

增液汤治疗 2 型糖尿病的“入血成分-靶点-效应”复杂网络研究

张倩茹^{1,2}, 常山泉¹, 戚进^{1*}, 胡元佳^{3*}

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038; 2. 遵义医科大学药学院, 基础药理教育部重点实验室, 贵州 遵义 563000; 3. 澳门大学中华医药研究院, 澳门 氹仔 20008)

摘要: **目的** 结合网络药理学方法探讨增液汤入血成分对 2 型糖尿病的潜在作用效应。**方法** 根据配体的化学结构相似性预测增液汤入血成分作用靶点, 并通过靶点与糖尿病治疗效应的关联性, 构建并分析“入血成分-靶点-效应”网络 (ITEN), 从而筛选出重要的潜在活性成分。对增液汤治疗 2 型糖尿病的潜在活性成分和作用效应进行体外实验验证。**结果** 哈帕昔、哈帕酯昔、阿魏酸、梓醇、毛蕊花糖苷等 6 个人血成分可能是增液汤的主要活性物质, 葡萄糖摄取、胰岛素分泌、糖原合成可能是增液汤治疗 2 型糖尿病的主要作用效应。**结论** 通过计算模拟和实验验证发现了增液汤入血成分的降糖活性效应, 为揭示增液汤治疗 2 型糖尿病的物质基础提供了理论依据。

关键词: 增液汤; 入血成分; 2 型糖尿病; 治疗效应

中图分类号: R966; R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)05-1698-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.05.056

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 又称非胰岛素依赖型糖尿病, 主要表现为胰岛素分泌相对不足或者机体对胰岛素的敏感性降低, 导致血糖水平异常升高, 从而对细胞、器官造成不可逆损伤。2019 年 IDF 全球糖尿病患者地图 (第 9 版) 显示, 我国糖尿病成年患者人数为 1.2 亿, 有 90%~95% 的患者属于 T2DM。预计到 2030 年, 糖尿病将成为全球范围内全因死亡率最高的疾病^[1]。基于传统药物特别是中药及复方, 筛选高效、低毒的活性成分是糖尿病药物研发的热点之一^[2]。

增液汤始载于清代吴鞠通所著《温病条辨》, 由玄参、生地和麦冬这 3 种常用滋阴药材组成, 具养阴增液润肠之功效, 主治阳明津液灼伤, 肠燥便秘之邪少虚多证, 常被作为治疗“阴虚热盛型”糖尿病 (早期 2 型糖尿病) 的基本方剂, 在临床上取得显著疗效^[3-4]。但是, 增液汤化学成分组成的多样性以及含量的微量化, 增加了物质基础研究难度, 对增液汤的深入研究和临床应用造成阻碍。基于方剂入血成分发现潜在活性物质, 是中药药效物质基础研究的重要思路之一^[5]。依据中药显效理论, “多成分、多靶点、效应叠加”是中药发挥生物活性的作用特点^[6]。增液汤治疗 T2DM 的机制可能是多种入血成分协同作用于多个靶点, 进而发挥与糖尿病治疗药物类似的效应。

基于前期工作, 本研究采用化合物结构相似性的对接模拟技术以及网络分析方法, 构建增液汤的“入血成分-靶点-效应”网络, 对增液汤潜在活性成分、相关机制、主要治疗效应进行预测, 为揭示增液汤的药效物质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 HepG2 细胞株购自中国科学院上海细胞库。胎牛血清 (FBS)、Fat-free 牛血清白蛋白, 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; DMEM 高糖培养基、RPMI-1640 培养基, 购自美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶, 购自合肥白鲨生物科技有限公司; 格列本脲, 购自美国 APEX BIO 公司; 胰岛素试剂盒, 购自上海科鉴生物科技有限公司; 糖原含量测定试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所; RIPA 细胞裂解液、青霉素链霉素溶液、PMSF 蛋白酶抑制剂、马血清, 购自上海碧云天生物技术有限公司; 盐酸二甲双胍, 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 仪器 酶标仪 (美国 BioTek 公司); 低温离心机、细胞培养箱、超低温冰箱 (美国 Thermo 公司); 生物安全柜 (苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 高压蒸汽灭菌锅 (上海博迅实业有限公司); 数显恒温水浴锅 (金坛市金城国胜实验仪器厂); 恒温孵育箱 (德国 Miltenyi Biotec 公司)。

收稿日期: 2021-10-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673555); 遵义医科大学 2017 年度学术新苗培养及探索专项 (黔科合平台人才 [2017] 5733-062)

作者简介: 张倩茹 (1982—), 女, 博士, 副教授, 从事中药活性标志物筛选研究。Tel: (0851) 28642340, E-mail: zhangqianru@zmc.edu.cn

*** 通信作者:** 胡元佳 (1980—), 男, 博士, 副教授, 从事药学信息研究。E-mail: yuanjiah@um.edu.mo

戚进 (1979—), 男, 博士, 教授, 从事中药及复方药效物质基础及作用机理研究。E-mail: qijin-cpu@cpu.edu.cn

1.3 数据收集

1.3.1 蛋白信息收集 以“diabetes mellitus, type 2” “stable diabetes mellitus” “diabetes mellitus” “non insulin dependent” “ketosis resistant diabetes” “type 2 diabetes mellitus” “adult-onset diabetes mellitus” “mason-type diabetes” “maturity onset diabetes” “type 2 diabetes” “noninsulin dependent diabetes mellitus” “type 2 diabetes mellitus” “non-insulin dependent diabetes mellitus” “diabetes mellitus type 2” 为检索词，在生物数据库 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://omim.org/>)、DisgeNet (<http://www.disgenet.org>) 中检索 T2DM 的疾病基因 (人源)。

