

● 实验研究 ●

基于网络药理学、分子对接技术和实验验证的
“厚朴-枳实-大黄”治疗糖尿病的作用机制研究陈登科^{1,2}, 金恩佑¹, 江国安², 贺怡仁², 马丽³, 杨乐乐^{4,5,△}, 张俊^{1,△}(1. 澳门科技大学中医药学院, 澳门 999078; 2. 韶关市中医院陈登科名中医工作室, 广东 韶关 512000;
3. 广州医科大学附属第一医院横琴医院, 广东 珠海 519031; 4. 澳门大学, 中华医药研究院, 中药质量研究国家重点实验室,
澳门 999078; 5. 珠海澳大科技研究院, 广东 珠海 519031)

摘要: 目的: 基于网络药理学、分子对接技术和体外实验, 探讨厚朴枳实大黄治疗糖尿病的潜在作用机制。方法: 借助中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP), 获取厚朴枳实大黄的主要化学成分及对应靶标基因, 通过人类基因数据库 (GeneCards) 获取糖尿病相关疾病基因。将药物靶标基因与疾病相关基因进行映射取交集, 得到厚朴枳实大黄预防和治疗糖尿病的潜在作用靶点。随后, 利用在线工具进行基因本体 (GO) 分析和京都基因及基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并获得蛋白与蛋白相互作用网络 (PPI), 挖掘出其治疗糖尿病的潜在信号通路。利用 Cytoscape 软件构建中药化合物-靶点-信号通路网络, 从而进一步发掘药物治疗糖尿病的潜在化学成分及核心靶点。并采用 AutoDock Vina 等软件进一步确证潜在活性成分与核心靶点的结合能力。采用 DPPH 自由基清除实验评价厚朴枳实大黄的抗氧化应激效果, 以及 LPS 诱导的巨噬细胞炎症模型检测其抗炎效果。结果: 厚朴、枳实、大黄作用于糖尿病的潜在有效成分分别有 10 个、2 个、19 个, 对应的关键靶点分别有 61 个、23 个、118 个。GO 分析结果显示, 厚朴枳实大黄治疗糖尿病潜在基因的生物功能主要涉及信号转导、磷酸化调控、蛋白磷酸化、脂多糖反应、氧化应激反应、炎症反应调控等。KEGG 通路富集结果显示, 厚朴枳实大黄治疗糖尿病潜在基因主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、胰岛素抵抗信号通路、2 型糖尿病信号通路等胰岛素相关通路, 以及 TNF 信号通路、p53 信号通路、MAPK 信号通路、NF-kappa B 信号通路等炎症相关通路。体外实验结果表明, 厚朴枳实大黄能够显著清除 DPPH 自由基, 并抑制炎症因子释放。结论: 厚朴枳实大黄治疗糖尿病是多成分、多靶点、多通路的复杂过程, 可能通过改善氧化应激和炎症异常等发挥治疗糖尿病的作用。

关键词: 厚朴; 枳实; 大黄; 糖尿病; 作用机制; 网络药理学

中图分类号: R 259 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3649 (2025) 02-0082-10

Mechanism of “Cortex Magnoliae Officinalis, Fructus Aurantii Immaturus and Radix et Rhizoma Rhei” in treating diabetes based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation/CHEN Dengke^{1,2}, JIN Enyou¹, JIANG Guoan², et al// (1. Faculty of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China; 2. Famous Doctor's Studio of Chen Dengke in Shaoguan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaoguan 512000, China)

Abstract: Objective: This study aims to investigate the therapeutic mechanisms of action of Cortex Magnoliae Officinalis, Fructus Aurantii Immaturus and Radix et Rhizoma Rhei in the prevention and treatment of diabetes by using network pharmacology, molecular docking and in vitro experiment. Methods: TCMSP platform was employed to obtain the chemical compounds, and corresponding targets of Cortex Magnoliae Officinalis-Fructus Aurantii Immaturus-Radix et Rhizoma Rhei, while the diabetes-related disease genes were extracted from the Human Gene Database (GeneCards). The drug target genes and disease-related genes are mapped and intersected, and the potential targets for preventing and treating diabetes are obtained. Then, the online tools were used for gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, and the protein-protein interaction network (PPI) was obtained, and its potential signal pathway for treating diabetes was excavated. The compound-target-signal pathway network of traditional Chinese medicine was constructed by Cytoscape software, so as to further explore the potential chemical components and core targets of drugs in treating diabetes. AutoDock Vina and other software were used to further confirm the binding ability of potential active ingredients with core targets. DPPH free radical scaven-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82204588)。第一作者: 陈登科, 硕士, 研究方向: 中医药治疗疑难病; E-mail: chen-dengke111@126.com。△ 通讯作者: 张俊, 研究方向: 中医药、针灸及推拿治疗疑难病; E-mail: jzhang@must.edu.mo; 杨乐乐, 研究方向: 中药药效物质基础; E-mail: yang.lele@connect.um.edu.mo。

ging experiment was used to evaluate the anti-oxidative stress effect of *Magnolia officinalis* and *Rhubarb*, and LPS-induced macrophage inflammation model was used to detect its anti-inflammatory effect. Results: The effective components of *Cortex Magnoliae Officinalis*, *Fructus Aurantii Immaturus*, *Radix et Rhizoma Rhei* in the treatment of diabetes included 10, 2, 19 with 61, 23, 118 corresponding targets, respectively. GO analysis showed that the potential genes targeted by these compounds for treating diabetes were mainly involved in signal transduction, regulation of phosphorylation, regulation of protein phosphorylation, response to lipopolysaccharide, response to oxidative stress, etc. KEGG pathway enrichment analysis suggested that the pathways involved mainly included PI3K-Akt signaling pathway, TNF signaling pathway, p53 signaling pathway, insulin resistance, MAPK signaling pathway, type II diabetes mellitus, NF-kappa B signaling pathway, etc. The results of in vitro experiment indicated that this formula possessed antioxidant effect, and significantly prevented the release of inflammatory factors. Conclusion: Network pharmacology results suggests that the herbal formula of *Cortex Magnoliae Officinalis*, *Fructus Aurantii Immaturus*, *Radix et Rhizoma Rhei* shows great potential for the treatment of diabetes mellitus via multi-components, multi-targets and multi-pathways. Multiple signal pathways, such as oxidative stress and inflammatory response related signal pathways are involved in the treatment of diabetes mellitus by this formula.

