

基于网络药理学和分子对接研究益气滋阴活血方治疗 2型糖尿病的潜在靶标和分子作用机制

李力源¹, 郭 箫¹, 王晓莹¹, 李艺坤¹, 张 越^{1,2}, 杨高山^{1,2}, 宋秋航^{1,2,*}, 李爱英^{2,3,*}

¹河北中医学院基础医学院; ²河北省心脑血管病中医药防治重点实验室; ³河北中医学院护理学院, 石家庄 050200

摘要:基于数据库筛选、核心网络分析、通路富集分析、分子对接技术和 GEO 转录组学数据分析,探索黄芪、山药、丹参和生地黄组成的益气滋阴活血方医治 2 型糖尿病 (T2DM) 的有效化合物及作用机制,得出益气滋阴活血方中丹酚酸 J、丹酚酸 D、甾萜醇、槲皮素、木犀草素、山奈酚和 β -谷甾醇等化合物,可能通过靶向 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、AGE-RAGE 信号通路和 IL-17 信号通路中的 AKT1、MAPK1、IL6 和 STAT3 等核心蛋白发挥治疗 T2DM 的作用。并发现多个丹酚酸类化合物是靶向 AKT1 和 MAPK1 的潜在抑制剂,特别是丹酚酸 A、C 和 H 与 AKT1 和 MAPK1 结合能力较强,今后可对丹酚酸类化合物的结构进行修饰和改造,使其达到成药标准,成为治疗 T2DM 的 AKT1 和 MAPK1 的靶向抑制剂。本研究为益气滋阴活血方临床治疗 T2DM 提供思路和参考依据,为筛选、开发天然产物来源的 AKT1 和 MAPK1 的靶向抑制剂提供骨架化合物,为进一步阐明益气滋阴活血方用于 T2DM 的特色防治提供理论基础,也为益气滋阴活血方的现代化应用和天然产物的开发提供新方向。

关键词:益气滋阴活血方; 2 型糖尿病; 网络药理学; 分子对接; GEO

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022) Suppl-0130-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.S.019

Potential targets and molecular mechanisms of Yiqi Ziyin Huoxue Prescription in the treatment of type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology and molecular docking

LI Li-yuan¹, GUO Xiao¹, WANG Xiao-ying¹, LI Yi-kun¹,
ZHANG yue^{1,2}, YANG Gao-shan^{1,2}, SONG Qiu-hang^{1,2,*}, LI Ai-ying^{2,3,*}

¹College of Basic Medical Sciences, Hebei University of Chinese Medicine;

²Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardiocerebrovascular Disease;

³College of Nursing, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

Abstract: Based on database screening, core network analysis, pathway enrichment analysis, molecular docking and GEO data analysis, to predict and screen the effective compounds and mechanisms of Yiqi Ziyin Huoxue Prescription (YZHP) composed of four herbs (Astragalii Radix, Dioscoreae Rhizoma, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and Rehmanniae Radix) in treating type 2 diabetes mellitus (T2DM). The results showed that the contents of salvianolic acid J, salvianolic acid D, stigmasterol, quercetin, luteolin, kaempferol, β -sitosterol and other compounds can target AKT1, MAPK1, IL6 and STAT3 in PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway and IL-17 signaling pathway to treat T2DM. And found that several salvianolic acids were potential inhibitors of AKT1 and MAPK1, especially salvianolic acids A, C and H have strong binding ability with AKT1 and MAPK1. In the future, the structure of salvianolic acids A, C and H can be modified to make them reach the standard of patent medicine, and become the targeted inhibitors of AKT1 and MAPK1 for the treatment of T2DM. In this paper, providing ideas and reference basis for clinical treatment of T2DM with YZHP, providing leading compounds for screening and developing targeted inhibitors of AKT1 and MAPK1 from natural products, providing the-

收稿日期: 2021-03-23 接受日期: 2021-08-04

基金项目: 河北中医学院博士科研基金 (BSZ2020011); 河北省重点研发计划项目-生物医药专项 (20372501D); 国家级大学生创新创业训练计划 (202014432017)

* 通信作者 Tel: 86-015043020809; E-mail: songqiuhan@163.com, liaiying@hebcm.edu.cn

oretical basis for further elucidating the prevention and treatment of T2DM with YZHP, providing theoretical basis for further elucidating the prevention and treatment of T2DM with YZHP.

Key words: Yiqi Ziyin Huoxue Prescription; T2DM; network pharmacology; molecular docking; GEO

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是由胰岛 β 细胞缺陷造成的胰岛素水平不足 (或相对不足) 和糖类、脂肪、蛋白质代谢异常的内分泌代谢疾病^[1]。国际糖尿病联盟发布的第九版全球糖尿病地图显示,截止到 2019 年全世界约有 4.6 亿糖尿病患者 (20 ~ 79 岁),并且这一数字到 2030 年和 2045 年,预计将达到 5.7 亿和 7.0 亿。目前,临床上用于治疗糖尿病的药物以西药为主,但西药存在局限性,甚至还会引起严重的不良反应,如双胍类药物会诱发乳酸中毒^[2],对肝、肾功能障碍的糖尿病患者使用磺脲类药物会导致低血糖而且磺胺类药物会导致体重增加^[3]。因此,国内外医学界逐渐把注意力转向中医治疗。中医称糖尿病为“消渴”,主要证候为气阴两虚证^[4],治疗常以滋阴清热、益气生津为主。陈澈分析了白虎加人参汤、玉女煎、玉液汤、参苓白术散等 444 个益气养阴活血的方剂^[5],结合用药频次及药物之间的网络关系得出排名前四的中药:黄芪、山药、丹参和生地黄,这四味药具有益气健脾、养阴生津和活血化瘀的功效,山药和生地黄多作为君药,丹参多作为臣药,黄芪多作为佐药,是降糖舒片、降糖胶胶囊和三黄降糖汤中的重要组成成分,推测其为治疗气阴两虚证 T2DM 的核心方药^[5,6]。基于上述研究结果,将黄芪、山药、丹参和生地黄黄裁为益气滋阴活血方,并通过网络药理学的方法研究其在治疗 T2DM 时的分子作用机制。

网络药理学是基于系统生物学理论,运用大数据进行分析的技术,在保留传统中医药基础的同时,满足现代中医药对系统性研究的需要^[7],将药物-疾病相关基因构成整体网络进行研究,并通过分子对接技术筛选核心靶点蛋白及其天然产物抑制剂。与经验筛选相比,网络药理学和分子对接技术的联用不仅为后期研发节约成本、提高效率,也可以揭示复方药物与疾病之间复杂的相互作用关系,为进一步筛选潜在的用药靶点及中药有效化合物提供理论依据。

益气滋阴活血方中:黄芪味甘、性温,作用于肺经、脾经,能够利水消肿、止汗固表^[8],用于气虚乏力,表虚自汗,内热消渴等^[3],含有黄酮、皂苷、多糖等多种化学物质,其中黄芪多糖可通过 SIRT1-PGC-1 α 信号通路和 PPAR α -FGF21 信号通路改善糖脂代谢和胰岛素抵抗^[9];山药味甘、苦、性寒,作用于心

