

基于网络药理学-分子对接研究桑不同入药部位防治糖尿病的作用机制

李德龙,何 韶,陈冰婷,伊丽则热·艾拜杜拉,马晓丽*

新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011

摘要:采用网络药理学-分子对接研究桑不同入药部位防治糖尿病的作用机制,从TCMSP、TCMID等多个中药数据库获得桑不同部位桑叶、桑椹、桑枝中的成分信息,结合OMIM、TTD等疾病数据库获得糖尿病靶点信息,利用Cytoscape 3.7.2软件分别构建不同部位的“活性成分-疾病靶点”的复杂网络及拓扑分析,应用WebGestalt工具进行通路富集分析。使用Autodesk vina软件对桑各入药部位主要活性成分与作用靶点进行分子对接。结果得到桑的不同入药部位主要有11个差异活性成分,调控MAPK8、AKT1、VEGFA、IL6、PPARG等32个核心靶点。靶点主要涉及急性炎症反应、有机氮化合物的反应、细胞增殖调控、对胰岛素刺激反应等生物过程。通过介素-17信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、PI3K-AKT信号通路和MAPK信号通路等来发挥治疗糖尿病的作用。本研究通过网络药理学分析桑不同入药部位防治糖尿病的活性成分群及作用机制,为桑的不同入药部位防治糖尿病的作用关系给出了参考依据。

关键词:网络药理学;分子对接;桑;不同入药部位;糖尿病;作用机制

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)2-0291-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.2.014

Study on the mechanism of different parts of *Morus alba* L. in preventing and treating diabetes based on network pharmacology-molecular docking

LI De-long, HE Tao, CHEN Bing-ting, YILZERA Ai-bai-du-la, MA Xiao-li*

Department of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: To explore the mechanism of different parts of *M. alba* in prevention and treatment of diabetes by network pharmacology and molecular docking. The component information of Folium Mori, Fructus Mori and Ramulus Mori in different parts of *Morus alba* L. was obtained from TCMSP, TCMID and other traditional Chinese medicine databases. Diabetes target information was obtained by combining OMIM, TTD and other disease databases. The complex network and topology analysis of "active ingredients-disease target" in different parts were constructed by using the software of Cytoscape 3.7.2, and the pathway enrichment was analyzed by WebGestalt tool. Autodesk Vina software was used to conduct molecular docking between the main active components and the target of *M. alba*. Results there were 11 active components in different parts of *M. alba*, which regulated 32 core targets such as MAPK8, AKT1, VEGFA, IL6 and PPARG. The targets are mainly related to acute inflammatory response, organic nitrogen compounds reaction, cell proliferation regulation, insulin stimulation response and other biological processes. It can play a role in the treatment of diabetes through interleukin-17 signaling pathway, tumor necrosis factor signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway and MAPK signaling pathway. In this study, we analyzed the active component groups and action mechanism of different parts of *M. alba* in the prevention and treatment of diabetes mellitus through network pharmacology, and provided a reference basis for the relationship between the different parts of *M. alba* in the prevention and treatment of diabetes.

Key words: network pharmacology; molecular docking; *Morus alba* L.; different parts; diabetes; mechanism

收稿日期:2020-09-14 接受日期:2020-12-10

基金项目:国家自然科学基金(81760753);新疆维吾尔自治区自然科学基金(2018D01C170)

*通信作者 E-mail:mxl108@sohu.com

桑科(Moraceae)桑属植物桑(*Morus alba* L.),始载于《神农本草经》^[1],其叶子、果实、枝均可入药,桑叶(Folium Mori, FoM),性味苦甘寒,归肺肝经,功效:疏风清热,养肺明目,临幊上常应用于心脑

血管病或脱发的治疗^[2];桑椹(*Fructus Mori*, FrM),性味甘寒,归心肾经,补阴补血,生津润肠^[3],被称为“民间圣果”;桑枝(*Ramulus Mori*, RaM),性味,苦平,归肝,功效:祛风清热通络,常用于关节炎、风湿的治疗^[4]。从性味归经来看,桑叶作用更加广泛,现代医学研究发现桑的不同入药部位中虽然都含有黄酮、生物碱、多酚等功效组分,具有抗氧化、抗炎、降脂、降糖、抗癌、降压等作用^[5],但各入药部位的活性成分含量、药理活性及临床用途并不完全相同。如何客观阐明桑各入药部位活性成分群、预测生物学机制成为了推动桑资源基础物质研究的关键问题。

糖尿病(*diabetes mellitus*, DM)是一种严重的代谢性疾病,对其有治疗作用的中药开发一直是当今的热点与难点,而网络药理学是一种基于大数据分析的多元方法,能够快速预测中药的“成分-靶点-疾病”网络,解释中药多成分起效的活性物质群,对评价中药的药用价值具有重要作用^[6]。Liu 等^[7]采用网络药理学的方法发现甘草昔主要通过调控 PI3K-AKT 信号通路、癌症信号通路、Ras 信号通路发挥治疗抑郁症和糖尿病的作用。Ge 等^[8]通过网络药理学研究了桑叶粉末抗糖尿病的作用机制,鉴定并得到 22 种药物成分,可调节 TNF、PPARG、CSK3B、IRS1、IL-6 等靶蛋白,它们与胰岛素及炎症信号通路、糖代谢等相关通路、慢性炎症性疾病等有关。本课题组前期采用网络药理学方法预测了桑椹多成分协同防治防治糖尿病的作用机制^[9]。

为进一步明确桑不同入药部位的抗糖尿病作用,本文通过网络药理学策略,系统分析各入药部位药性差异及作用机制,对比、解释桑不同部位防治糖尿病的关键药效物质,结合生物信息注释方法对药性差异进行全新阐释,为显著提升桑的药用资源开发领域,促进桑资源对复杂代谢性疾病防治提供全新的研究模式。

1 材料与方法

1.1 桑不同部位活性成分群及其潜在靶点的建立

通过 TCMSP、TCMID 和 BATMAN-TCM 等中药数据库中药名称检索及万方、知网文献检索获取桑叶、桑椹、桑枝的化合物成分信息及化合物对应的潜在靶标信息。参考 TCMSP 数据库中口服生物利用度^[10](oral bioavailability, OB ≥ 30%) 和类药性(drug-like, DL ≥ 0.18)等中药体内 ADME 参数对化合物库进行筛选,并将筛选后的活性成分对应的靶

点名用 Uniprot 蛋白数据库进行标准化处理,最终得到三个部位活性成分群及其潜在靶点。

1.2 桑不同部位活性成分-DM 靶标网络构建

在 OMIM、TTD、GeneCards 数据库中以“type 2 diabetes”为检索词,整合得到 II 型糖尿病靶点信息,与成分靶点取交集,得到不同部位治疗糖尿病的潜在靶点,利用 Cytoscape 3.7.2 软件分别绘制桑不同部位活性成分-疾病靶点网络图。

1.3 筛选桑不同入药部位的主要活性成分及其差异分析

通过不同入药部位活性成分-疾病靶点的网络筛选主要活性成分,将度值靠前的成分作为各入药部位主要活性成分,并比较其共有成分与差异成分,判断其药性差异的物质基础。

1.4 蛋白-蛋白互作网络(PPI)构建

为了获取与疾病有关的核心基因,我们分别将获得的三个入药部位的潜在作用靶点导入到 STRING 蛋白数据库,限定物种为人,选取 combined score > 0.7 的靶点作为核心靶点,将结果数据导入到 Cytoscape 3.7.2 软件中构建 PPI 网络。

1.5 GO 分类富集分析与通路分析

将获得的核心靶点导入到 WebGestalt (www.webgestalt.org/#)基因富集分析在线工具中进行多组间 GO 注释分析与 KEGG 通路富集分析(FDR < 0.05),比较并分析三个组织部位对 2 型糖尿病的作用机制。

