

基于网络药理学对蒲公英抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分及作用机制的研究

赵光耀¹, 赵坤¹, 蒋文雯^{1*}, 王道平², 张明²

¹贵州大学药学院, 贵阳 550025; ²贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014

摘要:为阐明蒲公英对 α -葡萄糖苷酶抑制的活性成分。实验对蒲公英进行活性筛选和分子对接, 结果表明, 其乙醇提取物的石油醚萃取成分能良好抑制 α -葡萄糖苷酶的作用 ($IC_{50} = 0.9 \mu\text{g/mL}$), 其抑制效果强于阳性药阿卡波糖 ($IC_{50} = 174.3 \mu\text{g/mL}$)。故采用 GC-MS 联用技术从上述成分中分离鉴定了 37 个化合物, 由虚拟筛选后, 共得到 5 个成药性强的小分子化合物; 通过与人源性 α -葡萄糖苷酶进行分子对接后, 证实其中 2 个小分子化合物能与 α -葡萄糖苷酶存在亲和性。基于网络药理学构建蒲公英“降糖成分—靶点”图, 阐述蒲公英的降糖机理。

关键词: 蒲公英; α -葡萄糖苷酶; 气相色谱-质谱联用; 分子对接; 网络药理学

中图分类号: R284; R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)3-0403-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.3.008

Study on active components and mechanism of inhibition of α -glucosidase by *Taraxacum mongolicum* based on network pharmacology

ZHAO Guang-yao¹, ZHAO Kun¹, JIANG Wen-wen^{1*}, WANG Dao-ping², ZHANG Ming²

¹Pharmacy College of Guizhou University, Guiyang 550025, China;

²Key laboratory of Natural Products Chemistry of Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550014, China

Abstract: In this study, a screening model of α -glucosidase inhibitor *in vitro* was utilized to screen the activity of the extract of *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz from Guizhou Province. The results showed that the petroleum ether extracts of the extract of *T. mongolicum* from Guizhou Province significantly inhibited the activity of α -glucosidase ($IC_{50} = 0.9 \mu\text{g/mL}$). And its activity was stronger than that of the positive drug acarbose ($IC_{50} = 174.3 \mu\text{g/mL}$). Thirty-seven compounds were isolated and identified from petroleum ether extracts of *T. mongolicum* from Guizhou by GC-MS. Five small molecule compounds with strong drug-forming ability were obtained after virtual screening. Two small molecular compounds were identified as have good affinity with human α -glucosidase after molecular docking with human α -glucosidase. Based on network pharmacology, the "hypoglycemic component-target" map of dandelion was constructed to explain the hypoglycemic mechanism of dandelion.

Key words: *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz; α -glucosaccharase; gas chromatography-mass spectrometry; molecular docking; network

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种以高血糖为特征的代谢性疾病; 通常将其分为 I 型糖尿病和 II 型糖尿病, 绝大多数患者为 II 型糖尿病患者。 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 因其副作用小, 可以有效控制糖尿病患者餐后血糖上升, 平稳血糖, 常作为辅助治疗

II 型糖尿病的首选药物。但目前的 α -葡萄糖苷酶抑制剂都存在胃肠道反应, 例如: 腹痛、腹泻、胃肠胀气等。因此本课题组想从天然产物中寻找一种安全、毒副作用小的 α -葡萄糖苷酶抑制剂来解决糖尿病人的需求^[1]。

蒲公英 (*Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz) 是一种常见的一年生或两年生菊科草本植物。具有清热解毒、消肿散结、利尿通淋之功效, 用于疔疮肿毒、湿热黄疸、热淋涩痛^[2-5]。近年来国内外研究证明了

收稿日期: 2019-02-10 接受日期: 2020-04-01

基金项目: 贵州省科技计划 (黔科合平台人才 [2017] 5788 号); 贵州省科技计划 (黔科合基础 [2019] 1120)

* 通信作者 E-mail: jww1001@sina.com

蒲公英具有降糖活性^[6-10],但对于蒲公英抑制 α -葡萄糖苷酶的研究报道,目前尚未见报到。本实验拟研究蒲公英是否具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性,并期望从中发现活性较强的小分子抑制剂。

1 试剂与仪器

1.1 药材与试剂

α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)购自Sigma公司;4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖(4-*N*-trophenyl- α -D-glucopyranoside, PNPG)购自Sigma公司;阿卡波糖(acarbose)购自德国拜耳公司;菜油甾醇(ergost-5-enol 麦角甾-5-烯醇), β 谷甾醇(β -sitosterol)均购置于道斯夫生物科技有限公司;蒲公英购于贵阳市万东桥民族药材市场,经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz);其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

FLEX超纯水系统(英国Elga);TW200酶标仪(瑞士Tecan);恒温培养箱(上海博泰实验设备有限公司);电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);RE-2000B型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);HP6890/5975C GC-MS联用仪(美国安捷伦公司);96孔板购自Corning Costar(美国Cambridge MA公司)。

2 试验方法

2.1 蒲公英提取物的制备

蒲公英全草洗净,烘干;用75%的乙醇溶液浸泡18 h,超声波提取30 min,反复三次;得到蒲公英总提取液,浓缩干燥得到蒲公英提取物浸膏,-20℃保存待用。

蒲公英全草按上述方法得到药材浸膏后,分散于水中,再分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等溶剂依次萃取3次^[11]。各萃取部位浓缩干燥后,-20℃保存待用。

2.2 α -葡萄糖苷酶活性的检测

α -葡萄糖苷酶活性的检测方法采用96孔板筛选体系,反应体系参照文献报道的方法^[12]。

阿卡波糖(acarbose)为本法的阳性对照,采用SPSS17.0软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)值。酶活性抑制率按下式计算:

$$\text{酶活性抑制率 (inhibitory rate)} = \left(\frac{A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{样品校正}}}{A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}}} \right) \times 100\%$$