Keywords: *Cortex Magnoliae Officinalis*; *Fructus Aurantii Immaturus*; *Radix et Rhizoma Rhei*; Diabetes mellitus; Mechanism of action; Network pharmacology

糖尿病 (Diabetes Mellitus, DM) 是一种由于胰岛素分泌缺陷或胰岛素抵抗所导致的以高血糖为特征的代谢性疾病。随着人们生活方式的改变和人口老龄化, DM 的患病率呈逐年递增的趋势, 成为影响人类健康的重要威胁之一^[1]。目前全球约有 2.4 亿 DM 患者, 据估计到 2040 年这一数字将达到 6.42 亿^[2]。DM 是导致心脑血管疾病、失明、肾功能衰竭的重要因素, 严重危害患者身心健康^[3], 每年约造成 150 万人死亡^[4]。国际糖尿病联合会的调查显示, 到 2040 年, 中国的 2 型糖尿病患者将超过 1 亿人^[5]。

中医将 DM 归为消渴范畴, 在世界医学史中, 中医学对消渴的认识较早, 且论述甚详^[6]。汉代张仲景在《金匮要略》对 DM 有专篇讨论, 并最早提出治疗方药, 主方有白虎加人参汤、肾气丸等^[6]。《证治准绳》在前人基础上, 对消渴进行了分类诊断, 分为“上消”“中消”“下消”。消渴的病因主要包括禀赋不足、饮食失节、情志失调、劳欲过度等。其病变主要发生在肺、胃、肾等脏腑。消渴的主要病机为阴津亏损、燥热偏盛, 以阴虚为根本, 燥热为表征, 二者相互影响。临床上常以清热、理气、养阴为主要治理方法。

当前, DM 主要采用口服降糖药和注射胰岛素等现代医学手段治疗, 但这些方法无法完全治愈疾病, 并且可能会引发许多副反应, 同时也会给患者带来很大的经济压力。因此, 有必要发掘有效的治疗方法和新的药物来治疗 DM。从传统的中药及复方中寻求价格低廉、安全有效、不良反应低的天然植物药逐渐成为防治 DM 的研究热点^[7]。然而, 随著医学技术的进步, 许多 DM 患者的早期或者中期的症状并未显现出来, 因此依照过去的中医方法去识别并处理这些病例可能会效果不佳。全小林教授通过观察 DM 的发病过程以及当今人们生活水平提高引起饮食习惯的改变, 结合《素问·奇病论》“此肥美之所发

也, 此人必数食甘美而多肥也, 肥者令人内热, 甘者令人中满, 故其气上溢, 转为消渴”。认为消渴是由于嗜食肥甘厚味, 引起内热中满蓄积于脾而造成脾瘅所导致的, 且脾瘅的核心病机是中满内热, 以“郁”起病^[8]。厚朴 (*Magnoliae Officinalis*)、枳实 (*Fructus Aurantii Immaturus*)、大黄 (*Radix et Rhizoma Rhei*) 的中药复方组合是全小林教授临证辨治糖尿病的靶方之一^[9]。临床上, 含有厚朴、枳实、大黄这三味药物的中医方剂已用于 DM 的治疗, 如厚朴三物汤化裁等。这三味药物均在实际应用中展现出其治疗糖尿病的有效性^[9-11]。但由于中药成分的多样性和与人体相互作用的复杂性, 厚朴枳实大黄治疗 DM 尚缺乏科学数据支撑, 具体作用机制尚不明确。随着网络药理学研究策略的出现, 现代中药研究逐渐从单一靶标向整体、系统的研究转变, 这为我们深入理解这类中药复合制剂的疗效机制提供了新的视角^[12]。在本研究中, 我们将运用网络药理学的方法探究厚朴、枳实、大黄治疗 DM 的潜在分子机制, 并利用体外实验验证其改善糖尿病的相关药效, 以期 DM 等相关疾病的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 厚朴-枳实-大黄化学成分及靶点挖掘 中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 是基于中药系统药理学综合分析药效学、药动学、靶标预测以及网络、组学和系统的平台^[13], 它可对药品的作用机理展开全面的研究并深入理解其内在属性及相关功能模式。借助 TCMSP 平台 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 获得“厚朴-枳实-大黄”中各味中药的化学成分, 根据口服生物利用度 (OB) 和类药性 (DL) 筛选出符合条件的候选化合物及其对应靶点, 然后借助 Uniprot 数据库和美国国家生物技术信息中心数据库 (NCBI), 将靶点基因转换成对应的蛋白。

1.2 DM 疾病相关基因 以“diabetes mellitus”“insulin resistance”为检索词，在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中搜索 DM 的相关疾病基因。

1.3 PPI 网络的构建及通路富集分析 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 可以用来分析蛋白质和蛋白质之间的相互作用，将药物-疾病交集靶点基因导入 STRING 数据库，限定研究物种为“Homo sapiens”，最低相互作用评分设置为最高置信度 [“highest confidence (0.900)”]，其余参数保持默认设置，得到厚朴-枳实-大黄作用于 DM 的 PPI (靶蛋白相互作用) 网络。同时，设定阈值 $P<0.05$ ，进行 GO 生物过程富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.4 中药化学成分-作用靶点网络的构建和关键靶点筛选 将中药化学成分的靶点与 DM 相关靶点取交集，所得交集靶点即为“厚朴-枳实-大黄”作用于 DM 的预测靶点。构建中药化学成分-作用靶点网络，利用 Cytoscape 3.7.1 软件中的“Network Analyzer”功能对中药化学成分-作用靶点网络进行分析，节点 (node) 代表“厚朴-枳实-大黄”中所含药物化学成分与潜在作用靶点；边 (edge) 展现了中药成分和其作用靶点之间的联系，根据化合物与靶点连接情况筛选出中药作用于 DM 的关键化合物。利用 Cytoscape 3.7.1 软件中的“Network Analyzer”对 PPI 网络进行拓扑分析，选取自由度、介数、中心性都大于平均值的靶点为关键靶点，并分析其药理作用。