以 T2DM 的 4 种治疗效应 “Glucose uptake” “insulin secretion” “insulin sensitivity” “Glycogen synthesis” 为检索词，从 OMIM、GeneCards、Polysearch2 数据库中获得与糖尿病治疗效应有关的蛋白编码基因。合并数据，在生物信息数据库 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)、HGNC (<https://www.genenames.org/>) 检索蛋白信息，建立 T2DM 疾病与治疗效应的蛋白数据库。

1.3.2 增液汤入血成分信息收集 前期研究表明，增液汤口服给药后有 36 个成分被吸收入血^[7-9]。从化学数据库 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、SciFinder (<https://scifinder.cas.org>) 获得入血成分的分子式、分子量、结构式等化学信息，通过文献确定植物来源。

1.3.3 化合物-靶点关系预测 基于配体特征的化学结构相似性方法 (similarity ensemble approach, SEA)，对入血成分-靶点的相互作用关系进行预测。用化学软件 DS Client ver 4.5 绘制化合物三维结构，并计算 SMILES 分子描述符。凭借在线工具 SEA (<http://sea.bkslab.org/>) 预测入血成分的潜在作用靶点 ($P<0.05$)^[10]，在构建的蛋白数据库中筛选与 T2DM 有关的潜在靶蛋白。

1.4 “入血成分-靶点-效应”网络的构建与分析

1.4.1 网络构建 基于“入血成分-靶点”“靶点-效应”的复杂关联，构建增液汤的“入血成分-靶点-效应”网络 (ingredient-target-effect network, ITEN)。入血成分、靶点、治疗效应在 ITEN 中分别用不同性状、不同颜色的网络节点表示；“入血成分-靶点”“靶点-效应”的两类不同复杂关系则分别用不同颜色的有向边表示。

1.4.2 网络分析 采用入度节点度 (indegree, D_{in})、出度节点度 (outdegree, D_{out}) 对 ITEN 网络节点的中心性进行评价。在 ITEN 网络中化合物节点的 D_{in} 均为 0, D_{out} 表示相连的靶点数；靶点节点的 D_{in} 表示相关的化合物数量, D_{out} 表示相关的效应数；效应节点的 D_{in} 为相连的靶点数量, D_{out} 均为 0。采用 Cytoscape v3.7.2 对 ITEN 进行可视化呈现与分析。

1.5 增液汤入血成分的体外活性验证

1.5.1 分组及给药 基于前期研究，以 100 $\mu\text{g/mL}$ 增液汤为标准确定化合物给药剂量。设置实验分组为空白组，模

型组、化合物给药组、增液汤组 (100 $\mu\text{g/mL}$)、阳性药组。

1.5.2 胰岛素分泌活性实验 取对数生长期的 MIN6 胰岛细胞，以每孔 1.0×10^5 个的密度接种于 24 孔板中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，按“1.5.1”项下分组给药，阳性药为格列苯脲 (Gli, 10 $\mu\text{mol/L}$)，继续培养 24 h，弃去上清液，PBS 洗涤，加 KRB 溶液 (0.2% BSA、2.8 mmol/L 葡萄糖) 300 μL 作用 1 h，再分别换成含 2.8、16.8 mmol/L 葡萄糖的 KRB 溶液，作用 1 h 后终止反应，2 500 r/min 离心 10 min，收集上清液，按试剂盒说明书测定胰岛素浓度。

1.5.3 肝糖原合成活性实验 取对数生长期 HepG2 细胞，以每孔 1.0×10^4 个的密度接种于 96 孔板中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，按“1.5.1”项下分组给药，阳性药为二甲双胍 (Met, 10 $\mu\text{mol/L}$)，继续培养 24 h，加含 100 nmol/L 胰岛素的无血清 DMEM 培养基刺激 4 h，弃上清，以预冷 PBS 洗涤 2 次，收集细胞，加入含 PMSF 的细胞裂解液 80 μL ，4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 30 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min，取上清，按试剂盒说明书测定糖原浓度。

1.5.4 葡萄糖摄取活性实验 取对数生长期 HepG2 细胞，以每孔 1.0×10^4 个的密度接种于 96 孔板中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，按“1.5.1”项下分组给药，阳性药为罗格列酮 (Ros, 10 $\mu\text{mol/L}$)，继续培养 24 h，弃上清，PBS 洗涤 2 次，加无酚红无糖培养基 (含 100 nmol/L 胰岛素) 100 μL 诱导 20 min，弃上清，加 2-NBDG (200 $\mu\text{mol/L}$) -PBS 溶液避光孵育 20 min，弃上清，清洗 2 次，于 540 nm 波长处检测吸光度，计算葡萄糖摄取活性。

1.5.5 统计学分析 通过 R 软件进行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间比较采用方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 T2DM 相关的疾病及效应蛋白 从数据库中获得 T2DM 相关蛋白编码基因共 2 202 个，与“insulin secretion”相关的有 1 428 个，“insulin sensitivity”1 328 个，“glucose uptake”796 个，“glycogen synthesis”255 个。