1.6 分子对接

应用 AutoDock vina 软件将三个部位 PPI 网络中度值排名前 3 的 5 个靶点分别与 3 个共有成分、8 个度值靠前的差异化合物进行分子对接验证,并用临床常用药物二甲双胍(metformin)作为对照。分别从 PDB 蛋白质结构数据库和 ZINC 数据库中下载受体的晶体结构和配体的化学结构,MAPK8、AKT1、VEGFA、IL6、PPARG 对应的 PDB ID 分别为 3PZE、6S9W、4KZN、1ALU、6MS7,采用 AutoDock Tools 工具对上述蛋白受体和配体进行常规处理,再用其 Autogrid 模块得到对接活性位点,运行程序进行分子对接,得到结合能(affinity)。本研究以结合能 < -5.0 kcal/mol 为分子与靶点结合性较好的条件。

2 结果

2.1 活性成分的筛选及疾病靶点的获取

通过检索数据库和相关文献并剔除掉没有明显药效的化合物后得到 FoM 中 194 个化合物,FrM 中

72个化合物,RaM中30个化合物,主要分为黄酮类、多糖类、挥发油、生物碱以及氨基酸类等,对三者作韦恩图比较(图1A),只有5种共有化合物桑黄酮(kuwanon c)、1-脱氧野尻霉素(DNJ)、桑色素(morin)、东莨菪内酯(scopoletin)、肌肉肌醇(myo-inositol),三个入药部位化合物种类差异明显。根据OB及DL参数筛选并删除一些一物多名的化合物与重复重现的靶标以及一些没有明确对应靶标的化合物后,FoM有45个活性化合物和232个化合物所对应的靶点,FrM中有29个活性化合物和350个化合物所对应的靶点,RaM中有16个活性化合物和153个

化合物所对应的靶点,这表明化合物与靶点的差异可能是桑不同入药部位作用差异的原因。在OMIM、TTD、GeneCards数据库中筛选得到II型糖尿病靶点284个,与不同入药部位活性成分作用靶点取交集(图1B),得到FoM治疗靶点24个(PTGS2、PTGS1、PPARG、F2、DPP4等),FrM治疗靶点31个(PPARG、PTGS2、PTGS1、NFKB1、TP53等),RaM治疗靶点22个(PTGS2、PTGS1、MGAM、DPP4、F2等),三者共有的治疗靶点13个(MGAM、PIK3CG、DPP4、PPARG、TP53等)。

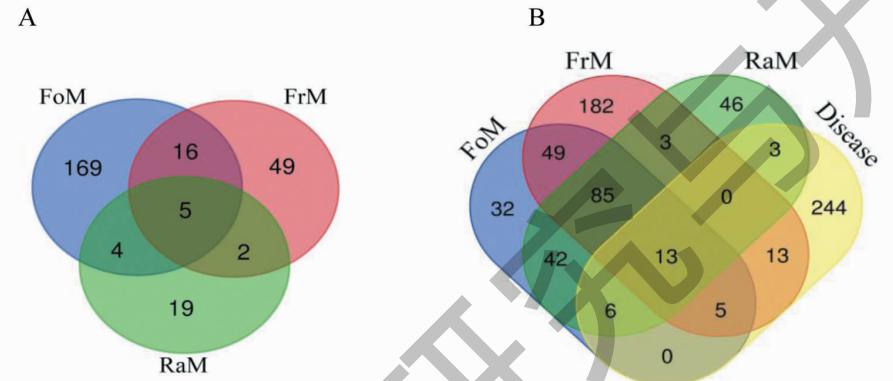


图1 三个入药部位整体化合物Venn图(A)与ADME筛选后化合物靶点与疾病靶点Venn图(B)

Fig. 1 Venn's diagram of all compounds (A) and compound target-disease target after ADME screening (B) in three parts of *M. alba*

2.2 桑不同部位活性成分-DM靶标进行网络构建

将三个入药部位的活性化合物靶标与疾病靶标映射后作活性成分-疾病靶点网络图(图2~4),FoM生成62个节点,136条边;FrM生成46个节点,57条边;RaM生成37个节点,65条边,节点大小和颜色表示该节点自由度值的大小,节点越大,由绿色变红色对应的度值越大。其中FoM中度值较大的成分及度值为槲皮素(quercetin,16)、山奈酚(kaempferol,15)、甲基丁香酚(mthyleugenol,5)、丁香酚(eugenol,5)等,度值较大的靶点及度值为环氧合酶2(PTGS2,10)、环氧合酶1(PTGS1,9)、麦芽糖淀粉酶(MGAM,8)、二肽酰肽酶IV(DPP4,8)等,这些化合物和靶点可能是桑源药材干预糖尿病的主要化合物与靶点。三者13种共有靶点中PTGS1、PTGS2、PPARG、F2、DPP4均度值靠前,但是PIK3CG只在FoM中度值靠前,TP53只在FrM中度值靠前,MGAM只在RaM中度值靠前;另外,FoM中没有独有靶点,FrM中13种独有靶点中NFKB1度值靠前,RaM中3种独有靶点中没有度值靠前的靶点。这些主要化合物与靶点的差异也进一步提示不同入药部位防治糖尿病作用机制的不同。

(kaempferol,15)、苦来西碱(cularicine,9)、桑色素(morin,6)、二氢山奈酚(dihydokaempferol,6)等,度值较大的靶点及度值为环氧合酶2(PTGS2,10)、环氧合酶1(PTGS1,9)、麦芽糖淀粉酶(MGAM,8)、二肽酰肽酶IV(DPP4,8)等,这些化合物和靶点可能是桑源药材干预糖尿病的主要化合物与靶点。三者13种共有靶点中PTGS1、PTGS2、PPARG、F2、DPP4均度值靠前,但是PIK3CG只在FoM中度值靠前,TP53只在FrM中度值靠前,MGAM只在RaM中度值靠前;另外,FoM中没有独有靶点,FrM中13种独有靶点中NFKB1度值靠前,RaM中3种独有靶点中没有度值靠前的靶点。这些主要化合物与靶点的差异也进一步提示不同入药部位防治糖尿病作用机制的不同。