1.5 分子对接 从 PubChem 数据下载小分子化合物的 3D 结构，从 PDB 数据库下载蛋白结构，将结构导入 AutodockTools-1.5.6 进行加氢、计算电荷和分配电荷等置保存为“pdbqt”格式。采用 AutoDock Vina1.1.2 进行对接，蛋白相关参数设置为：center_x = 26.516，center_y = 23.500，center_z = 48.341，其余参数为默认设置。

1.6 药材提取 按照厚朴三物汤处方量，按照 8:4:3 比例，分别称取厚朴、枳实、大黄。先将厚朴和枳实加水 (10 倍体积) 浸泡 30min，然后进行煎

煮 40min。随后，放入大黄再继续煎煮 20min。过滤后得到 0.45g/mL 的药材溶液，放置于-20℃ 备用。

1.7 DPPH 实验将药材溶液稀释成系列浓度，并配置 0.2mM DPPH 溶液。分别取 DPPH 溶液 (180μL) 和不同浓度的药材溶液 (20μL)，室温避光孵育 30min，然后在 517nm 测定吸光度。计算药材溶液的自由基清除活力：

$$\frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{control}}} \times 100\%$$

A_{sample} 为样品吸光度， A_{control} 为空白对照吸光度。

1.8 细胞培养 将 RAW 264.7 巨噬细胞放置于含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基中，在培养箱中进行培养。观察细胞状态，并及时更换培养基。当细胞生长到 80% 左右，进行传代，继续培养并开展实验。

1.9 炎症因子检测 取对数生长期的 RAW 264.7 细胞，置于 96 孔板中，进行培养。待细胞完全贴壁后，分别加入不同浓度的药材溶液 (0~224μg/mL)，孵育 24 小时后，加入 MTT 溶液检测细胞活力，评估药材溶液的安全给药浓度。为了测定药材的抗炎效果，将 RAW 264.7 细胞置于 6 孔板中培养贴壁后，分别加入 28、56、112μg/mL 的药材溶液共孵育 24 小时，然后加入 LPS 溶液刺激 24 小时。收集细胞上清液，离心备用。按照一氧化氮 (NO) 检测试剂盒说明书测定细胞上清液中 NO 的含量，据此评估药材溶液的药理活性。

1.10 数据统计 体外实验结果均为 3 次重复获得的平均值±标准差，使用 GraphPad Prism 9 软件进行绘图和显著性分析， P 值小于 0.05 代表组间有显著。

2 结 果

2.1 候选化合物及靶点的筛选 在 TCMSP 数据库中以 $OB \geq 30\%$ ， $DL \geq 0.18$ 作为筛选条件，获得厚朴-枳实-大黄三味中药对应的候选化合物分别为 10 个、2 个、19 个，以及对应靶点分别为 61 个、23 个、118 个。厚朴-枳实-大黄对应的候选化合物信息见表 1。

表 1 厚朴-枳实-大黄中候选化合物成分

序号	药材	化合物
1	Radix Rhei Et Rhizome	EUPATIN
2	Radix Rhei Et Rhizome	Physciondiglucoside
3	Radix Rhei Et Rhizome	rhein
4	Radix Rhei Et Rhizome	Torachrysone-8-O-beta-D-(6'-oxayl)-glucoside
5	Radix Rhei Et Rhizome	Toralactone
6	Radix Rhei Et Rhizome	Emodin-1-O-beta-D-glucopyranoside
7	Radix Rhei Et Rhizome	Daucosterol__qt
8	Radix Rhei Et Rhizome	beta-sitosterol
9	Radix Rhei Et Rhizome	aloe-emodin
10	Radix Rhei Et Rhizome	(-)-catechin

(续表1)

11	Magnolia Officinalis Rehd Et Wils	Eucalyptol
12	Magnolia Officinalis Rehd Et Wils	Neohesperidin
13	Aurantii Fructus Immaturus	Isosinensetin
14	Aurantii Fructus Immaturus	5,7,4'-Trimethylapigenin
15	Aurantii Fructus Immaturus	isosakuranetin-7-rutinoside
16	Aurantii Fructus Immaturus	Prangenin
17	Aurantii Fructus Immaturus	poncimarín
18	Aurantii Fructus Immaturus	isoponcimarín
19	Aurantii Fructus Immaturus	6-Methoxy auraptén
20	Aurantii Fructus Immaturus	citrusin B
21	Aurantii Fructus Immaturus	neohesperidin__qt
22	Aurantii Fructus Immaturus	Sinensetin
23	Aurantii Fructus Immaturus	Ammidin
24	Aurantii Fructus Immaturus	Eriodyctiol (flavanone)
25	Aurantii Fructus Immaturus	naringenin
26	Aurantii Fructus Immaturus	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one
27	Aurantii Fructus Immaturus	nobiletin
28	Aurantii Fructus Immaturus	didymin
29	Aurantii Fructus Immaturus	luteolin
30	Aurantii Fructus Immaturus	Tetramethoxyluteolin
31	Aurantii Fructus Immaturus	4-[(2S,3R) -5-[(E) -3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol

2.2 潜在靶点的 PPI 分析 从 GeneCards 数据库中，检索到 19748 个 DM 相关疾病基因。将所有化合物对应的靶点与 DM 相关疾病基因进行韦恩分析取交集，筛选出厚朴枳实大黄治疗糖尿病的潜在靶点（图 1）。随后，将映射得到的交集靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 网络分析。如图 2 所示，网络中发生蛋白相互

作用的靶点有 137 个，2344 条边代表了蛋白之间相互作用。网络中各节点的平均自由度为 34.2，平均介数（avg. local clustering coefficient）为 0.654，PPI 富集 p 值小于 1.0e-16，表明富集到的靶基因对应的蛋白相互作用较强。