经、肝经、肾经,能够补脾养胃、生津益肺^[10],含有的山药多糖可能通过 AR 信号通路、p38MAPK 信号通路和 CREB 信号通路,抑制醛糖还原酶通路激活^[11],降低血脂和血糖;丹参味甘、性平,作用于脾经、肺经、肾经,能够活血祛瘀,通经止痛,其含有的木犀草素可以通过激活 AMPK 信号通路、PI3K-AKT 信号通路发挥治疗 T2DM 的作用^[12,13];丹参酮 IIA 通过 AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路以及 IL6 和 IL3 信号通路发挥抗炎等作用治疗 T2DM^[14];生地黄味苦、性温,作用于心经、肝经,能够清热凉血,养阴生津,含有的 β -谷甾醇和梓醇等成分可通过抑制 IL-1 β 信号通路减轻炎症反应^[15],起到调节免疫、抗炎、降糖和利尿等作用^[16]。以上研究表明,黄芪、山药、丹参和生地黄可通过肺经、脾经、肾经、肝经和心经起到益气滋阴、活血化瘀的功效,并通过 PI3K-AKT 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、p38MAPK 信号通路等通路干预 T2DM 的发生发展,起到抗炎降糖的作用。因此,本研究采用了网络药理学结合分子对接技术探寻益气滋阴活血方医治 T2DM 的分子作用机制同时筛选出新的用药靶点和有效的中药化合物,为开发治疗 T2DM 的药物提供理论基础。

1 方法

1.1 T2DM 相关基因筛选

在人类基因综合数据库 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 中检索“Type 2 Diabetes Mellitus”,获得与 T2DM 相关的基因集。

1.2 活性化合物及相关靶点的筛选

采用中药系统药理学分析平台 (TCMSP <http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 分别以“黄芪”“山药”“丹参”和“生地黄”为关键字,口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为筛选标准进行检索,或通过 SwissADME 网站 (<http://www.swissadme.ch/>) 的胃肠吸收值和类药性指标进行药物筛选,获得四味药的有效中药化合物。

1.3 “活性化合物-交集靶点”网络可视化

通过 UniProt 数据库提取筛选出的活性化合物作用靶点对应的基因名,与 T2DM 相关基因取交集,并用 Cytoscape 3.2.1 软件进行“活性化合物-交集基因”网络可视化。

1.4 构建“蛋白-蛋白”互作网络(PPI)并筛选核心靶点蛋白

在 STRING(<https://string-db.org/>)数据库中输入上述交集基因,并将物种设定为人,生成 PPI 网络同时筛选出主要的靶点蛋白,并使用 Cytoscape 3.2.1 软件中的 MCODE 和 Hubba 功能模块构建 PPI 网络核心蛋白模组($\text{score} \geq 3.5$)。

1.5 关键靶点功能预测与富集分析

将活性化合物的靶点基因与 T2DM 相关基因的交集基因通过 R 语言中的 ClusterProfiler 包和 KOBAS 3.0 数据库(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)进行 GO 功能富集和进行 KEGG 信号通路富集($P < 0.05$),并使用可视化工具(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)制作柱状图或气泡图。

1.6 GEO 数据分析

通过 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)以“Type 2 Diabetes mellitus”为关键词进行检索,选择“Homo sapiens”人类样本,编号为 GSE76896 的数据集符合分析标准,共收集到 170 例样本,含 T2DM 患者胰岛样本 54 例,正常胰岛样本 116 例,借助 R 语言中的“limma”包进行差异基因分析($FC > 1.5$ 或 $FC < 0.66$, $P < 0.05$),并结合 KOBAS 3.0 数据库对差异基因进行 KEGG 富集分析,验证关键调控通路及蛋白的准确性。

1.7 “活性化合物-核心靶点蛋白”分子对接验证

为验证核心蛋白与筛选到的活性化合物之间的作用情况,将核心靶点蛋白分子与活性化合物和已上市或在临床试验阶段的阳性药物进行分子对接。首先准备蛋白结构:在 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)根据条件(物种为人;蛋白结果通过 X 晶体衍射获得;蛋白晶体解析度小于 3 \AA)下载核心靶点蛋白的 3D 结构,使用 PyMol 1.8 去除蛋白结构中的溶剂和非活性配体;其次准备配体结构:在 Pub-

Chem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载筛选到的活性化合物及阳性药物的 3D 结构;最后进行分子对接:使用 GOLD 5.2 软件对蛋白进行加氢,去水和分离原配体,之后添加活性化合物和阳性药物,将原配体作为参照,并用 ChemPLP 和 ChemScore 两个为打分函数来评价蛋白与化合物之间的结合情况。同时,使用 Autodock Vina 1.1.2 计算蛋白与化合物之间的结合自由能。

2 结果

2.1 疾病靶点的筛选

在 GeneCards 数据库中以“Type 2 Diabetes Mellitus”为关键词查询 T2DM 的作用靶点,共获得 9 215 个基因。取 Relevance score 值大于 30 的共 475 个基因作为 T2DM 的主要靶点。

2.2 活性化合物的筛选

在 TCMSPP 数据库中检索四味中药中包含的化合物,共 436 个,其中 87 个来自黄芪,76 个来自生地黄,71 个来自山药,202 个来自丹参。以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为筛选标准,或结合相关文献及 SwissADME 网站预测结果,筛选出潜在活性化合物 121 个,其中 20 个来自黄芪,21 个来自生地黄,16 个来自山药,64 个来自丹参(见表 1)。

2.3 中药靶点的预测及中药对 T2DM 作用靶点的获得

基于四味中药的有效成分,分析其作用靶点并统计数量:黄芪、山药、丹参和生地黄的活性化合物的作用靶点数分别为 180、59、107 和 40 个。黄芪与 T2DM 的共有靶点有 74 个:STAT3、JUN 和 MAPK1 等;山药与 T2DM 的共有靶点有 19 个:AKT1、VEGFA 和 ESR1 等;丹参与 T2DM 的共有靶点有 44 个:IL-6、STAT3 和 MAPK1 等;生地黄与 T2DM 的共有靶点有 13 个:PTGS1、PTGS2 和 ADRB2 等。四味药的预测靶点与 T2DM 靶点的交集共有 150 个交集靶点,去重后共有 84 个交集靶点(见表 1)。

表 1 中药有效成分及预测靶点数量

Table 1 Effective components and predicted targets number of traditional Chinese medicine

中药名称 Name of traditional Chinese medicine	有效成分数量 Number of active ingredients	预测靶点数量 Number of predicted targets	与 T2DM 的共有靶点 Common target with T2DM
黄芪	20	180	74
山药	16	59	19
丹参	64	107	44
生地黄	21	40	13
总计	121	386	150

2.4 “活性化合物-交集靶点”网络构建分析

对上述 121 个活性化合物与预测靶点所构建的网络进行分析,网络中的 415 条连线表明活性化合物和交集靶点有关联。进一步分析得出有 89 个活性化合物存在对应靶点,对 89 个活性化合物与预测

