. **Method:** Based on TCMSp database and Uniprot database, the active constituents and target genes of flavored modified Taohe Chengqitang were screened. Target genes of type 2 diabetes were screened by gene cards database and OMIM database, and Cytoscape software was used to construct "active component-target" interaction network diagram. The active component targets and disease targets were uploaded to the STRING database, the protein interaction network map (PPI) was constructed, and the

[收稿日期] 20190608(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873190)

[第一作者] 许强,在读博士,从事六经辨治内分泌疾病研究,E-mail:20183101196@stu.gzucm.edu.cn

[通信作者] *朱章志,博士生导师,主任医师,从事中医药治疗内分泌疾病研究,E-mail:zhuangzi@vip.sina.com

characteristic values were calculated, and core genes were screened by using R language. Finally, R language was used to analyze gene ontology (GO) enrichment and kyoto encyclopedia of genes and genome (KEGG) pathway enrichment of key targets. **Result:** The 155 active components and 106 effective targets of modified Taohe Chengqitang in the treatment of type 2 diabetes were predicted. Quercetin, kaempferol and isorhamnetin were the most effective components, while estrogen receptor alpha (ESR1), peroxisomal hyperplasia activates receptor gamma (PPARG) and androgen receptor (AR) were the most effective components. Core genes in PPI network are epidermal growth factor receptor (EGFR) and ESR1, etc. GO enrichment analysis shows that it can affect gene transcription, nuclear receptor activity, hormone receptor binding, neurotransmitter, etc. Enrichment analysis of KEGG pathway showed that fluid shear stress and atherosclerosis pathways were the most significant pathways, followed by advanced glycation end products-receptor for AGE (AGE-RAGE) pathway. **Conclusion:** Predicted by the method of network pharmacology modified Taohe Chengqitang key targets for prevention and treatment of type 2 diabetes and related pathways, results suggest the recipe has multiple targets, multiple pathways, such as complex mechanism, not only show that modified Taohe Chengqitang has hypoglycemic effect, but it also has anti-inflammatory, improve insulin resistance, regulate lipid metabolism, and biological functions.

[**Key words**] modified Taohe Chengqitang; type 2 diabetes; network pharmacology; potential targets

2 型糖尿病 (T2DM) 是具有遗传倾向, 以血糖偏高为基本特征的代谢性疾病, 其发病率逐年增高, 病程长且容易引发多种并发症。其发病机制是由胰岛 β 细胞功能缺陷导致胰岛素分泌减少或者胰岛素调控葡萄糖代谢能力下降, 即胰岛素抵抗而引起的糖、脂、蛋白代谢异常, 以高血糖为主要特征的代谢性-内分泌疾病^[1-2]。现代医学治疗 T2DM 主要包括口服传统的降糖药物、注射胰岛素、配合运动锻炼及控制饮食, 但却不能从根本上治愈 T2DM 及其并发症。因此, 探寻 T2DM 的有效靶点并对其进行干预, 是医学研究的重要课题之一。与现代医学相比, 中医复方具有多靶点、多通路等治疗特点, 在治疗 T2DM 及其并发症时具有独特的优势。

在 20 世纪 80 年代, 由广州中医药大学伤寒教研室熊曼琪教授带领其团队研制出院内降糖制剂一降糖三黄片, 其组成由桃核承气汤加减而来。《伤寒论》106 条: “太阳病不解, 热结膀胱……尚未可攻, 当先解其外, 外解已, 但少腹急结者, 乃可攻之, 宜桃核承气汤”, 该方主要用于下焦蓄血之证, 具有逐瘀泻热之功效。加味桃核承气汤则是以气阴两虚、瘀热互结为病机, 在桃核承气汤的基础之上加味而成。其中包括原方有的桃仁、大黄、桂枝、炙甘草、芒硝之外, 还增加了黄芪、生地黄、玄参等。黄芪能够补中益气, 生地黄能够清热养阴、补肾水, 玄参则滋阴泻火, 全方紧扣糖尿病的基本病机。经多年临床的使用及动物实验研究表明, 加味桃核承气汤临床效果显著, 不仅能改善 T2DM 而且能防治多种并发症^[3-4]。在降糖方面, 熊曼琪等^[5]通过临床试验

和体内实验发现, 加味桃核承气汤在临床上的总有效率与西药组相当, 但是降糖幅度和症状改善则较西药组较优, 且不具肝肾损伤, 并且通过动物实验发现, 加味桃核承气汤具有促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素、抑制胰高血糖素及加快肝糖原合成的作用; 在防治并发症方面, 加味桃核承气汤能保护糖尿病大鼠心肌细胞^[6], 改善血管内皮功能、防治糖尿病大血管病变^[7-8]。此外, 加味桃核承气汤还可改善糖尿病肾病、抗糖尿病大鼠的肝脂氧化等^[9-10]。总之, 加味桃核承气汤虽然脱出于经典之方, 但多年实践发现其疗效却不亚于经典之方, 这也体现了中医人不墨守成规, 敢于“常”中“变”的创新精神。

由于中药是多靶点协同作用, 具有很强的系统及整体性, 虽然前期以证实加味桃核承气汤对 T2DM 具有良好的疗效, 但尚缺乏系统性的研究, 而网络药理学的发展则为中药复方提供了探求其整体机制的可能。网络药理学是在“药物-成分-靶点-疾病”相互作用网络的基础上, 通过系统综合地观察药物与疾病间的关联性, 并能够揭示多分子药物协同作用的特点^[11]。因此, 本研究运用网络药理学的方法分析加味桃核承气汤治疗 T2DM 的作用靶点及相关信号通路, 并结合前期临床及实验研究, 进一步阐释加味桃核承气汤防治 T2DM 的作用机制, 发挥中医药的优势, 对现代医学治疗糖尿病起到优势互补的作用; 其次, 探索加味桃核承气汤未被发现的潜在作用靶点, 扩展其适用范围, 为后续研究加味桃核承气汤防治 T2DM 提供新的研究思路及方向。