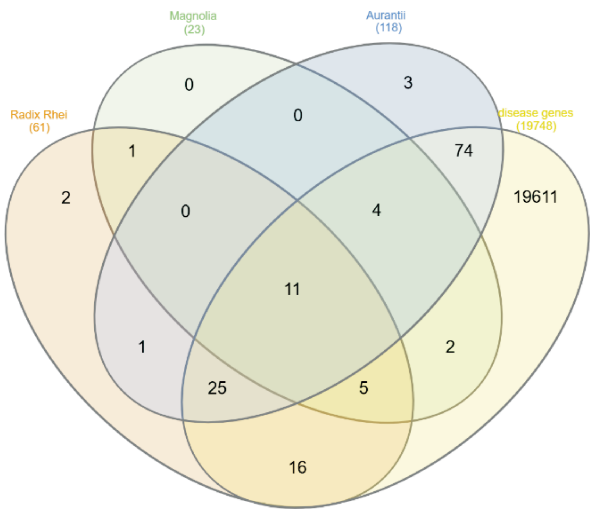


图 1 药物和疾病对应靶点的 Venn 图

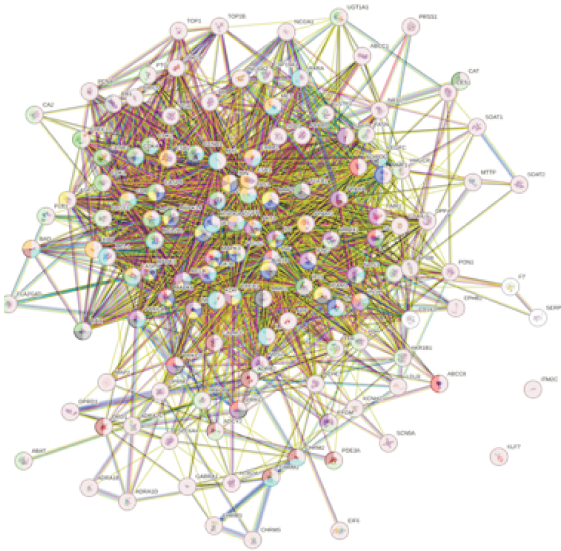


图 2 厚朴枳实大黄治疗糖尿病的靶蛋白的蛋白-蛋白互作网络图

2.3 潜在靶点的通路富集分析 随后,通过对这些靶点进行功能富集分析,提取核心的信号通路,进一步阐明厚朴枳实大黄治疗糖尿病的潜在作用机制。GO 分析总共注释到 1924 条 GO 注释条目,包括 1656 条 GO 生物学过程 (GO biological process)、153 条 GO 分子功能 (GO molecular function)、115 条 GO 相

关细胞组分 (GO cellular components)。GO 富集分析结果表明,厚朴枳实大黄活性成分对应的潜在靶点显著富集在信号转导、磷酸化调控、蛋白磷酸化、脂多糖反应、氧化应激反应、炎症反应调控等与防治糖尿病相关的生物过程中 (图 3)。GO 富集分析,结果统计见表 2。

表 2 GO 功能富集

#term ID	Pathway	Count	false discovery rate
GO:0007165	Signal transduction	90	2.14E-22
GO:0042325	Regulation of phosphorylation	50	2.17E-22
GO:0001932	Regulation of protein phosphorylation	45	4.06E-20
GO:0032496	Response to lipopolysaccharide	28	5.64E-20
GO:0006979	Response to oxidative stress	28	2.20E-18
GO:0050727	Regulation of inflammatory response	27	2.88E-17
GO:0043408	Regulation of MAPK cascade	32	9.16E-16
GO:0006954	Inflammatory response	23	3.19E-10
GO:0032868	Response to insulin	15	1.61E-09
GO:0007584	Response to nutrient	13	3.75E-09

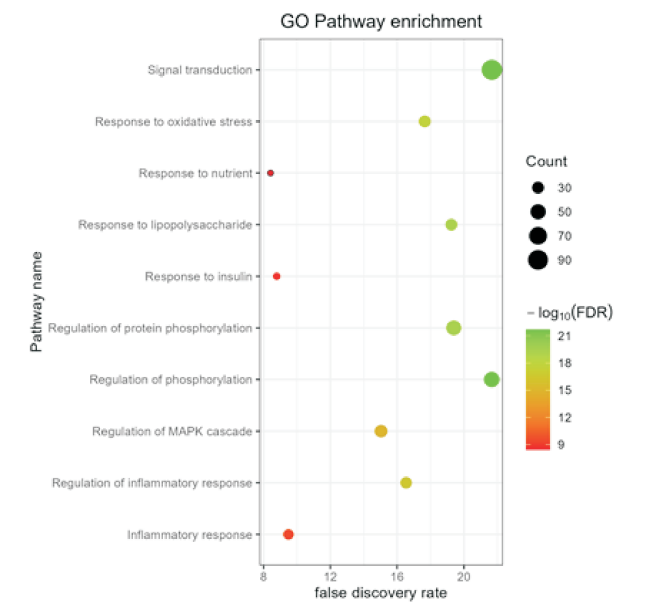


图 3 GO 功能富集分析

KEGG 通路富集分析结果表明,这些潜在靶点主要富集在 200 条信号通路上 ($P < 0.05$)。如图 4,从中发现多个与 DM 密切相关的信号通路,主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、胰岛素抵抗信号通路、2 型糖尿病信号通路等胰岛素相关通路,以及 TNF 信号通路、p53 信号通路、MAPK 信号通路、NF- κ B 信号通路等炎症相关通路。KEGG 通路富集分析,结果统计见表 3。综上,GO 功能富集和 KEGG 通路富集提示,厚朴枳实大黄可以通过调控多条信号通路