靶点所构建的网络进行分析(见图 1),以网络中活性化合物度值进行排名,前 10 的关键活性化合物有槲皮素(quercetin)、木犀草素(luteolin)和山奈酚(kaempferol)等(见表 2),说明这些化合物可能在 T2DM 的治疗中发挥重要作用。

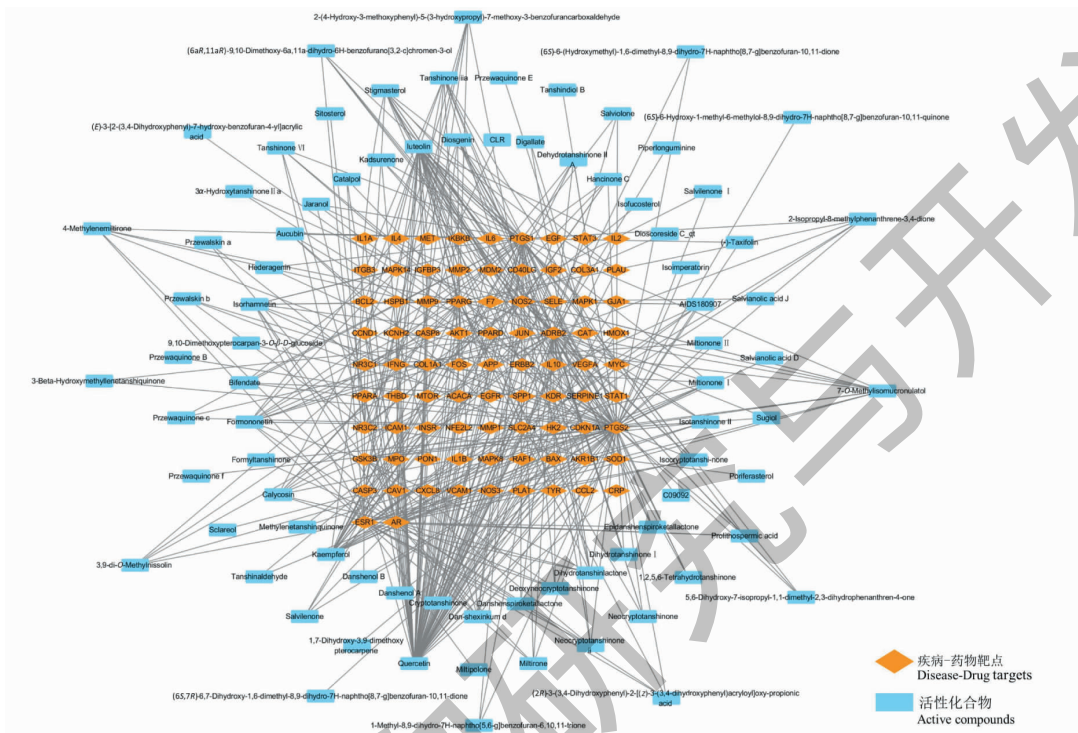


图 1 活性化合物-交集靶点网络
Fig. 1 Active compounds -intersection targets network

表 2 益气滋阴活血方关键活性化合物排名

Table 2 The rank of key active compounds of Yiqi Ziyin Huoxue Prescription

有效成分 Active ingredient	度值 Degree	来源 Source
槲皮素 Quercetin	66	黄芪
木犀草素 Luteolin	30	丹参
山奈酚 Kaempferol	22	黄芪
刺芒柄花素 Formononetin	12	黄芪
豆甾醇 Stigmasterol	12	山药、生地黄
异鼠李素 Isorhamnetin	11	黄芪
丹参酮 IIA Tanshinone IIA	10	丹参
7-O-甲基异木糖醇 7-O-methylisomucronulatol	10	黄芪
丹参新醌 D Dan-shexinkum D	9	丹参
毛蕊异黄酮 Calycosin	9	黄芪

2.5 “蛋白-蛋白”互作(PPI)网络及核心靶点蛋白

为探索 84 个“疾病-药物”交集靶点蛋白之间的关系网络及核心蛋白,利用 STRING 数据库进行分

析,得到 PPI 网络及核心靶点蛋白,该网络存在 84 个节点和 319 条边,平均节点度值为 7.6(见图 2),通过 MCODE 和 Hubba 功能模块预测出具有调控炎

症反应功能的核心蛋白模组 3 个 (score ≥ 3.5 , 蛋白靶点颜色越深, 代表其在模组中度值越大; 直径越大, 代表其在 PPI 网络中度值越大), 模组 1 含 MAPK1、AKT1、IL-6 等; 模组 2 含 JUN、MAPK8、IL-4 等; 模组 3 含 STAT3、STAT1、MAPK14 等 (见图 3),

说明益气滋阴活血方可能是通过调控这些核心靶点蛋白来发挥治疗 T2DM 的作用。对 PPI 网络进行可视化发现, 核心靶点蛋白主要有: MAPK1、STAT3、AKT1、JUN 和 IL-6 等 (见图 4)。

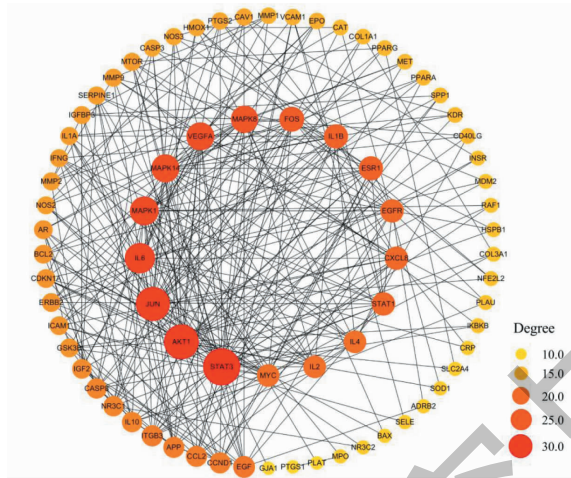


图 2 益气滋阴活血方与 T2DM“蛋白-蛋白”互作网络

Fig. 2 The protein-protein interaction network between Yiqi Ziyin Huoxue Prescription and T2DM

