

药用与食用黄精次生代谢产物差异分析及改善胰岛素抵抗的活性成分与作用机制研究

陈林,王敏,胡媛,刘友平,陈鸿平,王福*

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室,成都 611137

摘要:本研究以药用黄精与食用黄精为研究对象,分析其次生代谢产物差异,并对差异成分中改善胰岛素抵抗(IR)的潜在活性成分与作用机制进行预测分析及验证。采用UHPLC-ESI-MS/MS广泛靶向代谢组学技术检测药用与食用黄精次生代谢产物;将差异代谢物相对含量变化前十且上调的化合物进行改善胰岛素抵抗的网络药理分析,并进行分子对接验证;选取HepG2细胞,运用高糖培养基和高浓度胰岛素联合诱导胰岛素抵抗模型进行细胞实验验证。结果从药用与食用黄精样品中共鉴定出319个成分,其中差异成分106个。PCA及HCA聚类分析结果表明药用与食用黄精次生代谢产物含量存在明显差异。网络药理分析表明,异鼠李素、野漆树苷、异野漆树苷等5个上调化合物与IR疾病靶点相重合,交集靶点59个,主要涉及PI3K-Akt、mTOR、VEGF等信号通路。分子对接验证表明异鼠李素、野漆树苷、异野漆树苷与核心靶点PI3K、AKT1、VEGFA、mTOR、AMPK对接良好,其结合能均 ≤ -20.9 kJ/mol。细胞实验验证发现,异鼠李素可以显著提高HepG2细胞IR模型葡萄糖消耗量($P < 0.01$),使PI3K、AKT1蛋白表达水平升高,VEGF、mTOR蛋白表达水平降低。研究结果对了解药用与食用黄精次生代谢产物差异、完善黄精品质评价方法以及改善IR潜在活性成分的筛选具有重要的意义。

关键词:代谢组学;网络药理;黄精;次生代谢产物;胰岛素抵抗;异鼠李素

中图分类号:R28

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)9-1582-15

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.9.016

Differential analysis of secondary metabolites of medicinal and edible Polygonati Rhizoma and study on potential active components and mechanism for improving insulin resistance

CHEN Lin, WANG Min, HU Yuan, LIU You-ping, CHEN Hong-ping, WANG Fu*

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources,
Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Medicinal and edible Polygonati Rhizoma were used as research materials to analyze the difference of secondary metabolites, and to predict and validate the potential active ingredients and mechanisms for improving insulin resistance (IR) in the differential components. UHPLC-ESI-MS/MS was used to detect the secondary metabolites of medicinal and edible Polygonati Rhizoma. The compounds with the top ten changes in the relative contents of different metabolites and the upregulated metabolites were used for network pharmacological analysis and verified by molecular docking. HepG2 cells were selected for cellular experimental validation using IR model induced by the combination high-glucose medium and high-concentration insulin. 319 compounds were identified from the samples, of which 106 were different metabolites. The results of PCA and HCA cluster analysis showed that there were significant differences in the relative content of secondary metabolites between the medicinal and edible Polygonati Rhizoma. Network pharmacological analysis showed that 5 upregulation compounds, such as isorhamnetin, rhoifolin and isorhoifolin, coincided with IR disease targets, and there were 59 intersection targets, mainly involving PI3K-Akt, mTOR, VEGF and other signaling pathways. Molecular docking verification showed that isorhamnetin, rhoifolin and isorhoifolin have good docking with the core targets PI3K, AKT1, VEGFA, mTOR and AMPK, and their binding energy

收稿日期:2021-07-14

接受日期:2022-06-01

基金项目:成都中医药大学创新团队项目(CXTD2018011)

*通信作者 Tel:86-28-61800231; E-mail:wangfuboy2019@126.com

were ≤ -20.9 kJ/mol. Cell experiments showed that isorhamnetin could significantly increase glucose consumption in IR models of HepG2 cells ($P < 0.01$), and increase the protein expression levels of PI3K and AKT1 in IR HepG2 cells, while decrease the protein expression levels of VEGF and mTOR. The results of this study are of great significance for understanding the difference of secondary metabolites between medicinal and edible *Polygonati Rhizoma*, improving the evaluation method of *Polygonati Rhizoma* quality and screening of potential active ingredients for improving IR.

Key words: metabolomics; network pharmacology; *Polygonati Rhizoma*; secondary metabolites; insulin resistance; isorhamnetin

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 一般是指正常浓度下胰岛素靶细胞对定量浓度的胰岛素生物学应答敏感性降低, 即胰岛素促进葡萄糖摄取和利用作用受损, 导致胰岛素分泌代偿性增多, 引起骨骼肌、肝脏、脂肪等组织对胰岛素敏感性下降和对葡萄糖的利用障碍^[1]。其中, IR 是 2 型糖尿病重要的发病机制之一, 贯穿于 2 型糖尿病全过程^[2]。目前, 治疗 IR 的药物主要为胰岛素增敏剂, 但存在骨折、水肿、肝损伤等副作用^[3]。

黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 为百合科黄精属植物, 为《中国药典》2020 年版收录的 3 种黄精之一, 以干燥块茎入药, 为常见药食两用品, 因其外形呈结节状弯柱形类似鸡头, 俗称鸡头黄精, 广泛分布于四川、湖南、江西等地区, 性味甘平、无毒, 具有补气养阴, 健脾, 润肺, 益肾的功效, 用于治疗脾胃气虚, 体倦乏力, 内热消渴等证^[4], 主要含有多糖、皂苷、黄酮、生物碱及蒽醌等成分^[5]。临床上, 黄精复方被广泛用于 2 型糖尿病的治疗, 对气阴两虚型 2 型糖尿病可以缓解患者的中医证候, 降低血糖、血脂, 改善胰岛功能^[6]。文献报道黄精复方改善胰岛功能的机制认为, 其活性成分通过作用于 PI3K 和 STAT3 等靶点, 进一步影响蛋白质丝氨酸/苏氨酸活动、PI3K-AKT 等信号通路而发挥作用^[7]; 黄精单味药改善胰岛功能的机制研究认为, 黄酮类化合物通过作用于突触后膜, 改变细胞对药物的敏感性、细胞神经递质受体活性等生物过程及调控钙离子、激素抵抗等信号通路起到了改善 IR 的作用^[8]。

目前, HPLC、LC-MS/MS、UPLC-Q-TOF-MS 等技术常用于黄精化学成分的定性定量研究, 已报道黄精含有黄酮类成分以及生物碱等化学成分^[9], 但普遍存在检测成分数量少, 难以反映黄精中所含全部代谢产物。近年来, 随着代谢组学技术的发展, 基于 UPLC-ESI-MS/MS 的广泛靶向代谢组学技术广泛用于中药代谢产物的研究, 与传统常见色谱技术相比具有高灵敏度、低成本、高通量的优势^[10,11]。由于目前尚未见药用与食用黄精整体次生代谢产物差异分析报道, 本文以药用黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red.)

以及食用黄精 (互叶卷黄精 *Polygonatum alternicirrhosum* Hand. -Mzt., 俗称水果黄精) 为研究对象, 首次采用 UHPLC-ESI-MS/MS 广泛靶向代谢组学技术对其次生代谢产物进行全面检测, 并采用主成分分析 (PCA)、HCA 聚类分析以及正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 对代谢产物进行比较分析, 筛选差异代谢物; 其次对药用黄精与食用黄精差异代谢物相对含量变化前十且上调的化合物进行改善胰岛素抵抗的网络药理分析, 并对活性成分和关键靶点进行分子对接, 选用 HepG2 细胞进行细胞实验验证。一方面以期全面了解药用与食用黄精差异代谢物, 为黄精品质评价奠定基础, 另一方面拟筛选治疗 IR 的潜在活性成分, 为阐述黄精治疗 IR 的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

超高效液相色谱-质谱联用仪 (ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC, Shim-pack UFLC SHIMADZU CBM30A, Tandem mass spectrometry, MS/MS, Applied Biosystems 6500 QTRAP); 色谱柱 (Waters T3 C₁₈ 1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm); FA2003 电子分析天平 (上海浦春); MM400 球磨机 (德国莱驰); TGL-16 台式高速离心机、2500-A 台式低速离心机 (湖南湘仪实验仪器有限公司); 冻干机 (Scientz-100F); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司); HCB-1300V 洁净工作台、HCP-168 二氧化碳培养箱 (青岛海尔生物医疗股份有限公司); B25-12D 超声波清洗仪 (宁波新艺超声波设备有限公司); UPT-12D 优普系列超纯水机 (成都超纯科技有限公司); GR85DA 高压灭菌锅 (美国 ZEALWAY INSTRUMENT INC); NIKON DS-U3 成像系统 (日本尼康); Allegra X-12R 冷冻离心机 (Beckman Coulter); CKX53 显微镜 (奥林巴斯有限公司); 3001 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific Oy); HB120-S 金属浴、D1008 掌上离心机、MX-S 可调式混匀仪 (大龙兴创实验仪器有限公司); EPS-300 数显式稳压稳流电泳仪、VE-180B 垂直电泳槽、VE586 转移电泳槽 (上海天能科技有限公司); TS-2 脱色摇床 (海门市其林贝