1 材料与方法

1.1 材料 TCMSp 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>), GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>), STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org>), OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>), Cytoscape 3.7.1 软件, R 3.5.3 软件, Perl 语言及 Windows10 操作系统。

1.2 方法

1.2.1 预测加味桃核承气汤的作用靶点 在 TCMSp 数据库中选择“Herb name”分别检索桃仁、桂枝、大黄、黄芪、生地黄、玄参、炙甘草的分子 ADME 参数,及吸收、分布、代谢、排泄,然后参阅文献[12],设定每个分子的口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.18 筛选出加味桃核承气汤中可能的活性成分。最后,使用 Perl 语言并结合 Uniprot 数据库,最终得到加味桃核承气汤的基因靶点。

1.2.2 T2DM 靶点的收集及药物作用靶点的预测

使用 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库,以“diabetes mellitus, type 2”为关键词进行检索,将两数据库检索结果进行合并,并删除重复靶点,从而获得 T2DM 的全部作用靶点。然后把所得疾病靶点与加味桃核承气汤的靶点使用 R 语言程序进行对比,以此筛选出共同的靶点,同时绘制韦恩图。

1.2.3 网络模型的构建及分析 在 STRING 数据库中,将加味桃核承气汤和 T2DM 共作靶点输入到 STRING 数据库中进行检索,选取 minimum required interaction score > 0.9 的蛋白相互作用网络(PPI),同时显示设置隐藏游离点,然后下载 PPI 图形件并保存 tsv 文件,最后使用 R 语言对得到的 PPI 进行核心基因的筛选。将加味桃核承气汤和 T2DM 共同的靶点进行整理,使用 Perl 对节点数据进行属性标识,然后把所得数据导入 Cytoscape3.7.1 软件,并对其参数进行设置后得到加味桃核承气汤的“活性成分-靶点”相互作用网络图。

1.2.4 基因本体(GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 首先,对上述所得的靶点进行 ID 转换,即使用 R 语言将加味桃核承气汤与 T2DM 的共作靶点转换成 entrezID,为下一步做基础;其次,在 R 语言中调用生物类的程序包,如 clusterProfiler, bioconductor 等进行数据的处理;再其次,运行 R 语言得到 GO 和 KEGG 富集分析的条形图、气泡图、通路图及包含 P 值的结果,如果

是图形则设置只显示 P 值最小的前 20 个;最后,使用 Perl 将转换的 entrez ID 变成原始基因靶点。

2 结果

2.1 药物-疾病靶标的预测结果 OB $\geq 30\%$, BL ≥ 0.18 ,除去数据库中不存在的芒硝及剔除 14 个重复活性成分,总共得到 155 个有效成分。在 DrugBank 数据库中查询加味桃核承气汤的性成分作用靶点,然后检索 GeneCards 数据库及 OMIM 数据库中与 T2DM 相关疾病基因靶点后,最后使用 R 语言制作韦恩图得到药物-疾病共作靶点 106 个。

2.2 网络药理的可可视化 在 GeneCards 数据库及 OMIM 数据库中检索 T2DM 的全部相关靶点,见图 1,其中有 106 个潜在靶点与加味桃核承气汤治疗 T2DM 相关。通过 Cytoscape 3.7.1 软件将 155 个活性成分与 106 个 T2DM 相关潜在靶点相连,绘制出加味桃核承气汤的“活性成分-靶点”相互作用的网络图,见图 2。在图 2 中,棱形节点代表活性成分,三角形节点代表作用靶点。

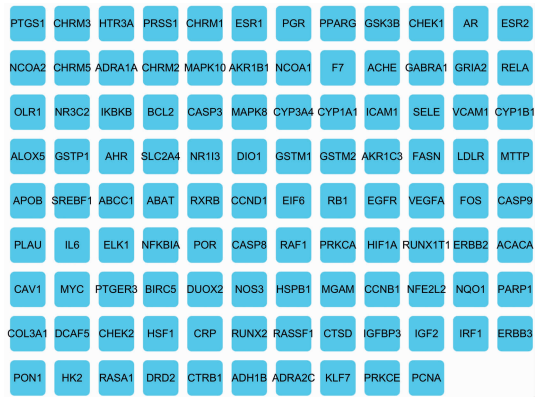


图 1 155 个活性成分作用的 106 个潜在靶点

Fig.1 155 potential targets of 106 active ingredients

度值(degree)表示网络中其他节点与该节点相连的全部路线数,如每一个椭圆形节点代表活性成分所拥有的靶点数。经 Cytoscape 软件对图 3 进行分析后显示,槲皮素(querctetin)具有最多的潜在靶点 138 个,其次是山柰酚(kaempferol)有 53 个,排名第三的是异鼠李素(isorhamnetin)有 19 个。从作用靶点的角度进行分析得到,雌激素受体(ESR1)有着最多的相互作用配体,为 85 个,其次是过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPARG)与雄激素受体(AR),分别有 69,68 个相互作用配体。这说明加味桃核承气汤的同一活性成分能作用于多靶点,且相同靶点可以由不同的活性成分作用,体现出了中药方剂的复杂性与整体性,也反映出加味桃核承气汤“多成分-多靶点”的综合调节的特点。