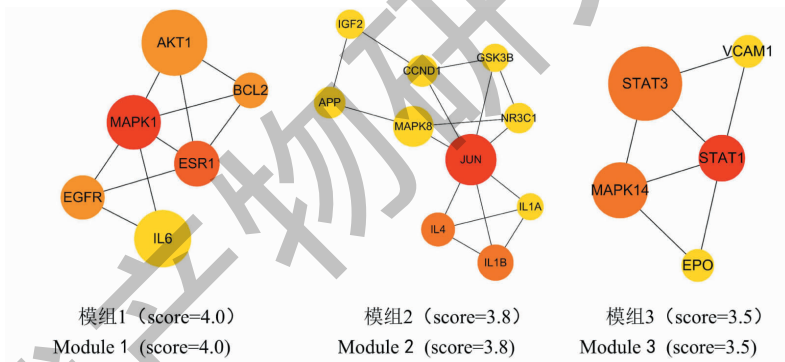


图 3 “蛋白-蛋白”互作网络的核心蛋白模组

Fig. 3 The core targets protein module of protein-protein interaction network

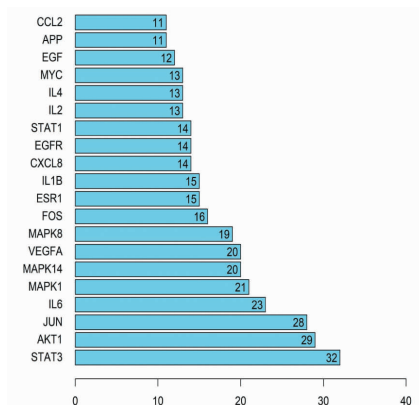


图 4 PPI 网络的核心靶点蛋白排名

Fig. 4 The rank of core targets protein in PPI network

2.6 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

将 84 个关键基因用 ClusterProfiler 包和 KOBAS 3.0 数据库进行 GO 富集和 KEGG 通路富集分析。GO 富集结果显示:生物过程 (BP, 93%) 富集到 2116 个条目,主要与活性氧代谢过程、对脂多糖的反应和对类固醇激素刺激的反应等相关;分子功能

(CC, 2%) 富集到 50 个条目,主要与部分膜区、线粒体外膜和内质网内腔等相关;细胞组成 (MF, 5%) 富集到 108 个条目,主要与蛋白酶结合、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、生长因子活性和受体配体活性等相关(见图 5)。表明益气滋阴活血方可能通过作用到这些生物途径发挥治疗 T2DM 的作用。

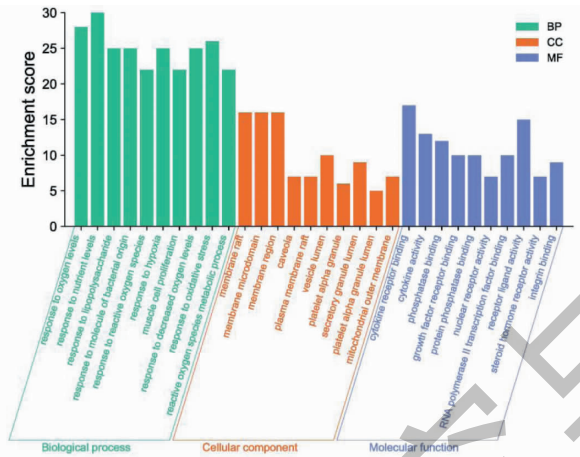


图 5 益气滋阴活血方治疗 T2DM 预测靶点的 GO 功能分析图

Fig. 5 GO functional analysis diagram of predicted targets of Yiqi Ziyin Huoxue Prescription in treating T2DM

靶点的 KEGG 通路富集结果显示有 153 条信号通路被显著富集 ($P < 0.05$), 主要通路有 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路和 IL-17 信号通路等(见图 6)。提示益气滋阴活血方主要通过影响糖脂代谢、炎症细胞的增殖分化与凋亡和细胞周期的失调等方式发挥治疗 T2DM 的作用。

到 1 329 个差异表达基因,其中上调基因 765 个,下调基因 564 个,对差异基因进行通路富集分析得出, TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Rar1 信号通路和 MAPK 信号通路等通路与 T2DM 发生、发展相关(见图 7),上文 2.6 结果表明益气滋阴活血方通过靶向 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路和 MAPK 信号通路治疗 T2DM,提示益气滋阴活血方可能通过靶向 PI3K-Akt 信号通路和

2.8 GEO 数据分析预测通路的准确性

对 GSE76896 数据集进行差异表达分析,共得

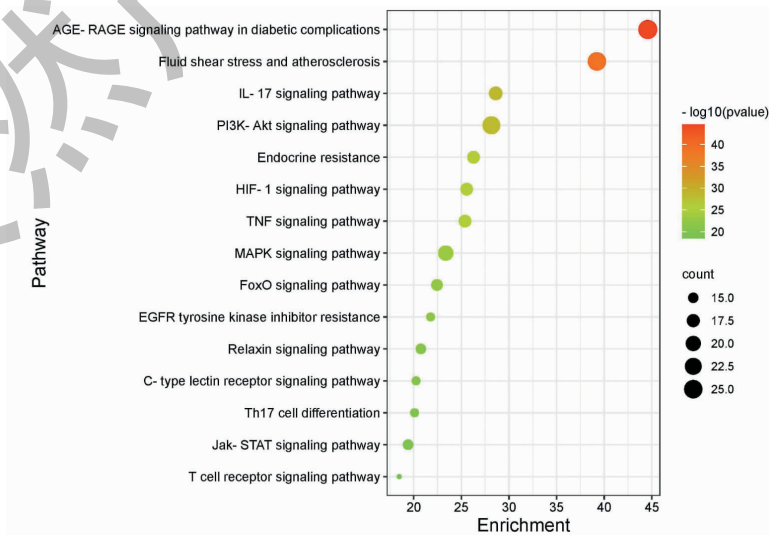


图 6 益气滋阴活血方治疗 T2DM 预测靶点的 KEGG 通路富集图

Fig. 6 KEGG enrichment pathway diagram of predicted targets of Yiqi Ziyin Huoxue Prescription in treating T2DM

MAPK 信号通路发挥治疗 T2DM 的作用,结合 PPI 核心蛋白排名结果,预测 AKT1 和 MAPK1 是益气滋

阴活血方治疗 T2DM 的关键调控蛋白。

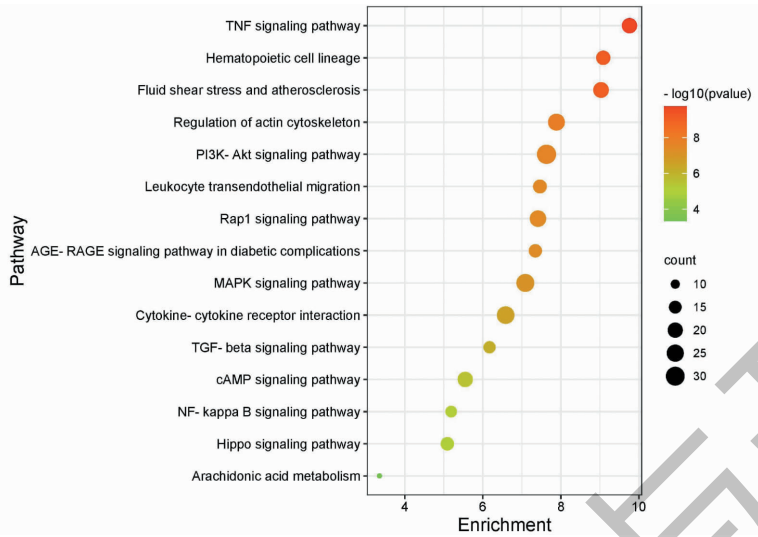


图7 GSE76896 数据集差异基因的 KEGG 通路富集图

Fig. 7 KEGG enrichment pathway diagram of differential genes in GSE76896 data set