尔仪器制造有限公司)。

乙腈(美国 Fisher chemical, 色谱纯);娃哈哈纯净水;甲酸(美国, MREDA Technology Inc);甲醇、乙醇(北京化工厂, 分析纯);二甲亚砜(成都市科隆化学有限公司, 分析纯);二甲基亚砜(Sigma, 细胞级, 批号 SHBK2703);胰酶细胞消化液(Biosharp, 批号 70090500);胎牛血清、PBS 缓冲液(BI, 批号分别为 2106044、2138268);青霉素-链霉素双抗溶液(美国 HyClone 公司, 批号 J190033);DMEM 培养基(Gibco, 批号 8121557);DMEM 高糖培养基、脱脂奶粉(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 20211124、107B055);BCA 蛋白定量试剂盒、化学发光检测试剂盒、PAGE 凝胶快速制备试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、TBST、快速转膜缓冲液、电泳缓冲液、RIPA 裂解液、BSA 蛋白标准、三色预染 Marker、PVDF 膜(上海雅酶生物科技有限公司, 批号分别为 01543050、024B1100、024A1250、01461050、034B1200、01451040、034B1200、014B1070、01542050、02552410、280659340);噻唑蓝(安耐吉生物, 批号 EQ9RED6D);葡萄糖测定试剂盒(上海荣盛药业有限公司, 批号为 20211208137);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠、兔抗 AKT1、兔抗 mTOR、兔抗 VEGF(碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 A0208、A0216、AF1777、AF1648、AF0312); β -actin、鼠抗 AMPK、鼠抗 PI3K(景杰生物, 批号分别为 RL080946、ML081163、L011304);异鼠李素、野漆树苷(上海同田生物技术有限公司, 批号分别为 21041623、21080923);异野漆树苷(西力生物, 批号为 BBP01924);精蛋白人胰岛素混合注射液(通化东宝药业股份有限公司, 国药准字 S20030004);盐酸二甲双胍缓释片(山东司邦得制药有限公司, 国药准字 H20060230)。

实验所用细胞为人肝癌细胞系 HepG2 细胞, 来自于成都中医药大学药学院;实验所用样品采集于重庆市秀山土家苗族自治县八家路村, 收集时间为 2020 年 7 月 9 日, 经成都中医药大学严铸云教授鉴定, 样品 1 为互叶卷黄精(*Polygonatum alternicirrhosum* Hand. -Mzt.)新鲜全株;样品 2 为药用黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.)新鲜全株。1 号样品为地方野生食用品种, 该品种因多糖含量高, 口感甜, 俗称水果黄精(SGHJ);2 号样品为药典收载药用品种(HJ)。样品 1 与 2 各收集 3 批次, 编号标记, 返回实验室后, 将样品块茎放置于冻干机中真空冷冻干

燥, 采用研磨仪研磨(30 Hz, 1.5 min)至粉末状, 保存于 -80 °C 冰箱, 备用。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

取药用与食用黄精干燥样品(过四号筛)100 mg, 量取 1.0 mL 甲醇水溶液(70% 甲醇)溶解, 超声 0.5 h, 低温静置 12 h, 期间涡旋 3 次, 离心并吸取上清, 过滤, 于进样瓶中备用。

1.2.2 色谱与质谱条件

质谱与色谱条件参考文献报道方法^[12]。液相条件主要包括:(1)色谱柱:Agilent SB-C₁₈ 1.8 μ m, 2.1 mm \times 100 mm;(2)流动相:A 相为超纯水(加入 0.1% 的甲酸), B 相为乙腈(加入 0.1% 的甲酸);(3)洗脱梯度:0.00 min B 相比比例为 5%, 9.00 min 内 B 相比比例线性增加到 95%, 并在 95% 维持 1 min, 10.00 ~ 11.10 min, B 相比比例降为 5%, 并以 5% 平衡至 14 min;(4)流速 0.35 mL/min;柱温 40 °C;进样量 4 μ L。质谱条件主要包括:LIT 和三重四极杆(QQQ)扫描是在三重四极杆线性离子阱质谱仪(Q TRAP), AB4500 Q TRAP UPLC/MS/MS 系统上获得的, 该系统配备了 ESI Turbo 离子喷雾接口, 可由 Analyst 1.6.3 软件(AB Sciex)控制运行正负两种离子模式。ESI 源操作参数如下:离子源, 涡轮喷雾;源温度 550 °C;离子喷雾电压(IS)5 500 V(正离子模式)/4 500 V(负离子模式);离子源气体 I(GSI)、气体 II(GSII)和帘气(CUR)分别设置为 50、60 和 25.0 psi, 碰撞诱导电离参数设置为高。在 QQQ 和 LIT 模式下分别用 10 和 100 μ mol/L 聚乙二醇溶液进行仪器调谐和质量校准。QQQ 扫描使用 MRM 模式, 并将碰撞气体(氮气)设置为中等。通过进一步的 DP 和 CE 优化, 完成了各个 MRM 离子对的 DP 和 CE。根据每个时期内洗脱的代谢物, 在每个时期监测一组特定的 MRM 离子对。

1.2.3 代谢物定性定量原理

代谢物结构解析参考了 MassBank (<http://www.massbank.jp>)、KNAPSACk (<http://kanayanaist.jp/KNAPSAcK>)、HMDB (<http://www.hmdb.ca>)、MoToDB (<http://www.ab.wur.nl/moto>)、MET-LIN(<http://metlin.scripps.edu/index.php>)、MWDB (metware database) 等已有的质谱数据库。代谢物定量是利用三重四级杆质谱的多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)分析完成。MRM 模式中, 四级杆首先筛选目标物质的前体离子

(母离子),排除掉其他分子量物质对应的离子以初步排除干扰;前体离子经碰撞室诱导电离后断裂形成很多碎片离子,碎片离子再通过三重四级杆过滤选择出所需要的一个特征碎片离子,排除非目标离子干扰,使定量更为精确,重复性更好。

1.2.4 代谢物定性定量分析

图 1A 所示为混合样品的总离子流图(TIC),纵

坐标为离子流强度,横坐标为保留时间。基于“1.2.3”所列代谢数据库,对本实验所有样本的代谢物进行了质谱定性定量分析。为了比较所检测到代谢物的含量差异,对检测到的每个代谢物的质谱峰进行校正。获得不同样本的代谢物质谱分析数据后,对所有物质质谱峰进行峰面积积分,并对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正。