2.3 蒲公英不同部位 α -葡萄糖苷酶活性影响

将蒲公英的各个植株部位分别用75%的乙醇

超声提取;再分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取;将萃取液浓缩干燥,得到不同部位、不同极性提取物;参照“2.1”的方法进行体外活性实验。

2.4 双倒数法(Lineweaver-Burk)研究蒲公英活性部位的抑制类型

将蒲公英全草的石油醚部位溶解于二甲基亚砜(DMSO)中配制为100 mg/mL的溶液;将上述配好的溶液,取5 μ L DMSO溶液加入495 μ L PB缓冲液将每个样品分别稀释100倍,在 α -葡萄糖苷酶活性测定的反应体系中样品溶液的反应终浓度为10 μ g/mL。同时配制以下五个浓度的PNPG溶液:1.7、2.5、3.3、5 mmol/mL。即使底物浓度的倒数成等差数列。在酶标仪中记录、测量每分钟吸光度的变化量;整理数据,绘制双曲线倒数图。

2.5 蒲公英提取物GC-MS的分析条件

色谱柱为FB-5MSI(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m)弹性石英毛细管柱,柱温46℃,保持2 min,以6℃/min升温至310℃,保持12 min,进样温度250℃;载气为高纯He(99.999%);柱前压7.06 psi,载气流量1.0 mL/min。

离子源为EI源;离子源温度230℃;四极杆温度150℃;电子能量70 eV;发射电流34.6 μ A;倍增器电压1 612 V;接口温度280℃;质量范围29~500 amu。NIST2005和WILEY275谱库;不分流进样;溶剂延迟时间:4 min。

2.6 活性成分的虚拟筛选与分子对接

将2.5实验步骤中GC-MC的结果,选择通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)筛选有效成分,以化合物口服生物利用度(OB) \geq 30%和类药性(DL) \geq 0.18作为活性化合物的筛选条件,筛选出TCMSP中具有较高活性的化合物。通过Pubmed(医学文献检索)数据库,下载活性化合物的3D或2D结构;并用分子对接软件AutoDockVina将化合物分子对接到 α -葡萄糖苷酶的活性位点,得到相对应的化合物对接打分。

2.7 单体化合物的 α -葡萄糖苷酶体外活性验证

根据分子对接的结果,选取2种分子对接分数较高的单体化合物,按照“2.3”的实验步骤,进行 α -葡萄糖苷酶的体外活性的验证。

2.8 基于网络药理学对蒲公英活性成分的降糖活性机制研究

将筛选到的有效成分经Pubmed(医学文献检索)数据库检索得到相关靶点名,再由Universal Pro-

tein(蛋白质信息)数据库中,转化为标准基因;通过在 Swiss target 数据库中查找靶点基因,进而采用 Cytoscape 软件构建化合物-靶点网络图;经 Genecard 数据库构建疾病靶点相互作用网络图;筛选药物靶点和疾病靶点相互作用图的核心靶点,利用 ClueGO 对核心靶点进行分析,进一步运用 DAVID 数据库对网络预测出的靶点所涉及的基因功能 Gene-Ontology (GO)进行注释分析,并对相关通路 (pathway) 进行 KEGG 通路富集分析。

3 统计处理

所有数据均表示为 $\bar{x} \pm s$, 并采用 t 检验对各组

表 1 蒲公英全草各提取部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibition of alpha-glucosidase by extracts from whole grass of dandelion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品 Sample	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抑制率 Inhibition rate (%)	半数抑制率 Half inhibition rate ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
乙醇总提取物 Ethanol total extract	1	46.80 \pm 0.41	1.9
	5	54.03 \pm 3.23	
	10	57.63 \pm 2.27	
	50	86.81 \pm 5.13 *	
	100	87.29 \pm 5.13 *	
石油醚萃取物 Petroleum ether extract	1	51.30 \pm 5.07	0.9
	5	84.41 \pm 3.00 *	
	10	90.90 \pm 5.90 *	
	50	91.72 \pm 3.16 *	
	100	96.50 \pm 0.44 * *	
乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extract	1	8.67 \pm 0.82	6.7
	5	40.95 \pm 0.89	
	10	74.13 \pm 0.11	
	50	75.00 \pm 1.29	
	100	99.57 \pm 0.72 * *	
正丁醇萃取物 n-Butanol extract	1	28.54 \pm 6.32	4.1
	5	52.82 \pm 2.10	
	10	77.99 \pm 2.07	
	50	64.70 \pm 3.47	
	100	63.59 \pm 4.57	
水提取物 Water	1	-14.80 \pm 2.25	192.4
	5	6.42 \pm 1.78	
	10	33.50 \pm 1.96	
	50	29.55 \pm 5.38	
	100	43.40 \pm 5.14	
阿卡波糖 Acarbose	1	4.27 \pm 0.57	174.3
	10	9.56 \pm 2.31	
	100	32.10 \pm 1.20	
	1 000	83.10 \pm 0.76 *	

注:与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with negative control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

数据进行比较,以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义的标准。

4 结果

4.1 蒲公英醇提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响

由表 1 所示,蒲公英全草乙醇提取物对浓度 α -葡萄糖苷酶具有良好的抑制作用,其抑制效果呈依赖性关系。蒲公英各极性萃取物溶液对 α -葡萄糖苷酶均有抑制效果,其抑制效果与各萃取物溶液自身浓度呈依赖性关系;且石油醚的萃取物抑制效果尤为明显。石油醚萃取物与阴性对照组存在显著性差异,抑制效果强于阳性对照组阿卡波糖。