2.8 “活性化合物-核心靶点蛋白”分子对接分析

将 AKT1 和 MAPK1 分别与筛选到的 89 个活性化合物通过 GOLD 5.2 和 Autodock Vina 1.1.2 进行分子对接,并选择已上市或已处于临床试验阶段的药物做为阳性对照。结果表明,丹酚酸 J、丹酚酸 D、豆甾醇和 β -谷甾醇与 AKT1 和 MAPK1 的对接打分值较高,结合自由能数值较低,提示活性化合物能够与靶蛋白稳定结合。四个活性化合物与 AKT1 的打分值接近甚至超过阳性药物 Ipatasertib、Cpivasertib 和 Afuresertib;四个活性化合物与 MAPK1 的打分值接近阳性药物 AZD0364,其中丹酚酸 J 和丹酚酸 D 的打分值超过阳性药物 Ulixertinib 和 KO947 (见表 3),说明四个化合物均可以与 AKT1 和 MAPK1 紧密

结合。为进一步分析四个化合物与 AKT1 和 MAPK1 的结合情况,将 AKT1 和 MAPK1 蛋白结构分别与 4 种化合物的最佳构象对接(见图 8),结果显示丹酚酸 J 与 AKT1 蛋白的第 17、85 位谷氨酸、274 位天冬氨酸和 205 位丝氨酸形成氢键;丹酚酸 D 与 AKT1 蛋白的第 79 位谷氨酸、274 位天冬氨酸、80 位色氨酸、213 位亮氨酸、211 位苏氨酸和 205 位丝氨酸形成氢键;豆甾醇和 β -谷甾醇与第 205 位丝氨酸形成氢键,同理这四种小分子也可与 MAPK1 蛋白的不同位置的氨基酸形成氢键,说明丹酚酸 J、丹酚酸 D、豆甾醇和 β -谷甾醇可以稳定的结合在蛋白的活性口袋中,是其潜在的抑制剂。

表 3 核心靶点蛋白与相关活性化合物的分子对接打分

Table 3 The molecular docking score of core target proteins with active compounds

靶点蛋白 Target protein	PDBID	配体/活性化合物 Ligand /active compound	来源 Source	GOLD		Vina
				ChemPLP	Chemscore	结合能 Affinity (kJ/mol)
AKT1	6HHF	Borussertib	原配体	116.79	41.96	-13.5
		Ipatasertib	阳性对照	86.36	31.25	-10.9
		Cpivasertib	阳性对照	84.54	26.19	-12.1
		Afuresertib	阳性对照	80.04	27.69	-9.1
		丹酚酸 J Salvianolic acid J	丹参	101.3	22.85	-12.6
		丹酚酸 D Salvianolic acid D	丹参	92.78	27.75	-11.4

续表 3 (Continued Tab. 3)

靶点蛋白 Target protein	PDBID	配体/活性化合物 Ligand / active compound	来源 Source	GOLD		Vina
				ChemPLP	Chemscore	结合能 Affinity (kJ/mol)
AKT1	6HHF	豆甾醇 Stigmasterol	山药、生地黄	82.10	40.95	-12.7
		β -谷甾醇 β -Sitosterol	生地黄	81.51	42.47	-12.9
MAPK1	6SLG	AZD0364	原配体	94.45	25.32	-12.2
		Ulixertinib	阳性对照	74.52	31.09	-9.1
		KO947	阳性对照	70.31	36.64	-10.2
		丹酚酸 J Salvianolic acid J	丹参	78.19	15.89	-10.9
		丹酚酸 D Salvianolic acid D	丹参	75.78	16.56	-10.4
		豆甾醇 Stigmasterol	山药、生地黄	66.40	33.16	-12.2
		β -谷甾醇 β -Sitosterol	生地黄	67.97	30.73	-10.1

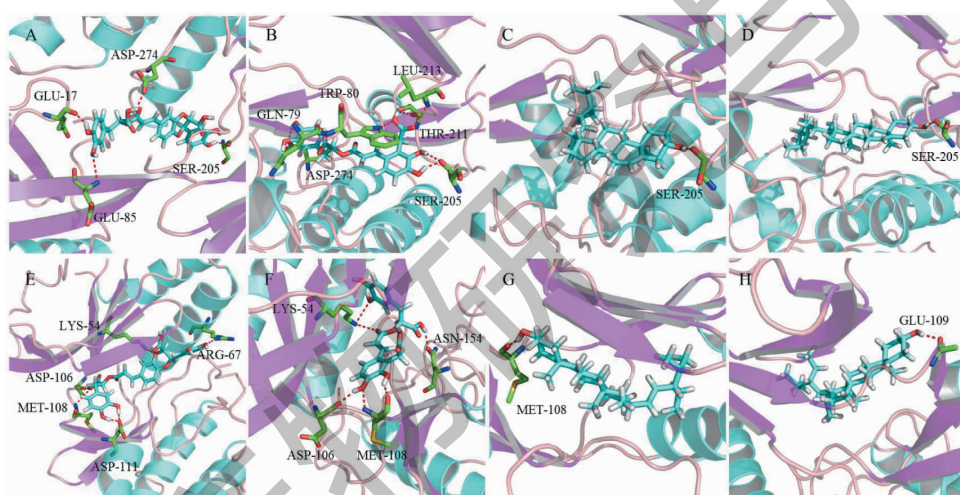


图 8 核心蛋白 AKT1 和 MAPK1 与关键活性化合物分子对接模式图

Fig. 8 Molecular docking patterns diagram of core target proteins AKT1 and MAPK1 with key active compounds

注: A ~ D: 核心蛋白 AKT1 与丹酚酸 J、丹酚酸 D、豆甾醇和 β -谷甾醇的分子对接模式图; E ~ H: 核心蛋白 MAPK1 与丹酚酸 J、丹酚酸 D、豆甾醇和 β -谷甾醇的分子对接模式图。Note: A ~ D: Molecular docking patterns diagram of core target proteins AKT1 with salviaic acid J, salviaic acid D, stigmasterol and β -sitosterol; E ~ H: Molecular docking patterns diagram of core target proteins MAPK1 with salviaic acid J, salviaic acid D, stigmasterol and β -sitosterol.