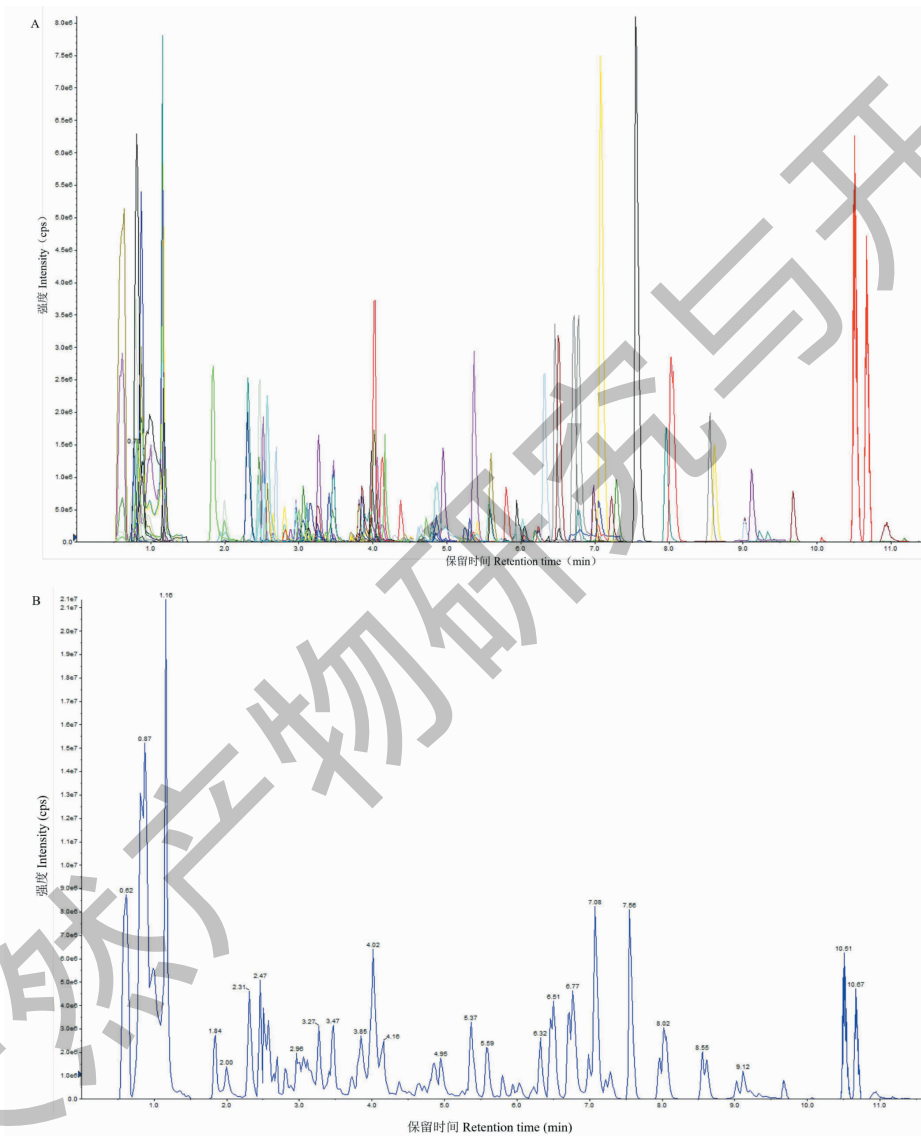


图 1 QC 样本质谱检测 TIC 重叠图(A)与混合样品 TIC 图(B)

Fig. 1 TIC overlapping map of QC sample (A) and TIC map of mixed sample (B)

1.2.5 样本质控分析

在实验过程中,为确保实验的准确性,在每 2 个检测分析样本中插入一个质控样本,以监测分析过程中的重复性。通过对不同质控样本质谱检测分析的总离子流图(见图 1B)进行重叠展示分析,可以判

断代谢物提取和检测的重复性,即技术重复。仪器的高稳定性为数据的重复性和可靠性提供了保障。

1.2.6 网络药理分析

1.2.6.1 药物成分及靶点筛选

使用 PubChem 数据库获得药用黄精与食用黄

精差异代谢物相对含量变化前 10 且上调的化合物的结构,导入 Swiss Target Prediction 数据库,取预测得分大于 0 的靶标作为药物靶点。

1.2.6.2 IR 疾病靶点蛋白的确认

以“insulin resistance”为检索词检索 DisGeNET、CTD、GeneCards 与 OMIM 数据库获取 IR 的疾病靶点蛋白,去除重复值后运用 UniProt 数据库对其进行蛋白名称标准化,以备进一步分析。运用 R 3.6.0 将黄精的药物靶点与 IR 的疾病靶点取交集,作为黄精治疗 IR 的潜在作用靶点。

1.2.6.3 药物-成分-靶点-疾病网络构建

使用 Cytoscape 3.7.2 软件,构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图,使用 Network Analyzer 功能对黄精的主要活性成分进行分析,将黄精潜在活性成分与药物-疾病共同靶点输入 Cytoscape 软件中,绘制出“药物-成分-靶点-疾病”相互作用的网络图。

1.2.6.4 PPI 网络构建

将上述药物-疾病共同靶点输入到 STRING 数据库中进行检索,设置蛋白种类为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值为 0.4,构建蛋白相互作用的 PPI 网络。

1.2.6.5 分子对接验证

运用 AutoDock Vina 软件(1.2.2)和 Pymol 软件对“1.2.6.1”和“1.2.6.2”筛选活性成分与关键靶点进行分子对接,评价黄精活性成分与关键靶点之间的结合活性,并以结合能来评价其结合活性。

1.2.7 细胞实验验证

1.2.7.1 HepG2 细胞培养

HepG2 细胞复苏后,用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液的 DMEM 完全培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养,待细胞贴壁且汇合度达 80% 以上,用 0.25% 胰酶消化传代,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.7.2 MTT 法检测野漆树苷、异野漆树苷、异鼠李素对 HepG2 细胞存活率的影响

将对数生长期的 HepG2 细胞以 4 000 个/孔的密度接种于 2 块 96 孔板中,每孔 100 μL,培养箱培养 24 h,吸弃培养基。设置空白组、对照组和药物处理组。空白组仅加入不含药 DMEM 完全培养基,不接种细胞,对照组加入不含药 DMEM 完全培养基,药物处理组加入用不含血清的 DMEM 培养基配制的不同浓度的野漆树苷(浓度处理分别为:30、15、7.5、3.8、1.9、1 μg/mL)、不同浓度的异野漆树苷

(浓度处理分别为 100、50、25、12.5、6.3、3.2、1.6 μg/mL)、不同浓度的异鼠李素(浓度处理分别为 200、100、50、25、12.5、6.3 μg/mL),每组浓度设 3 个复孔,培养箱培养 24 h 后每孔加入 20 μL MTT 液(5 mg/mL),培养 4 h 后吸弃培养基,每孔加入 150 μL DMSO,摇床震荡 10 min,于 570 nm 处测每孔吸光度值并计算细胞存活率,公式如下:

$$\text{细胞存活率} = (\text{药物处理组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) \times 100\%$$

1.2.7.3 建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗(IR)模型与药物干预处理

取对数生长期的 HepG2 细胞,以悬液浓度为 8×10^5 个/皿的密度接种于直径为 100 mm 的细胞培养皿中,培养箱培养至细胞贴壁且汇合度达 80%,吸弃培养基,PBS 清洗 2 次,加入无血清培养基饥饿培养 12 h,将饥饿培养后的细胞随机分组为对照组、模型组、阳性对照组、野漆树苷组、异野漆树苷组、异鼠李素组,饥饿培养后吸弃培养基,PBS 清洗 2 次,对照组加入 DMEM 完全培养基,其他组加入新配制的含有胰岛素(胰岛素浓度为: 1×10^{-6} mol/L)的 DMEM 高糖完全培养基,于培养箱中继续培养 24 h 即得胰岛素抵抗(IR)模型。24 h 后,对照组加入 DMEM 完全培养基,模型组加入含有胰岛素的培养基,阳性对照组加入含有二甲双胍和胰岛素的培养基,根据 MTT 实验结果,野漆树苷组加入含有胰岛素和野漆树苷的培养基,异野漆树苷组加入含有胰岛素和异野漆树苷的培养基,异鼠李素组加入含有胰岛素和异鼠李素的培养基,于培养箱中培养 24 h。24 h 后取培养基上清,离心,按照葡萄糖检测试剂盒说明书操作,计算细胞葡萄糖消耗量。

1.2.7.4 Western blot 检测 PI3K、AKT1、VEGF、mTOR、AMPK 信号通路相关蛋白表达情况

将药物干预后的细胞弃去培养基,用预冷的 PBS 清洗 2 次,加入新配制的 RIPA 裂解液并收集细胞于预冷的 1.5 mL 离心管中,用枪头反复吹打细胞裂解液数次,冰上裂解 30 min,于 4 °C、13 000 r/min 离心 30 min,取上清,用 BCA 法测蛋白浓度,蛋白加入 $5 \times$ loading buffer 于 98 °C 煮 8 min,使蛋白变性,煮完后冰上预冷,涡旋,离心,放 -20 °C 保存备用。制备蛋白上样样品,取蛋白样品 10 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,湿法转膜,转膜后加入适量含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液于摇床上室温封闭 2 h,封闭完成后,用 TBST 洗膜,共 3 次,每次 10 min,洗膜完成

后加入一抗,4 ℃ 孵育过夜。次日回收一抗,用 TBST 洗膜,共 3 次,每次 10 min,加入二抗,于摇床上室温孵育 1 h,用 TBST 洗膜,共 3 次,每次 10 min,洗膜后 ECL 法显影。采用 Image J 软件对目的条带进行灰度值分析:目的蛋白表达量 = 目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值。

1.2.7.5 数据分析

本实验中实验数据均采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验数据作方差齐性检验后作 t 检验。

2 实验结果

2.1 样品中次生代谢产物的鉴定

经过分析本文共鉴定出 319 种次生代谢产物,

包括酚酸类 86 种,黄酮类 96 种,萜醌类 5 种,木脂素与香豆素 25 种,鞣质 3 种,生物碱 51 种,萜类 11 种,甾体 21 种,其他类 21 种。代谢物含量数据采用极差法进行归一化处理,通过 R 软件(www.r-project.org/),对代谢物在不同样本间的积累模式进行聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)。通过聚类分析(见图 2A)可知,同一品种不同批次的药用黄精和食用黄精存在次生代谢物差异,种内次生代谢物变异较大;不同批次药用黄精与食用黄精次生代谢物分别聚为一类,可以明显区分。从热图可以判断,药用黄精与食用黄精次生代谢产物差异较大,药用黄精次生代谢物相对含量普遍高于食用黄精,且相对含量较高的次生代谢物数量占优。