2.2 入血成分的潜在靶点 增液汤 36 个入血成分的化学信息及植物来源 (玄参^[11]、生地黄^[12]、麦冬^[13]) 如表 1 所示。依据 SEA 模拟结果，31 个入血成分共作用于 205 个靶点，其中的 109 个具有 T2DM 治疗效应，“insulin secretion”有关的有 82 个，“insulin sensitivity”72 个，“glucose uptake”57 个，“glycogen synthesis”16 个，表明增液汤可通过作用于相关靶点发挥降糖作用，见图 1。

2.3 “入血成分-靶点-效应”网络可视化分析 依据“化合物-靶点”“靶点-效应”绘制增液汤治疗 T2DM 的 ITEN。该网络共由 144 个节点、598 条连线构成，3 种不同类型的节点分别代表 31 个入血成分、109 个靶点、4 种效应；369 条连线表示“化合物-靶点”关系；229 条边代表“靶点-效应”关系，见图 2。

表 1 增液汤入血成分

编号	成分	CAS 号	分子式	相对分子量	来源
ZYT001 *	acteoside	61276-17-3	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624. 59	玄参、生地黄
ZYT002 *	angoroside C	115909-22-3	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉	784. 76	玄参、生地黄
ZYT004 *	cistanoside F	97411-47-7	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	488. 44	玄参、生地黄
ZYT005 *	darendoside B	94410-28-3	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₂	476. 48	玄参、生地黄
ZYT006 *	decaffeoylacteoside	61548-34-3	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	462. 45	玄参、生地黄
ZYT007 *	ferulic acid	1135-24-6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194. 19	玄参、生地黄
ZYT019 *	8- <i>O</i> -caffeoyl harpagide	1316091-64-1	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	526. 49	玄参
ZYT021 *	aucubin	479-98-1	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	346. 33	玄参
ZYT022 *	cinnamic acid	140-10-3	C ₉ H ₈ O ₂	148. 16	玄参
ZYT023 *	cistanoside D	94492-21-4	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	652. 65	玄参
ZYT024 *	harpagide	6926/8/5	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀	364. 35	玄参
ZYT025 *	harpagoside	19210-12-9	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	494. 49	玄参
ZYT028 *	p-coumaric acid	4501-31-9	C ₉ H ₈ O ₃	164. 16	玄参
ZYT029 *	scrophuloside B ₁	240820-55-7	C ₃₅ H ₄₆ O ₉	770. 73	玄参
ZYT031 *	β-(3-hydroxy-4-methoxyhenyl) ethyl- <i>O</i> -α- <i>L</i> -arabinopyranosyl-(1→6)- <i>O</i> -[6-α- <i>L</i> -rhamnpy-ranosyl-(1→3)]-β- <i>D</i> -glucopyranoside	115873-00-2	C ₂₆ H ₄₀ O ₁₆	608. 59	玄参
ZYT032 *	5,7,2',4'-tetradihydroxy-8-methoyl-6-methyl-homoisoflavanone	1243677-84-0	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	346. 33	麦冬
ZYT035 *	5-7-4'-trihydroxy-5'-methoxy-6,8-dimethyl hamoisoflavanone	1791424-44-6	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	344. 36	麦冬
ZYT036 *	methylophiopogonanone A	74805-92-8	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	342. 35	麦冬
ZYT037 *	methylophiopogonanone B	74805-91-7	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	328. 36	麦冬
ZYT038 *	methylophiopogone A	74805-90-6	C ₁₉ H ₁₆ O ₆	340. 33	麦冬
ZYT040 *	ophiopogonanone A	75239-63-3	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	328. 32	麦冬
ZYT041 *	ophiopogonanone E	588706-66-5	C ₁₉ H ₂₀ O ₇	360. 36	麦冬
ZYT050 *	8-epiloganic acid	82509-41-9	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	376. 36	生地黄
ZYT051 *	catalpol	2415-24-9	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	362. 33	生地黄
ZYT053 *	geniposidic acid	27741-01-1	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	374. 34	生地黄
ZYT054 *	jionoside A ₁	120444-60-2	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	800. 75	生地黄
ZYT056 *	leonuride	50906-66-6	C ₁₅ H ₂₄ O ₉	348. 35	生地黄
ZYT058 *	rehmaionoside A	104112-06-3	C ₁₉ H ₃₄ O ₈	390. 47	生地黄
ZYT059 *	rehmannioside D	81720-08-3	C ₂₇ H ₄₂ O ₂₀	686. 61	生地黄
ZYT060 *	rehmapicrogenin	135447-39-1	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	184. 24	生地黄
ZYT061 *	6- <i>O</i> -methylcatalpol	1617-84-1	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	376. 36	生地黄
ZYT062 *	jiocarotenoside A ₁ /A ₂	138195-44-5	C ₂₁ H ₃₄ O ₉	430. 49	玄参
ZYT063 *	leucosceptoside A	83529-62-8	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	638. 62	生地黄
ZYT064	isoacteoside	61303-13-7	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624. 60	玄参
ZYT065	isoangoroside C	290809-86-8	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉	783. 27	玄参
ZYT066	rhamnopyranosyl vanilloyl	—	C ₁₄ H ₁₈ O ₈	313. 09	玄参

注：“*”表示入血成分有潜在作用靶点。

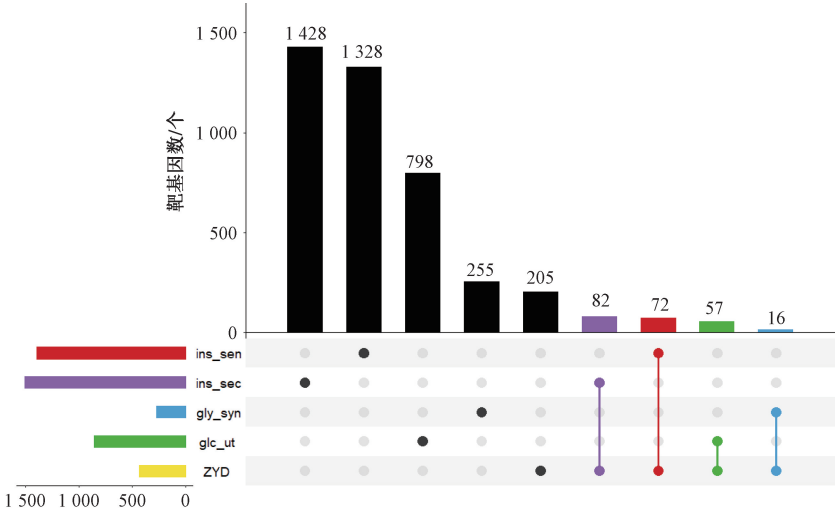
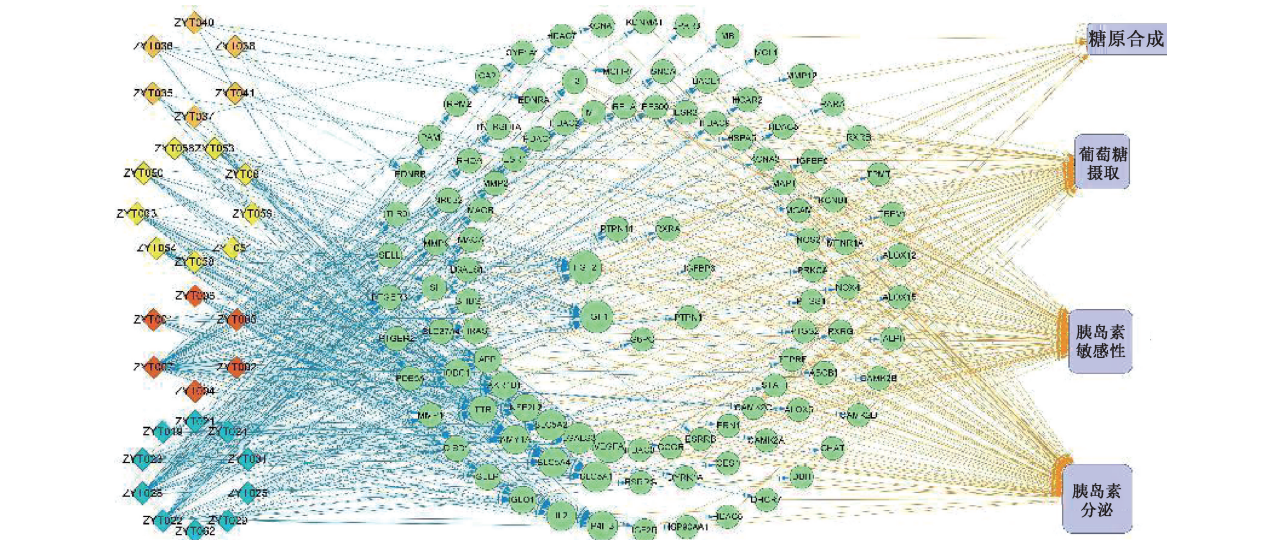


图 1 T2DM 相关基因与增液汤作用靶点交集



注：方形、圆形、菱形的节点分别对应效应、靶点、入血成分；黄色表示玄参，橙色表示麦冬，蓝色表示生地，红色表示玄参和生地的共有成分；节点大小代表 D_{in} ；橙色有向边表示靶点与效应的关系，蓝色有向边表示化合物对靶点的潜在作用。

图 2 增液汤入血成分“入血成分-靶点-效应”网络

2.4 节点中心性分析 ITEN 节点的中心性分析有助于发现增液汤的重要活性成分、主要靶点以及关键效应。高中心性节点可能在增液汤治疗 T2DM 中发挥重要作用，入血成分的 D_{in} 越高，表明该成分作用的潜在靶点越多。ITEN 的重要节点如表 2 所示，节点中心性前十位的入血成分有阿魏酸 (ferulic acid, ZYT007)、肉桂酸 (cinnamic acid, ZYT022)、对香豆酸 (*p*-coumaric acid, ZYT028)、毛蕊花糖苷 (acteoside, ZYT001)、表番木鳖酸 (8-epiloganic acid, ZYT050) 等。

D_{in} 最高的前十位靶点有成纤维细胞生长因子 1 (fibroblast growth factor 1, FGF1)、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)、血管内皮细胞生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、半乳糖凝集素 3 (galectin-3, LGALS3)、钠/葡萄糖转运蛋白 1 (sodium/glucose cotransporter 1, SLC5A1)、钠/葡萄糖转运蛋白 2 (sodium/glucose cotransporter 2, SLC5A4)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL2)、α-淀粉酶 1 (alpha-amylase 1, AMY1A)。靶点的 D_{in} 越大，表明可作用于该蛋白的入血成分越多； D_{out} 越大，则代表靶点参与越多的治疗效应。

根据效应节点的 D_{in} 可发现增液汤治疗 T2DM 的重要效应，其中胰岛素分泌相关的靶点有 82 个，可能是增液汤治疗 2 型糖尿病的关键效应。

ferulic acid、cinnamic acid、哈帕苷 (harpagide, ZYT024)、哈帕酯苷 (harpagoside, ZYT025)、*p*-coumaric acid、acteoside 共 6 个入血成分在药材中的含量较高 (另文发表)，可潜在作用于 FGF1、FGF2、VEGFA、LGALS3、SLC5A1 等 86 个靶点，见表 3。

2.5 验证实验 6 个入血成分的给药浓度以增液汤 (100 μg/mL) 为准进行确定，分别为 harpagoside (52 nmol/L)、ferulic acid (7.7 nmol/L)、*p*-coumaric acid (7.7 nmol/L)、

harpagide (243 nmol/L)、acteoside (28 nmol/L)、cinnamic acid (98 nmol/L)。

表 2 ITEN 的重要节点

化合物	D_{out}	靶点	D_{in}	D_{out}	效应	D_{in}
ZYT007	61	FGF1	18	4	胰岛素分泌	82
ZYT022	38	FGF2	18	4	胰岛素敏感性	72
ZYT028	38	VEGFA	17	3	葡萄糖摄取	57
ZYT023	19	LGALS3	15	3	糖原合成	16
ZYT054	19	SLC5A1	14	3	—	—
ZYT063	19	SLC5A2	14	2	—	—
ZYT001	15	P4HB	13	2	—	—
ZYT050	12	SLC5A4	13	1	—	—
ZYT006	12	IL2	12	1	—	—
ZYT056	11	AMY1A	11	2	—	—

2.5.1 胰岛素分泌活性验证 如图 3A 所示，与空白组比较，在低糖 (2.8 mmol/L) 刺激下，仅 *p*-coumaric acid 对胰岛素分泌有一定促进作用 ($P<0.05$)。如图 3B 所示，与空白组比较，在高糖 (16.8 mmol/L) 刺激下，harpagoside、ferulic acid、*p*-coumaric acid、harpagide、增液汤、格列苯脲可促进 MIN6 细胞的胰岛素分泌 ($P<0.05$, $P<0.01$)，而 acteoside 和 cinnamic acid 无明显促进作用 ($P>0.05$)。结果表明增液汤的降糖作用可能与 harpagide、harpagoside、ferulic acid、*p*-coumaric acid 的促胰岛素分泌活性有关。

2.5.2 肝糖原合成活性验证 如图 3C 所示，模型组糖原水平较空白组降低 ($P<0.01$)；harpagoside、ferulic acid、*p*-coumaric acid、harpagide、增液汤、二甲双胍可促进糖原合成 ($P<0.05$, $P<0.01$)，而 acteoside 和 cinnamic acid 则无明显促进作用 ($P>0.05$)。结果表明，harpagide、harpagoside、ferulic acid、*p*-coumaric acid 可能是增液汤促进肝糖原合成的活性成分。

表 3 增液汤 6 个入血成分的相关靶点

入血成分	潜在靶点数/个	潜在作用靶点
ferulic acid	61	ABCB1、ALOX12、ALOX15、ALPI、BACE1、CA2、CAMK2A、CAMK2B、CAMK2D、CAMK2G、CYP1A1、DHCR7、DYRK1A、EP300、ERN1、ESR1、ESR2、F3、GCGR、HDAC1、HDAC2、IGFBP3、IGFBP5、KCNA3、KCNMA1、MAOA、MAOB、MAPT、MCL1、MIF、MMP1、MMP2、MMP9、NR0B2、PTGER2、PTGER3、PTGS1、PTGS2、PTPN1、PTPN11、RARA、RELA、RHOA、SLC37A4、SNCA、TLR9、TNFRSF1A、TRPV1、AKR1B1、ALOX5、APP、CISD1、GLO1、IGF2R、NFE2L2、NOX4、ODC1、RXRA、SHBG、TPMT、TTR
cinnamic acid	38	CES1、CHAT、CYP1A1、DBH、ESR1、F3、HCAR2、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9、HSP90AA1、LPAR3、MAOA、MAOB、MMP1、MMP2、MMP9、NR0B2、PAM、PTGER2、PTGER3、PTPN11、PTPRF、RELA、RHOA、SNCA、STAT1、TLR9、TNFRSF1A、TRPM2、AKR1B1、GLO1、NFE2L2、TTR
<i>p</i> -coumaric acid	38	BACE1、CA2、EP300、ESR1、ESR2、ESRRG、F3、G6PC、HCAR2、HDAC1、HDAC2、HDAC5、HDAC7、HDAC9、MAOA、MAOB、MB、MIF、MMP1、MMP2、MMP9、NR0B2、PAM、PTGER2、PTGER3、PTPN11、RHOA、SLC37A4、TLR9、TNFRSF1A、TRPM2、AKR1B1、APP、CISD1、GLO1、NFE2L2、ODC1、TTR
acteoside	15	AMY1A、AKR1B1、FGF1、FGF2、HRAS、IL2、LGALS3、P4HB、SLC5A1、SLC5A2、SLC5A4、TTR、VEGFA、PRKCA、SLC37A4
harpagide	9	FGF1、FGF2、IL2、LGALS3、SI、SLC5A1、SLC5A2、SLC5A4、VEGFA
harpagoside	9	FGF1、FGF2、LGALS1、LGALS3、SLC5A1、SLC5A2、SLC5A4、VEGFA