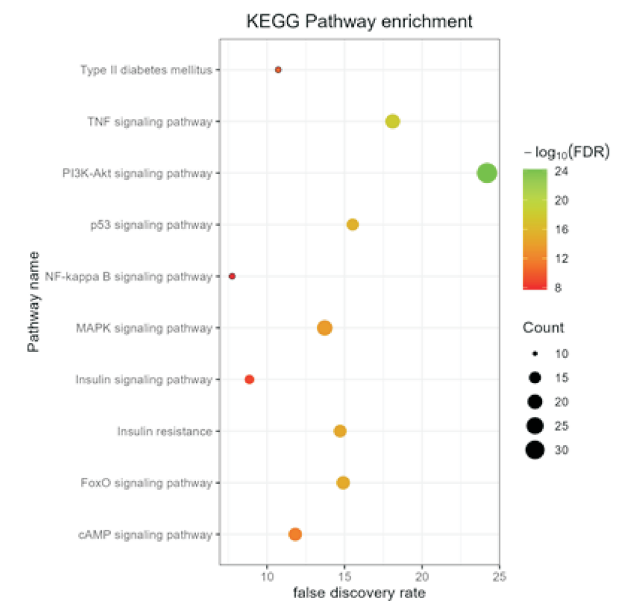


图 4 KEGG 通路富集分析

从而发挥改善糖尿病的作用。

表 3 KEGG 通路富集分析结果

#term ID	Pathway	Count	false discovery rate
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	33	6.35E-25
hsa04668	TNF signaling pathway	19	7.87E-19
hsa04115	p53 signaling pathway	15	3.02E-16
hsa04068	FoxO1 signaling pathway	17	1.23E-15
hsa04931	Insulin resistance	16	1.94E-15

(续表3)

hsa04010	MAPK signaling pathway	21	1.91E-14
hsa04024	cAMP signaling pathway	17	1.51E-12
hsa04930	Type II diabetes mellitus	10	1.91E-11
hsa04910	Insulin signaling pathway	12	1.38E-09
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	10	1.79E-08

2.4 “化学成分-靶点-通路”的网络构建及分析
为了进一步筛选厚朴枳实大黄防治糖尿病的核心靶点,根据 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析结果,选择 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、胰岛素抵抗信号通路对应的靶点及相应的化学成分,利用 Cytoscape 软件构建化学成分-靶点-通路相互作用网络。如图 5 所示,黄色代表中药化学成分,红色代表对应的靶点,橙色代表信号通路。网络中有 78 个节点(其中化学成分对应节点 24 个、靶点对应节点 51 个、信号通路对应节点 3 个)和 246 条边。为了得到厚朴枳实大黄防治糖尿病的核心靶点和活性成分,随后采用 network analyze 对网络进行分析。表 4 结果表明,度值 (degree) 大于等于 5 的中药化合物,包

括 luteolin、naringenin、aloe-emodin、nobiletin、beta-sitosterol、tetramethoxyluteolin、eucalyptol,推测这些度值较高的化合物可能是厚朴枳实大黄发挥防治 DM 作用的关键活性成分。以中药化学成分-疾病共同靶点的度值为评价参数,度值越大,说明其对应的靶点在网络中越重要。表 5 结果表明,其中度值排名前 5 的核心靶点分别为 PTGS2、HSP90AA1、JUN、CASP3、AKT1,这些靶点可能是厚朴枳实大黄治疗 DM 的关键靶点。

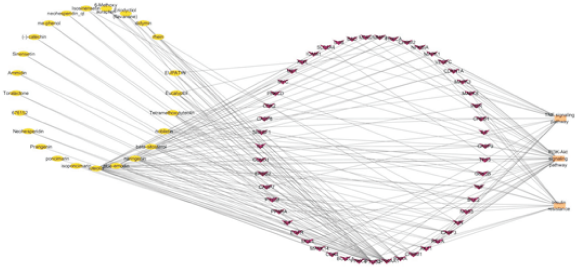


图 5 化学成分-靶点-通路网络图

表 4 关键化合物信息

Name	Degree	Betweenness Centrality	Closeness Centrality	Neighborhood Connectivity	Radiality	Stress
luteolin	29	0.24	0.52	4.31	0.97	13708
naringenin	11	0.06	0.42	6.91	0.96	3784
aloe-emodin	11	0.06	0.42	6.55	0.96	3926
nobiletin	10	0.03	0.42	7.60	0.96	2610
beta-sitosterol	10	0.04	0.41	7.60	0.96	2614
Tetramethoxyluteolin	7	0.03	0.40	8.86	0.95	1650
Eucalyptol	5	0.01	0.39	11.60	0.95	642

表 5 核心靶点信息

Targets	Degree	Betweenness Centrality	Closeness Centrality	Neighborhood Connectivity	Radiality	Stress
PTGS2	25	0.264	0.588	5.56	0.978	8380
HSP90AA1	20	0.163	0.546	7.2	0.974	6644
JUN	5	0.009	0.399	14.2	0.953	802
CASP3	5	0.010	0.421	16	0.957	1222
AKT1	5	0.016	0.450	21.4	0.962	2328
RXRA	5	0.010	0.376	10	0.948	430
RELA	5	0.016	0.450	21.4	0.962	2328
CHRM1	5	0.012	0.383	10.4	0.950	478
TNF	4	0.009	0.412	18.75	0.955	1190
CREB1	4	0.010	0.445	19.25	0.961	1390
IL6	4	0.011	0.445	24	0.961	1736
BCL2	4	0.006	0.399	15.75	0.953	636
CASP9	4	0.006	0.412	20.25	0.955	782

(续表5)

GSK3B	4	0.009	0.416	16.25	0.956	1026
NOS3	4	0.011	0.407	14.5	0.955	858
TP53	4	0.007	0.421	20.5	0.957	908

2.5 分子对接分析 为了进一步明确厚朴枳实大黄防治 DM 的活性成分与对应靶点之间的相互作用，选择化学成分-靶点-通路网络中度值最大的核心靶点：PTGS2，与度值大于 5 的化学成分进行分子对接。如

图 6 和表 6 所示，厚朴枳实大黄不同活性成分（aloe-emodin，beta-sitosterol，luteolin，naringenin，nobiletin）与 PTGS2 的结合能小于等于-8kcal/mol，表明这些化合物都具有调控 PTGS2 的潜在作用。