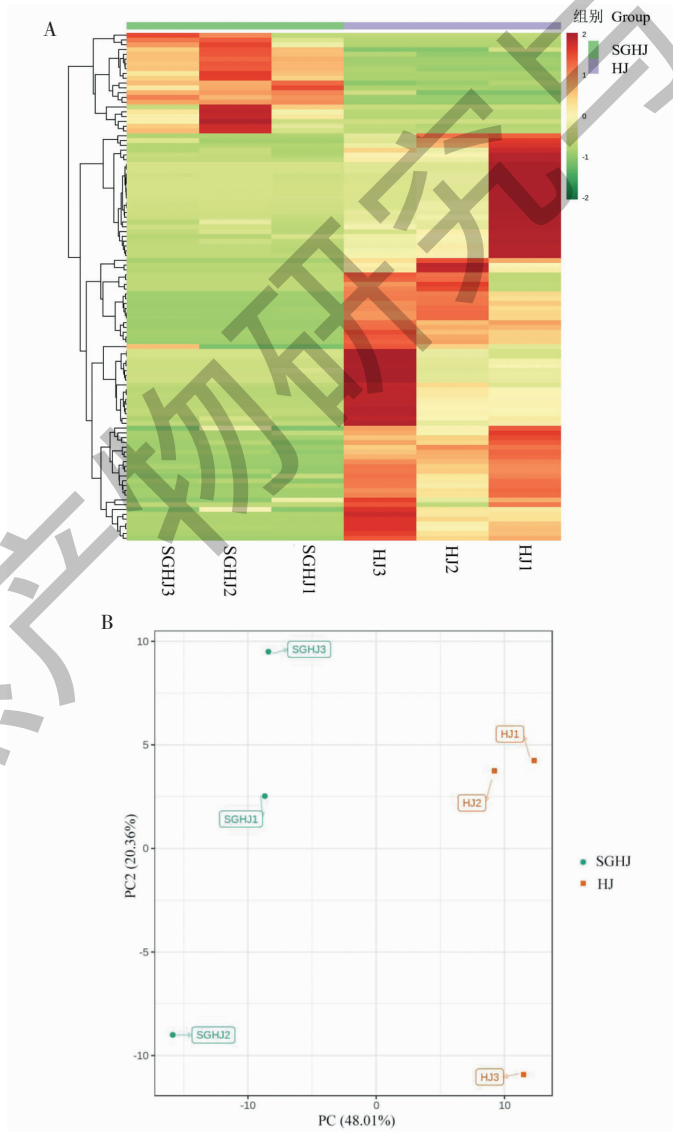


图 2 药用黄精与食用黄精代谢物的聚类(A)与主成分(B)分析

Fig. 2 HCA (A) and PCA (B) analyses of medicinal and edible *Polygonati Rhizoma*

2.2 主成分分析 (PCA) 与正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)

本文通过主成分分析方法将次生代谢物的差异通过降维处理以直观反映样本之间的代谢物差异情况。图 2B 中可以看出,主成分 PC1 与 PC2 的占比分别达到了 48.01% 和 20.36%, 积累贡献率达到了 68.37%。药用黄精与食用黄精分别聚为一类, 可明显区分, 实验结果与聚类分析一致; 正交偏最小二乘

判别分析 (OPLS-DA) 被广泛用于代谢组数据的分析, 由于其分析方法可以最大化组间差异常被用于差异代谢物的筛选。在 OPLS-DA 分析中, Q^2 是一个重要的参数, 若数值大于 0.9, 则可以反映该模型的可靠性与稳定性。图 3A 中可以看出, 药用黄精与食用黄精比较组 OPLS-DA 模型中 Q^2 为 0.996, 其数值大于 0.90, 证实该模型可以用以下一步的差异代谢物分析。

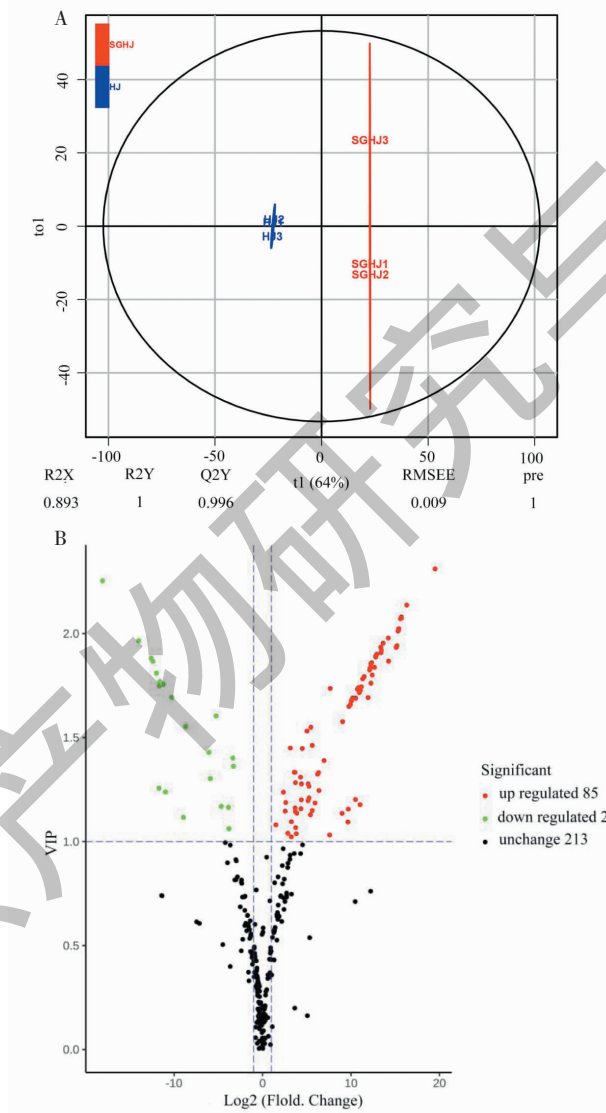


图 3 药用黄精与食用黄精代谢物的 OPLS-DA (A) 与差异代谢物分析 (B) 图

Fig. 3 OPLS-DA (A) and volcano plots (B) of differential metabolites of medicinal and edible Polygonati Rhizoma

2.3 差异代谢物的筛选、注释与富集

本文结合单变量分析的差异倍数 (fold change) 与多变量分析 OPLS-DA 模型中变量重要性投影 (variable importance in project, VIP) 数值进行样

品之间的差异代谢物筛选。筛选标准为选取 $\text{fold change} \geq 2$ 或 $\text{fold change} \leq 0.5$ 和 $\text{VIP} \geq 1$ 的差异代谢物, 即代谢物在组间差异为 2 倍以上或 0.5 倍以下以及 $\text{VIP} \geq 1$, 则认为差异显著。结果表明, 药用

黄精与食用黄精共计筛选出 106 种差异代谢物,从图 3B 中可以看出,上调化合物 85 种,下调化合物 21 种。药用黄精与食用黄精样品之间差异代谢物经过数据库 KEGG 注释,其分类结果显示(见图 4A),差异代谢物主要参与次级代谢生物合成、黄酮类生物合成、黄酮与黄酮醇生物合成、异黄酮生物合成与生物碱生物合成;KEGG 富集结果显示(见图 4B),差异代谢物富集主要集中于黄酮、异黄酮与黄酮醇代谢途径。为进一步了解药用黄精与食用黄精次生代谢物含量差异变化较大物质,筛选了差异代谢物相对含量变化前十的化合物(见表 1)。药用黄

精与食用黄精比较相对含量上调的 9 种,分别为:异鼠李素、薯蓣皂苷元-3-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-(6''-对香豆酰)葡萄糖苷、异野漆树苷、野漆树苷、苜蓿素-4'-O-葡萄糖苷-7-O-葡萄糖苷、纤细薯蓣皂苷、薯蓣皂苷元-3-O-β-D-葡萄糖基(1→4)-α-L-吡喃鼠李糖基(1→4)-[α-L-吡喃鼠李糖基(1→4)]-β-D-葡萄糖苷、延龄草苷-6'-O-槐三糖苷;相对含量下调的化合物 1 种:27-O-(3-羟基-3-甲基戊二酰)螺柱-5-烯-β,27-二醇(异炔醇酮)-3-O-鼠李糖-(1→2)-O-[葡萄糖-(1→4)]-葡萄糖苷。