4.2 蒲公英各部位的不同极性提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响

如表 2 所示,蒲公英的根、茎、叶、花、种子的总提取物对 α -葡萄糖苷酶都具有较强的抑制作用,其中蒲公英茎的总提取液的抑制作用最强,其次是花和种子两个部位。但单独研究某一个极性条件下的活性抑制效果时,可以发现蒲公英的根和花在石油

醚萃取部位表现出很强的抑制作用,同时随着萃取溶剂的极性的逐渐变大,抑制效果逐渐下降,而蒲公英茎和叶则是水和正丁醇的抑制活性较好,但是没有蒲公英的根和花的石油醚萃取部位的活性强,由此我们可以判断蒲公英抑制 α -葡萄糖苷酶主要是通过花和根的石油醚极性萃取物成份起到主要作用。

表 2 蒲公英不同部位的 α -葡萄糖苷酶活性的结果

Table 2 Results of α -glucosidase activities in different parts of *T. mongolicum*

蒲公英植株部位 Dandelion plant part	成分 Ingredient	半数抑制率 IC_{50} Half inhibition rate ($\mu\text{g/mL}$)
花 Flower	总提取液 Total extract	0.4
	正丁醇层 n-Butanol layer	14.1
	石油醚层 Petroleum ether layer	0.4
茎 Stem	总提取液 Total extract	0.1
	石油醚层 Petroleum ether layer	2.1
	乙酸乙酯层 Ethyl acetate layer	1.8
	正丁醇层 n-Butanol layer	0.3
	水层 Water layer	0.6
叶 Leaf	总提取液 Total extract	1.1
	石油醚层 Petroleum ether layer	1.1
	乙酸乙酯层 Ethyl acetate layer	1.2
	叶的正丁醇层 n-Butanol layer	0.6
	水层 Water layer	0.6
根 Root	总提取液 Total extraction	1.1
	石油醚层 Petroleum ether layer	0.1
	乙酸乙酯层 Ethyl acetate layer	1.2
	正丁醇层 n-Butanol layer	1.3
	水层 Water layer	1.7
种子 Seed	原液 Primary liquid	1.0

4.3 蒲公英石油醚部位的抑制类型研究

如图 1 所示, Lineweaver-Burk 双倒数曲线作图均为相交于纵轴的一点的一组直线,随着抑制剂蒲公英石油醚萃取物溶液浓度的增大,直线纵轴截距不变,而直线斜率逐渐增大,米氏常数 K_m 值(横截距为 $-1/K_m$) 随抑制剂浓度的增大而增大,最大反应速率 V_{max} (纵截距为 $1/V_{max}$) 保持不变,可推测石油醚部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型为竞争性抑制^[14]。根据竞争性抑制动力学方程可求得蒲公英石油醚部位在不同加入量下表现的抑制常数 $K_i = 22.915 \text{ mg/L}$ (见图 1)。

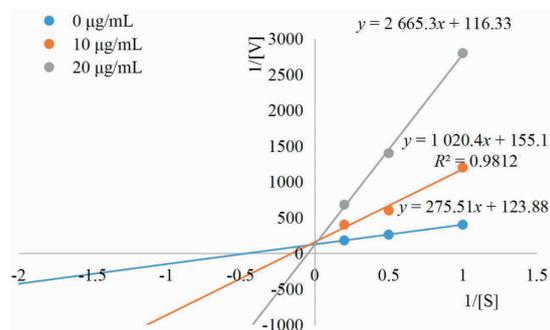


图 1 蒲公英全草石油醚 Lineweaver-Burk 双倒数曲线
Fig. 1 Double reciprocal curve of petroleum ether Lineweaver-Burk of dandelion herb

4.4 蒲公英石油醚部位化学成分 GC-MS 分析

采用 GC-MS 对具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的石油醚部位进行鉴定分析, 鉴定得到 39 个化合物,