上述分子对接结果显示,丹酚酸 J 和丹酚酸 D 均能与 AKT1 和 MAPK1 的活性口袋稳定结合,因此预测丹酚酸类化合物可以靶向抑制 AKT1 和 MAPK1。将丹酚酸 A ~ C、E ~ I、K ~ L 分别与 AKT1 和 MAPK1 进行分子对接,以阳性对照的 ChemPLP、Chemsocre 和结合能值为筛选标准,对丹酚酸类化合物进行综合对接能力排序(见表 4),丹酚酸 A、C 和 H 可以与 AKT1 稳定结合(ChemPLP ≥ 80 、Chemsocre ≥ 25 、结合能 ≤ -11 kJ/mol),也可与 MAPK1 稳定结合(ChemPLP ≥ 80 、Chemsocre ≥ 19 、结合能

≤ -9 kJ/mol)(见图 9)。丹酚酸 A 和 H 与 AKT1 蛋白的第 274 位天冬氨酸形成氢键,结合模式与阳性对照 Ipatasertib 相似,丹酚酸 A、C 和 H 与 MAPK1 蛋白的第 108 位蛋氨酸形成氢键,结合模式与阳性对照 AZD0364 和 Ulixertinib 相似,提示丹酚酸 A、C 和 H 为潜在的 AKT1 和 MAPK1 抑制剂。在 TCMSP 数据库中丹酚酸 A、C 和 H 的 OB 和 DL 未满足活性化合物筛选标准。同时,通过 SwissADME 对丹酚酸 A、C 和 H 进行药代动力学分析,发现三个化合物胃肠道吸收和类药性普遍偏低,有待进一步的结构优化和改造。

表4 核心靶点蛋白与丹酚酸类活性化合物的分子对接打分

Table 4 The molecular docking score of core target proteins with salvianolic acids

靶点蛋白 Target protein	PDBID	活性化合物 Active compound	GOLD		Vina	SwissADME	
			ChemPLP	Chemscore	结合能 Affinity (kJ/mol)	胃肠道吸收 GI absorption	类药性 DL
AKT1	6HHF	丹酚酸 A Salvianolic acid A	114.34	38.82	-12.8	低 Low	低 Low
		丹酚酸 C Salvianolic acid C	106.7	31.11	-13.2	低 Low	低 Low
		丹酚酸 H Salvianolic acid H	101.04	25.85	-12.1	低 Low	低 Low
		丹酚酸 E Salvianolic acid E	125.26	29.67	-17.9	低 Low	低 Low
		丹酚酸 K Salvianolic acid K	105.19	19.2	-12.7	低 Low	低 Low
		丹酚酸 I Salvianolic acid I	102.95	21.7	-12.5	低 Low	低 Low
		丹酚酸 F Salvianolic acid F	77.77	41.96	-11.8	高 high	低 Low
		丹酚酸 G Salvianolic acid G	76.19	24.92	-11.5	高 high	低 Low
		丹酚酸 L Salvianolic acid L	65.32	4.6	-10.1	低 Low	低 Low
		丹酚酸 B Salvianolic acid B	61.25	8.13	-12.7	低 Low	低 Low
MAPK1	6SLG	丹酚酸 A Salvianolic acid A	82.22	19.75	-11.2	低 Low	低 Low
		丹酚酸 H Salvianolic acid H	89.24	21.7	-12.5	低 Low	低 Low
		丹酚酸 C Salvianolic acid C	80.15	21.71	-10.0	低 Low	低 Low
		丹酚酸 E Salvianolic acid E	89.34	8.06	-15.9	低 Low	低 Low
		丹酚酸 K Salvianolic acid K	77.7	12.95	-9.1	低 Low	低 Low
		丹酚酸 I Salvianolic acid I	74.53	4.46	-10.4	低 Low	低 Low
		丹酚酸 B Salvianolic acid B	71.24	8.39	-11.7	低 Low	低 Low
		丹酚酸 L Salvianolic acid L	68.21	5.26	-8.2	低 Low	低 Low
		丹酚酸 F Salvianolic acid F	66.22	25.88	-9.8	高 high	低 Low
		丹酚酸 G Salvianolic acid G	58.1	25.89	-10.6	高 high	低 Low

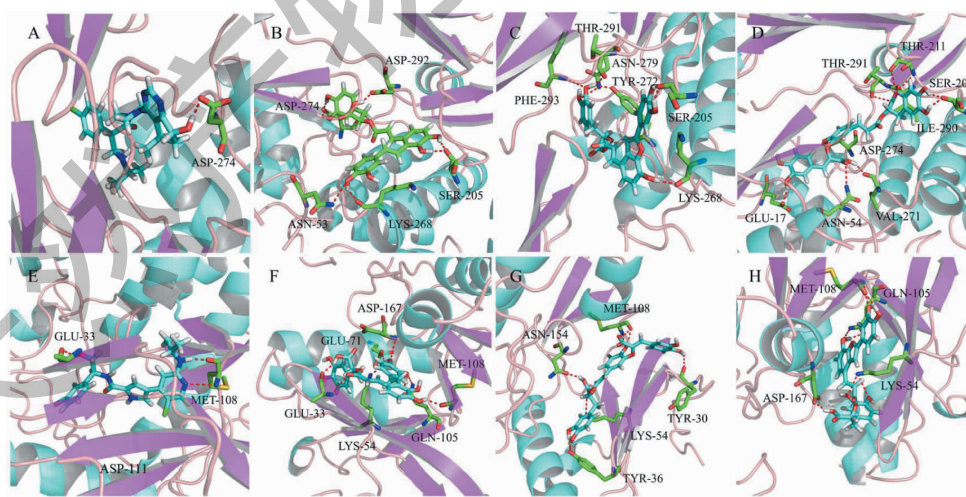


图9 核心蛋白 AKT1 和 MAPK1 与活性化合物分子对接模式图

Fig. 9 Molecular docking patterns diagram of core target proteins AKT1 and MAPK1 with active compounds

注: A~D: 核心蛋白 AKT1 与 ipatasertib、丹酚酸 A、C 和 H 的分子对接模式图; E~H: 核心蛋白 MAPK1 与 ulixertinib、丹酚酸 A、H 和 C 的分子对接模式图。Note: A-D: Molecular docking patterns diagram of core target proteins AKT1 with ipatasertib, salvianolic acid A, salvianolic acid C and salvianolic acid H; E-H: Molecular docking patterns diagram of core target proteins MAPK1 with ulixertinib, salvianolic acid A, salvianolic acid C and salvianolic acid H.

3 讨论与结论

PPI 网络核心蛋白模组和 GO 富集分析显示,自拟的益气滋阴活血方可以通过调节能量代谢、调控活性氧代谢过程和减少炎症因子损伤来发挥治疗 T2DM 的作用。T2DM-益气滋阴活血方的核心靶点 PPI 网络分析、KEGG 富集分析及 GEO 差异基因的通路富集结果显示,益气滋阴活血方主要通过影响 PI3K-Akt 信号通路和 MAPK 信号通路发挥作用,其主要靶点蛋白有 STAT3、AKT1、IL-6 和 MAPK1 等(见图 10)。STAT3 与胰岛 β 细胞的凋亡相关,导致糖异生的通路受阻,影响糖代谢及胰岛素信号通路^[17];AKT 的激活可改善胰岛素抵抗(IR),增强血液内葡萄糖的利用率,最终达到降糖、治疗 T2DM 的目的^[18,19];IL-6 是体内的炎症细胞因子,可以调节

糖原相关酶的活性来促进糖原的分解并减少糖原的合成^[20];p38MAPK 信号通路的过度激活会导致糖尿病心肌损伤和糖尿病肾病等并发症,抑制 p38MAPK 信号通路可缓解糖尿病肾病的肾小球炎症^[21],MAPK1 也在糖尿病性心脏病的发生中发挥作用^[22]。由此可见,靶点蛋白 STAT3、AKT1、IL-6 和 MAPK1 可能在 T2DM 的发生、发展中起到关键作用。目前已有关于 STAT3、AKT1 和 MAPK1 的抑制剂治疗癌症的研究,IL-6 也已被证实可以作为免疫性疾病如类风湿性关节炎的治疗靶点,但暂未见到这几种靶点蛋白抑制剂应用于 T2DM 治疗的报道,因此本研究预测 AKT1、STAT3、IL-6 和 MAPK1 是治疗 T2DM 的潜在靶点。

