

三黄汤治疗 2 型糖尿病的分子机制研究

段玉红¹ 高 泓² 苏虹霞¹

(1 陕西中医药大学附属医院内分泌二科, 咸阳, 712000; 2 成都中医药大学附属医院科研科, 成都, 610075)

摘要 目的:探讨基于网络药理及分子对接明确三黄汤发挥降糖、降脂的分子机制。方法:选取 CTD 筛选 2 型糖尿病的靶标基因。基于网络药理学平台筛选三黄汤发挥作用的有效化学成分,通过 DAVID 6.8 对靶标基因进行分子功能分析,同时通过 STRING 进行基因相互作用分析,筛选 2 型糖尿病关键靶标基因,基于分子对接技术对关键靶标进行验证。并采用 Cytoscape 3.5.1 软件构建三黄汤化学成分-关键基因网络模型。结果:三黄汤有效化学成分 14 个,2 型糖尿病靶标基因 30 个。关键靶标基因 7 个(NFKB1A,BCL2,TNF,RELA,TGFB1,PPARG,HMOX1),分子对接发现三黄汤化学成分与 HMOX1,BCL2,PPAR- γ 有很好的结合作用。结论:初步阐释三黄汤降糖、降脂的分子机制,为进一步研究三黄汤治疗 2 型糖尿病靶标基因的选取提供理论指导。

关键词 三黄汤;化学成分;2 型糖尿病;分子对接;网络药理学;分子功能;网络模型;蛋白相互作用

Molecular Mechanism of Sanhuang Decoction in Treating Type 2 Diabetes Mellitus

Duan Yuhong¹, Gao Hong², Su Hongxia¹

(1 Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China;

2 Department of Scientific Research, Affiliated Hospital of Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract Objective: To explore the molecular mechanism of Sanhuang Decoction in treating type 2 diabetes mellitus (T2DM) based on network pharmacology and molecular docking. **Methods:** The effective chemical constituents of Sanhuang Decoction were screened based on the network pharmacology platform, and the target gene of type 2 diabetes was screened by CTD. The molecular function of potential targets were analyzed by DAVID 6.8. At the same time, STRING was used for gene interaction analysis to screen key target genes of type 2 diabetes, and the key targets were verified based on molecular docking technology. The Cytoscape 3.5.1 software was used to construct the network model of Sanhuang Decoction chemical composition-key gene. **Results:** There were 14 effective chemical composition of Sanhuang Decoction, 30 corresponding target genes of type 2 diabetes, 7 key target genes (NFKB1A, BCL2, TNF, RELA, TGFB1, PPARG, HMOX1) in Sanghuang Decoction. Through molecular docking, it was found that the chemical constituents of Sanhuang Decoction had a good binding effect with HMOX1, BCL2 and PPAR γ . **Conclusion:** The molecular mechanism of Sanhuang Decoction for reducing blood sugar and lowering lipid was preliminarily explained, which provided theoretical guidance for further study on the selection of Sanhuang Decoction for the treatment of type 2 diabetes target genes.

Key Words Sanhuang Decoction; Chemical composition; Type 2 diabetes mellitus; Molecular docking; Network pharmacology; Molecular function; Network model; Protein interaction

中图分类号: R289.5; R587.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.052

糖尿病严重威胁人类健康,发病率逐年上升,成为威胁人类健康的慢性疾病之一。中医认为糖尿病的发病机制比较复杂,而且也受自身体质、生活环境、饮食等因素的影响,使其病机十分复杂^[1-2]。在糖尿病的分类中,大约 95% 为 2 型糖尿病(T2DM),其为代谢异常综合征。主要由环境因素和遗传因素导致的复杂疾病。面对 T2DM 及其并发症给患者带来的危害,预防和治疗 T2DM 成为研究的热点^[3]。目前,随着中医药的不断发展,人们对中药的认识和信任,使糖尿病的治疗有了新的突破。大黄、黄连、知母等多种中药及复方都具有降糖作用,而且不良

反应少。其降糖机制具有多成分-多靶点-多通路等特点,影响糖代谢、胰岛素分泌、改善临床症状、修复胰岛 B 细胞等达到降糖效果^[4-6]。依据 T2DM 的发病机制,确立了清热解毒、泄毒、泻火的治疗方法,基于文献及经典方剂选取三黄汤进行研究。

三黄汤由黄连、黄芩、大黄组成,出自《伤寒论》泻心汤方。方中黄连、黄芩、大黄为典型寒性中药,黄连、黄芩具有清热燥湿、泻火解毒之功,两者相须为用,增强清热燥湿之功,共为君药。大黄具有清热泻火、泻下攻积、凉血解毒等功效。黄连、黄芩、大黄共用可清三焦之热,相辅相成。因此本研究选择三

基金项目:国家自然科学基金项目(81774304)

作者简介:段玉红(1977.02—),女,硕士研究生,副主任医师,研究方向:糖尿病及其并发症的中医药防治, E-mail: 56782039@qq.com

通信作者:高泓(1976.07—),女,中医内科博士,副主任医师,研究方向:中医药防治内分泌代谢性疾病的临床与实验研究, E-mail: cdgh76@163.com