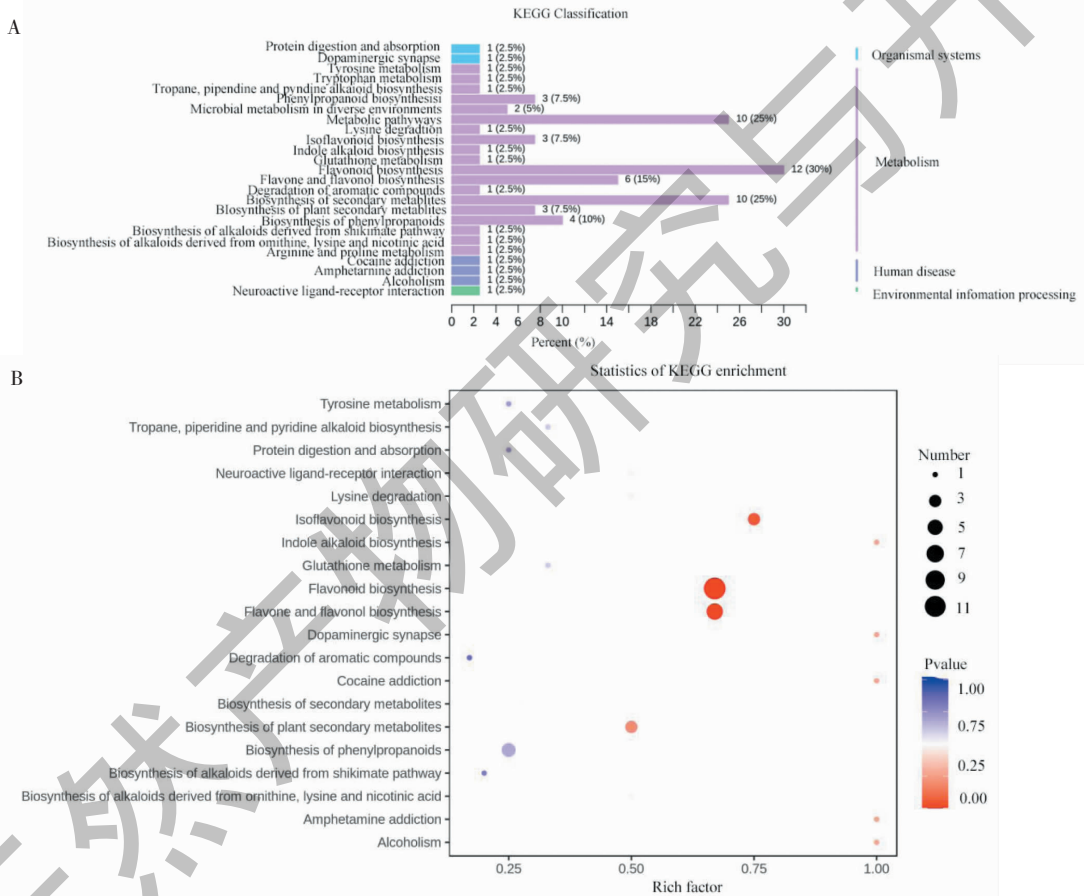


图 4 药用黄精与食用黄精差异代谢物 KEGG 分类图(A)与富集图(B)

Fig. 4 KEGG classification (A) and KEGG enrichment statistics (B) of medicinal and edible Polygonati Rhizoma

表 1 药用黄精与食用黄精差异代谢物相对含量变化前十的化合物

Table 1 The top 10 different metabolites in relative content of edible and medicinal Polygonati Rhizoma

编号 No.	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	分类 Classification	VIP	FC	LogFC
1	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	异鼠李素 Isorhamnetin	黄酮	2.01	4.07E + 04	15.3
2	C ₃₃ H ₅₂ O ₈	薯蓣皂苷元-3-O-葡萄糖苷 Diosgenin-3-O-glucoside	萜类	2.02	4.22E + 04	15.4

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	分类 Classification	VIP	FC	LogFC
3	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	芹菜素-7-O-(6''-对香豆酰)葡萄糖苷 Apigenin-7-O-(6''- <i>p</i> -coumaryl) glucoside	黄酮	2.07	4.93E+04	15.6
4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	异野漆树苷 Isorhoifolin	黄酮	2.08	5.30E+04	15.7
5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	野漆树苷 Rhoifolin	黄酮	2.07	5.30E+04	15.7
6	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₇	苜蓿素-4'-O-葡萄糖苷-7-O-葡萄糖苷 Tricin-4'- <i>O</i> -glucoside-7- <i>O</i> -glucoside	黄酮	1.98	1.90E+04	14.2
7	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇	纤细薯蓣皂苷 Gracillin	甾体	2.31	7.44E+05	19.5
8	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₁	薯蓣皂苷元-3-O-β-D-葡萄糖基(1→4)-α-L-吡喃鼠李糖基(1→4)-[-α-L-吡喃鼠李糖基(1→4)]-β-D-葡萄糖苷 Diosgenin-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -Glc (1→4)-α- <i>L</i> -Rha (1→4) [α- <i>L</i> -Rha (1→2)]-β- <i>D</i> -Glc	甾体	2.02	4.32E+04	15.4
9	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₃	延龄草苷-6'-O-槐三糖苷 Trillin-6'- <i>O</i> -sophorotrioside	萜类	2.14	8.08E+04	16.3
10	C ₅₁ H ₈₀ O ₂₂	27-O-(3-羟基-3-甲基戊二酰)螺柱-5-烯-3β,27-二醇(异炔醇酮)-3-O-鼠李糖-(1→2)-O-[葡萄糖-(1→4)]-葡萄糖苷 27- <i>O</i> -(3-Hydroxy-3-methylglutaroyl) spirost-5-ene-3β,27-diol (isonarthogenin)-3- <i>O</i> -Rha-(1→2)- <i>O</i> -[Glu-(1→4)]-glucoside	甾体	2.25	3.56E-06	-18.09

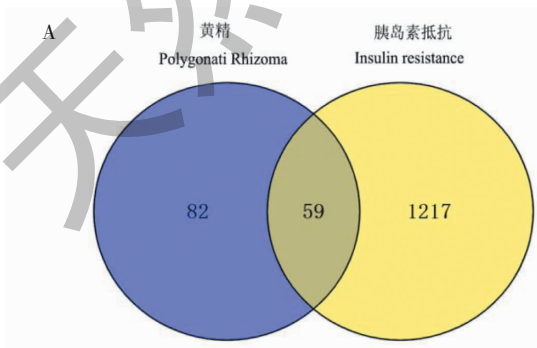
注:VIP:变量重要性投影;FC:差异倍数;Log FC:取对数后的差异倍数。

Note:VIP:Variable importance projection;FC:Fold change;Log FC:The fold change of taking logarithm.

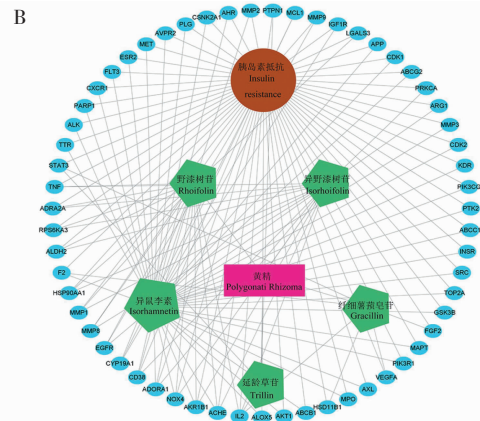
2.4 网络药理分析

将药用黄精与食用黄精差异代谢物相对含量变化前十的化合物作用的靶点与 IR 的疾病靶点用 R 3.6.0 取交集后获取靶点 59 个,为药用黄精改善 IR 的作用靶点,用 Venny 2.1 做出韦恩图,如图 5A 所示,黄色代表 IR 的疾病靶点,蓝色代表化合物的作用靶点,重合部分为化合物靶点与疾病靶点的交集靶点,其中仅 5 种化合物与 IR 疾病靶点相重合。从“药物-成分-靶点-疾病”相互作用的网络图(见图 5B)可以看出,异鼠李素、野漆树苷、异野漆树苷 3

种黄酮类化合物通过 PI3K、AKT1、VEGFA、mTOR、AMPK 等核心靶点作用于 PI3K-Akt、mTOR、VEGF、AMPK 等信号通路,同时通路中各靶点蛋白相互作用(见图 5C~5D)。KEGG 富集图(见图 5E)结果表明,PI3K-Akt 信号通路、mTOR 信号通路等信号通路富集明显。分子对接结果表明(见图 6),异鼠李素、野漆树苷、异野漆树苷与核心靶点 PI3K、AKT1、VEGFA、mTOR、AMPK 结合度好,其结合能均 ≤20.9 kJ/mol。