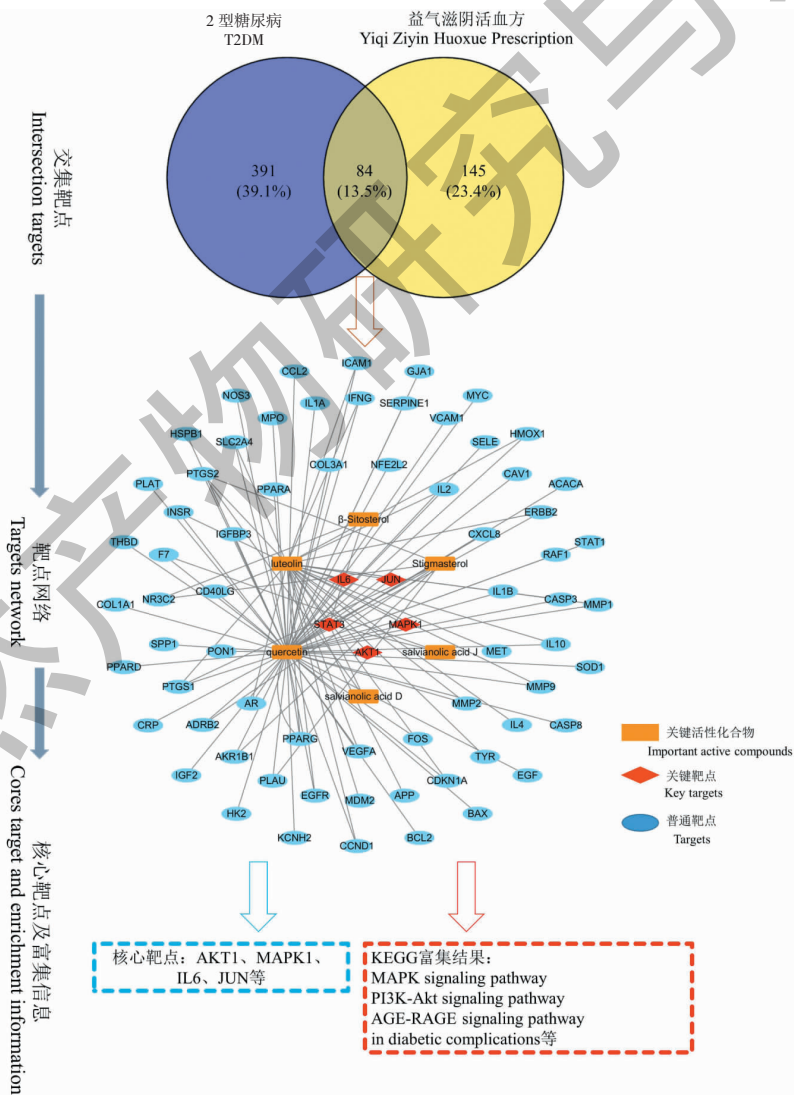


图 10 益气滋阴活血方与 T2DM 交集靶点网络、核心靶点及通路结果注释

Fig. 10 Notes on the intersection target network, core targets and pathways of Yiqi Ziyin Huoxue Prescription and T2DM

分子对接结果显示,活性化合物丹酚酸 D、丹酚酸 J、豆甾醇和 β -谷甾醇可以与 AKT1 和 MAPK1 蛋白的活性口袋稳定结合,说明可能是潜在的 AKT1 和 MAPK1 抑制剂。研究表明,豆甾醇经过修饰后可作为 PTP1B 抑制剂用于糖尿病的治疗; β -谷甾醇可以通过调控 IR 和 GLUT4 胰岛素信号分子来增强糖原合成及糖异生过程并抑制糖原的分解,进而改善 T2DM 大鼠的血糖水平^[23];丹酚酸类化合物能够通过线粒体氧化应激来抑制葡萄糖诱导的 VEGFA 表达,发挥抗炎和抗氧化作用^[24],还可通过调控多种蛋白改善 T2DM 及其并发症,如可调控 Act-A 蛋白的表达,减轻炎症反应、增生反应,减轻肾脏纤维化症状^[25]。本研究中活性化合物-T2DM 交集靶点网络结果显示,起到治疗 T2DM 的关键的活性化合物有槲皮素、木犀草素、山奈酚、刺芒柄花素、豆甾醇和丹参酮 IIA 等。其中槲皮素可减轻高糖环境下活性氧(ROS)对 T2DM 大鼠胰岛 INS-1 细胞的氧化应激损伤^[26];木犀草素能激活 Wnt/ β -catenin 信号通路改善 IR,减轻并恢复 T2DM 造成的 β 胰岛细胞损伤^[27];山奈酚可以通过减少 β 胰岛细胞氧化应激损伤,改善 IR 和调节糖类和脂质代谢紊乱等防治 T2DM^[28];刺芒柄花素能抑制 NF- κ B 信号通路的表达,抑制高糖环境下系膜细胞和促炎因子的过度表达^[29];丹参酮 IIA 可显著降低 T2DM 患者 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子的表达水平,发挥抗炎的作用^[14]。以上结果显示,AKT1 和 MAPK1 的靶向抑制剂豆甾醇、 β -谷甾醇和丹酚酸类化合物可提高抗氧化应激能力、提高胰岛素的敏感性并增强糖异生过程。同时自拟方中的槲皮素、木犀草素、山奈酚、刺芒柄花素和丹参酮 IIA 等也通过协同增效的方式发挥抗炎、改善 IR,起到保护胰岛细胞的作用。

本研究表明丹酚酸 D、丹酚酸 J 与 AKT1、MAPK1 的结合能力较强,且 GEO 组学数据证明 AKT1、MAPK1 所在的 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路在 T2DM 的发生、发展过程中起到重要调控作用,因此推测益气滋阴活血方中丹参来源的丹酚酸 D、丹酚酸 J 在治疗 T2DM 的发生、发展发挥关键作用。丹酚酸 D、丹酚酸 J 为益气滋阴活血方中满足 OB \geq 30%,DL \geq 0.18 的活性化合物,其余丹酚酸类化合物由于 OB 和 DL 值未达标,所以未包含在有效活性化合物内,为了发现更多靶向 AKT1 和 MAPK1 的抑制剂,将丹酚酸类化合物分别与 AKT1、MAPK1 进行分子对接,发现丹酚酸 A、C 和 H 与

AKT1 和 MAPK1 也有较好的结合能力,提示丹酚酸类化合物可能是潜在的 AKT1、MAPK1 的抑制剂,但丹酚酸 A、C 和 H 在 TCMS 数据库中 OB 和 DL 未达到活性化合物筛选标准,在 SwissADME 中胃肠吸收度和类药性较低,未达到成药性要求,后续可对该类化合物进行结构修饰和改造,有望使其成为治疗 T2DM 的有效化合物。