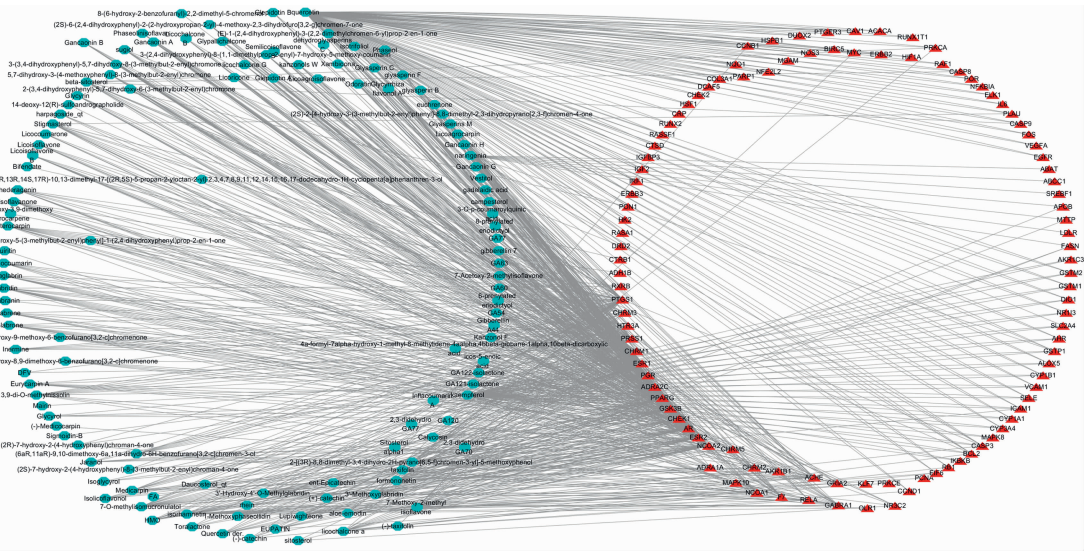


图 2 加味桃核承气汤的“活性成分-靶点”相互作用的网络

Fig. 2 Network diagram of active ingredient-target interaction of modified Taohe Chengqitang

2.3 加味桃核承气汤与 T2DM 蛋白质相互作用网络(PPI)的构建及其核心基因 将韦恩图得到的 106 个潜在基因录入 STRING 数据库中进行分析得到 PPI(图 3),其包含 106 个节点,195 条边,平均节点度值为 3.68,PPI 富集 P 值少于 1.0×10^{-16} ,其中节点表示蛋白,每条边则表示蛋白与蛋白之间的相互作用关系,线条越多表示关联度越大。将 STRING 中下载的 tsv 文件用 R 语言进行处理,得到 PPI 中的核心基因表皮生长因子受体(EGFR),雌激素受体(ESR1)等,见图 4。

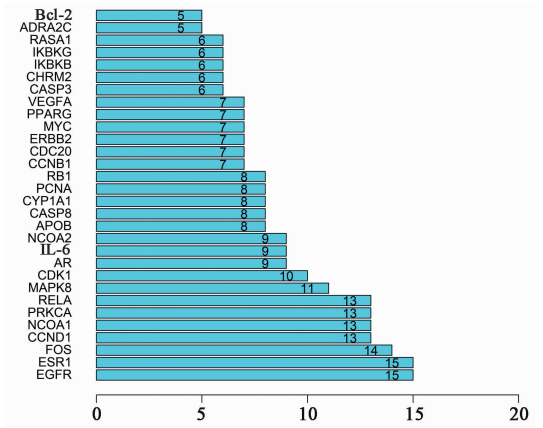


图 4 PPI 中的核心基因

Fig. 4 Core genes in PPI

见图 5, P 代表富集的显著性,相应的 P 值也越小,其颜色越偏向红色,反之颜色偏向蓝色;横坐标表示富集数目,由结果可知富集最多的是 16 个基因,GO 功能富集后富集数目较多的如 DNA 结合转录激活活性, RNA 聚合酶 II 特异性 (DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific), 转录因子活性, RNA 聚合酶 II 近端启动子序列 (transcription factor activity, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding), 蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (protein serine/threonine kinase activity) 等。