续图 5 (Continued Fig.5)



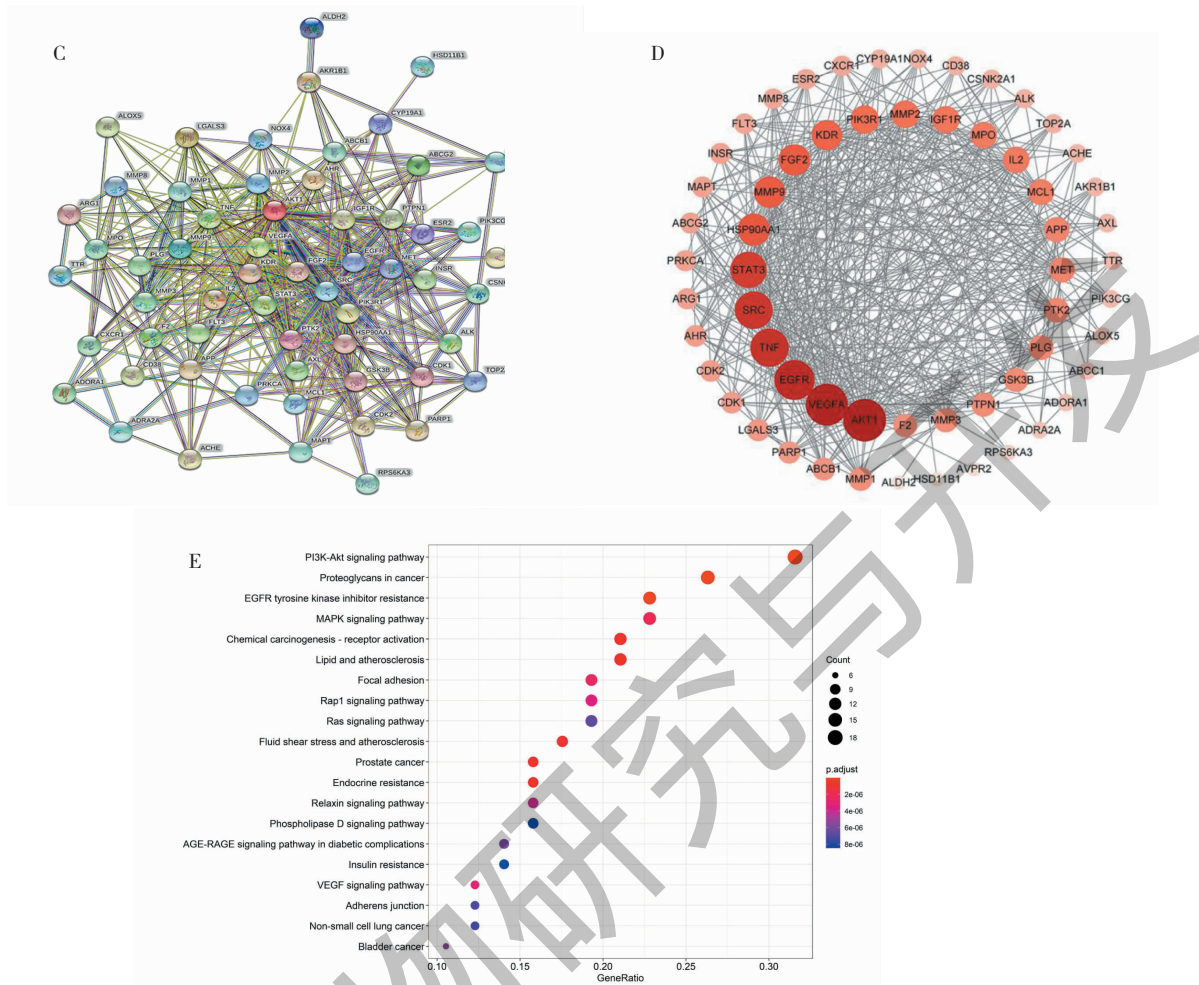


图5 黄精与治疗疾病的网络药理分析

Fig. 5 Network pharmacological analysis of Polygonati Rhizoma and therapeutic diseases

注:(A)黄精与胰岛素抵抗靶点韦恩图;(B)药物-成分-靶点-疾病相互作用的网络图;(C~D)蛋白相互作用网络;(E)黄精治疗胰岛素抵抗的KEGG富集分析。Note:(A) Venn diagram of Polygonati Rhizoma and insulin resistance targets;(B) Network diagram of drug-component-target-disease interactions;(C-D) Protein-protein interaction network;(E) KEGG enrichment analysis of Polygonati Rhizoma for insulin resistance.

2.5 野漆树苷、异野漆树苷、异鼠李素对 HepG2 细胞活性的影响

采用 MTT 法检测野漆树苷、异野漆树苷、异鼠李素对 HepG2 细胞活性的影响,结果如图 7 所示。与对照组相比,HepG2 细胞经不同浓度的药物处理 24 h 后,细胞活性发生明显改变,野漆树苷药物处理组中 30、7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理组的细胞存活率较高,异野漆树苷药物处理组中 25、3.2、1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理组的细胞存活率较高,异鼠李素药物处理组中 100、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理组的细胞存活率较高。基于药物对细胞活性的影响、药物浓度的有效性以及药物配制过程中的误差,本实验选择 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 野漆树苷、3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 异野漆树苷和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 异鼠李素进行下一步的实验。

2.6 野漆树苷、异野漆树苷、异鼠李素对 IR HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

野漆树苷、异野漆树苷、异鼠李素对 IR HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响的结果如图 8 所示,与对照组比较,经过胰岛素处理后,模型组细胞培养基中的葡萄糖含量升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明模型组细胞葡萄糖消耗量降低,模型组细胞产生了 IR 作用,IR 模型建立成功。与模型组比较,野漆树苷和异野漆树苷组细胞葡萄糖含量升高,且差异不具有统计学意义,说明野漆树苷和异野漆树苷干预后不能改善 HepG2 细胞 IR 状态;与模型组比较,异鼠李素组和阳性对照组细胞葡萄糖含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明异鼠李素组细胞葡萄糖消耗量增加,异鼠李素干预后能改善

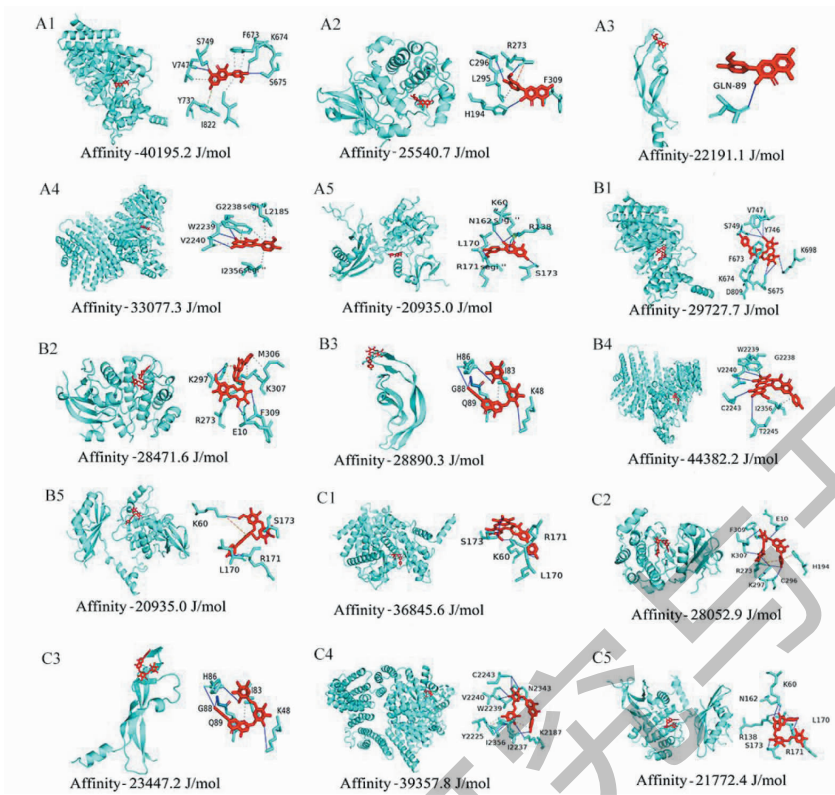


图6 异鼠李素、野漆树苷、异野漆树苷与核心靶点 PI3K、AKT1、VEGFA、mTOR、AMPK 分子对接结果

Fig. 6 Docking results of isorhamnetin, rhoifolin and isorhoifolin with core targets PI3K, AKT1, VEGFA, mTOR and AMPK
 注: A1 ~ A5 分别为异鼠李素与靶点 PI3K、AKT1、VEGFA、mTOR、AMPK 对接图; B1 ~ B5 分别为野漆树苷与靶点 PI3K、AKT1、VEGFA、mTOR、AMPK 对接图; C1 ~ C5 分别为异野漆树苷与靶点 PI3K、AKT1、VEGFA、mTOR、AMPK 对接图。Note: A1-A5 are docking diagrams of isorhamnetin with target PI3K, AKT1, VEGFA, mTOR and AMPK respectively; B1-B5 are docking diagrams of rhoifolin and target PI3K, AKT1, VEGFA, mTOR and AMPK respectively; C1-C5 are docking diagrams of isorhoifolin and target PI3K, AKT1, VEGFA, mTOR and AMPK respectively.