2.5.3 葡萄糖摄取活性验证 如图 3D 所示，与空白组比较，模型组对 2-NBDG 的摄取降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，acteoside、harpagide、cinnamic acid、增液汤、罗格列酮可促进 HepG2 细胞对 2-NBDG 的摄取 ($P<0.05$ ，

$P<0.01$)，而 ferulic acid、*p*-coumaric acid 对 2-NBDG 的摄取有促进趋势，但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果表明，harpagoside、ferulic acid、*p*-coumaric acid、harpagide 可能具有促进糖摄取效应的生物活性。

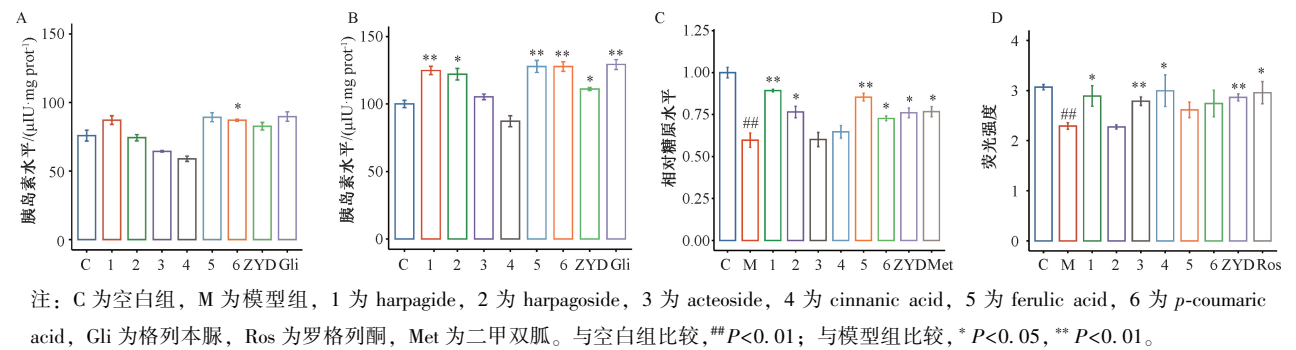


图 3 增液汤化合物体外活性实验

3 讨论

能否被吸收入血是中药成分发挥生物活性的前提，入血成分的分析与鉴定为探索增液汤治疗 T2DM 的物质基础提供重要线索。ITEN 网络分析显示，harpagide、harpagoside、acteoside、cinnamic acid、ferulic acid、*p*-coumaric acid 这 6 个入血成分潜在作用的高中心性靶点中，FGF1 和 FGF2 属于成纤维细胞生长因子家族，可增加 β 细胞分化与增殖，参与胰岛素的代谢过程并促进胰岛素分泌^[14]，能持续而平稳地降低 T2DM 动物模型过高的血糖水平，是糖尿病治疗的潜在作用靶点^[15]。半乳糖凝集素 3 能抑制自身免疫以及获得性免疫识别过剩营养成分，造成血糖水平失衡进而诱发糖尿病^[16]。PTPN1、PTPN11 作为蛋白酪氨酸磷酸酶家族的非受体蛋白，与癌症、代谢紊乱、心血管疾病、免疫疾病等发生发展密切相关。PTPN1 是胰岛素通路的负调控因子，能潜在调节葡萄糖合成过程^[17]。SLC5A1、SLC5A2 属于钠/葡萄糖协同转运蛋白家族，是葡萄糖在上皮细胞转运的重要媒介。SLC5A1 实现葡萄糖在肠道的转运与重摄取，SLC5A2 与葡萄糖在肾小管的重吸收有关^[18]。SGLT2 (SLC5A2) 抑制剂可增强葡萄糖排泄，快速降低血

糖水平，同时增加胰岛素分泌、提高细胞对胰岛素的敏感性^[19]。

另外，增液汤对 T2DM 的治疗可能涉及糖摄取、葡萄糖合成、胰岛素分泌等效应。为验证预测结果，本研究采用细胞实验对 6 个高含量入血成分的治疗效应进行考察。葡萄糖摄取活性的体外实验发现，除 harpagoside 外，另外 5 个成分均能促进 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取。PI3K/Akt 通路是胰岛素抵抗及 T2DM 发生的基本机制之一，而 cinnamic acid、*p*-coumaric acid、ferulic acid、harpagide、acteoside 等增加糖摄取的作用机制均与上调 PI3K 表达进而激活下游信号转导有关^[20-24]。基于对接模拟结果，ferulic acid 可作用于维 A 酸受体 (retinoic acid receptor RXR-alpha, RXRA)，RXRA 能调控 Akt 表达，对 PI3K/Akt 通路的信号传递起到重要影响^[25]。同时，cinnamic acid 可潜在作用于磷脂酰肌醇-4, 5-双磷酸 3-激酶 (transcription factor p65, RELA)，RELA 参与 Akt 的磷酸化，通过调控胰岛素敏感性起到调节血糖作用^[26]。acteoside、harpagide 可作用于 VEGFA，VEGFA 能促进 PI3K 的生物合成过程进而激活 PI3K/Akt 信号通路，增强细胞膜糖转运蛋白的转运能力^[27]。