2.3 筛选桑不同入药部位的主要活性成分及其差异分析

将各部位成分-疾病靶点网络图中的化合物进行整理,得到FoM中有38个成分,FrM中有15个成分;RaM中有15个成分,将三部位成分进行韦恩分

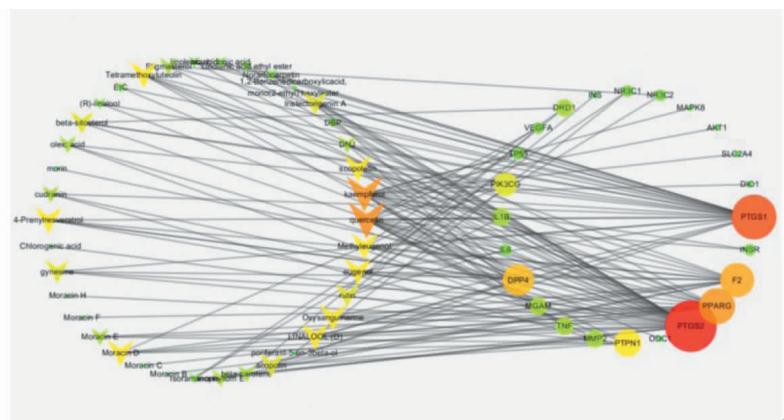


图 2 FoM 化合物-DM 疾病靶点网络图
Fig. 2 Network of FoM ingredients-disease target

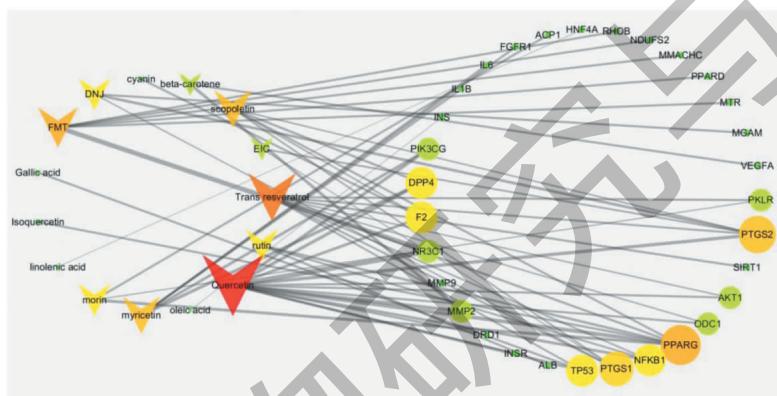


图 3 FrM 化合物-DM 疾病靶点网络图
Fig. 3 Network of FrM ingredients-disease target

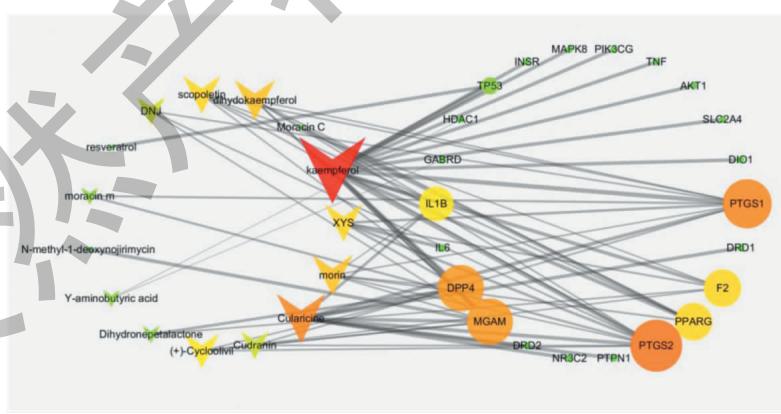


图 4 RaM 化合物-DM 疾病靶点网络图
Fig. 4 Network of RaM ingredients-disease target

析,见表1,并结合各部位成分-疾病靶点网络图分析其度值,发现三部位中共有的主要成分有3个:桑色素、东莨菪内酯、1-脱氧野尻霉素。桑色素是RaM中度值较高的成分;FoM中的特有成分有26个,其

中丁香酚和甲基丁香酚是其度值较高的成分;FrM中的特有成分有6个,其中反式白藜芦醇与杨梅素是其度值较大的成分;RaM中的特有成分有9个,其中苦来西碱与二氢山奈酚是其度值较大的成分。

两两比较中, FoM 与 FrM 共有成分为 9 个, 槲皮素为两者中高度值的成分, FoM 与 RaM 共有成分为 6 个, 其中山奈酚为两者中高度值的成分。有趣的是 FrM 与 RaM 都有 15 个主要成分, 但共有成分仅有 3

个常见成分, 从三部位个差异成分的个数比较得出, FoM 分别与 FrM 和 RaM 在防治糖尿病方面可能具有相似的作用, FrM 与 RaM 在防治糖尿病方面可能作用的途径差异较大。

表 1 三个入药部位活性成分差异

Table 1 Different active components of three parts used in medicine

交集 Intersection	总数 Total	成分 Ingredient
FrM FoM RaM	3	桑色素(morin)、东莨菪内酯(scopoletin)、1-脱氧野尻霉素(DNJ)
FrM FoM	6	α-亚麻酸(linolenic acid)、槲皮素(quercetin)、芦丁(rutin)、油酸(oleic acid)、(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸(EIC)、β-胡萝卜素(beta-carotene)
FoM RaM	3	山奈酚(kaempferol)、氧化白藜芦醇(cudranin)、桑辛素 C(moracin C)
FoM	26	桑辛素 H(moracin H)、丁香酚(eugenol)、红厚壳内酯(inophyllum E)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)、花生四烯酸(arachidonic Acid)、γ-谷甾醇(poriferast-5-en-3β-ol)、葫芦巴碱(gynenoside)、桑辛素 E(moracin E)、桑辛素 F(moracin F)、植物甾醇(stigmasterol)、绿原酸(chlorogenic acid)、亚麻酸乙酯(linolenic acid ethyl ester)、甲基丁香酚(methyleugenol)、氧化血根碱(oxysanguinarine)、鸢尾甲黄素 A(iristectorigin A)、4-戊基白藜芦醇(4-Prenylresveratrol)、异热马酮(isoramaneone)、桑辛素 B(moracin B)、(S)-芳樟醇((S)-linalool)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、降桂木生黄亭(norartocarpentin)、邻苯二甲酸单乙基己基酯(1,2-benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethyl) hexylester)、东莨菪碱(scopolin)、桑辛素 D(moracin D)、3,4,5,7-四甲氧基黄酮(tetramethoxyluteolin)、(R)-芳樟醇((R)-linalool)
FrM	6	甲酸(FMT)、异槲皮素(isoquercetin)、没食子酸(gallic acid)、反式白藜芦醇(trans resveratrol)、杨梅素(myricetin)、花青苷(cyanin)
RaM	9	环橄榄脂素((+)-cycloolivil)、桑辛素 M(moracin M)、二氢山奈酚(dihydrokaempferol)、二氢戊内酯(dihydropelatacone)、D-木糖(XYS)、白藜芦醇(resveratrol)、γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid)、苦来西碱(cularicine)、N-甲基-1-脱氧尿霉素(N-methyl-1-deoxyojirimycin)

2.4 蛋白-蛋白互作网络(PPI)构建

将 STRING 数据库中按照结合分数(combined score) > 0.7 筛选后的核心靶点相互作用关系导入到 Cytoscape 3.7.2 软件中分别构建三个部位 PPI 核心网络(图 5), 边越粗结合分数越大, 节点越大表明度值越大, FoM 中共有 22 个节点, 74 条边, 其中胰岛素(INS, 14)、促分裂原活化蛋白激酶 8(MAPK8, 12)、α 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(AKT1, 12)靶点度值排名靠前; FrM 中共有 26 个节点, 80 条边, 其中

胰岛素(INS, 14)、α 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(AKT1, 14)、血管内皮生长因子 A(VEGFA, 13)靶点度值排名靠前; RaM 中共有 16 个节点, 40 条边, 其中度值排名靠前的靶点有白细胞介素-6(IL6, 9)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(PPARG, 8)、α 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(AKT1, 8)。三个入药部位共涉及 32 个核心靶点, 这些度值排名靠前的靶点可能是与糖尿病有关的关键靶点。