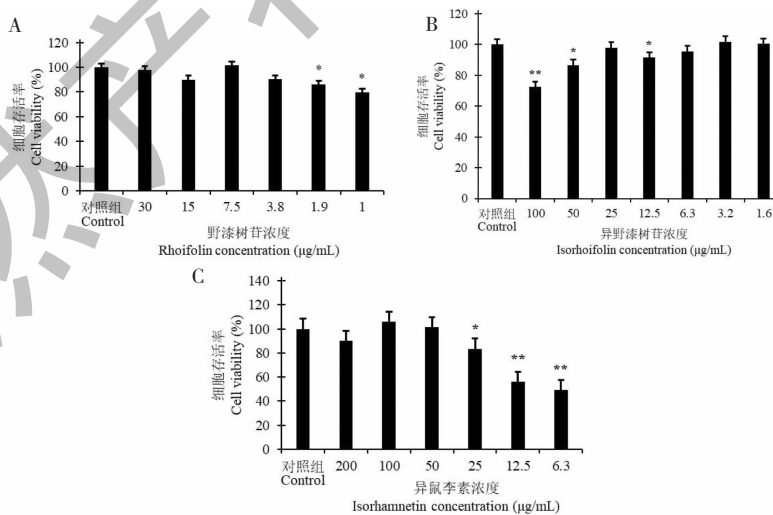


图7 野漆树苷 (A)、异野漆树苷 (B)、异鼠李素 (C) 对 HepG2 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of rhoifolin (A), isorhoifolin (B) and isorhamnetin (C) on HepG2 cells viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

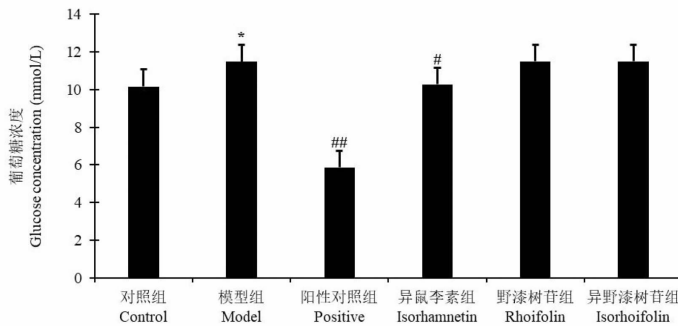


图 8 野漆树苷、异野漆树苷、异鼠李素对 IR HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 8 Effects of rhoifolin, isorhoifolin and isorhamnetin on glucose consumption of IR HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$)

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

HepG2 细胞 IR 状态,选择异鼠李素进行下一步的实验。

2.7 异鼠李素对 IR HepG2 细胞 PI3K、AKT1、VEGF、mTOR、AMPK 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 9 所示,本实验选取 β -actin 作为内参蛋白,结果显示内参表达水平趋于一致,表明该实验具有可靠性。与对照组比较,模型组细胞 PI3K、AKT1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$), VEGF、mTOR 蛋

白表达均显著升高 ($P < 0.05$), AMPK 蛋白表达虽升高,但不具有显著性差异;与模型组比较,异鼠李素药物干预后 PI3K、AKT1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$), VEGF 和 mTOR 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$),且均与阳性对照趋势一致。实验结果表明异鼠李素主要通过影响 PI3K、AKT1、VEGF 和 mTOR 蛋白表达从而改善 HepG2 细胞 IR 状态。

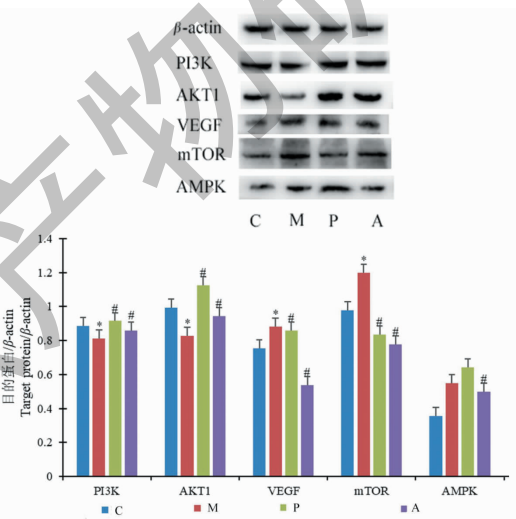


图 9 异鼠李素对 IR HepG2 细胞 PI3K、AKT1、VEGF、mTOR、AMPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effects of isorhamnetin on expression of PI3K, AKT1, VEGF, mTOR and AMPK signaling pathway related proteins in IR HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:C:对照组;M:模型组;P:阳性对照组;A:异鼠李素组。与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。Note: C: Control group; M: Model group; P: Positive group; A: Isorhamnetin group. Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$.

3 讨论与结论

本文基于 UHPLC-ESI-MS/MS 技术的代谢组学方法对药用黄精与食用黄精的次生代谢产物进行分

析。结果共鉴定出 319 种次生代谢产物,包括酚酸类 86 种,黄酮类 96 种,萜醌类 5 种,木脂素与香豆素 25 种,鞣质 3 种,生物碱 51 种,萜类 11 种,甾体

21种,其他类21种。药用黄精与食用黄精所含次生代谢物差异较大,PCA与HCA均可显著区别。另药用黄精与食用黄精比较组中共筛选出106种差异代谢物,其中上调化合物85种,下调化合物21种,药用黄精在次生代谢产物数量与相对含量方面具有明显优势。为进一步比较药用黄精与食用黄精次生代谢物的变化规律,将差异代谢物经过数据库KEGG注释,由KEGG分类与富集结果表明,药用黄精在黄酮、黄酮醇、异黄酮、生物碱代谢途径发生明显富集,这可能与药用黄精品质形成相关。由文献报道可知^[13],植物在生长过程中,由于生长环境或逆境的胁迫会产生种类丰富的次生代谢产物,这些代谢产物往往具有抗旱、抵御病害、虫害等特定的生物功能,同时这些次生代谢物的积累也有利于植物药用部位药效品质的提升。如:黄酮类成分的积累有利于抗氧化、抗炎、抗肿瘤功效的提高^[14];生物碱类成分积累则表现出有较高的抗肝癌作用及抑制 α -糖苷酶活性的作用^[15];甾体皂苷具有多样生物活性的成分,如抗炎、抗肿瘤等^[16]。因此,在对这些差异积累的黄酮类、生物碱类以及甾体类化合物的深入分析,有利于筛选出与药用黄精品质相关的质量标志物。

目前《中国药典》2020年版一部黄精项下并未对黄酮、生物碱类等次生代谢产物进行含量限定。本研究对药用黄精与食用黄精差异代谢物相对含量变化前十的化合物进行比较发现,50%的代谢物属于黄酮类化合物,这与差异代谢物KEGG分类与富集结果一致。其中药理活性较高的代谢物,如:异鼠李素具有较好的抗肿瘤、抗心肌缺氧、缺血,缓解心绞痛,抗心律失常,治疗冠心病和高血压,清除氧自由基,降低血清胆固醇,保护心血管,促进血流通畅等多种生物学效应,广泛应用于临床^[17,18];纤细薯蓣皂苷在抗肿瘤、抗菌、杀灭寄生虫、溶血、降血脂、抗骨质疏松、抗突变等方面也有一定的生理活性^[19,20]。而异鼠李素与纤细薯蓣皂苷仅在来源于黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 这一物种表现出明显差异上调。基于此,下一步可以食用黄精(水果黄精)为对照,探究来源于药典收载的滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua 以及地方可药用黄精品种(如:四川南充、重庆秀山、湖南新化等地广泛种植的大叶黄精)干燥块茎为实验组,基于广泛靶向代谢组分析各比较组次生代谢产物的变化规律,进而结合特