综上所述,本研究得出了自拟益气滋阴活血方治疗 T2DM 的潜在用药靶点(AKT1 和 MAPK1)、主要活性成分(丹酚酸 J、丹酚酸 D、豆甾醇和 β -谷甾醇)及潜在的天然产物(丹酚酸 A、C 和 H),阐释了黄芪、山药、丹参和生地黄的组成的益气滋阴活血方通过靶向 PI3K-Akt 信号通路和 MAPK 信号通路等通路发挥治疗作用,为进一步的实验研究和 T2DM 临床治疗提供思路和参考依据,为以 AKT1 和 MAPK1 为靶点的抑制剂开发提供骨架化合物,为进一步阐明益气滋阴活血方用于 T2DM 的特色中医治疗提供理论基础,也为益气滋阴活血方的现代化应用和天然产物的开发提供新方向。但是本文只是初步分析了益气滋阴活血方的化学成分及其治疗 T2DM 的分子机制,后续我们将基于本文提供的线索设计体内或体外实验验证其治疗 T2DM 的药效作用和分子机制,进一步对方药进行开发。

参考文献

- 1 Xu JL, Zhou KJ, Zhou W, et al. Investigation and analysis of several issues based on guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes in China(2017) [J]. Milit Med J South Chin(华南国防医学杂志), 2019, 33: 834-837.
- 2 Jang JJ. Current status of diabetes diagnosis and treatment [J]. China Transport Med J(中国交通医学杂志), 2003 (3): 235-236.
- 3 Liu J, Jin LY, Wang YF, et al. Reappraisal of anti-diabetic drugs[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2011, 20: 2090-2094.
- 4 Yin DH, Liang XC, Piao YL, et al. Analysis of Chinese medicine syndrome pattern in patients with type 2 diabetes mellitus and its relationship with diabetic chronic complications [J]. Chin J Integer Tradit West Med(中国中西医结合杂志), 2009, 29: 506-510.
- 5 Chen C. To explore the core Chinese medicine herbs for treating type 2 diabetes based on complex network through analyzing of the network structure and the rules of medication [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学), 2018.

- 6 Bai M, Liu BS, Peng MF, et al. Mechanisms and medication rules of type 2 diabetes mellitus based on data mining and network pharmacology[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学), 2019, 25(9):182-188.
- 7 Zhang YQ, Li S. Progress in network pharmacology for modern research of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2015, 29: 883-892.
- 8 Shi LE, Nie KZ, Zhang WJ, et al. Study on the mechanism of *Salvia miltiorrhiza* in treating type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43:444-451.
- 9 Wei Y. Study of efficacy of *Astragalus* polysaccharides on insulin resistance in obesity model Rats[J]. Henan Tradit Chin Med(河南中医), 2021, 41:562-565.
- 10 Zou TJ, Peng T. Research progress in the treatment of diabetes with single active ingredient of traditional Chinese medicine [J]. J Hubei Minzu Univ Med(湖北民族大学学报(医学版)), 2021, 38:85-87.
- 11 Gao ZH, Li RF, Lv HZ, et al. Effects of *Dioscorea opposita* polysaccharide on renal function and aldose reductase pathway in mice with diabetic nephropathy[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2019, 42:643-646.
- 12 Yang WB, Hang FX, Liu ZM, et al. Puerarin improves the glucose uptake and insulin resistance of 3T3-L1 adipocytes [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2019, 21:603-609.
- 13 Navarro-gonzalez JF, Mora-fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19:433-442.
- 14 Zhu JH, Jiang F, Wu JB. The influence of tanshinone II A on inflammatory reaction in patients with type 2 diabetes mellitus complicated with atherosclerosis[J]. Pract Clin J Integer Tradit Chin West Med(实用中西医结合临床), 2020, 20(12):4-7.
- 15 Chen JP, Zhang KX, Liu Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of *Rehmannia glutinosa*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52: 1772-1784.
- 16 Wang P. The modern pharmacological research and clinical should be raw Radix Rehmanniae[J]. Chin Med Mod Distance Edu China(中国中医药现代远程教育), 2008(8): 986.
- 17 Zhao MT. Effects and mechanisms study of STAT3 dictating B cell apoptosis by modulating PTEN on hyperglycemia[D]. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), 2019.
- 18 Wang S, Jin L, Hai CX, et al Research progress of PI3K/Akt signaling pathway in insulin resistance[J]. J Toxicol(毒理学杂志), 2015, 29:313-316.
- 19 Zhang LJ, Lin Han-hua, Wang Hong-wei, et al. Interleukin-6, obesity and type 2 diabetes mellitus[J]. J Clin Pediat(临床儿科杂志), 2005, 23:332-334.
- 20 Singh DK, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire[J]. Nat Rev Endocrinol, 2011, 7(3):176-184.
- 21 Huang YR, Wang YG, Sun W, et al. Effects and mechanisms of multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* improving glomerular inflammatory injury by regulating p38MAPK signaling activation in diabetic nephropathy rats[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39:4102-4109.
- 22 Li F, Zeng O, Luo J, et al. Effects of hydrogen sulfide on myocardial fibrosis and MAPK1/3 and MMP-8 expression in diabetic rats[J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2015, 35:549-552.
- 23 Ponnulakshmi R, Shyamaladevi B, Vijayalakshmi P, et al. In silico and *in vivo* analysis to identify the antidiabetic activity of beta sitosterol in adipose tissue of high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic experimental rats[J]. Toxicol Mech Method, 2018, 29(4):1-45.
- 24 Qian S, Huo D, Wang S, et al. Inhibition of glucose-induced vascular endothelial growth factor expression by *Salvia miltiorrhiza* hydrophilic extract in human microvascular endothelial cells: evidence for mitochondrial oxidative stress [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137:985-991.
- 25 Wang L, Wu QF. Effects of Danshen polyphenolic acid on expression of activin A of kidney tube interstitial in type 2 diabetic nephropathy rats[J]. Global Tradit Chin Med(环球中医药), 2017, 10:1312-1317.
- 26 Li WW, Zhong DP, Zhang W, et al. The protective role of quercetin on islet in diabetic rats and related mechanism [J]. J Guangxi Med Univ(广西医科大学学报), 2021, 38: 298-303.
- 27 Yuan Y, Hu YM, Cheng SY, et al. Luteolin relieves pancreatic injury in diabetic rats via regulating the Wnt/Beta-catenin signaling pathway[J]. Med J Wuhan Univ(武汉大学学报:医学版), 2018, 39:760-764.
- 28 Zhang Z, Sun W, Liu TH, et al. Effects of kaempferol on the skeletal muscle of KKAY mice via PI3K-AKT-GLUT4 signaling[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2016, 18:1139-1143.
- 29 Wei QF, Wang HX. Research progress in *Astragalus* total flavone multi-target regulation for diabetes mellitus and its complications[J]. Cent South Pharm(中南药学), 2020, 18: 1348-1356.