见图 2 和表 3。从表 3 可以看出石油醚部位的化学成分主要为脂肪酸、酮类、酯类和三萜类化合物。

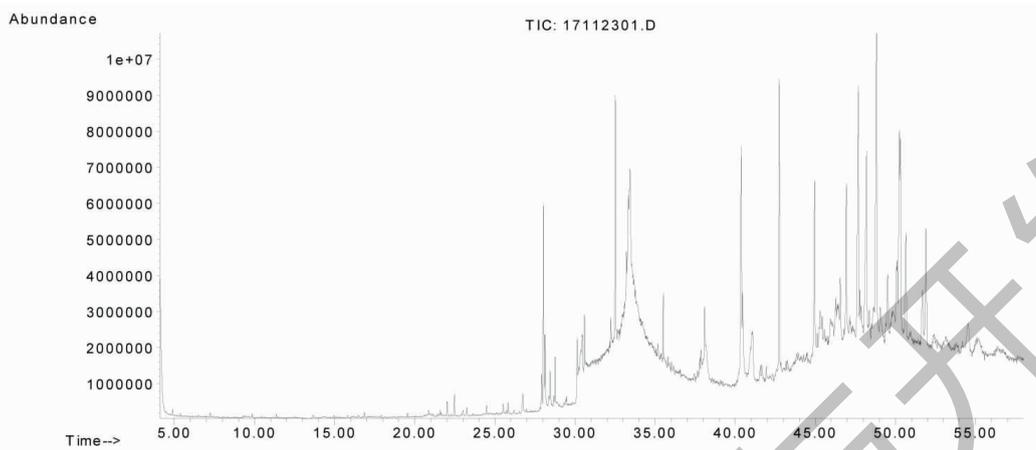


图 2 蒲公英全草石油醚部位 GC-MS 图谱

Fig. 2 GC-MS chromatogram of petroleum ether fraction of dandelion herb

表 3 蒲公英石油醚部位主要化学成分

Table 3 Main chemical constituents of petroleum ether fraction of dandelion

序号 No.	名称 Name	分子式 Molecular formula	出峰时间 Peak time (min)	分子质量 Molecular mass	含量 Content(%)
1	Decane 癸烷	$C_{10}H_{22}$	9.85	142	0.029
2	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one 2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮	$C_6H_8O_4$	13.64	144	0.043
3	Dodecane 十二烷	$C_{12}H_{26}$	14.95	170	0.022
4	3-Ethyl-4-methylpyrrole-2,5-dione 3-乙基-4-甲基吡咯-2,5-二酮	$C_7H_9NO_2$	15.82	139	0.040
5	3-Methyl-dodecane 3-甲基-十二烷	$C_{13}H_{28}$	16.87	184	0.066
6	Tetradecane 十四烷	$C_{14}H_{30}$	19.54	198	0.046
7	Indole 吲哚	$C_{15}H_{24}O$	22.01	220	0.184
8	Dihydroactinidiolide 二氢猕猴桃(醇酸)内酯	$C_{11}H_{16}O_2$	22.47	180	0.306
9	Lauric acid 月桂酸	$C_{12}H_{24}O_2$	23.01	200	0.061
10	2-Hydroxy- β -ionone 2-羟基- β -紫罗兰酮	$C_{13}H_{20}O_2$	25.50	208	0.124
11	1,15-Pentadecanediol 1,15-十五烷二醇	$C_{15}H_{32}O_2$	25.82	244	0.144
12	Myristic acid 豆蔻酸	$C_{14}H_{28}O_2$	26.74	228	0.350
13	Iso-neophytadiene 异新植二烯	$C_{20}H_{38}$	27.91	278	0.402
14	Nephtadiene 新植二烯	$C_{20}H_{38}$	28.04	278	2.556
15	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone 6,10,14-二甲基-2-噁唑烷酮	$C_{18}H_{36}O$	28.13	268	0.865
16	Isophytol 异植醇	$C_{20}H_{40}O$	28.76	296	0.533
17	Methyl palmitate 棕榈酸甲酯	$C_{17}H_{34}O_2$	29.47	270	0.085
18	Butyl phthalate 苯二甲酸丁酯	$C_{16}H_{22}O_4$	30.14	278	0.599
19	Palmitic acid 棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	30.46	256	1.396
20	Ethyl palmitate 棕榈酸乙酯	$C_{18}H_{36}O_2$	30.59	284	0.588

续表 3 (Continued Tab. 3)

序号 No.	名称 Name	分子式 Molecular formula	出峰时间 Peak time (min)	分子质量 Molecular mass	含量 Content(%)
21	Nonadecane 十九烷	C ₁₉ H ₄₀	32.24	268	0.329
22	Phytol 叶绿醇	C ₂₀ H ₄₀ O	32.52	296	3.233
23	Ethyl linoleate 亚油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	33.21	308	0.755
24	Linoleic acid 亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	33.43	280	23.074
25	Uncertain component 未确定成份	N/A	35.51	N/A	0.935
26	1-Eicosano 1-类二十烷酸	C ₂₀ H ₄₂ O	37.79	298	0.245
27	Heneicosane 二十一烷	C ₂₁ H ₄₄	37.87	296	0.437
28	2-Monopalmitin 2-棕榈酸单甘油酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	38.08	330	2.660
29	Cyclotetacosane 二十四环烷	C ₂₄ H ₄₈	40.37	336	4.180
30	1-Docosanol 正二十二醇	C ₂₂ H ₄₆ O	40.46	326	1.575
31	Lupeol acetate 羽扇豆醇酸酯	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	41.07	468	2.587
32	Uncertain component 未确定成份	N/A	42.75	N/A	4.494
33	Uncertain component 未确定成份	N/A	44.96	N/A	2.716
34	Vitamin E 维生素 E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	45.43	430	0.446
35	Ergost-5-enol 麦角甾-5-烯醇	C ₂₈ H ₄₈ O	46.55	400	1.060
36	Stigmasterol 豆甾醇	C ₂₉ H ₄₈ O	46.93	412	2.510
37	γ -Sitosterol γ -谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	47.68	414	5.632
38	Phytol decanoate 十三烷酸叶绿醇	C ₃₀ H ₅₈ O ₂	47.77	450	0.482
39	β -Amyrin β -香树素	C ₃₀ H ₅₀ O	48.19	426	4.604

4.5 活性成分的虚拟筛选与分子对接结果

将 4.4 中 GC-MS 气相色谱鉴别出的化合物,通过 TCMS 数据库进行虚拟筛选;选择口服利用度 (OB) $\geq 30\%$,类药性 (DL) ≥ 0.18 ;作为筛选条件。(结果见表 4) 气质联用技术鉴定结果中蒲公英全草石油醚部位成分仅有五种化合物满足成药条件(部分化合物数据库尚未收录)把这五种化合物 ergost-5-enol 麦角甾-5-烯醇(俗称菜油甾醇,后文中皆以菜

油甾醇出现)、 γ -sitosterol (γ -谷甾醇)、phytol(叶绿醇)、ethyl linoleate(亚油酸乙酯) palmitic acid(棕榈酸);用软件 autodock vina 软件与 α -葡萄糖苷酶进行打分;将打分结果大于 7 的化合物,认为其与 α -葡萄糖苷酶有强结合作用;可以得出菜油甾醇与 γ -谷甾醇能 α -葡萄糖苷酶较其他几种成分与 α -葡萄糖苷酶有较强的结合能力(结果见图 3)。