定类别代谢物的生物活性筛选出中药黄精品质相关代谢物,为正品黄精的品质评价与质量控制提供依据。

为了进一步验证代谢组学筛选出的差异上调化合物的活性,本文结合黄精传统功效健脾以及主治内热消渴证,以IR为疾病模型进行网络药理分析,通过KEGG通路分析的结果可以看出:异鼠李素、野漆树苷、异野漆树苷3种差异上调化合物于PI3K-Akt信号通路、mTOR信号通路、VEGF信号通路、雌激素信号通路、AMPK等信号通路富集显著性程度较高,通过对既往文献进行查阅并分析可以发现:PI3K/AKT信号通路涉及细胞周期、细胞凋亡、细胞增殖和葡萄糖代谢,而胰岛素主要作用于肌肉、肝脏和脂肪组织,它通过与胰岛素受体结合来激活PI3K/AKT信号通路,从而调控葡萄糖和脂肪代谢过程^[21];mTOR信号通路通过参与调控骨骼肌葡萄糖摄入量及胰岛素抵抗,通路激活可提高胰岛素敏感性,然而当其过度激活时则会抑制胰岛素的敏感性^[22];VEGFA作为VEGF信号通路的重要靶点蛋白,通过提高脂肪和肌肉中胰岛素的敏感性来改善IR,进而控制血糖^[23];腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是调节机体能量代谢的重要物质,研究表明多种天然化合物能激活AMPK,增强胰岛素的敏感性,是改善胰岛素抵抗的潜在靶点^[24]。此外,黄精改善IR的作用靶点还可能通过作用于雌激素信号通路等相关通路,调节垂体-肾上腺轴及其他组织器官,直接或者间接起到了改善IR的作用^[25]。以上研究结果与文献报道单体成分异鼠李素治疗糖尿病结果一致^[26]。另通过分子对接技术进一步揭示黄精对改善IR的功效的作用机制,结果显示PI3K-Akt信号通路、mTOR信号通路、VEGF信号通路、雌激素信号通路、AMPK等信号通路关键靶点与异鼠李素、野漆树苷、异野漆树苷对接效果好,结合能均 ≤ -20.9 kJ/mol。因此推测黄精活性成分与关键靶点的结合可能是黄精发挥治疗IR的关键。通过进一步的细胞实验验证发现差异代谢物中异鼠李素可以有效改善HepG2细胞IR状态,主要通过影响PI3K、AKT1、VEGF和mTOR信号通路相关蛋白的表达,结果表明异鼠李素可以使IR HepG2细胞PI3K、AKT1蛋白表达水平升高,VEGF、mTOR蛋白表达水平降低。

综上所述,本文通过广泛靶向代谢组学技术准确、全面地鉴定了药用与食用黄精中的次生代谢物,

药用黄精与食用黄精相比差异上调化合物异鼠李素等通过 PI3K、AKT1、VEGFA 和 mTOR 等核心靶点作用于 PI3K、AKT1、VEGF 和 mTOR 等信号通路起到了改善 IR 的目的,充分体现了中药多成分-多靶点-多途径的药效特点。该研究结果为黄精活性成分的筛选与品质评价奠定了基础、为阐述黄精治疗 IR 作用机制提供了依据。

参考文献

- Yang P, Li YH, Han YZ, et al. Mechanism of fasting treatment to attenuate type 2 diabetes mellitus[J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2021, 37:1146-1152.
- Gao JF, Liu MM, Guo ZP. Puerarin alleviates insulin resistance in type 2 diabetic mice by modulating fetuin B-AMPK/ACC signaling pathway in the liver[J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2021, 41:839-846.
- Sshen T, Lei T, Chen L, et al. Effect of sitagliptin on the expression of TNF- α , IL-6 and IL-10 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with type 2 diabetes mellitus complicated with NAFLD[J]. Shanxi Med J(山西医药杂志), 2021, 50:1907-1911.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:319.
- Liu S, Hu ST, Jia QJ, et al. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Polygonati Rhizoma*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:1783-1796.
- Gong GM, Zhang Y, Yuan HP, et al. Clinical effect of compound *Polygonatum sibiricum* prescription in treatment of type 2 diabetes with deficiency of both Qi and Yin: An analysis of 32 cases[J]. Hunan J Tradit Chin Med(湖南中医杂志), 2021, 37(1):5-8.
- Tao YT, Li FJ, Yang M, et al. Mechanism of Huangjing Pill on improving disorder of glycolipid metabolism based on network pharmacology[J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med(上海中医药大学学报), 2021, 35(1):83-92.
- Zhang XJ, Lv XF, Wang JH, et al. Researching the mechanism of improving insulin resistance by bioactive components in *Polygonati Rhizoma* through network pharmacology[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2021, 7(1):1-15.
- Ren HM, Zhang JL, Deng YL, et al. Analysis of chemical constitutions of *Polygonatum cyrtonea* dried rhizomes before and after processing with wine based on UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(4):110-121.
- Wang CC, Zao H, Yan Y, et al. Thoughts of omics research on quality formation in Dao-di herbs[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43:2407-2412.
- Sun X, Li L, Pei J, et al. Metabolome and transcriptome profiling reveals quality variation and underlying regulation of three ecotypes for *Cistanche deserticola*[J]. Plant Mol Biol, 2020, 102:253-269.
- Wang F, Chen L, Chen HP, et al. Analysis of flavonoid metabolites in *Citrus* peels (*Citrus reticulata* "Dahongpao") using UPLC-ESI-MS/MS[J]. Molecules, 2019, 24(15):2680.
- Yang HJ, Lan YQ, Wang SH. Omics research progress of plant response to low temperature stress[J]. Shandong Agric Sci(山东农业科学), 2020, 52(5):142-148.
- Calvo MI. Homoisoflavanones from *Ledebouria floribunda*[J]. Fitoterapia, 2009, 80(2):96-101.
- Wu ZR, Chen P, Li Y, et al. Two cinnamoyloctopamine antioxidants from garlic skin attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis[J]. Phytomedicine, 2015, 22(1):178-182.
- Gao SY, Li WM, Shuai Y, et al. Advances on steroidal saponins from medicinal plants lily[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(16):337-343.
- Gong G, Guan YY, Zhang ZL, et al. Isorhamnetin: a review of pharmacological effects[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128:110301.
- Liu N, Feng J, Lu X, et al. Isorhamnetin inhibits liver fibrosis by reducing autophagy and inhibiting extracellular matrix formation via the TGF- β 1/smad3 and TGF- β 1/p38 MAPK pathways[J]. Mediat Inflamm, 2019, 2019:6175019.
- Wei JY, Li JC, Xiong F, et al. Effect of gracillin on differentiation and bone resorption of osteoclasts[J]. J Guangxi Med Univ(广西医科大学学报), 2020, 37:664-669.
- Fu K, Shui GC, Shi JM. Study on the inhibitory effect of triterpenoid dioscin on human hepatocarcinoma HepG2 cells[J]. Cardiovasc Dis J Integr Tradit Chin Western Med(中西医结合心血管病电子杂志), 2020, 8(1):67-68.
- Wan JY, Long Y, Zhang YL, et al. Role of PI3K/Akt signaling pathway in diabetic nephropathy and research progress on intervention of traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52:3705-3716.
- Wang Z, Yang L, Liao M, et al. Research progress of mTOR pathway in pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Curr Biotech(生物技术进展), 2021, 11:316-321.
- Li JH. Efficacy analysis of vitreous injection VEGF drugs

- combined with cataract phaco in the treatment of diabetic macular edema[J]. Chron Pathematol J(慢性病学杂志), 2021, 22:1077-1081.
- 24 Gao JF, Liu MM, Guo ZP, et al. Puerarin alleviates insulin resistance in type 2 diabetic mice by modulating fetuin B-AMPK/ACC signaling pathway in the liver[J]. J Southern Med Univ(南方医科大学学报), 2021, 41:839-846.
- 25 Xu L, Zhang W. Effect of ER α expression in adipose tissue of gestational diabetes mellitus on insulin resistance[J]. J Med Res(医学研究杂志), 2019, 48(11):109-113.
- 26 Bao QQ, Li MR, Huang R, et al. The mechanism of isorhamnetin regulating AKT-FOXO1 pathways on improve the insulin resistance model of HepG2 cells[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2020, 41(23):320-324.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林	刘相国
WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin	LIU Xiangguo
孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉	汪海波
SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li	WANG Haibo
沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊	欧阳杰
MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun	OUYANG Jie
易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛	夏永刚
YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao	XIA Yonggang
高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕	曾克武
GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan	ZENG Kewu
蓝蔚青	廖晨钟	薛永波			
LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo			