

· 方药研究 ·

基于网络药理学的家蚕抗 2 型糖尿病分子机制研究[※]许光辉^{1*} 万慧琪¹ 陈佩璐¹ 黄亦琦² 李 明^{1,3}

摘 要 目的:通过网络药理学技术探讨家蚕活性成分改善 2 型糖尿病的分子机制。方法:通过检索中国知网(CNKI)和国际性综合生物学信息书目数据库(Medline)构建家蚕的活性成分数据集,运用网络药理学技术筛选家蚕活性成分靶点和疾病靶点,并且对核心靶点进行京都基因和基因组百科全书(KEGG)和基因本体(GO)富集分析。结果:家蚕抗 2 型糖尿病活性成分对应核心靶点 30 个,涉及 63 条相关信号通路,其中显著富集在癌症通路、ErbB 信号通路、HIF-1 信号通路、胰岛素抵抗、FoxO 信号通路、非酒精性脂肪肝(NAFLD)等信号通路。结论:家蚕活性成分抗 2 型糖尿病的作用机制可能与炎症、氧化应激、脂肪肝、癌症发生等相关信号通路的调节有关。

关键词 家蚕;2 型糖尿病;网络药理学;分子机制

家蚕(幼虫)的药用价值一直受到人们的重视,古代医籍《中华本草》《本草纲目》均记载家蚕体入药可止消渴(糖尿病),现代医药学也进一步证明了家蚕幼虫体具有保肝、提高免疫、降血糖、降血脂等多种功效。但目前关于家蚕抗 2 型糖尿病(T2DM)的作用机制研究并不充分。因此,本研究通过网络药理学对家蚕活性成分抗 T2DM 的潜在靶点和分子机制进行解析,为更全面地研究家蚕抗 T2DM 的作用机制指明方向。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件 中国知网(<https://www.cnki.net/>); Medline 数据库(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>); TCMSD 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>); PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>); Gene Card 数据库(<https://www.genecards.org/>);在线韦恩图(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>); STRING 数据库(<https://string-db.org/>); DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>); Cytoscape 3.8.0 软件。

[※]基金项目 福建省自然科学基金面上项目(No.2019D018);福建省自然科学基金青年创新项目(No.2018D0023);福建省科技引导性项目(No.2017D0021)

* 作者简介 许光辉,男,硕士研究生导师。主要从事中药、天然药物生物活性与作用机制研究。

• 作者单位 1.厦门市医药研究所 厦门市天然药物研究与开发重点实验室(福建 厦门 361008);2.北京中医药大学厦门医院(福建 厦门 361009);3.中国人民解放军陆军第七十三集团军医院(福建 厦门 361003)

1.2 家蚕主要活性成分与 T2DM 疾病相关靶点数据集构建 通过查阅文献对家蚕中的主要活性成分进行归类,建立家蚕活性成分集。通过检索 PubChem、Swiss Target Prediction 和 Gene Card 数据库获取家蚕活性成分与 T2DM 对应的靶标。

1.3 家蚕抗 T2DM 潜在靶点筛选 利用在线韦恩图获取家蚕活性成分与 T2DM 靶点的交集则为家蚕抗 T2DM 的潜在靶点。

1.4 蛋白-蛋白网络互作分析(PPI) 将潜在靶点上传至 STRING 平台,设置最高置信区间和隐藏离散靶点进行蛋白相互作用关系分析,计算相应的拓扑参数。

1.5 家蚕活性成分抗 T2DM 的核心靶点筛选 将家蚕活性成分抗 T2DM 的潜在靶点导入 Cytoscape 3.8.0 软件中,根据点度中心值(degree)、接近中心值(closeness)和中介中心值(betweenness)筛选 TOP 30 个靶点作为家蚕活性成分抗 T2DM 的核心靶点并进行可视化展示。

1.6 GO 与 KEGG 富集分析 将核心靶点上传至 DAVID 6.8 在线数据分析平台,以 $P < 0.01$ 为显著性差异筛选家蚕活性成分抗 T2DM 涉及的生物过程及信号通路,分析其可能的作用机制。

2 结果

2.1 家蚕活性成分及与 T2DM 相关靶点数据集 现有文献检索结果^[1-19]表明,家蚕主要活性成分包括生物碱、黄酮类、氨基酸、维生素、脂肪酸等,各成分的口服生物利用度、类药性及与 T2DM 相关的靶基因数目见表 1。

表 1 家蚕活性成分

类别	成分	靶点数目	口服生物利用度	类药性
生物碱	神经碱	1	—	—
	白桥楼碱	3	38.7	0.04
	荞麦碱	2	63.41	0.03
	打碗花素	2	—	—
	1, 4-二脱氧-1, 4-亚氨基-D-阿拉伯糖醇	2697	—	—
	DNJ	137	44.04	0.03
黄酮类	槲皮素	627	46.43	0.28
	山奈酚	200	41.88	0.24
	芦丁	12	3.2	0.68
氨基酸	异槲皮素	16	1.86	0.77
	谷氨酸	4490	60.78	0.02
	丙氨酸	5601	85.17	0.01
	甘氨酸	3811	48.74	0
	天门氨酸	3988	79.74	0.02
	赖氨酸	6500	29.33	0.02
	组氨酸	2806	53.18	0.03
	亮氨酸	4812	72.92	0.01
	缬氨酸	1843	53.33	0.01
	精氨酸	4703	47.64	0.03
	丝氨酸	8641	83.59	0.01
	苏氨酸	781	73.52	0.01
	脯氨酸	5796	77.57	0.01
	酪氨酸	7961	57.55	0.05
	异亮氨酸	97	59.05	0.02
	苯丙氨酸	3591	41.62	0.04
	甲硫氨酸	24	70.87	0.01
	胱氨酸	1394	39.58	0.05
脂肪酸	亚麻酸	405	45.01	0.15
	亚油酸	705	41.9	0.14
维生素	维生素B	5648	71.13	0.02
	维生素E	5615	14.26	0.55

2.2 家蚕活性成分抗 T2DM 潜在靶点 通过 PubChem、Swiss Target Prediction 和 Gene Card 数据库获得 T2DM 对应靶标 12272 个,氨基酸对应靶点 19400 个,脂肪酸对应靶点 1067 个,生物碱对应靶点 3822 个,维生素对应靶点 7832 个,黄酮类对应靶点 714 个。161 个交集靶点则为家蚕活性成分抗 T2DM 的潜在靶点。见图 1。

2.3 靶蛋白 PPI 将 161 个潜在靶点上传至 STRING 数据库进行蛋白互作分析。PPI 结果显示,家蚕活性成分抗 T2DM 功效 PPI 网络节点 161 个,平均度值 7.25,584 条边, $P<1.0e-16$ 。见图 2。

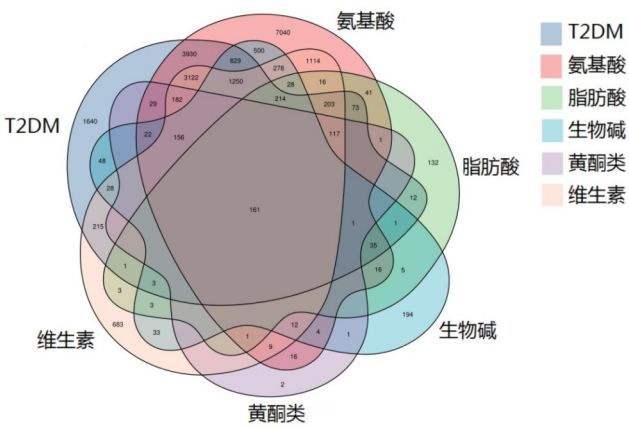


图 1 家蚕活性成分与 T2DM 的靶基因映射

2.4 核心靶点 GO 富集分析 对家蚕活性成分抗 T2DM 的 30 个核心靶点进行 GO 富集分析。根据 $P<0.01$,筛选得出家蚕活性成分抗 T2DM 核心靶点显著富集的生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)分别为 39 条、6 条和 16 条,其中 P 值最小的 Top 10 条生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)见图 3。结果显示,家蚕活性成分抗 T2DM 靶点显著富集的生物过程包括 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、药物反应、一氧化氮生物合成过程的正调控、平滑肌细胞增殖的正调控、药物代谢过程、ERBB2 信号通路、类固醇代谢过程、细胞缺氧反应、环氧化酶 P450 途径、单萜代谢过程等;显著富集的细胞组分有胞质溶质、内质网膜、胞内包膜细胞器、细胞器膜、内体腔、内吞囊泡腔等;显著富集的分子功能包括酶结合、蛋白质结合、血红素结合、类固醇羟化酶活性、氧结合、单加氧酶活性、铁离子结合、氧化还原酶活性、蛋白磷酸酶结合、花生四烯酸环氧化酶活性等。

2.5 药物-成分-疾病-核心靶点-通路分析 图 4 为家蚕抗 T2DM 的成分-疾病-核心靶点-通路网络拓扑图。结果显示,家蚕体中活性成分主要通过作用于 CYP1A1、SRC、AKT1、PPARGC1A、PIK3CA、APOA1、TP53、CYP2C19、INS、CYP3A4、MAPK8、CTNNB1、EDN1、PPARA、CYP2E1、IRS1、PLCG1、EGF、HSP90AA1、APOB、APP、CYP2B6、EGFR、EP300、KNG1、TNF、MTOR、JUN、MAPK14、CYP2C9 等靶点,进而调节癌症通路、ErbB 信号通路、HIF-1 信号通路、胰岛素抵抗、FoxO 信号通路、非酒精性脂肪肝 (NAFLD)、Rap1 信号通路、甲状腺激素信号通路、神经营养因子信号通路、脂肪细胞因子信号通路、TNF 信号通路、胰岛素信号通路、2 型糖尿病、mTOR 信号通路等多条途径参与改善 T2DM。

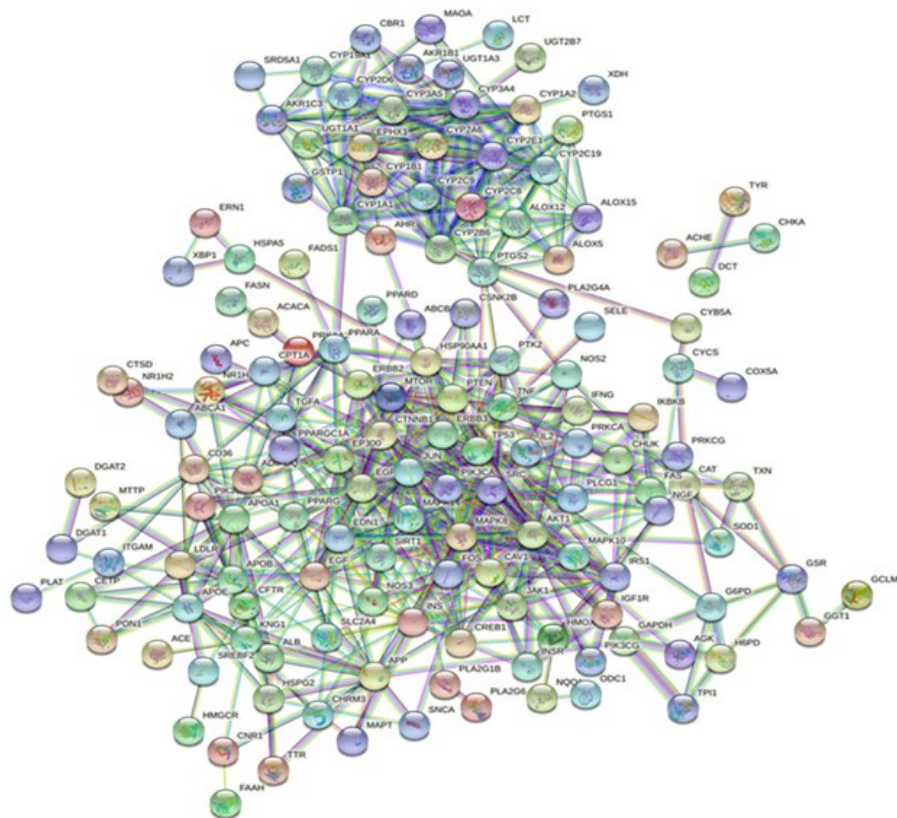


图2 潜在靶点PPI网络

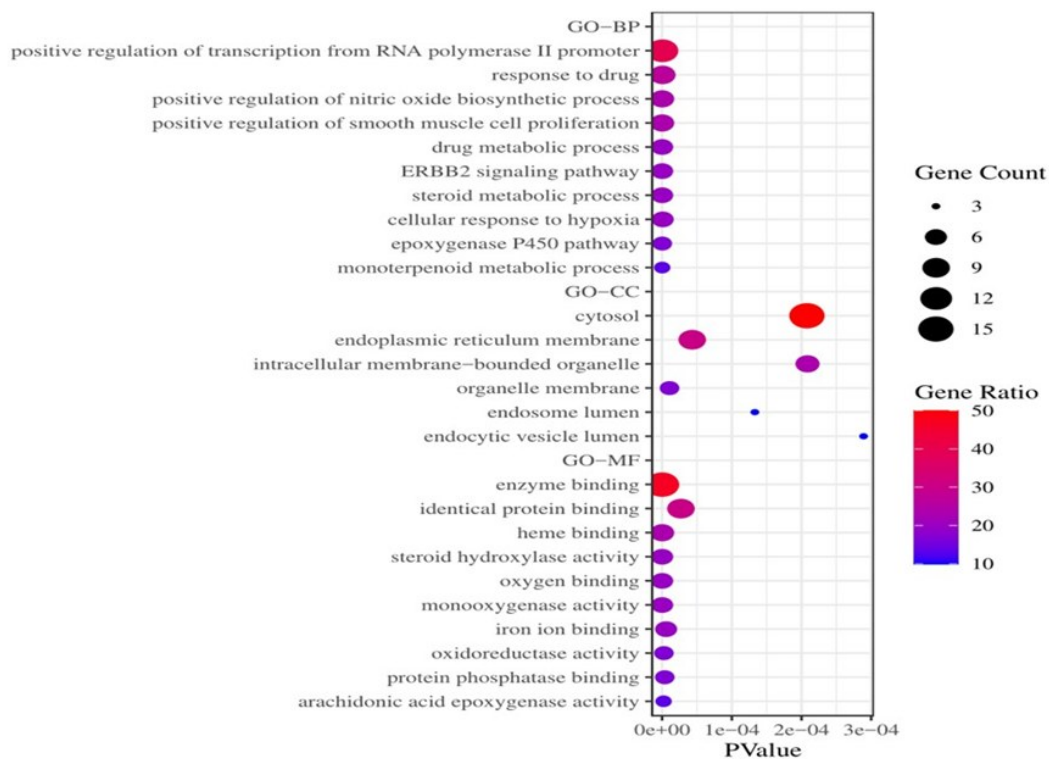


图3 核心靶点GO富集分析

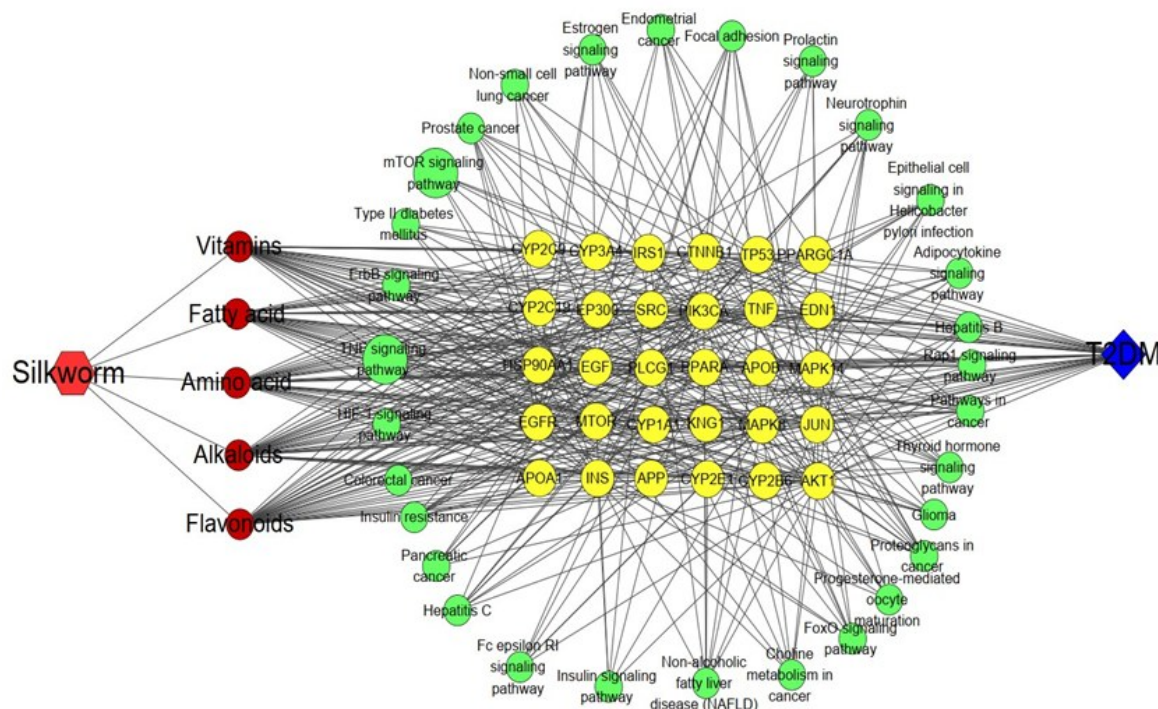


图 4 药物-成分-疾病-核心靶点-通路网络图

3 讨论

家蚕作为一种经济资源昆虫,其药用价值一直受到人们的重视,古代医籍《中华本草》《本草纲目》中均有家蚕体入药可治疗糖尿病的相关记载^[20]。现代医药学也进一步证明了家蚕体的药用价值,揭示了其具有保肝、提高免疫、抗肿瘤、降血糖、降血脂等作用^[1]。网络药理学是基于多种技术的综合应用,利用多种数据库和平台,阐释疾病的发生、发展过程或者疾病与药物的相互作用关系并指导新药发现的一门学科,在新药研究、药效物质基础和作用机制的研究等方面提供了诸多便利^[21]。本研究利用网络药理学技术对家蚕体中的生物碱、黄酮类、氨基酸、脂肪酸、维生素 5 大类共 31 种主要活性成分抗 T2DM 的作用靶点、分子机制进行解析,结果表明家蚕可通过作用于 PI3K-Akt 信号通路、非酒精性脂肪肝通路、FoxO 信号通路、TNF 信号通路、脂肪细胞因子信号通路、胰岛素信号通路、II 型糖尿病、mTOR 信号通路等多条途径改善 2 型糖尿病。

氨基酸和维生素是机体进行正常生理活动所必需的物质,根据既往研究发现,氨基酸代谢异常与 T2DM 的发生密切相关。张志军等^[22]通过氢谱磁共振代谢组学技术对 2 型糖尿病患者尿液中的代谢物进行监测,发现患者体内氨基酸、脂肪代谢异常和维生

素 B12 缺乏导致尿液中的甲基丙二酸水平升高。有文献报道,长期服用二甲双胍、罗格列酮等药物会导致 T2DM 患者体内缺乏维生素 B12^[23]。另外,孙爱丽等^[14]发现,维生素 B12 的缺乏会导致 T2DM 患者更容易发生周围神经病变。王晋飞^[24]通过研究发现,T2DM 小鼠血清中的谷氨酰胺、缬氨酸、异亮氨酸、甘氨酸和丙氨酸 5 种氨基酸含量较正常小鼠明显降低。家蚕不仅有显著的降血糖作用,而且富含高蛋白和维生素,对糖尿病患者大有裨益。

亚麻酸和亚油酸为人体必需脂肪酸,对维持机体正常生命活动起着至关重要的作用。 α -亚麻酸为 ω -3 系列多不饱和脂肪酸,具有显著的药理作用和营养价值。从食物中获取的 α -亚麻酸可在体内合成一系列代谢产物,其中最重要的是具有调节血脂、抗炎、抗氧化、提高免疫力等生理活性的二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)^[25]。朱丽丽等^[26]通过研究发现,富含亚麻酸的膳食亚麻籽油可显著增加 T2DM 大鼠外周血和脾脏中的髓源抑制细胞,降低血浆中白介素 1 β 和 TNF- α 水平,减少炎症反应,改善 T2DM。此外, α -亚麻酸能够显著降低糖尿病大鼠血清中炎症因子含量和丙二醛水平,增加血清一氧化氮含量、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性,具有抗炎和抗氧化作用^[27]。另有研究^[28]表明,共轭亚油酸可通过激活

PPAR α 转录因子,下调肝脏 CD36 表达水平,调节脂代谢异常,明显改善 ob/ob 小鼠脂肪肝和糖耐量异常,对糖尿病并发症具有一定的防治作用。

黄酮类化合物主要通过清除机体自由基,调节脂质代谢紊乱,减少炎症反应,进而改善 T2DM,是具有极高应用价值的天然活性产物。生物碱类主要通过调节胰岛素信号通路相关蛋白的表达,提高外周组织对胰岛素的敏感性,减少氧化应激以及胰岛素抵抗等参与糖尿病的发展进程^[29]。张立雯^[30]通过研究发现,桑叶生物碱类成分莽麦碱在糖尿病大鼠体内的吸收较 DNJ 更快,且停留时间更长,对疾病改善有良好的作用。

综上,本研究通过网络药理学技术阐释了家蚕可通过多成分-多靶点-多途径调控机制改善 T2DM。

参考文献

- [1] 贺伟强. 家蚕活性成分及其药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(5):213-215.
- [2] 庄媛. 家蚕 HPLC 法指纹图谱及抗 2 型糖尿病体外分子机制研究[D]. 福州:福建中医药大学, 2014.
- [3] 马雪云. 家蚕治疗糖尿病的抗氧化药效成分分析[D]. 福州:福建中医药大学, 2018.
- [4] 刘淑梅. 家蚕体主要药用活性成份的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2004.
- [5] 庄媛, 黄亦琦, 许光辉, 等. 家蚕药用功效及糖尿病临床应用探析[J]. 海峡药学, 2017, 29(3):49-51.
- [6] 张友洪, 肖文福, 黄世群, 等. 家蚕幼虫全蚕粉的营养成分差异性分析[J]. 陕西农业科学, 2017, 63(3):14-19.
- [7] 杨辉, 黄亦琦, 罗友华, 等. 家蚕氨基酸、微量元素及总黄酮含量测定分析[J]. 福建医药杂志, 2009, 31(6):76-78.
- [8] 赵艳丽, 黄亦琦, 胡珊梅, 等. HPLC 测定全蚕粉中槲皮素和山奈素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18):95-97.
- [9] 赵艳丽, 黄亦琦, 胡珊梅, 等. HPLC 测定家蚕中 1-脱氧野尻霉素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22):124-126.
- [10] 戚欢阳, 马雪云, 许光辉, 等. 家蚕中抗氧化活性成分分析[J]. 海峡药学, 2020, 32(9):35-39.
- [11] 张艳, 董照明, 赵东超, 等. 基于超高效液相色谱-质谱技术对野蚕茧和家蚕茧化学成分进行比较[J]. 生物工程学报, 2019, 35(8):1546-1556.
- [12] ASANO N, TOMIOKA E, KIZU H, et al. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*[J]. Carbohydr Res, 1994, 253(6):235-245.
- [13] 颜新培, 蔡光先, 李顺祥, 等. 桑蚕及相关产物的化学成分与药理研究现状[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(5):78-80.
- [14] 金超. 不同品种蚕(桑)主要活性物质含量的比较研究[D]. 江苏镇江:江苏科技大学, 2015.
- [15] 顾燕燕, 贺伟强, 时连根. 家蚕雌蛾体中氨基酸的分析[J]. 蚕桑通报, 2007, 38(2):13-17.
- [16] 顾美儿, 贺伟强, 顾燕燕, 等. 家蚕雌蛾体中微量元素和脂肪酸的分析[J]. 科技通报, 2008, 24(5):658-662.
- [17] 贺伟强. 家蚕雌蛾体主药活性成分的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2005.
- [18] 彭金年, 程庚金生, 冯玲燕, 等. 家蚕幼虫化学成分初步研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(1):62-63.
- [19] ZHAO Q, JIA T, CAO Q, et al. A crude 1-DNJ extract from home made *bombyx batryticatus* inhibits diabetic cardiomyopathy-associated fibrosis in db/db mice and reduces protein N-glycosylation levels[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(6):1699.
- [20] SAHIN M, TUTUNCU NB, ERTUGRULD, et al. Effects of metformin or rosiglitazone on serum concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B12 in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Journal of Diabetes & Its Complications, 2007, 21(2):118-123.
- [21] 董培良, 李慧, 韩华. 中药网络药理学的应用与思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17):204-211.
- [22] 张志军, 马红, 董继扬. 氢谱磁共振代谢组学在 2 型糖尿病特征代谢物监测中的应用[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(4):47-49.
- [23] 孙爱丽, 刘元涛, 倪一虹, 等. 维生素 B12 与甲基丙二酸水平在糖尿病二甲双胍治疗中的变化[J]. 中华内分泌与代谢杂志, 2013, 29(1):24-25.
- [24] 王晋飞. 多穗柯叶片提取物降低 T2DM 小鼠血糖机理的研究[D]. 北京:北京林业大学, 2017.
- [25] 柏薇薇. α -亚麻酸的功效[J]. 食品界, 2017, 3(10):99.
- [26] 朱丽丽, 张晓霞, 王振, 等. 富含亚麻酸的膳食亚麻籽油对 2 型糖尿病大鼠外周血和脾脏髓源抑制细胞及炎症因子的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(2):14-18, 31.
- [27] 张利华, 张薇, 韦广洪, 等. α -亚麻酸对糖尿病大鼠炎症介质和氧化应激的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(1):64-67.
- [28] 李灵杰. 共轭亚油酸改善肥胖糖尿病小鼠脂代谢的作用及其分子机制研究[D]. 广州:南方医科大学, 2018.
- [29] 朱晓丹, 江冰洁, 刘新元, 等. 天然产物中黄酮多酚及生物碱类化合物治疗 2 型糖尿病研究进展[J]. 中国现代中药, 2019, 21(11):1592-1598.
- [30] 张立雯, 季涛, 宿树兰, 等. 桑叶黄酮类和生物碱类成分在正常和糖尿病大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21):178-185.

(收稿日期:2021-07-21)

(本文编辑:蒋艺芬)