表 4 蒲公英活性成分—分子对接打分结果

Table 4 Taraxacum active components-molecular docking scoring results

成分 Compound	打分 Point (kcal/mol)	口服生物利用度 Oral bioavailability(%)	类药性 Drug-likeness
菜油甾醇 Ergost-5-enol	8.5	44.88	0.72
棕榈酸 Palmitic acid	4.1	19.30	0.10
β -谷甾醇 β -Sitosterol	7.8	36.91	0.75
γ -谷甾醇 γ -Sitosterol	7.8	36.91	0.75
叶绿醇 Phytol	5.1	33.82	0.13
亚油酸乙酯 Ethyl linoleate	5.1	42.00	0.19

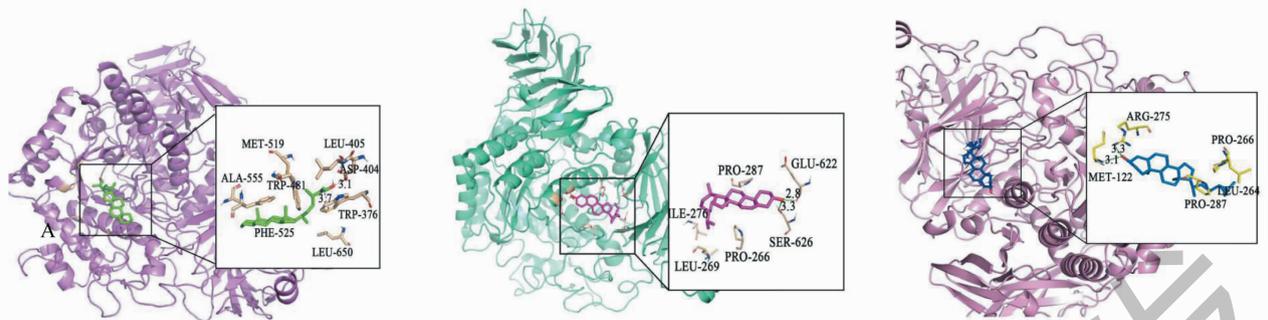


图3 活性成分的分子对接3D图

Fig. 3 3D map of molecular docking of sitosterol

注:A:菜油甾醇;B: γ -谷甾醇;C: β -谷甾醇。Note:A:Ergost-5-enol;B: γ -Sitosterol;C: β -Sitosterol.

4.6 单体化合物的体外活性结果

由4.5的实验数据结果,得出结论认为 ergost-5-enol 麦角甾-5-烯醇(即菜油甾醇)、 γ -sitosterol(γ -谷甾醇)这两种物质能与 α -葡萄糖苷酶很好的结合;可能是活性强的小分子是 α -葡萄糖苷酶抑制

剂。为验证此猜想;购买这两种单体进行体外活性实验(注: γ -sitosterol(γ -谷甾醇)全球未有供货商所以用 β -sitosterol(β -谷甾醇)代替它实验,也另做有 β -谷甾醇与 α -葡萄糖苷酶的分子对接图3和表4),其活性结果见表5。

表5 单体外活性成分

Table 5 The active ingredients in dandelion inhibiting the activity of α -glucosidase of monomer *in vitro*

样品 Sample	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抑制率 Inhibition rate (%)	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
菜油甾醇 Ergost-5-enol	0.05	13.17 ± 1.32	0.924
	0.1	23.10 ± 0.40	
	0.2	24.05 ± 0.45	
	0.5	26.86 ± 0.42	
	1	54.92 ± 0.36	
β 谷甾醇 β -Sitosterol	1	13.70 ± 0.80	71.14
	10	36.40 ± 0.54	
	100	61.30 ± 0.89	

4.7 基于网络药理学初步研究蒲公英活性成分的降糖作业机制

利用 TCMSP、TCMID 数据库、PubChem 等数据库联用检索,将蒲公英的有效化合物逐一配对潜在靶点^[15]。同时使用蛋白质数据库(Uniprot Database),筛选出物种为“人”的靶点,从而获得与候选化合物相关的靶点蛋白信息。同时在 TCMSP 数据库中筛选靶点对应的疾病。在 genecards(基因信息最全面的网站)里面找到 II 型糖尿病的相关靶点。

4.7.1 筛选蒲公英活性成分的 ADME 参数

利用网络药理学分析数据库(TCMID)和(TCM-SP)搜索蒲公英化学成分,利用 PubChem 数据库(对

化学成分的分子结构进行确证,最后建立蒲公英化合物数据库。再筛选通过 ADME 参数筛选:以选择口服利用度(OB) $\geq 30\%$,类药性(DL) ≥ 0.18 作为化合物分子的筛选条件^[16],得到五种化合物:叶黄呋喃素、菊黄素、槲皮素、蒲公英萜醇、 β -谷甾醇。

4.7.2 绘制疾病—成分靶点图

在 genecards 里找到 II 型糖尿病靶点,取相关度大于 10 的靶点和成分靶点在 CTD(comparative toxicogenomics database)里面做 vene(韦恩)图得到成分靶点 217 个和二型糖尿病靶点 584 个,且得到共有靶点基因 78 个(见图4)。

4.7.3 绘制成分—靶点图

在通过 TCMSP 平台寻找蒲公英活性成分与市

表 6 蒲公英活性成分筛选结果及其 ADME 参数表

Table 6 Screening results of active components of dandelion and its ADME parameters

序号 No.	MOL ID	成分名称 Name	OB(%)	DL
1	MOL000358	β -谷甾醇 β -Sitosterol	36.91	0.75
2	MOL006554	蒲公英萜醇 Taraxerol	38.40	0.77
3	MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28
4	MOL004492	菊黄素 Chrysanthemaxanthin	38.72	0.58
5	MOL002680	叶黄味喃素 Flavoxanthin	60.41	0.56

注:数据来源:TCMID、TCMSP、PubChem 数据库。

Note:Source:TCMID,TCMSP, PubChem database.

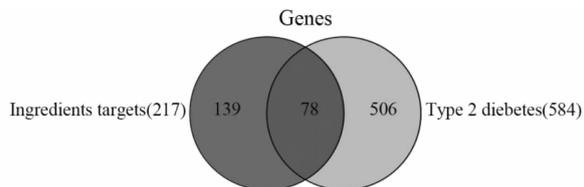


图 4 二型糖尿病—蒲公英成分靶点基因的韦恩图

Fig. 4 Type 2 diabetes-Ingredients targets gene-VennDiagram

面上常见的几种 II 型糖尿病药物的潜在靶点,将候选化合物与 II 型糖尿病的靶点蛋白上传至 Cytoscape 软件生成体现蒲公英药物-靶点相互作用的网络图,通过与主流药物与蒲公英成分通过共同靶点建立联系建立联系(见图 5)。

以 $\text{degree}(\text{度}) \geq 15$ 作为筛选条件,在网络中,一个节点的度(degree)表示网络中和节点相连路线的条数;度越大,说明该成分与靶点相关程度越高。

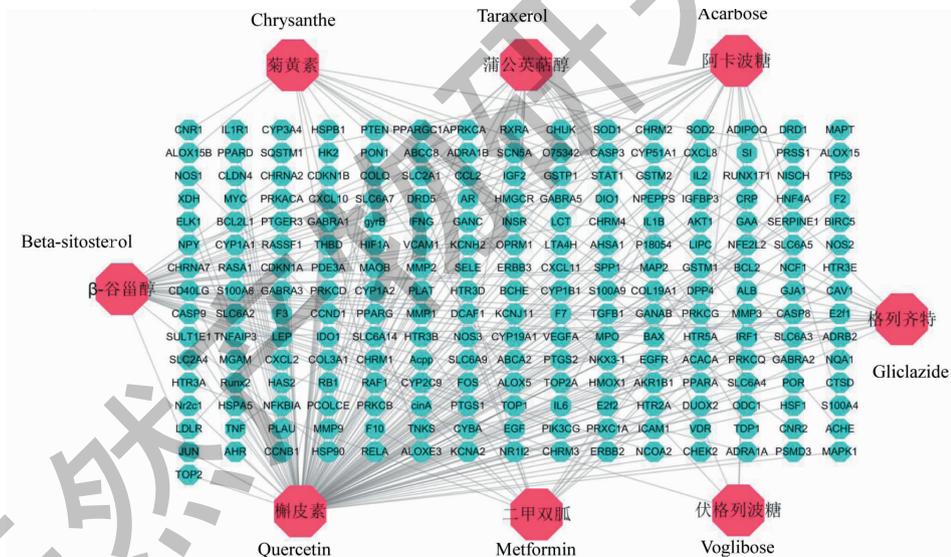


图 5 蒲公英成分与降糖药-靶点图

Fig. 5 Dandelion components and hypoglycemic agents-target picture

蒲公英成分中有蒲公英萜醇、槲皮素、菊黄素、 β -谷甾醇,有效成分其中槲皮素的度为 149 β -谷甾醇的度为 37 明显高于几种主流的 II 型糖尿病药物(见表 7)。说明槲皮素、 β -谷甾醇等天然成分可作用于多个降糖靶点,可能具有良好的降糖作用。

4.8 PPI 网络的构建与分析

在 string 中输入共有基因,设定最低交互评分为 0.9,得到 ppi 网络互作图^[16]得到 78 个节点,189

条边(图 6)。平均节点 4.85。运用 Bisogenet 插件对网络中所有点的拓扑参数(度、介度中心度和接近中心度)进行分析,选择靶点中每个靶点的度拓扑参数值大于中位数,即度 ≥ 12 , closeness centrality(接近中心度) ≥ 0.5 作为筛选核心靶点的条件,筛选核心靶点 Hub-蛋白。得到了 3 个核心靶点 AKT1(蛋白激酶)、IL6(白介素-6)、TNF(肿瘤坏死因子- α)。

表 7 蒲公英成分和二型糖尿病药物降糖靶点的度值
Table 7 Degree of taraxacum components and hypoglycemic targets of type 2 diabetes drugs

成分 Compound	度 Degree
蒲公英萜醇 Taraxerol	15
槲皮素 Quercetin	149
菊黄素 Chrysanthemaxanthin	15
β -谷甾醇 β -Sitosterol	37
二甲双胍 Metformin	15
伏格列波糖 Voglibose	5
格列齐特 Gliclazide	14
阿卡波糖 Acarbose	21

4.9 绘制蒲公英成分与降糖药物的疾病成分共有靶点图

运用 Cytoscape 软件绘制蒲公英成分与降糖药物的疾病成分共有靶点图^[17] (见图 7) 得到 87 个节点 110 条边。在图中我们可以看出蒲公英成分中的蒲公英萜醇与菊黄素对 II 型糖尿病有着一定的联系, β -谷甾醇具有较好作用; 槲皮素有很强的降糖活性。

4.10 GO 富集分析

利用 DAVID 平台对蒲公英中 PPI 网络中涉及的核心靶点进行 GO 功能富集分析。根据错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05, 进一步确定了 GO 条目。其中包括通路、生物学过程、细胞成分、

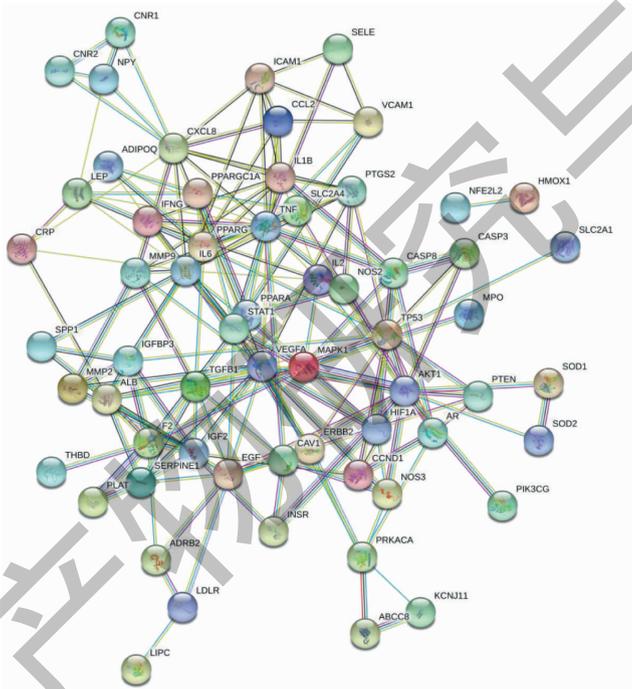


图 6 蒲公英成分蛋白相互作用网络

Fig. 6 Dandelion component protein interaction network

分子功能; 其中通路的条目为 145 条, 包括得有主要的降糖通路 AMPK (AMP 依赖的蛋白激酶) 12 条和 PI3K-AKT13 条。将其运用 cytoscape 绘制得到了新的靶点-通路图 (见图 8 和图 9)。

5 讨论

本课题组首次研究发现黔产蒲公英全草乙醇提取液具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制作用 (见表 1), 且石油醚萃取物的抑制效果最为显著 (IC_{50} 约为 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。为更好的分析石油醚萃取物中的有效成份, 特选用气相色谱-质谱联用技术作为检测手段; 检测出石油醚萃取的浸膏成份中共有 39 种化合物,

其中 2 种未知成份。进一步对 37 种已知化合物进行分析, 查阅相关文献, 选择口服利用度 (OB) $\geq 30\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 作为筛选条件, 同时对相关参数接近但有相关的文献支撑的化合物, 一并选入进行了分子对接。实验结果得出 β -谷甾醇、 γ -谷甾醇、菜油甾醇对 α -葡萄糖苷酶具有良好的亲和性; 后续的单体化合物体外活性实验结果也证明了这个结论。

通过对蒲公英全草研究后, 也对蒲公英各个植株部位的抑制活性作用再次进行实验; 从中发现蒲公英中除茎外, 绝大多数植株部位的低极性成分抑

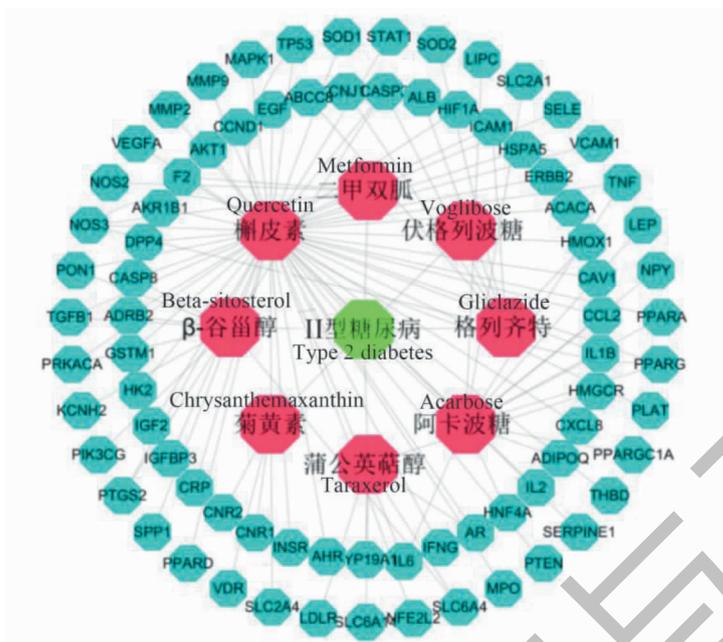


图7 蒲公英成分与降糖药物的疾病成分共有靶点图

Fig. 7 Common target diagram of dandelion components and disease components of hypoglycemic drugs

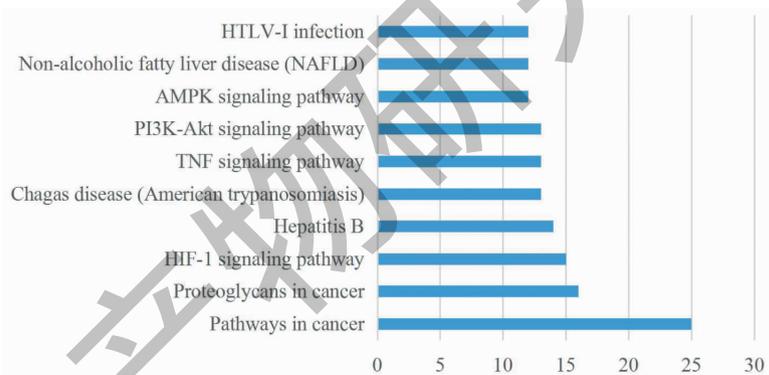


图8 蒲公英有效成分通路图

Fig. 8 Road map of dandelion active component

制效果要优于高极性成分^[13];这与之前的全草体外活性中石油醚萃取成分活性良好结果相互印证;同时,由表2可知,蒲公英根和花的石油醚萃取物具有良好的抑制效果,本课题组推测其在全草石油醚萃取物中起主导作用。蒲公英茎中的活性成分,多富集于正丁醇萃取物中;其活性效果与其他部位有差异,其茎乙醇总提取物活性是整个蒲公英植株部位中最好;但茎用各萃取剂所萃取成分活性均不如总提取液活性;说明蒲公英茎中乙醇总提取物活性是由各个极性成分的共同协同作用体现。