2.5 KEGG 通路富集分析 将所得的 106 个共作靶点使用 R 语言程序进行 KEGG 通路富集分析,运行后得到 118 条通路,其中结果显著性最大的前 20 条通路(表 1)。将显著性前 20 的结果作条形图得

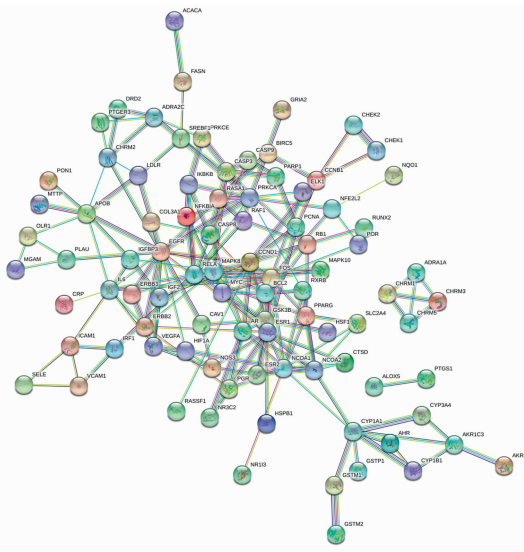


图 3 STRING 数据库分析蛋白的相互作用

Fig. 3 Analysis of target-target interaction by STRING

2.4 GO 功能富集分析 经 R 语言运行后总共得到 126 个功能,前 20 个功能的 GO 功能富集的气泡图,

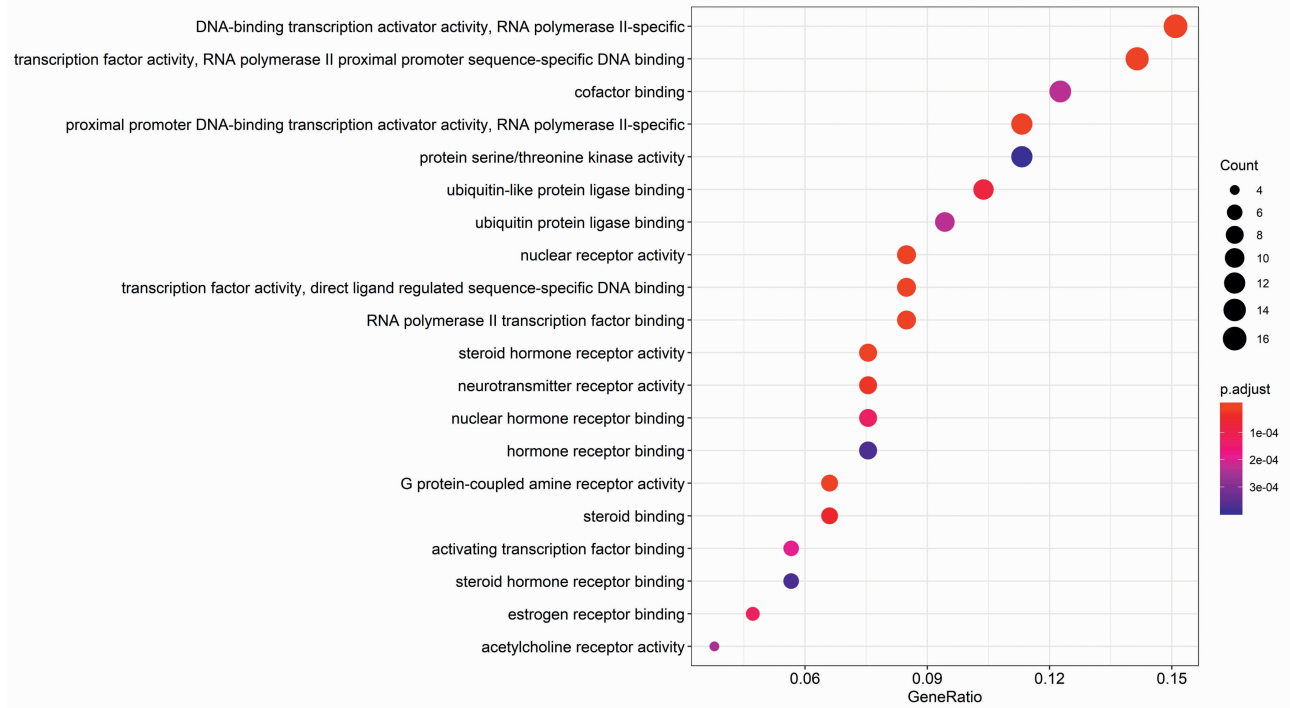


图 5 加味桃核承气汤治疗 T2DM 候选靶点的 GO 富集

Fig. 5 Gene ontology terms of candidate targets of modified Taohe Chengqitang against T2DM

到图 6,横坐标表示靶点数,左边表示通路名称,颜色表示 P 值,P 值越小颜色越偏向红色,P 值越大则越偏向蓝色。结果显示,加味桃核承气汤治疗 T2DM 涉及除了有流体剪切力及动脉硬化 (fluid shear stress and atherosclerosis),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) 等显著性较高的通路外,另外还得到乙型肝炎 (hepatitis B),卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染 (kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection),前列腺癌 (prostate cancer),结肠直肠癌 (colorectal cancer),肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway),细胞凋亡 (apoptosis),胰腺癌 (pancreatic cancer),人类巨细胞病毒感染 (human cytomegalovirus infection),催乳激素信号通路 (prolactin signaling pathway),麻疹 (Measles),甲状腺激素信号通路 (thyroid hormone signaling pathway),肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma),蛋白聚糖在癌症 (proteoglycans in cancer),膀胱癌 (bladder cancer),内分泌的阻力 (endocrine resistance),丙型肝炎 (hepatitis C),ERBB 信号通路 (ERBB signaling pathway),胰岛素抵抗 (insulin resistance) 共 18 条显著性较高的通路;显著性前 20 的靶点包括丝裂原活化蛋白激酶 10 (MAPK10),丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8),转录

因子 p65 (RELA),人 KB 抑制蛋白激酶 (IKKB),B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2),细胞间黏附分子-1 (ICAM-1),I 型血管细胞黏附蛋白 (VCAM1),谷胱甘肽转硫酶 P1 (GSTP1),谷胱甘肽硫转移酶 M (GSTM),血管内皮生长因子 (VEGF),原癌基因 (FOS),细胞窖蛋白-1 (CAV-1),一氧化氮合酶 (NOS),人红细胞衍生核因子 2 样蛋白 2 (NFE2L2),醌氧化还原酶 1 (NQO1),细胞周期蛋白 D1 (CCND1),白细胞介素-6 (IL-6),蛋白激酶 (PRKC),III 型胶原 (COL3A1),半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase),增殖细胞核抗原 (PCNA),糖原合成激酶 (GSK),低氧诱导因子-1 (HIF1),固醇调节元件结合蛋白 (SREBF),见表 1。反映了中药多靶点参与体内多个生物学过程,同时表明加味桃核承气汤可能通过改善这些生物过程发挥其治疗 T2DM 的作用。

3 讨论

本研究结果显示,通过 TCMSP 数据库共筛选出 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 的加味桃核承气汤候选成分共 155 个,对加味桃核承气汤与 T2DM 的共同作用靶点取交集,得到药物-疾病共作靶点 106 个。在加味桃核承气汤的“活性成分-靶点”图 (图 2) 中清晰可见相同成分作用于多靶点,每一个靶点也对应多成分,这充分体现了中药多成分、多靶点的特点。与此同时,对图 3 网络进行分析后可见,在活性成分中

表 1 加味桃核承气汤潜在靶点与对应靶点通路

Table 1 Information of potential targets and signaling pathways for constituents from modified Taohe Chengqitang

通路	靶点	靶点数	P
fluid shear stress and atherosclerosis	MAPK10/RELA/IKKKB/BCL2/MAPK8/ICAM1/SELE/VCAM1/GSTP1/GSTM1/GSTM2/VEGFA/FOS/CAV1/NOS3/NFE2L2/NQO1	17	1.07×10^{-10}
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	MAPK10/RELA/Bcl-2/Caspase-3/MAPK8/ICAM1/SELE/VCAM1/CCND1/VEGFA/IL-6/PRKCA/NOS3/COL3A1/PRKCE	15	1.07×10^{-10}
hepatitis B	MAPK10/RELA/IKKKB/Bcl-2/Caspase-3/MAPK8/RB1/FOS/Caspase-9/IL-6/ELK1/NFKBIA/Caspase-8/RAF1/PRKCA/MYC/BIRC5/PCNA	18	1.07×10^{-10}
kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	GSK3B/MAPK10/RELA/IKKKB/Caspase-3/MAPK8/ICAM1/CCND1/RB1/VEGFA/FOS/Caspase-9/IL-6/NFKBIA/Caspase-8/RAF1/HIF1A/MYC	18	6.20×10^{-10}
prostate cancer	GSK3B/AR/RELA/IKKKB/Bcl-2/GSTP1/CCND1/RB1/EGFR/Caspase-9/PLAU/NFKBIA/RAF1/ERBB2	14	6.20×10^{-10}
colorectal cancer	GSK3B/MAPK10/Bcl-2/Caspase-3/MAPK8/CCND1/EGFR/FOS/Caspase-9/RAF1/MYC/BIRC5	12	2.47×10^{-8}
TNF signaling pathway	MAPK10/RELA/IKKKB/Caspase-3/MAPK8/ICAM1/SELE/VCAM1/FOS/IL-6/NFKBIA/Caspase-8/IRF1	13	3.26×10^{-8}
apoptosis	MAPK10/RELA/IKKKB/Bcl-2/Caspase-3/MAPK8/FOS/Caspase-9/NFKBIA/Caspase-8/RAF1/BIRC5/PARP1/CTSD	14	3.93×10^{-8}
pancreatic cancer	MAPK10/RELA/IKKKB/MAPK8/CCND1/RB1/EGFR/VEGFA/Caspase-9/RAF1/ERBB2	11	5.16×10^{-8}
human cytomegalovirus infection	GSK3B/RELA/IKKKB/Caspase-3/CCND1/RB1/EGFR/VEGFA/Caspase-9/IL-6/ELK1/NFKBIA/Caspase-8/RAF1/PRKCA/MYC/PTGER3	17	5.93×10^{-8}
prolactin signaling pathway	ESR1/GSK3B/ESR2/MAPK10/RELA/MAPK8/CCND1/FOS/RAF1/IRF1	10	3.10×10^{-7}
measles	GSK3B/MAPK10/RELA/IKKKB/Bcl-2/Caspase-3/MAPK8/CCND1/FOS/Caspase-9/IL-6/NFKBIA/Caspase-8	13	3.16×10^{-7}
thyroid hormone signaling pathway	ESR1/GSK3B/NCOA2/NCOA1/DIO1/RXR/B/CCND1/Caspase-9/RAF1/PRKCA/HIF1A/MYC	12	3.56×10^{-7}
hepatocellular carcinoma	GSK3B/GSTP1/GSTM1/GSTM2/CCND1/RB1/EGFR/ELK1/RAF1/PRKCA/MYC/NFE2L2/NQO1/IGF2	14	3.56×10^{-7}
proteoglycans in cancer	ESR1/Caspase-3/CCND1/EGFR/VEGFA/PLAU/ELK1/RAF1/PRKCA/HIF1A/ERBB2/CAV1/MYC/IGF2/ERBB3	15	4.46×10^{-7}
bladder cancer	CCND1/RB1/EGFR/VEGFA/RAF1/ERBB2/MYC/RASSF1	8	4.91×10^{-7}
endocrine resistance	ESR1/ESR2/MAPK10/Bcl-2/MAPK8/CCND1/RB1/EGFR/FOS/RAF1/ERBB2	11	4.91×10^{-7}
hepatitis C	GSK3B/RELA/IKKKB/Caspase-3/LDLR/CCND1/RB1/EGFR/Caspase-9/NFKBIA/Caspase-8/RAF1/MYC	13	8.53×10^{-7}
ERBB signaling pathway	GSK3B/MAPK10/MAPK8/EGFR/ELK1/RAF1/PRKCA/ERBB2/MYC/ERBB3	10	1.16×10^{-6}
insulin resistance	GSK3B/MAPK10/RELA/IKKKB/MAPK8/SLC2A4/SREBF1/IL-6/NFKBIA/NOS3/PRKCE	11	1.16×10^{-6}

度值最高的活性成分包括槲皮素, 山柰酚和异鼠李素, 此三者都是天然黄酮类化合物, 在自然界中广泛的存在。现代研究发现, 槲皮素具有多重生物活性, 如抗氧化、抗病毒、抗炎作用, 在细胞和动物实验中可以用来治疗肝、心、脾、肺、肾、骨科疾病、神经系统疾病等^[13]。与槲皮素化学结构类似的山柰酚具有抗氧化、抗炎、抗癌, 防治糖尿病、动脉粥样硬化和骨

质疏松, 保护神经、肝脏和心肌以及抑制蛋白激酶活性等作用^[14]。异鼠李素有内皮保护、抗动脉粥样硬化、抗心肌缺血、保护心肌细胞、降血压、抗血栓及血小板凝集、抗氧化等多种心脑血管保护作用, 且具有抑制脂肪细胞分化, 耐缺氧, 抗肿瘤, 降糖, 抗炎, 抗病毒等多种作用^[15]。在降糖方面, 槲皮素具有降低 T2DM 大鼠血糖的作用, 其治疗效果与二甲双胍

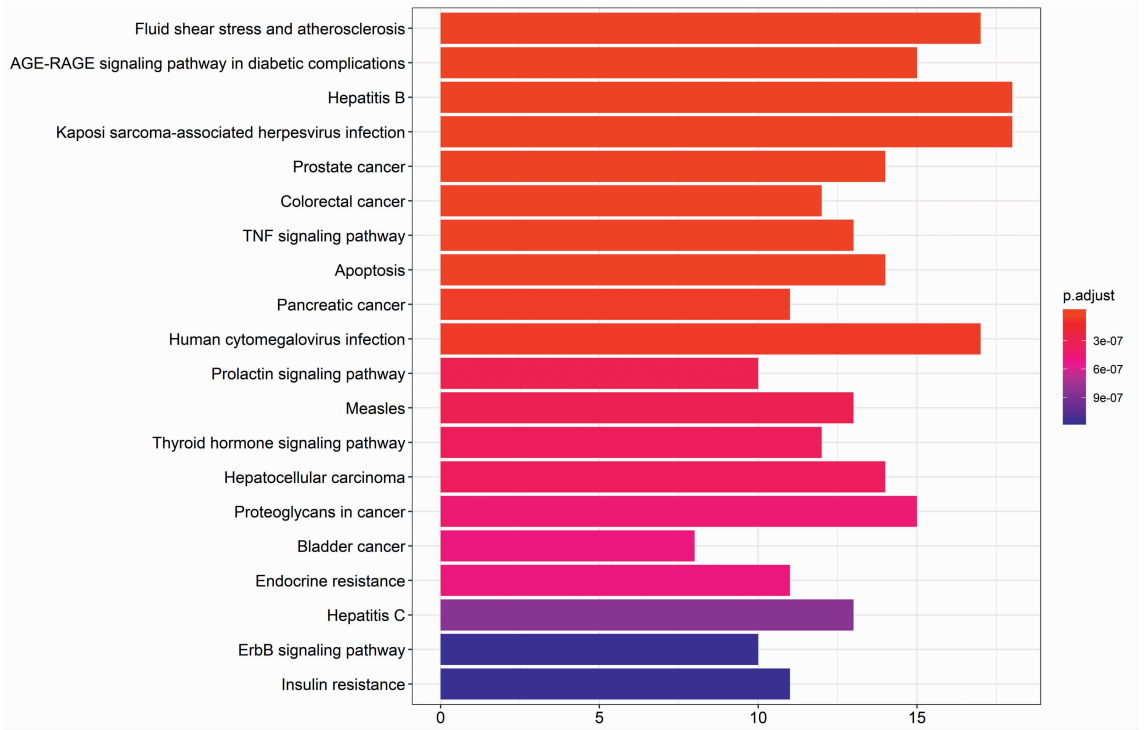


图 6 加味桃核承气汤-T2DM 潜在靶点 KEGG 通路富集分析

Fig.6 Modified Taohetong Chengqitang and T2DM target genes KEGG pathway analysis

一致。此外,槲皮素还能有效减轻大鼠外周胰岛素抵抗,其作用机制与胰腺组 FGF21/AMPK 信号通路的激活有关^[16];山柰酚具有有效降低大鼠的空腹血糖、改善胰岛素抵抗及调节糖脂代谢紊乱的作用^[17]。另外,山柰酚通过抗炎、抗氧化、抑制醛糖还原酶等途径,能够在一定程度上抑制 T2DM 大鼠的并发症^[18];异鼠李素不仅具有降糖作用,而且能够抑制心肌 TGF- β /Smad 信号通路相关缓解糖尿病大鼠心肌纤维化^[19-20]。在加味桃核承气汤中,槲皮素、山柰酚和异鼠李素主要包含在黄芪及炙甘草当中。黄芪具有调节免疫、保护 β 细胞、改善胰岛素抵抗、抗炎及抗氧化等作用,对糖尿病及其并发症有很好的应用前景^[21];炙甘草对胰岛 β 细胞同样具有保护作用,并且能够促进组织摄取和利用葡萄糖,改善糖、脂代谢紊乱,抑制 α -葡萄糖苷酶,从而发挥降糖作用^[22]。靶点中度值最高的为 ESR1, AR 及 PPARG。有研究发现,ESR1 与妊娠期糖尿病密切相关并且具有作为临床孕早期诊断妊娠期糖尿病及评估新生儿预后的生物学指标的潜力^[23-24];AR 能介导的靶基因转录,在抵抗肥胖、抑制机体产生胰岛素抵抗方面发挥重要作用^[25];PPARG 不仅能抗炎,抑制促炎因子,如 TNF- α , IL-6, IL-1 等的表达,而且能够调控脂肪细胞分化和脂代谢,维持血糖和血脂的稳定^[26]。因此,笔者推测槲皮素、山柰酚和异鼠