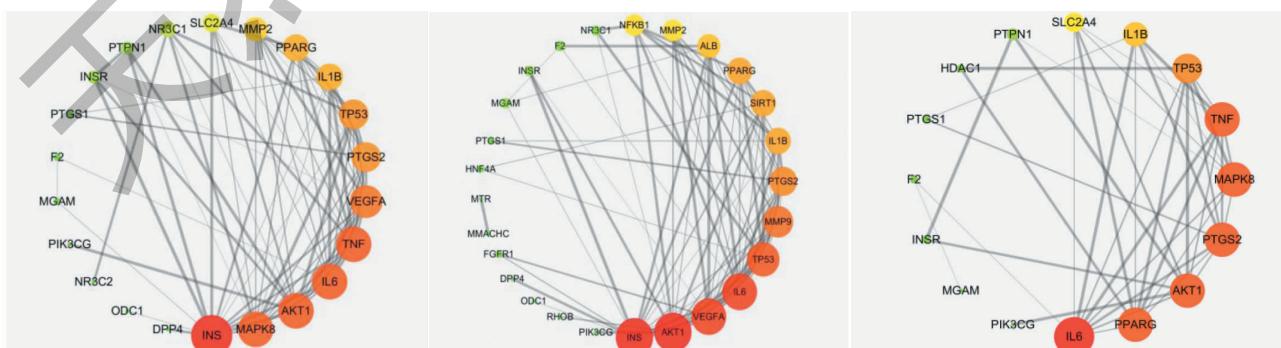


图 5 三部位 PPI 网络图

Fig. 5 PPI network of three parts

注: A: FoM; B: FrM; C: RaM。

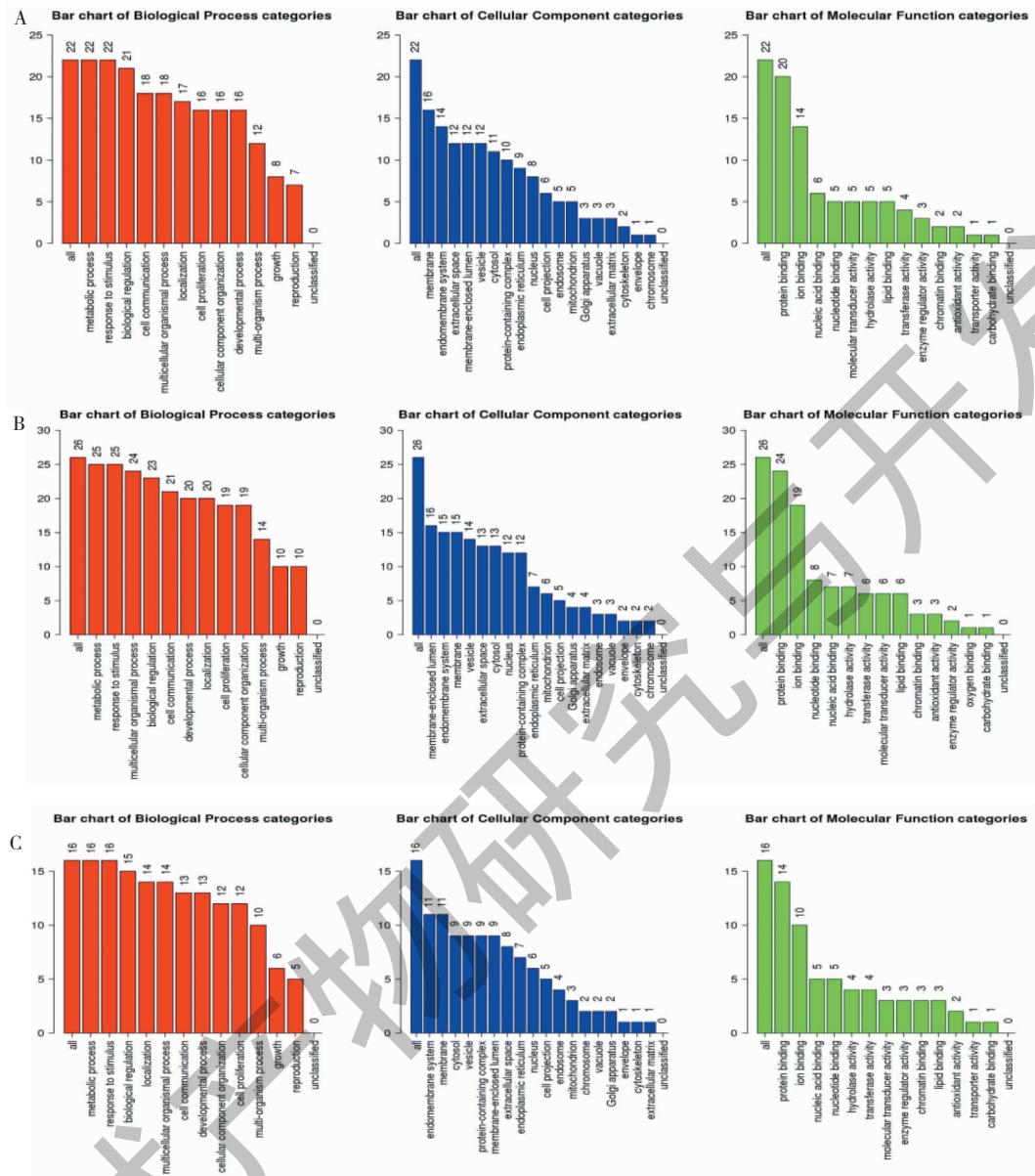


图 6 三个入药部位 GO 富集分析柱状图

Fig. 6 Column diagram of go enrichment analysis in three parts

注: A: FoM; B: FrM; C: RaM。

2.5 GO 分类富集分析与通路分析

2.5.1 GO 富集分析

将获得的三个部位的核心靶点导入 WebGestalt 在线工具中进行 GO 分析 ($FDR < 0.05$): 生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF)。发现 FoM 中与 BP 相关的条目有细胞对含氧化合物的反应、急性炎症反应调节、细胞对有机氮化合物的反应、细胞增殖调控、细胞凋亡调节、代谢过程调节、细胞对胰岛素刺激的反应等 993 条; CC 相关条目有膜筏、内质网、细胞表面等 13 条; MF 相关条目有信号受体结合、蛋白磷酸酶 2A 结合、相同蛋白结合、胰岛素样生长因子受体结合等 33 条。FrM 中与 BP 相关条目有细胞增殖调控、细胞对含氧化合物的反应、凋亡过程调控、转运调控、急性炎症反应调节、脂质代谢过程的调控、氧化应激反应等 983 条; CC 相关条目有内质网腔、分泌颗粒、分泌囊泡等 8 条; MF 相关条目有相同蛋白结合、信号受体结合、蛋白质二聚活性、脂肪酸结合、胰岛素样生长因子受体结合等 66 条。RaM 中与 BP 相关条目有活性氧代谢过程的正调节、急性炎症反应的调节、细胞对含氧化合物反

结合、蛋白磷酸酶 2A 结合、相同蛋白结合、胰岛素样生长因子受体结合等 33 条。FrM 中与 BP 相关条目有细胞增殖调控、细胞对含氧化合物的反应、凋亡过程调控、转运调控、急性炎症反应调节、脂质代谢过程的调控、氧化应激反应等 983 条; CC 相关条目有内质网腔、分泌颗粒、分泌囊泡等 8 条; MF 相关条目有相同蛋白结合、信号受体结合、蛋白质二聚活性、脂肪酸结合、胰岛素样生长因子受体结合等 66 条。RaM 中与 BP 相关条目有活性氧代谢过程的正调节、急性炎症反应的调节、细胞对含氧化合物反

应、细胞凋亡调节、对有机氮化合物反应、细胞增殖等 886 条;CC 相关条目有膜微域、内质网、转移含磷基团的转移酶复合物等 12 条;MF 相关条目有信号受体结合、蛋白质磷酸酶结合、受体配体活性、抗氧化活性等 36 条。将本体条目按注释到的基因数目进行功能分类做柱状图(图 7A~C),可以看到涉及多个生物过程,其中所有靶点都与代谢过程有关,而糖尿病又是代谢紊乱的疾病,桑的三个入药部位有可能主要干预代谢过程发挥治疗糖尿病的作用,对三者 BP 进行比较分析发现其都涉及细胞对含氧化合物的反应、急性炎症反应调节、细胞对有机氮化合物的反应、细胞增殖调控、细胞凋亡调节等生物过程,三者中尤以桑叶靶点功能最多(993 条),桑椹其次(983 条),桑枝最少(886 条),此结果可能表明调节代谢过程能力:桑叶 > 桑椹 > 桑枝。

2.5.2 通路分析

利用 WebGestalt 在线工具对三个入药部位治疗 DM 的核心靶点进行 KEGG 通路富集分析($FDR < 0.05$),FoM 靶点有 83 条通路,FrM 有 80 条,RaM 有 93 条。分别选取 FDR 值排名前 20 的通路,见表 2~4,通路富集分析结果表明三个入药部位的作用通路主要涉及疾病通路、炎症与免疫相关通路等。

表 2 FoM 治疗靶点 KEGG 通路富集分析

Table 2 Enrichment analysis of KEGG pathway in FoM therapy target

编号 ID	通路 Pathway	数量 Count	基因 Gene	错误率 FDR
hsa04931	Insulin resistance	8	INS, INSR, PTPN1, AKT1, MAPK8, TNF, IL6, SLC2A4	1.48×10^{-7}
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	7	AKT1, MAPK8, TNF, IL1B, IL6, VEGFA, MMP2	1.65×10^{-6}
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	7	AKT1, MAPK8, TP53, TNF, IL1B, VEGFA, MMP2	1.11×10^{-5}
hsa04932	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	7	INS, INSR, AKT1, MAPK8, TNF, IL1B, IL6	1.28×10^{-5}
hsa04930	Type II diabetes mellitus	5	INS, INSR, MAPK8, TNF, SLC2A4	1.28×10^{-5}
hsa04923	Regulation of lipolysis in adipocytes	5	INS, INSR, AKT1, PTGS2, PTGS1	2.14×10^{-5}
hsa04625	C-type lectin receptor signaling pathway	6	AKT1, MAPK8, TNF, IL1B, IL6, PTGS2	2.14×10^{-5}
hsa04668	TNF signaling pathway	6	AKT1, MAPK8, TNF, IL1B, IL6, PTGS2	2.61×10^{-5}
hsa04010	MAPK signaling pathway	8	INS, INSR, AKT1, MAPK8, TP53, TNF, IL1B, VEGFA	4.24×10^{-5}
hsa04068	FoxO signaling pathway	6	INS, INSR, AKT1, MAPK8, IL6, SLC2A4	5.56×10^{-5}
hsa04910	Insulin signaling pathway	6	INS, INSR, PTPN1, AKT1, MAPK8, SLC2A4	6.34×10^{-5}
hsa04657	IL-17 signaling pathway	5	MAPK8, TNF, IL1B, IL6, PTGS2	1.48×10^{-4}
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	5	INS, INSR, AKT1, IL6, VEGFA	1.98×10^{-4}
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	5	AKT1, MAPK8, TNF, IL1B, IL6	2.14×10^{-4}
hsa04152	AMPK signaling pathway	5	INS, INSR, AKT1, PPARG, SLC2A4	4.06×10^{-4}
hsa04920	Adipocytokine signaling pathway	4	AKT1, MAPK8, TNF, SLC2A4	7.42×10^{-4}

FoM 中与疾病有关的通路有胰岛素抵抗、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、流体剪应力与动脉粥样硬化、II 型糖尿病、胰岛素信号通路癌症等;炎症与免疫相关通路主要有脂肪细胞脂肪分解的调节、C 型凝集素受体信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、FoxO 信号通路、IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等。FrM 中与疾病有关的通路有流体剪应力与动脉粥样硬化、前列腺癌、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、癌症、胰岛素抵抗;免疫与炎症相关通路有脂肪细胞脂肪分解的调节、PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、AMPK 信号通路、MAPK 信号通路、IL-17 信号通路、血管内皮生长因子信号通路等。RaM 中与疾病有关的通路有胰岛素抵抗、非酒精性脂肪性肝病、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、II 型糖尿病、胰岛素信号通路、乙肝等;免疫与炎症相关通路有 C 型凝集素受体信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、Toll 样受体信号通路、AMPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等。三个入药部位通路富集分析都有糖尿病及其并发症通路与大量的炎症通路,可以看出糖尿病与炎症具有密不可分的关系^[11]。

续表2(Continued Tab. 2)

编号 ID	通路 Pathway	数量 Count	基因 Gene	错误率 FDR
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	7	INS, INSR, AKT1, TP53, IL6, VEGFA, PIK3CG	8.08×10^{-4}
hsa05200	Pathways in cancer	8	AKT1, MAPK8, TP53, IL6, PPARG, VEGFA, MMP2, PTGS2	1.12×10^{-3}
hsa05164	Influenza A	5	AKT1, MAPK8, TNF, IL1B, IL6	1.50×10^{-3}
hsa05323	Rheumatoid arthritis	4	TNF, IL1B, IL6, VEGFA	1.52×10^{-3}

表3 FrM治疗靶点KEGG通路富集分析
Table 3 Enrichment analysis of KEGG pathway in FrM therapy target

编号 ID	通路 Pathway	数量 Count	基因 Gene	错误率 FDR
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	7	AKT1, TP53, VEGFA, MMP9, IL1B, MMP2, NFKB1	4.49×10^{-5}
hsa05215	Prostate cancer	6	INS, AKT1, TP53, MMP9, NFKB1, FGFR1	4.82×10^{-5}
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	6	AKT1, VEGFA, IL6, IL1B, MMP2, NFKB1	4.82×10^{-5}
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	6	INS, INSR, AKT1, VEGFA, IL6, NFKB1	4.82×10^{-5}
hsa04923	Regulation of lipolysis in adipocytes	5	INS, INSR, AKT1, PTGS2, PTGS1	4.82×10^{-5}
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	9	INS, INSR, AKT1, TP53, VEGFA, IL6, PIK3CG, NFKB1, FGFR1	5.97×10^{-5}
hsa04668	TNF signaling pathway	6	AKT1, MMP9, IL6, IL1B, NFKB1, PTGS2	5.97×10^{-5}
hsa04152	AMPK signaling pathway	6	INS, INSR, AKT1, SIRT1, PPARG, HNF4A	7.96×10^{-5}
hsa04010	MAPK signaling pathway	8	INS, INSR, AKT1, TP53, VEGFA, IL1B, NFKB1, FGFR1	1.15×10^{-4}
hsa05200	Pathways in cancer	10	AKT1, TP53, VEGFA, MMP9, IL6, MMP2, NFKB1, PPARG, PTGS2, FGFR1	1.15×10^{-4}
hsa04932	Non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD)	6	INS, INSR, AKT1, IL6, IL1B, NFKB1	1.94×10^{-4}
hsa04657	IL-17 signaling pathway	5	MMP9, IL6, IL1B, NFKB1, PTGS2	2.56×10^{-4}
hsa04625	C-type lectin receptor signaling pathway	5	AKT1, IL6, IL1B, NFKB1, PTGS2	4.17×10^{-4}
hsa04931	Insulin resistance	5	INS, INSR, AKT1, IL6, NFKB1	4.53×10^{-4}
hsa04068	FoxO signaling pathway	5	INS, INSR, AKT1, SIRT1, IL6	9.85×10^{-4}
hsa04014	Ras signaling pathway	6	INS, INSR, AKT1, VEGFA, NFKB1, FGFR1	1.35×10^{-3}
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	4	AKT1, IL6, IL1B, NFKB1	3.80×10^{-3}
hsa04370	VEGF signaling pathway	3	AKT1, VEGFA, PTGS2	8.59×10^{-3}
hsa05323	Rheumatoid arthritis	3	VEGFA, IL6, IL1B	2.04×10^{-2}
hsa04950	Maturity onset diabetes of the young	2	INS, HNF4A	2.04×10^{-2}

表4 RaM治疗靶点KEGG通路富集分析
Table 4 Enrichment analysis of KEGG pathway in RaM therapy target

编号 ID	通路 Pathway	数量 Count	基因 Gene	错误率 FDR
hsa04931	Insulin resistance	7	PTPN1, INSR, MAPK8, AKT1, TNF, IL6, SLC2A4	4.10×10^{-7}
hsa04625	C-type lectin receptor signaling pathway	6	MAPK8, AKT1, TNF, IL1B, IL6, PTGS2	8.04×10^{-6}
hsa04668	TNF signaling pathway	6	MAPK8, AKT1, TNF, IL1B, IL6, PTGS2	8.04×10^{-6}
hsa04932	Non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD)	6	INSR, MAPK8, AKT1, TNF, IL1B, IL6	3.69×10^{-5}
hsa04657	IL-17 signaling pathway	5	MAPK8, TNF, IL1B, IL6, PTGS2	7.59×10^{-5}

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 ID	通路 Pathway	数量 Count	基因 Gene	错误率 FDR
hsa04933	ACE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	5	MAPK8、AKT1、TNF、IL1B、IL6	7.59×10^{-5}
hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	6	MAPK8、TP53、AKT1、IL6、PIK3CG、PTGS2	7.59×10^{-5}
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	5	MAPK8、AKT1、TNF、IL1B、IL6	7.59×10^{-5}
hsa04930	Type II diabetes mellitus	4	INSR、MAPK8、TNF、SLC2A4	7.80×10^{-5}
hsa04923	Regulation of lipolysis in adipocytes	4	INSR、AKT1、PTGS2、PTGS1	1.26×10^{-4}
hsa04068	FoxO signaling pathway	5	INSR、MAPK8、AKT1、IL6、SLC2A4	1.48×10^{-4}
hsa04910	Insulin signaling pathway	5	PTPNI、INSR、MAPK8、AKT1、SLC2A4	1.62×10^{-4}
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	5	MAPK8、TP53、AKT1、TNF、IL1B	1.62×10^{-4}
hsa05161	Hepatitis B	5	MAPK8、TP53、AKT1、TNF、IL6	1.89×10^{-4}
hsa04920	Adipocytokine signaling pathway	4	MAPK8、AKT1、TNF、SLC2A4	2.13×10^{-4}
hsa04010	MAPK signaling pathway	6	INSR、MAPK8、TP53、AKT1、TNF、IL1B	3.57×10^{-4}
hsa05152	Tuberculosis	5	MAPK8、AKT1、TNF、IL1B、IL6	4.25×10^{-4}
hsa05200	Pathways in cancer	7	MAPK8、TP53、AKT1、HDAC1、IL6、PPARG、PTGS2	7.28×10^{-4}
hsa04152	AMPK signaling pathway	4	INSR、AKT1、PPARG、SLC2A4	1.12×10^{-3}
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	5	INSR、TP53、AKT1、IL6、PIK3CG	5.05×10^{-3}

2.6 分子对接

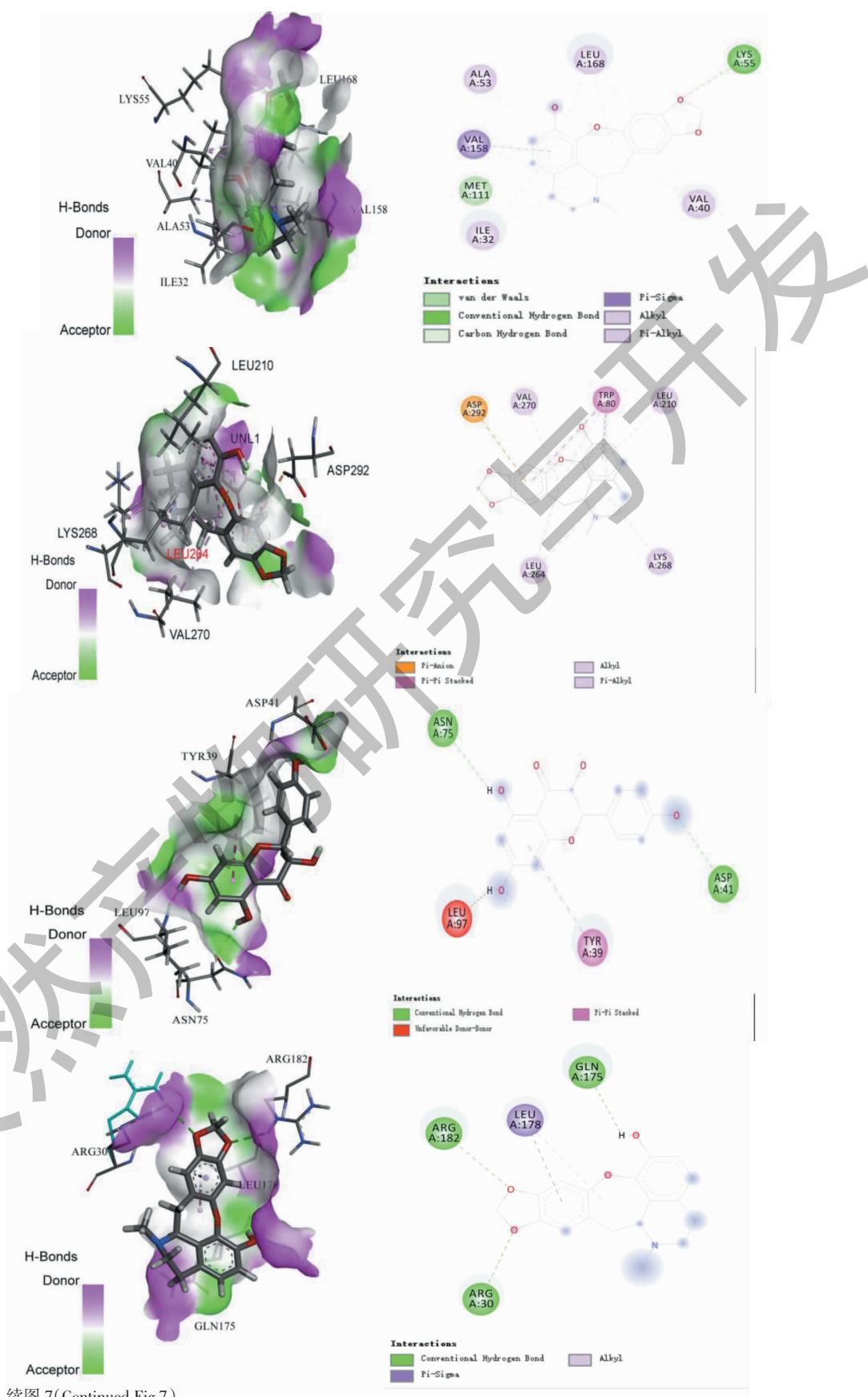
将三个部位 PPI 网络中度值排名前 3 的 5 个靶点蛋白 MAPK8、AKT1、VEGFA、IL6、PPARG 分别与 metformin、3 个共有成分(A)和度值靠前的 8 个差异化合物(B)进行分子对接验证,结果见表 5。若结合能 <0,表明配体分子均能和受体蛋白能自发地结合,结合能 <-5.0 kcal/mol,表明其结合良好,结合能越小结合性越好。表中 70% 成分能与靶点蛋白

较好地结合,且 90% 的成分结合性均好于对照药。与 5 个靶点最佳的分子对接如图 8,其中苦来西碱与 AKT1 结合最好为 -10.9 kcal/mol,苦来西碱(cularicine)与 AKT1 活性位点氨基酸残基 ASP292 是形成 π -阴离子相互作用、与 TRP80 形成 π - π 堆积作用等非键相互作用。结果表明,这 12 种成分与靶点蛋白结合性能较好。

表 5 三部位差异化合物与核心靶点分子对接结果

Table 5 Results of molecular docking between differentially active compounds and target proteins

类型 Term	名称 Name	亲和力 Affinity (kcal/mol)				
		MAPK8	AKT1	VEGFA	IL6	PPARG
对照药 Reference	二甲双胍 Metformin	-3.7	-5.2	-3.6	-3.2	-3.9
A	桑色素 Morin	-7.7	-9.1	-5.2	-5.2	-8.1
	东莨菪内酯 Scopoletin	-6.6	-7.7	-4.2	-4.9	-6.4
	1-脱氧野尻霉素 DNJ	-4.0	-5.2	-3.8	-3.9	-4.5
B	槲皮素 Quercetin	-8.0	-9.9	-5.4	-4.5	-8.3
	山奈酚 Kaempferol	-8.2	-9.9	-5.5	-4.8	-8.2
	甲基丁香酚 Methylugenol	-5.5	-6.4	-3.7	-4.1	-5.5
	丁香酚 Eugenol	-5.7	-6.9	-3.9	-4.2	-5.7
	反式白藜芦醇 trans-Resveratrol	-6.9	-8.7	-5.2	-4.5	-7.8
	杨梅素 Myricetin	-8.0	-9.7	-5.5	-4.3	-8.1
	苦来西碱 Cularicine	-8.9	-10.9	-5.8	-6.2	-7.9
	二氢山奈酚 Dihydrokaempferol	-8.0	-10.1	-5.9	-5.3	-8.0



续图 7(Continued Fig.7)

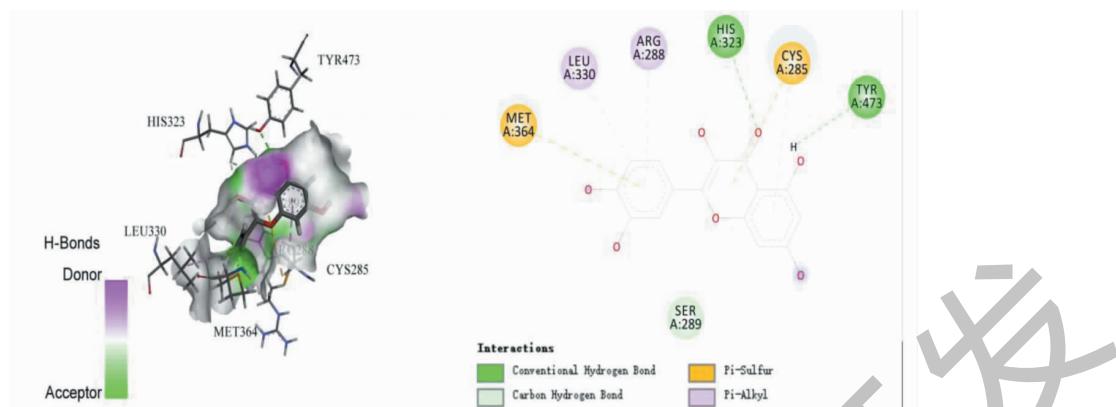


图 7 分子对接的 3D 和 2D 模式图

Fig. 1 3D and 2D pattern diagrams of molecular docking

注:A:苦来西碱-MAPK8;B:苦来西碱-AKT1;C:二氢山奈酚-VEGFA;D:苦来西碱-IL6;E:槲皮素-PPARG。Note: A:Cularicine-MAPK8; B:Cularicine-AKT1; C:Dihydrokaempferol-VEGFA; D:Cularicine-IL6; E:quercetin-PPARG.

3 讨论

糖尿病是一种发病率高,危害性大的代谢性疾病,有研究表明^[11]糖尿病的发生发展与炎症具有密切的关系,本研究也发现桑治疗糖尿病的潜在靶点 VEGFA、IL6、MAPK8、TNF、TP53 等与炎症通路有关。

桑叶,性味苦甘寒,归肺肝经^[2];桑椹,性味甘寒,归心肾经^[3];桑枝,性味,苦平,归肝^[4]。从桑各部位性味归经来看,桑叶作用更加广泛,桑椹与桑枝作用差异较大。通过化合物-疾病靶点网络表明桑的不同入药部位防治糖尿病的化合物种类及其作用靶点具有明显差异,从三部位差异化合物的个数比较得出,FoM 分别与 FrM 和 RaM 在防治糖尿病方面可能具有相似的作用,FrM 与 RaM 在防治糖尿病方面可能作用的途径差异较大,这与各部位性味归经相符。三个入药部位中桑色素、东莨菪内酯、1-脱氧野尻霉素 3 种为共有化合物,丁香酚、甲基丁香酚、反式白藜芦醇、杨梅素、苦来西碱、二氢山奈酚、槲皮素、山奈酚 8 种为度值靠前的差异化合物。有研究表明^[12]桑色素是一种 PTP1B 的非竞争性抑制剂,能起到胰岛素增敏的作用,还能通过抗氧化与抗炎作用对胰岛细胞起保护作用^[13];东莨菪内酯是一种天然植物抗毒素,Jang 等^[14]发现东莨菪内酯通过激活 3T3-L1 脂肪细胞的 PI3K 和 AMPK 途径,促进 GLUT4 易位到 PM,从而促进葡萄糖摄取,具有抗糖尿病作用。1-脱氧野尻霉素是从桑中发现的一种重要生物碱,对 α -葡萄糖苷酶具有抑制作用,并可以促进糖酵解,抑制糖的异生,降低胆固醇合成,还能

抑制胰岛素的分泌,改善胰岛素抵抗的作用^[15]。甲基丁香酚是一种是丁香酚的衍生物,具有镇痛抗炎与抗氧化应激的作用^[16]。反式白藜芦醇能通过激活细胞内的 SIRT1 和 AMPK 通路缓解胰岛素抵抗,保护胰岛 B 细胞功能^[17]。杨梅素具有抗癌、抗氧化、抗炎、抗菌和镇痛等药理活性,它还具有抗糖尿病的作用,对人胰岛淀粉样多肽(HIAPP)诱导的胰腺 β -细胞的细胞毒性和胰岛功能的恢复有保护作用^[18]。苦来西碱是 RaM 中特有成分,并且与 AKT1、MAPK8、IL6 分子对接得分较高,目前还未见报道其药理作用,其对 AKT1 的高结合性有待进一步的实验验证。山奈酚通过抑制肝脏糖异生和提高肝脏胰岛素敏感性来改善肥胖小鼠的高血糖^[19]。桑的各部位的主要活性成分在改善糖尿病方面具有多种功效、为桑的不同部位防治糖尿病的活性成分群及其作用机制的研究奠定了理论基础。

PPI 网络中桑的三个部位按度值排名靠前的靶点有 MAPK8、AKT1、VEGFA、IL6、PPARG。在分子对接中 12 种成分都能与这些靶点较好结合。VEGF 是一种与肝素结合的同型二聚体蛋白,在生理和病理条件下调节血管生成和血管通透性,有研究表明^[20] VEGFA 的表达与糖尿病具有相关性。MAPK8 是 MAP 激酶家族的成员。MAP 激酶是多种生化信号的整合点参与,细胞的增殖、分化、转录调控和发育等多种过程。这种激酶被各种细胞刺激物激活,并针对特定的转录因子,从而介导细胞刺激后的早期基因表达。Guo 等^[21]采用 Gene-ChipTM miRNA 4.0 Array 筛选糖尿病人外周血血清发现 MAPK8 等

7个基因可能与2型糖尿病胰岛素抵抗有关。AKT1 调控着许多过程,包括新陈代谢、增殖、细胞存活、生长和血管生成,并且 AKT1 基因多态性与代谢综合征风险相关^[22]。IL6 是一种重要的炎症因子,参与多种免疫反应,其在糖尿病病人中有显著升高^[23]。PPARG 控制着脂肪酸的过氧化物酶体 β 氧化途径,是脂肪细胞分化和葡萄糖稳态的关键调节因子,其表达量与2型糖尿病的风险有关^[24]。这些结果与分子对接结果表明 MAPK8、AKT1、VEGFA、IL6、PPARG 这5个靶点可能是桑源药材治疗糖尿病的关键靶点。