在对蒲公英石油醚萃取物做酶代动力学研究中,发现通过改变底物浓度;使得反应速率发生改

变,但其关于纵坐标的交点几乎保持不边(见图1);可初步判断石油醚萃取物中成分的抑制类型为竞争性抑制。结合后面实验中的分子对接实验结果分析,可以进一步确定蒲公英低极性成分存在可作为抑制 α -葡萄糖苷酶抑制剂先导化合物。

本研究采用液相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对蒲公英石油醚萃取部位的化学成分进行了分析^[14,15]。本研究从蒲公英石油醚部位共检测并鉴定得到39个化合物,其中含有三种未知物质,其化学成分主要为脂肪酸、三萜类、黄酮、植物甾醇类、乙酰酯类、挥发油等。在检测出的化合物中,叶绿醇和亚油酸乙酯、 γ -谷甾醇等类化合物的降糖活性虽有

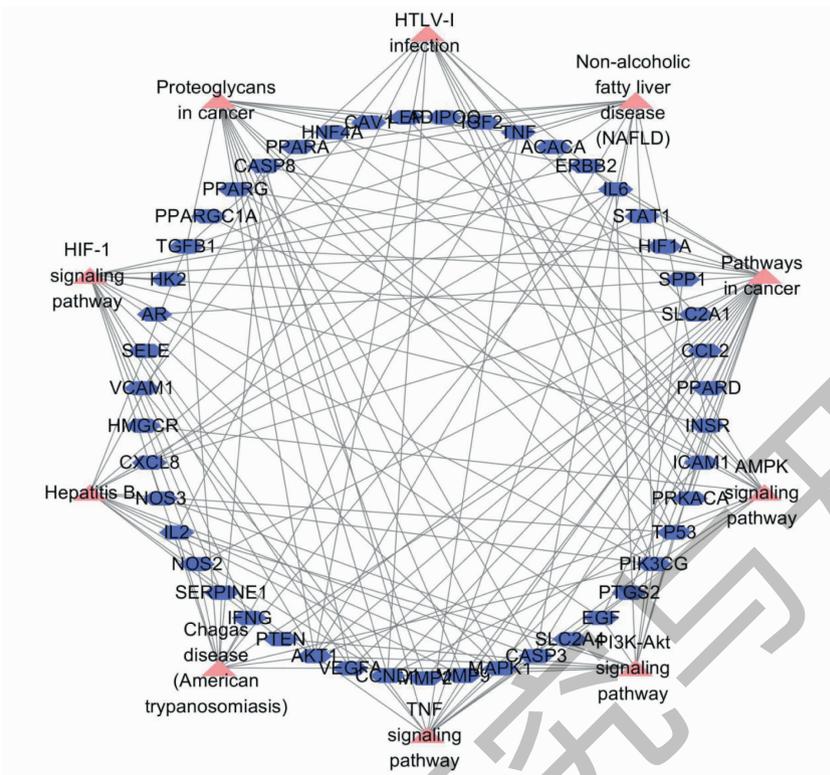


图9 蒲公英有效成分的靶点-通路图

Fig.9 Target-pathway diagram of active components of dandelion

降糖研究方面的报道,但目前缺乏抑制糖苷酶方面的报道^[16-19],并且我们首次发现麦角甾酮-烯醇具有较强抑制 α -葡萄糖苷酶作用。

本文探索了黔产蒲公英抑制 α -葡萄糖苷酶的活性和相关化学成分,并通过网络药理学初步分析了其降糖的作用机制,丰富了蒲公英植物生理活性及化学成分的内涵,提供了蒲公英开发为新的 α -葡萄糖苷酶活性抑制剂或降糖药物的实验依据。

参考文献

- 1 Wu YL, Pu HS. Advances in pharmacological research of dandelion[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2004,15:519-520.
- 2 Ding H,Zhang QF,Huang M,et al. Dandelion medicinal research progress[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报),2018,20:156-159.
- 3 Yang C,Yan QZ,Tang J,et al. Study on chemical composition of volatile oil from taraxaci herba and its anti-inflammatory and anti-tumor activities[J]. Chin J Tradit Med Pharm(中华中医药杂志),2018,33:3106-3111.
- 4 Shi S,Zhang YP,Hang KL,et al. Study on chemical constituents of dandelion[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂

- 志),2009,34:1002-1004.
- 5 Feng RJ, Ma L,Cao HH, et al. Hypoglycemic effect of wild dandelion combined with seabuckthorn on diabetic model mice and comparison with drug alone[J]. Guangzhou Med J(广州医药),2013,44(6):7-9.
- 6 Song XY,Liu Q,Wang ZH. Study on pharmacological action of dandelion polysaccharide[J]. J China Pharm(中国药房),2009,20:2095-2097.
- 7 Sweeney B,Vora M,Ulbricht C, et al. Evidence-based systematic review of dandelion(*Taraxacum officinale*) by ntural standard research collaboration[J]. J Herb Pharmacother. 2005;5:79-93.
- 8 Goksu E,Eken C,Karadeniz O,et al. First report of hypoglycemia secondary to dandelion(*Taraxacum officinale*) ingestion[J]. Am J Emerg Med,2010,28:111. e1-111. e2.
- 9 Li SY,Jiang B,Zhao YJ,et al. Study on the change law of the content of dandelion effect components and the hypoglycemic effect in different picking periods[J]. Food Sci(食品科学),2014,35:238-242.
- 10 Li XS,Zhang YW. Hypoglycemic effect and mechanism of dandelion water extract on streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2013,44:863-868.