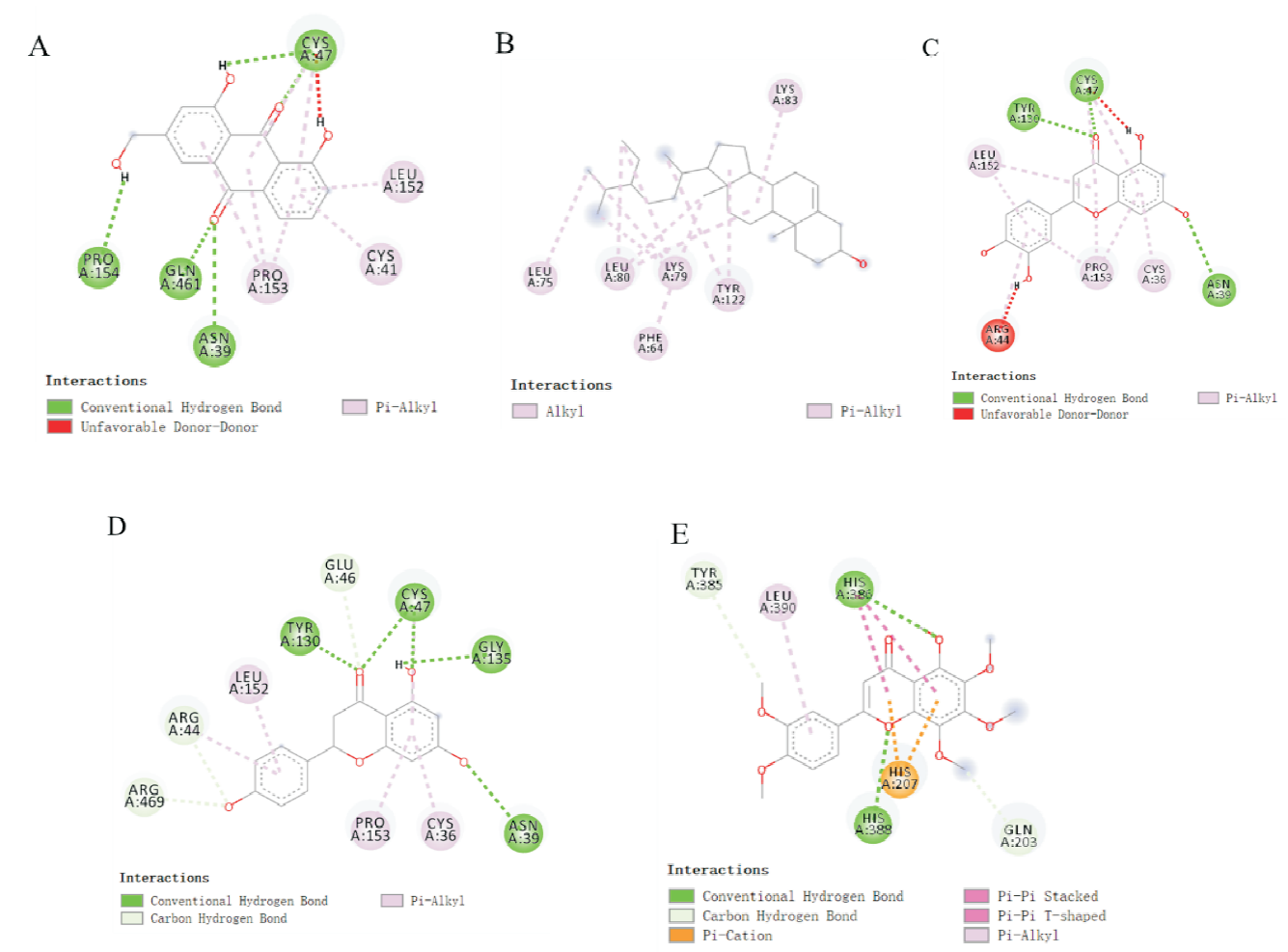


图 6 潜在活性成分和靶点的分子对接图

(A: aloe-emodin; B: beta-sitosterol; C: luteolin; D: naringenin; E: nobiletin)

表 6 潜在活性成分和靶点的结合能

No.	Compound	Energy (kcal/mol)
1	aloe-emodin	-8.8
2	beta-sitosterol	-8.0
3	luteolin	-9.1
4	naringenin	-8.6
5	nobiletin	-8.1

2.6 药材清除 DPPH 自由基的活性 根据网络药理学通路富集结果，厚朴枳实大黄复方组合可能通过

清除机体自由基，达到预防和治疗糖尿病的效果。由图 7 可见，DPPH 实验结果表明药材溶液能够剂量依赖性地清除 DPPH 自由基。药材溶液在1.75mg/mL 浓度时能够显著清除自由基（10%左右），28mg/mL 的药材溶液清除自由基的活性达到 90%以上。

2.7 药材对巨噬细胞炎症因子的影响 氧化应激和炎症异常激活被认为是糖尿病及其并发症的重要诱因，也是药物防治糖尿病的关键途径之一。如图 8，细胞活力实验表明，药材溶液在 14~224μg/mL 浓度范围，对 RAW 264.7 细胞没有毒性。如图 8 结果表

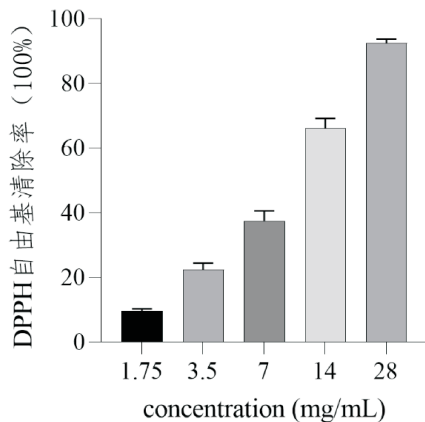


图7 不同浓度药材溶液的抗氧化活性

明,与对照组比较,LPS能够显著刺激细胞NO的释放。与LPS模型组比较,药材溶液在56 μ g/mL和112 μ g/mL能够显著抑制RAW 264.7巨噬细胞模型NO的释放。