李素可能作用于关键靶点 ESR1, AR 及 PPARG 等在加味桃核承气汤的药理中发挥着相对重要的作用。

基于 STRING 数据库构建靶点交互作用网络,分析得到 EGFR, ESR1, FOS, MAPK8 等治疗 T2DM 的核心靶点,他们是参与 T2DM 的病理过程,也是加味桃核承气汤治疗 T2DM 的关键靶点所在。其中,EGFR^[27]参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭等,EGFR 和其配体在胰腺尤其是胰岛 β 细胞数量的调控起着重要作用;FOS 是一种原癌基因,在信号传导、细胞增殖方面起着重要作用,能调控 TGF- β 介导的信号传导,如果患者糖尿病患者血浆、肾组织或尿液检测到 TGF- β 表达异常增高时,则说明糖尿病肾病已经发生病变,所以 TGF- β 与糖尿病肾病密切相关^[28];有研究发现^[29],在对 T2DM 患者外周血清 miRNA 差异表达分析,MAPK8 可能与 T2DM 胰岛素抵抗相关。除上述之外,还存在 RELA, IL-6 等与炎症相关的靶点。

GO 富集结果表明,加味桃核承气汤的活性成分靶点会影响基因的转录、核受体活性。核受体的基因表达紊乱是前列腺癌、肥胖病及糖尿病等病理过程中的重要病因^[30]。另外,其对激素的受体结合、神经递质等也具有一定的影响,如雌激素受体结合、核激素受体结合、乙酰胆碱受体的活性。研究

表明^[31],胆碱能抗炎通路可以改善胰岛素抵抗、促进葡萄糖摄取及抑制炎症。通过 KEGG 通路富集分析的结果可知,流体剪切应力和动脉粥样硬化通路为显著性最高的通路,此通路包含 Toll 样受体,核转录因子- κ B (NF- κ B), MAPK 等主要信号通路等,他们已经被证实与 T2DM 密切相关。其中, Toll 样受体信号通路能对病原相关分子模式识别来调节免疫应答与炎症反应,这与 T2DM 患者的炎症反应和胰岛素抵抗及糖尿病大血管炎性改变形成过程中起着重要作用^[32]。NF- κ B 作为炎症关的经典的信号通路,在改善胰岛素抵抗、抑制胰岛 β 细胞凋亡及糖尿病的并发症过程中发挥着重要作用^[33-35]。促分裂原活化的蛋白激酶信号通路是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,与胰岛素抵抗、高脂血症都有着密切的联系。此外, AGE-RAGE 能够激活 NF- κ B, 从而导致组织损伤与炎症反应,这是 T2DM 发生及其并发症形成的重要机制^[36]。

尽管网络药理学的系统性能能够为挖掘中药的潜在价值提供可靠的方法,但本研究仍存在不足。其一,本研究未能从更加整体性的角度阐述加味桃核承气汤治疗 T2DM 的作用机制。由于 TCMSP 数据库中未纳入“芒硝”这一味中药,经查询相关文献得知,“芒硝”的主要成分是含水硫酸钠,另外还夹杂硫酸钙、硫酸镁等。芒硝的主要作用是泻下,原理是在肠内形成高渗溶液,使得肠内水分增加,导致机械刺激从而促进肠蠕动引起泻下。芒硝在糖尿病方面,主要是外敷应用于并发症,如外敷治疗糖尿病足,其机制可能有改善血液循环有关;其二,本研究着重于理论,后期需要更多的体内及体外实验加以证明,为加味桃核承气汤治疗 T2DM 的临床应用提供可靠的理论依据。

综上所述,本研究初步阐明了加味桃核承气汤组方的合理性,以及治疗 T2DM 的科学性。其主要作用机制是通过影响关键基因的表达,调控流体剪切应力和动脉粥样硬化等通路,不仅说明加味桃核承气汤具有降糖的作用,而且还具有抗炎、改善胰岛素抵抗、调节脂代谢等生物学功能。这结论也基本符合前期研究,如许帅^[37]发现加味桃核承气汤能够有效抑制 AGE-RAGE 通路、修复抗氧化应激能力、更能有效地延缓动脉粥样硬化的进展;邓小凤^[38]发现加味桃核承气汤基于 NF- κ B 通路来防治糖尿病大血管病变,其机制是与抑制 NF- κ B,降低 IL-6 及 TNF 的表达有关;陈云等^[4]发现加味桃核承气汤能下调转化生长因子- β ,使细胞外基质合成减少,起到

保护肾组织、推迟肾纤维化的作用。另外,笔者还发现加味桃核承气汤对妊娠期糖尿病具有潜在作用,能作用于妊娠期糖尿病相关的特异性雌激素受体,但是查阅相关文献,此方面研究较少,这可为以后扩展加味桃核承气汤的适应范围提供理论性的参考。

[参考文献]