从KEGG富集结果分析可知,桑的三种入药部位主要从炎症与免疫相关信号通路发挥治疗糖尿病的作用,包括白介素-17信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、PI3K-AKT信号通路和MAPK信号通路等。磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶(Akt)通过介导生长因子信号在生物体生长、葡萄糖稳态、脂质代谢等方面起着重要作用,是胰岛素信号转导的主要途径,是调控血糖的主要信号通路,PI3K/Akt信号通路异常是糖尿病发生的重要原因^[25]。IL-17是一种促炎性细胞因子。在糖尿病的发展中,p38MAPK与肾组织损伤密切相关。一方面,高血糖、血流动力学异常、氧化应激以及前炎症因子等多种因素可以在上游诱导p38MAPK信号通路激活,另一方面,活化的p38MAPK信号通路可以通过诱导下游炎症细胞活化,促进炎症介质表达,干预细胞因子产生等途径而导致肾组织炎症性损伤^[26]。研究结果表明,显著富集的信号通路中也存在着部分调控其他疾病的通路,例如前列腺癌信号通路、非酒精性脂肪肝信号通路、动脉粥样硬化信号通路等。表明机体代谢是相互关联的,药桑可以通过作用于全身其他系统发挥间接治疗糖尿病的作用。

总之,本研究首次应用网络药理学思路与方法揭示了桑的不同入药部位防治糖尿病的成分群及其作用机制,为研究同源异效的中药资源提供了新的思路,为合理利用桑资源提供了理论参考。

参考文献

- Wang Y. Advances in active ingredients and hypoglycemic functions of mulberry medicinal portions[J]. Sci Seric(蚕业科学),2015,41:367-375.
- Wang T. Research progress in Mori Folium[J]. Food Drug (食品与药品),2018,20:390-393.
- Zhao X, Fan D. Review of physiological active components, extraction and detection methods and pharmacological bioactivities of mulberry [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志),2017,37:378-385.
- Luo J. Studies on separation and fingerprint analysis of Ramulus Mori[D]. Changsha: Central South University(中南大学),2011.
- Li MJ, Li CY, Wang ZX, et al. Advances in anti-diabetes mechanism of active components in *Morus Alba* L. extract [J]. Guangdong Chem Ind(广东化工),2020,47(9):117-119.
- Li W. Network pharmacology studies on the bioactive compounds and action mechanisms of natural products for the treatment of diabetes mellitus: a review [J]. Front Pharmacol,2017,8:74.
- Liu P, Tian J. An exploration on mechanisms of “treating different diseases with same method” of liquiritin in treating depression and diabetes based on network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:1880-1886.
- Ge Q, Chen L, Tang M, et al. Analysis of mulberry leaf components in the treatment of diabetes using network pharmacology[J]. Eur J Pharmacol,2018,833:50-62.
- Subinuer B. Active ingredients and mechanisms of mulberry prevention and treatment of diabetes based on network pharmacology[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University(新疆医科大学),2020.
- Zong Y, Dong H, Chen T, et al. Mechanism of herb pair containing Scutellariae Radix and Coptidis Rhizoma on treatment of type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2019,50:888-894.
- Haffner SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease [J]. Am J Cardiol, 2006,97:3-11.
- Paoli P, Cirri P, Caselli A, et al. The insulin-mimetic effect of morin: a promising molecule in diabetes treatment [J]. Biochim Biophys Acta,2013,1830:3102-3111.
- Wang N, Zhang J, Qin M, et al. Amelioration of streptozotocin-induced pancreatic β cell damage by morin: involvement of the AMPK-FOXO3-catalase signaling pathway [J]. Int J Mol Med,2018,41:1409-1418.
- Jang JH, Park JE, Han JS. Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells [J]. Nutr Res,2020,74:52-61.
- Guo SY, Li L, Zhon H, et al. Mechanism for the inhibitory effect of 1-deoxynojirimycin on α -glucosidase [J]. Food Sci

- (食品科学),2019,40:45-50.
- 16 Yang H, Yu F, Wan D, et al. Study of antinociceptive and anti-inflammatory effect and antinociceptive mechanism of Methyleugenol [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理),2017,28:292-297.
- 17 Wei X, Wang QF, Huang H, et al. Research progress on molecular mechanism of resveratrol in the treatment of diabetes mellitus [J]. China Pharm (中国药房), 2018, 29: 2576-2580.
- 18 Gupta G, Siddiqui MA, Khan MM, et al. Current pharmacological trends on myricetin [J]. Drug Res, 2020, 70: 448-454.
- 19 Alkhaldy H, Moore W, Wang A, et al. Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice[J]. J Nutr Biochem, 2018, 58:90-101.
- 20 Sellami N, Lamine LB, Turki A, et al. Association of VEGFA variants with altered VEGF secretion and type 2 diabetes: A case-control study[J]. Cytokine, 2018, 106:29.
- 21 Guo YC, Lu YJ, Zhong WC, et al. Study on the difference of serum miRNA expression profile in peripheral blood of patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Mod Lab Med(现代检验医学杂志), 2018, 33:5-8.
- 22 Devaney JM, Gordish-Dressman H, Harmon BT, et al. AKT1 polymorphisms are associated with risk for metabolic syndrome [J]. Hum Genet, 2011, 129:129-139.
- 23 Joshi S, Tambwekar S, Khadalia K, et al. Role of inflammatory marker interleukin 6 (IL-6) and insulin in diabetes and diabetic neuropathy [J]. Bombay Hosp J, 2008, 50:466-471.
- 24 Amit RM, Jason F, Peter F, et al. Rare variants in PPARG with decreased activity in adipocyte differentiation are associated with increased risk of type 2 diabetes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111:13127-13132.
- 25 Huang XJ, Liu GH, Guo J, et al. The PI3K/Akt pathway in obesity and type 2 diabetes[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14:1483-1496.
- 26 Chen HL, Wan YG, Zhao Q, et al. Regulative mechanism of renal inflammatory-related p38MAPK signaling pathway in diabetic nephropathy and interventional effects of Chinese herbal medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38:2268-2272.

蓝藻中天然蓝色基团快速提取方法

蓝藻是一种原核生物,可以进行释氧光合作用,并利用藻胆体作为光合作用的捕光天线复合体。藻蓝蛋白是一种组成藻胆体的色素蛋白,在冰淇淋等食品中被用作天然蓝色着色剂。藻蓝素(Phycocyanobilin, PCB)是蓝藻中的一种天然蓝色发色基团。PCB 有望被用作食品着色剂和具有抗炎、抗氧化作用的药物。PCB 作为光开关的发色基团,在合成生物学中控制生物功能。PCB 与藻蓝蛋白共价结合,藻蓝蛋白是光合天线蛋白的一种成分,其提取需要专业技术、耗时的程序和/或昂贵的试剂。

2021 年 1 月 2 日 Plant and Cell Physiology 报道,日本丰桥技术科学大学(Toyohashi University of Technology)研究团队建立了一种从蓝藻细胞中提取 PCB 的简单快速方法。在该方法中,在环境温度和大气压下蓝藻细胞用酒精洗涤去除非共价结合的发色基团,例如叶绿素。然后从蛋白质基质中分离 PCB,并在高温(125°C)和高压(100 bar)条件下通过三次 5 分钟的处理在乙醇中提取,该方法 PCB 的提取效率与传统方法相当。因为使用乙醇作为提取溶剂,所以提取的 PCB 可以作为食品着色剂。研究还证明,这种方法可用于 PCB 同位素标记及其与光开关蛋白的重组。该技术有望被用于解析多种结合 PCB 的光开关结构,开发新的蓝色着色剂、功能性食品和药物。

孙裕彤,吴晓燕编译自 https://www.eurekalert.org/pub_releases/2021-01/tuot-dor012621.php

原文链接:<https://academic.oup.com/pcp/advance-article/doi/10.1093/pcp/pcaa164/6059233>

原文标题:Pressurized liquid extraction of a phycocyanobilin chromophore and its reconstitution with a cyanobacteriochrome photosensor for efficient isotopic labeling.