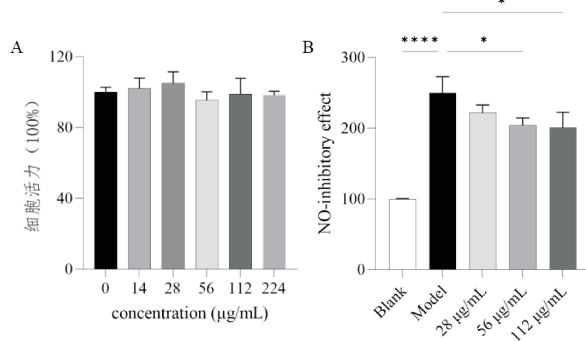


图8 不同浓度药材溶液的抗炎效果

3 讨论

DM是一种以血糖异常升高为特征的慢性代谢性疾病,长期持续的高血糖及相关的代谢紊乱常常加剧病情恶化,累及全身的组织器官,进而导致各种严重的并发症,严重影响患者的身心健康。目前,DM尚无根治的有效临床治疗药物,治疗方法主要是通过口服或者注射药物控制血糖水平为主。由于DM是一种慢性疾病,需要长期服用药物进行治疗,因此常常会伴随出现低血糖、体重增加、肾毒性等药物不良反应。因此,需要寻找安全有效且能够长期服用的治疗DM药物。相对于化学药物,中药具有毒副作用较小的优势。本研究以厚朴枳实大黄为研究对象,发掘其防治糖尿病的活性成分、潜在靶点以及相关的信号通路,以阐明其防治糖尿病的科学内涵,为进一步开发应用提供依据。

厚朴、枳实、大黄的中药组合是全小林教授临证辨治糖尿病的重要方剂^[9]。临床研究表明,厚朴三

物汤化裁能够显著改善糖尿病患者的血糖水平,并能降低炎症因子水平^[11]。有研究表明,大黄及其类方能够通过调控糖脂代谢、改善胰岛素敏感性、增加胰岛素分泌等防治糖尿病及其并发症^[10]。结合文献报道,本研究进一步明确了,厚朴枳实大黄通过不同有效成分治疗糖尿病的潜在作用机制。通过KEGG通路富集分析,可以从整体上了解厚朴枳实大黄防治糖尿病所涉及的信号通路。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指外周组织,如肝脏、骨骼肌、脂肪组织等,对胰岛素的敏感性不足,进而引起胰岛信号通路传导功能障碍,导致组织对葡萄糖的摄取和利用不足,从而导致机体血糖异常变化^[14]。胰岛素抵抗是2型糖尿病的病理生理机制之一,胰岛素介导的经典信号通路也是药物治疗糖尿病的关键通路之一^[15]。在正常的生理状况下,胰岛素会与胰岛素受体底物(IRS)结合,导致IRS被磷酸化并激活蛋白激酶B(Akt),从而促进葡萄糖在靶器官的摄取利用。病理条件下,这一途径发生失调,从而导致IRS/PI3K/Akt信号受阻^[16]。IRS/PI3K/Akt途径是经典的胰岛素信号通路,也是临床药物治疗糖尿病的常见途径之一。大量报道证实,慢性炎症是胰岛素抵抗的关键诱因。炎症反应能够引起不同组织的炎症因子水平异常,增加氧化应激,从而在胰岛素受体及其底物水平损伤胰岛素通路^[14,17]。肿瘤坏死因子(TNF)已被证明可以抑制IRS及其底物的磷酸化,并能够导致葡萄糖转运蛋白(GLUT4)的下调^[18]。据报道,TNF- α 还能够通过不同途径,如加速脂肪分解、抑制PPAR γ 功能等,引起机体糖脂代谢异常^[19]。经过本研究,我们发现厚朴枳实大黄的活性成分,可能通过干预TNF炎症信号通路,改善PI3K/Akt信号通路,从而改善胰岛素抵抗,达到防治DM的药理效应。

在此基础上,本研究随后通过网络分析,从厚朴枳实大黄中挖掘出七个潜在的活性成分:luteolin、naringenin、aloe-emodin、nobiletin、beta-sitosterol、tetramethoxyluteolin、eucalyptol,大多具有改善糖尿病及相关并发症的效果。体内外实验研究表明,木犀草素(luteolin)能够通过改善 β 细胞功能、缓解胰岛素抵抗、调节脂质代谢、抑制肠道糖脂吸收等防治糖尿病^[20]。柚皮素(naringenin)能够通过抑制STZ诱导的胰腺 β 细胞凋亡及胰岛炎症反应,改善胰岛功能障碍,从而改善STZ诱导的葡萄糖稳态受损^[21]。柚皮素还能够通过抑制组蛋白乙酰转移酶进而降低Txnip表达,从而保护糖尿病小鼠的胰腺 β 细胞^[22]。实验研究报道,桉油精(eucalyptol)能够改

善糖尿病动物的肾功能障碍、血脂异常、高血糖等，具有抗炎、抗氧化等作用，在改善糖尿病及其并发症方面具有潜在优势^[23]。结合这些文献报道，本研究进一步表明，所挖掘的厚朴枳实大黄中的活性成分可能通过干预不同靶点、通路，为改善糖尿病提供潜在靶向治疗。

为进一步明确厚朴枳实大黄活性成分的核心药效靶点，通过对“化学成分-靶点-通路”的网络进行分析，提取到 PTGS2、HSP90AA1、JUN、CASP3、AKT1 等药效靶点。前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 也称为环氧合酶-2 (COX-2)，是常见的抗炎靶点之一。有研究证实，抑制 PTGS2 活性，能够改善脂多糖 (LPS) 诱导的大鼠心肌葡萄糖代谢和胰岛素作用受损^[24]。研究表明，相较于正常志愿者，1 型或 2 型糖尿病患者的单核细胞中 COX-2 基因表达水平显著升高。高糖培养刺激，能够诱导体外单核细胞 COX-2 的激活，会进一步增强炎症反应，从而加剧糖尿病及并发症相关的单核细胞激活^[25]。靶向 COX-2，还能够改善肝损伤^[26]。借助分子对接技术，本研究随后预测了主要活性成分与核心靶点 PTGS2 的相互作用。进一步表明，厚朴枳实大黄可能通过多种活性成分调控 COX-2 的表达，改善糖尿病引起的炎症应激，从而发挥治疗糖尿病的潜在作用。随后，开展基于 DPPH 自由基清除和巨噬细胞炎症模型的实验，对厚朴枳实大黄的抗氧化活性和抗炎效果进行验证。实验结果表明，厚朴枳实大黄药材溶液能够剂量依赖性地清除自由基，同时能够显著性地抑制炎症细胞 NO 等炎症介质的释放。