- [1] 沈洁,周珊珊,万晓刚. 黄连对 2 型糖尿病大鼠胰腺内质网应激 PERK/ATF4/CHOP 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 50-55.
- [2] Tadic M, Cuspidi C. Type 2 diabetes mellitus and atrial fibrillation: from mechanisms to clinical practice [J]. Arch Cardiovasc Dis, 2015, 108(4): 269-276.
- [3] 江丹,吴伟,林明欣,等. 降糖三黄片对早期糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF- β_1 /Smad1 信号通路的影响[J]. 世界中医药, 2014, 9(8): 1067-1072.
- [4] 陈云,李赛美,王保华. 降糖三黄片对糖尿病肾病大鼠肾组织蛋白激酶 C 和转化生长因子 β_1 的影响[J]. 中医杂志, 2012, 53(8): 689-692.
- [5] 熊曼琪,梁柳文,林安钟,等. 加味桃核承气汤治疗 II 型糖尿病的临床和实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1992, 20(2): 74-75.
- [6] 储全根,李赛美,莫伟,等. 加味桃核承气汤及其不同提取物对糖尿病大鼠心肌细胞 GluT4 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(12): 912-914.
- [7] 李赛美,凌家杰,王志高. 加味桃核承气汤及其拆方对糖尿病血管病变的体外作用观察[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(1): 51-53.
- [8] 古玉梅,朱章志,许帅,等. 加味桃核承气汤对糖尿病大鼠血糖、血脂及大血管病变的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 583-587.
- [9] 熊曼琪,苗理平. 加味桃核承气汤对糖尿病鼠肾超微结构的影响[J]. 中国医药学报, 1990, 21(5): 25-27.
- [10] 李静,葛超,韩莲莲,等. 加味桃核承气汤对 STZ 糖尿病大鼠肝、肾和心组织的抗氧化保护作用[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(30): 12052-12054, 12058.
- [11] 徐婷,麦葭沂,向俊,等. “黄芪-当归”药对主要活性成分的网络药理学研究[J]. 中药材, 2017, 40(9): 2195-2201.
- [12] 严诗楷,赵静,窦圣姍,等. 基于系统生物学与网络生物学的现代中药复方研究体系[J]. 中国天然药物, 2009, 7(4): 249-259.
- [13] 马纳,李亚静,范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 221-224.

- [14] 张雅雯,邵东燕,师俊玲,等. 山奈酚生物功能研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(4): 400-405.
- [15] 滕丹,栾新尧. 异鼠李素的药效学研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2016, 28(4): 593-596.
- [16] 葛凌,蔡亚军,王章达. 槲皮素对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的改善作用及 FGF21/MAPK 信号通路的影响[J]. 中国药师, 2019, 22(3): 418-421.
- [17] 刘贵波,刘跃光,孙成,等. 山奈酚对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2012, 16(9): 1-3.
- [18] 吴巧敏,金雅美,倪海洋. 山奈酚对 2 型糖尿病大鼠慢性并发症相关因子的影响[J]. 中草药, 2015, 46(12): 1806-1809.
- [19] 白跳,迟丽屹,高宇勤,等. 异鼠李素对糖尿病大鼠心肌纤维化的干预作用[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(7): 865-869.
- [20] 谭琪明,胡丹,何珺. 沙棘中异鼠李素降血糖活性研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(15): 13-15.
- [21] 段炼,李会军,闻晓东,等. 黄芪治疗糖尿病研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(7): 776-781,792.
- [22] 张明发,沈雅琴. 甘草及其有效成分的抗糖尿病药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2015, 12(1): 1-5.
- [23] 郭艳娟,赵楠楠,邹歌,等. 妊娠期糖尿病患者血清 miR-222 和雌激素受体- α 表达的临床意义[J]. 中国计划生育学杂志, 2018, 26(11): 1086-1090.
- [24] 马丽媛,李超,王伟伟. 雌激素受体 β 基因 AluI、RsaI 位点多态性与妊娠期糖尿病易感性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(9): 1062-1065.
- [25] 贺小威,韩丽妍,赵越. 雄激素受体及其辅调节因子在肥胖及胰岛素抵抗中作用的研究进展[J]. 生命科学, 2015, 27(4): 453-461.
- [26] 林小晶. Chemerin 在有氧运动改善肥胖和 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢中的作用及 PPAR γ 相关机制[D]. 上海:上海体育学院, 2017.
- [27] 郭莉霞,殷菲,刘建辉. 表皮生长因子受体及其配体与胰腺 β 细胞[J]. 生物医学工程学杂志, 2011, 28(1): 203-207.
- [28] 王全顺,张国山,刘洁,等. 转化生长因子与糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(43): 8408.
- [29] 郭宜晨,鲁亚静,钟伟传,等. 2 型糖尿病患者外周血 miRNA 表达谱差异研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(6): 5-8.
- [30] 王水良,傅继梁. 核受体的研究进展[J]. 遗传学报, 2004, 31(4): 420-429.
- [31] 李芬. 小檗碱改善胰岛素抵抗作用分子机制的研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2016.
- [32] 吴珺,鲁一兵,刘超. Toll 样受体和糖尿病[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2008, 28(2): 116-118.
- [33] Harada C, Harada T, Mitamura Y, et al. Diverse NF-kappaB expression in epiretinal membranes after human diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy[J]. Mol Vis, 2004, 10(4/5):31-36.
- [34] Ortis F. Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a proapoptotic role in pancreatic beta cells[J]. Diabetologia, 2008, 51(7):13-25.
- [35] Sriwijitkamol A, Christ-Roberts C, BerriaR, et al. Reduced skeletal muscle inhibitor of kappaB beta content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training[J]. Diabetes, 2006, 55(3):760-767.
- [36] Yamagishi S I. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes[J]. Exp Gerontol, 2011, 46(4): 217-224.
- [37] 许帅. 基于 AGEs-RAGE 加味桃核承气汤防治 T2DM 大血管病变大鼠的实验研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2017.
- [38] 邓小凤. 基于 NF- κ B 通路加味桃核承气汤及其化裁方防治糖尿病大血管病变的实验研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2016.

[责任编辑 孙丛丛]