ferulic acid 可能通过增加细胞内钙离子内流而发挥促进胰岛素分泌的作用^[28]。FGF1、FGF2 可增加 β 细胞分化与增殖, LGALS3 对免疫介导的 β 细胞损伤起到修复作用, SLC5A2 受到抑制时可保护胰腺 β -细胞免受葡萄糖毒性并保持胰岛素分泌能力^[29-32]。ferulic acid 可以升高 C57BL/6N 和 C57BL/KsJ-db/db 高血脂小鼠的肝糖原累积, 并增加葡萄糖激酶活性^[28,33]。*p*-coumaric acid 能增加糖尿病大鼠的肝糖原含量, 有助于减少肝糖输出、维持血糖稳态^[20]。本研究显示, 增液汤的 harpagide、harpagoside、ferulic acid 和 *p*-coumaric acid 均能促进 MIN6 细胞在高糖刺激下的胰岛素分泌, 且具有促进肝糖原合成的活性。ITEN 网络分析结果表明, *p*-coumaric acid、harpagide、harpagoside 可共同作用于 FGF1、FGF2、LGALS3、SLC5A2 等靶点。

综上所述, 增液汤的 6 个人血成分被证明可能通过作用于多个靶点, 共同发挥多种治疗效应。本研究为进一步探讨增液汤治疗 T2DM 的物质基础及作用机制提供理论依据, 也为中药药效物质基础研究新方法的建立提供重要借鉴。

参考文献:

[1] Kerru N, Singh-Pillay A, Awolade P, *et al.* Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 152: 436-488.

[2] Alam F, Islam M A, Kamal M A, *et al.* Updates on Managing type 2 diabetes mellitus with natural products: Towards antidiabetic drug development[J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25 (39): 5395-5431.

[3] 刘鸣昊, 段卫娜, 张振凌. 增液汤临床研究进展[J]. *中医学报*, 2016. 31(10): 1525-1528.

[4] 庄智荣. 增液汤现代临床应用的文献研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.

[5] 朱春胜. 中药血清谱效学研究现状概述[J]. *中草药*, 2020, 51(13): 3569-3574.

[6] 蔡少青, 王璇, 尚明英, 等. 中药“显效理论”或有助于阐释并弘扬中药特色优势[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (17): 3435-3443.

[7] Chang S Q, Wang M, Tian Y S, *et al.* Systematic analysis and identification of the absorption and metabolic components of Zengye decoction in type 2 diabetic rats by HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS[J]. *Chin Med*, 2020, 15: 50.

[8] Tian Y S, Du Z Y, Xiao Y, *et al.* Screening and identification of potential hypoglycemic components in Zeng Ye Tang by high-performance liquid chromatography coupled with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Separat Sci*, 2017, 40(24): 4709-4717.

[9] 田雨闪, 杜中英, 戚进. 增液汤的体内肠吸收评价研究[J]. *海峡药学*, 2016, 28(7): 14-16.

[10] Keiser M J, Roth B L, Armbruster B N, *et al.* Relating protein pharmacology by ligand chemistry[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25 (2): 197-206.

[11] 张刘强, 李医明. 近 10 年玄参属植物化学成分和药理作用

研究进展[J]. *中草药*, 2011, 42(11): 2360-2368.

[12] Liang Q D, Ma J, Ma Z C, *et al.* Chemical comparison of dried rehmannia root and prepared rehmannia root by UPLC-TOF MS and HPLC-ELSD with multivariate statistical analysis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2013, 3(1): 55-64.

[13] Li Z, Wu Y Y, Yu B X. Methylophipogonanone A, an *Ophiopogon* homoisoflavonoid, alleviates high-fat diet-induced hyperlipidemia: assessment of its potential mechanism[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 53(3): e9201.

[14] Tennant K G, Lindsley S R, Kirigiti M A, *et al.* Central and peripheral administration of fibroblast growth factor 1 improves pancreatic islet insulin secretion in diabetic mouse models[J]. *Diabetes*, 2019, 68(7): 1462-1472.

[15] Gasser E, Moutos C P, Downes M, *et al.* FGF1—a new weapon to control type 2 diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(10): 599-609.

[16] Pejnovic N N, Pantic J M, Jovanovic I P, *et al.* Galectin-3 is a regulator of metaflammation in adipose tissue and pancreatic islets[J]. *Adipocyte*, 2013, 2(4): 266-271.

[17] Cheyssac C, Lecoer C, Dechaume A, *et al.* Analysis of common PTPN1gene variants in type 2 diabetes, obesity and associated phenotypes in the French population [J]. *BMC Medical Genetics*, 2006, 7: 44.

[18] Rieg T, Vallon V. Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(10): 2079-2086.

[19] DeFronzo R A, Norton L, Abdul-Ghani M. Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(1): 11-26.

[20] Abdel-Moneim A, El-Twab S M A, Yousef A I, *et al.* Modulation of hyperglycemia and dyslipidemia in experimental type 2 diabetes by gallic acid and *p*-coumaric acid: The role of adipocytokines and PPAR γ [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 1091-1097.

[21] Gong W, Zhang N D, Cheng G, *et al.* *Rehmannia glutinosa* Libosch extracts prevent bone loss and architectural deterioration and enhance osteoblastic bone formation by regulating the IGF-1/PI3K/mTOR pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 3964.

[22] Huang D W, Shen S C, Wu J S B. Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57 (17): 7687-7692.

[23] Kang B B, Chiang B H. Amelioration of insulin resistance using the additive effect of ferulic acid and resveratrol on vesicle trafficking for skeletal muscle glucose metabolism[J]. *Phytother Res*, 2020, 34(4): 808-816.

[24] Prabhakar P K, Doble M. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(12): 1119-1126.

[25] Tang J M, Zhong G S, Zhang H B, *et al.* LncRNA DANCER upregulates PI3K/AKT signaling through activating serine phosphorylation of RXRA [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9

(12): 1167.

[26] Ke B L, Zhao Z Y, Ye X, *et al.* Inactivation of NF- κ B p65 (RelA) in liver improves insulin sensitivity and inhibits cAMP/PKA pathway[J]. *Diabetes*, 2015, 64(10): 3355-3362.

[27] Fruman D A, Chiu H, Hopkins B D, *et al.* The PI3K Pathway in Human Disease[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605-635.

[28] Son M J, Rico C W, Nam S H, *et al.* Effect of oryzanol and ferulic acid on the glucose metabolism of mice fed with a high-fat diet[J]. *J Food Sci*, 2011, 76(1): H7-H10.

[29] Inchovska M, Ogneva V, Martinova Y. Role of FGF1, FGF2 and FGF7 in the development of the pancreas from control and streptozotocin-treated hamsters[J]. *Cell Prolif*, 2006, 39(6): 537-550.

[30] Li P P, Liu S N, Lu M, *et al.* Hematopoietic-derived galectin-3 causes cellular and systemic insulin resistance[J]. *Cell*, 2016, 167(4): 973-984.

[31] Pørksen N, Hollingdal M, Juhl C, *et al.* Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes [J]. *Diabetes*, 2002, 51 Suppl 1: S245-S254.

[32] Satin L S, Butler P C, Ha J, *et al.* Pulsatile insulin secretion, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes[J]. *Mol Aspects Med*, 2015, 42: 61-77.

[33] Jung E H, Ran Kim S, Hwang I K, *et al.* Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(24): 9800-9804.

基于 UPLC-MS 法探究三角咪在大鼠体内的代谢组学

方 媛^{1,2}, 彭 梅², 杨 娟², 李良群², 何磊磊³, 郁华英³, 王道平², 杨小生^{2*}
(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550000; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳, 550000; 3. 贵州大学明德学院, 贵州 贵阳 550000)

摘要: **目的** 对三角咪醇提物在大鼠血清、尿液、粪便中的化学成分进行研究, 阐明其体内药效物质基础。**方法** 大鼠灌胃给予三角咪醇提物后, 采集不同时间段的血清、尿液、粪便, 将三角咪中吸收入血和代谢的化学成分采用 UPLC-MS 法测定, 再通过正离子碰撞模式扫描, 对大鼠灌胃给予三角咪醇提物前后的血清、尿液、粪便进行比较, 以确定其入血成分和代谢部分。**结果** 从三角咪醇提物中共检测到 14 种成分, 其中 5 种为吸收入血的成分, 4 种为尿液代谢的成分, 4 种为粪便代谢的成分, 主要为甾体生物碱类。**结论** 初步确定三角咪的入血成分和代谢成分, 为三角咪的临床应用提供了理论依据。

关键词: 三角咪; 代谢成分; 甾体生物碱; UPLC-MS

中图分类号: R284 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)05-1704-07

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2023. 05. 057

三角咪是贵州特色民族药材, 为黄杨科三角咪属(板凳果属)植物多毛板凳果的干燥根茎或全草^[1], 主要分布于陕西、江西、福建、广东、海南、广西、贵州、云南等地, 具有祛风除湿、活血止痛的功效。研究发现, 三角咪中含有丰富的化学成分, 主要以甾体类生物碱、挥发油居多^[2], 其中生物碱类具有抗溃疡、抗癌活性^[3], 也因其活血化瘀及抗炎抗菌活性极好而在民间得到广泛应用。迄今为止, 关于三角咪的研究主要集中在化学成分分离, 而其体内发挥药效的入血成分及代谢途径, 尚未见文献报道。

课题组前期研究发现, 三角咪醇提物在体外有较强的抗癌活性^[4]。因三角咪中的化学成分较多, 通过动物体内给药, 真正入血的成分可能才是药材的有效物质基础, 同

时又因血液成分多而复杂, 且三角咪中成分多半无紫外吸收, 采用液相色谱 DAD 检测到的成分较少, 采用蒸发光检测的成分也不多且灵敏度较低, 而 UPLC-MS 法检测到的成分较多, 专一性强, 成分明确, 因此本研究采用 UPLC-MS 法, 将三角咪的醇提物经大鼠灌胃后的含药血清和空白血清、含药粪便和空白粪便、含药尿液和空白尿液与三角咪醇提物进行比较, 初步研究三角咪主要入血成分和代谢成分, 以期三角咪的临床应用提供参考。

1 材料

赛默飞 Q Exactive Focus LCMSMS 系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Millipore-0026 超纯水机(美国 Millipore 公司); ME204E 型万分之一精密电子天平(上海盛平电子有限公司); 高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

收稿日期: 2021-10-09
基金项目: 国家基金项目(U1812403); 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2019] 2756 号, 黔科合企企[2020] 4013 号)
作者简介: 方 媛(1997—), 女, 硕士, 从事药物化学研究。Tel: 18364213909, E-mail: fyy216122@163.com
*** 通信作者:** 杨小生, 研究员, 博士生导师, 从事生物物质资源与采用研究, Tel: (0851) 83804370, E-mail: gzcnp@sina.cn