综上所述，本研究通过网络药理学和分子对接技术，结合体外实验，对厚朴枳实大黄的中药组合防治 DM 进行了系统分析和实验验证，为其进一步开发应用提供了数据支撑。本研究证实了，厚朴枳实大黄多种活性成分通过靶向多个靶点，从而调控不同的信号通路，达到防治糖尿病的潜在作用机制。但是，由于糖尿病疾病生理病理的复杂性，以及中药复方化学成分和药效靶点相互作用的复杂关系。为了更加全面地阐明厚朴枳实大黄的临床应用价值，还需要开展更全面的体内外实验加以验证其具体药理效果以及具体信号靶点的变化。

参考文献

- [1] 李甜. 基于网络药理学的两色金鸡菊活性成分马里昔抗糖尿病的作用机制研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [2] Reusch JE, Manson JE. Management of type 2 diabetes in 2017: getting to goal [J]. JAMA, 2017, 317 (10), 1015-1016.
- [3] Goff DC Jr, Gerstein HC, Ginsberg HN, *et al.* Prevention of cardiovascular disease in persons with type 2 diabetes mellitus: current knowledge and rationale for the action to control cardiovascular risk in diabetes (ACCORD) trial [J]. The American journal of cardiology, 2017, 99 (12A): 4i-20i.
- [4] Mendis S, Davis S, Norrving B. Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease [J]. Stroke, 2015, 46 (5): e121-e122.
- [5] Carracher AM, Marathe PH, Close KL. International Diabetes Federation 2017 [J]. Journal of diabetes, 2018, 10 (5): 353-356.
- [6] 周仲英. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017.
- [7] 施岚尔, 聂课朝, 张文婧, 等. 基于网络药理学探讨大黄黄连泻心汤治疗 2 型糖尿病作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (18): 160-166.
- [8] 乔丽萍, 王昭博, 李梦甜, 等. 全小林教授态靶辨治糖尿病微血管病变的学术思想与病案举例 [J]. 吉林中医药, 2023, 43 (11): 1271-1275.
- [9] 郑玉娇, 张莉莉, 丁齐又, 等. 厚朴、枳实、生大黄治疗 2 型糖尿病胃肠实热证经验——全小林三味小方撷萃 [J]. 吉林中医药, 2020, 40 (07): 865-867.
- [10] 曾洁琼, 侯永春, 万海同, 等. 大黄及其类方应用于糖尿病的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42 (01): 82-86.
- [11] 陈玉, 贺红梅, 王齐有, 等. 厚朴三物汤化裁对脾胃壅滞证 2 型糖尿病患者降糖效果及炎症因子水平的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18 (07): 164-166.
- [12] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. 中草药, 2016, 47 (16): 2938-2942.
- [13] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform. 2014, 6 (1): 1-6.
- [14] 魏颖, 张嘉诚, 李晓娟, 等. 基于经典胰岛素传导及炎症信号通路的相互作用中药改善胰岛素抵抗作用研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24 (05): 2026-2034.
- [15] 王晓萌, 杨鹏, 李晓晨, 等. 基于 AMPK 信号通路改善 T2DM 胰岛素抵抗中药有效成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30 (07): 247-255.
- [16] Tong Y, Xu S, Huang L, *et al.* Obesity and insulin resistance: pathophysiology and treatment [J]. Drug discovery today, 2022, 27 (3): 822-830.
- [17] 蒲昕怡, 张林铃, 包斌. 炎症介导的肥胖与 2 型糖尿病关系及对应的膳食干预治疗研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44 (04): 472-479.
- [18] Skolnik EY, Marcsohn J. Inhibition of insulin receptor signaling by TNF: potential role in obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Cytokine & growth factor reviews, 1996, 7 (2): 161-173.
- [19] Moller, DE. Potential Role of TNF- α in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2000, 11 (6): 212-217.

- [20] 林烨, 柳丽, 孙静, 等. 木犀草素防治糖尿病的作用机制研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40 (7): 112-118.
- [21] Park S, Sim KS, Huang Y, *et al.* Naringenin and phytoestrogen 8-prenylnaringenin protect against islet dysfunction and inhibit apoptotic signaling in insulin-deficient diabetic mice [J]. *Molecules*, 2022, 27 (13): 4227.
- [22] Wang SW, Sheng H, Bai YF, *et al.* Inhibition of histone acetyltransferase by naringenin and hesperetin suppresses txnip expression and protects pancreatic β cells in diabetic mice [J]. *Phytomedicine*, 2021, 15 (88): 153454-153454.
- [23] Hoch, CC, Petry J, Griesbaum L, *et al.* 1, 8-cineole (eucalyptol): a versatile phytochemical with therapeutic applications across multiple diseases [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2023, 167: 115467-115467.
- [24] Alpert E, Grumzman A, Lardi-Studler B, *et al.* Cyclooxygenase-2 (PTGS2) inhibitors augment the rate of hexose transport in L6 Myotubes in an insulin-and AMPK α -independent manner [J]. *Diabetologia*, 2006, 49 (3): 562-570.
- [25] Shanmugam N, Gaw Gonzalo IT, Natarajan R, *et al.* Molecular mechanisms of high glucose-induced cyclooxygenase-2 expression in monocytes [J]. *Diabetes*, 2004, 53 (3): 795-802.
- [26] Chen C, Chen F, Gu L, *et al.* Discovery and validation of COX2 as a target of flavonoids in apocyni veneti folium: implications for the treatment of liver injury [J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2024, 326: 117919-117919.

(收稿日期 2024-07-30)