黄汤辨治组方思路与降糖、降脂的研究思路相一致。已经有相关报道三黄汤对 T2DM 有较好的治疗作用^[7],但其发挥作用的主要化学成分及靶点并不明确,所以本研究基于网络药理学平台筛选三黄汤发挥作用的有效化学成分,采用 CTD 筛选 T2DM 的靶标基因。通过 DAVID 6.8 对靶标基因进行分子功能分析,同时通过 STRING 进行基因相互作用分析,筛选 T2DM 的关键靶标基因,基于分子对接技术对关键靶标进行验证。并采用 Cytoscape 3.5.1 软件构建三黄汤成分-关键基因网络模型。明确三黄汤中 14 种化学成分通过相互协同治疗 T2DM。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 三黄汤化学成分 基于中药系统药理学分析平台(TCMSP)在 Herb name 中进行查找黄连、黄芩、大黄的化学成分^[8-9]。基于 CTD (<http://ctd-base.org/>)筛选 T2DM 的靶标基因。参照 Lipinski’s 五规则,选择同时满足 $-2 \leq ALogP \leq 5$, $OB \geq 50\%$, $DL \geq 0.18$, $MW \leq 500$ 筛选三黄汤有效化学成分。

1.1.2 靶点分子功能 基于 DAVID6.8 生物信息学数据,该数据库可以对靶标蛋白或基因进行分子功能、生物过程、细胞成分等分析。

1.1.3 基因相互作用 STRING (<https://string-db.org/>),将 2 型糖尿病(Diabetes Mellitus, Type 2)中的 30 个基因输入到 STRING 中,对 30 个基因之间的相关性进行分析。

1.1.4 分子对接 iGEMDOCK 操作相对比较简单,而且对接范围比较广,也可以用于金属对接。

1.2 方法

1.2.1 三黄汤化学成分筛选 相关参数设置为口服生物利用度(Oral Bioavailability,OB) $\geq 50\%$,类药性(Drug Likeness,DL) ≥ 0.18 , $-2 \leq$ 脂水分分配系数(ALogP) ≤ 5 分子量(Molecular Weight,MW) ≤ 500 。在 TCMSP 中下载小分子 MOL2 结构,采用 Open Babel-2.4.1 构建成三维结构,对其加氢、加电荷。Open Babel 为开源软件,一般用来进行多种分子结构文件格式的相互转换,也可以计算结构描述参数。

1.2.2 T2DM 的靶点筛选 在 Diseases(疾病)中输入 2 型糖尿病(Diabetes Mellitus, Type 2)或 D003924。进行检索,选择参考数(Reference Count)大于等于 130 作为 T2DM 靶标基因。靶标基因包括:基因名称(Gene Symbol),基因 ID(Gene ID),疾病名称(Disease Name),疾病 ID(Disease ID),参考数(Reference Count)相关信息。

1.2.3 潜在靶点分子功能分析及构建分子功能-靶点网络模型 在线打开 DAVID Bioinformatics Resources 6.8,将基因 ID(Gene ID)输入到基因列表(Gene List)中,相关参数选择为:基因 ID(GENE_ID),List Type(列表类型):Gene List(基因列表)。最后选择提交列表(Submit List)。同时,基于 Cytoscape 3.5.1 软件^[10]建立分子功能-靶点网络模型。网络包括活性成分、靶点 2 类节点。若某一靶点为某化合物的潜在作用靶点,则以边(edge)相连。

1.2.4 基因相互作用分析 输入 30 个基因名称(Gene Symbol),来源(Organism):人源(Homo sapiens),进行相互作用分析。

1.2.5 关键靶点分子对接 小分子支持 PDB, MOL 和 MOL2 3 种格式。对接后的结果以氢键(H),电荷能(E)和范德瓦耳力(V)等作用统计,并将能量转换成单位 kcal/mol^[11-13]。将三黄汤和阳性药共 15 化学成分与关键靶标进行对接。相关参数设置:解的个数(Number of solution):2,子代(Generation):70,群体大小(generic evolutionary method):200。

2 结果

2.1 三黄汤有效化学成分 黄连活性成分 5 个,大黄活性成分 2 个,黄芩活性成分 7 个。见表 1。

表 1 三黄汤化学成分

药物和化合物	口服生物利用度	类药性	分子量	脂水分分配系数
黄连				
Magnograndiolide	63.71	0.19	266.37	1.18
Moupinamide	86.71	0.26	313.38	2.86
Palmatine	64.60	0.65	352.44	3.65
(R)-Canadine	55.37	0.77	339.42	3.40
Corchoroside A	104.95	0.78	404.55	1.34
大黄				
aloe-emodin	83.38	0.24	270.25	1.67
EUPATIN	50.80	0.41	360.34	1.99
黄芩				
(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	55.23	0.20	270.30	2.82
DIHYDROOROXYLIN	66.06	0.23	286.30	2.55
2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone	69.04	0.22	302.30	2.62
Skullcapflavone II	69.51	0.44	374.37	2.54
5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	74.24	0.26	302.30	2.28
Panicolin	76.26	0.29	314.31	2.57
NEOBAICALEIN	104.34	0.44	374.37	2.54

2.2 靶标基因 基于 CTD 数据库查找 T2DM 的潜在靶点 30 个。见表 2。

表 2 T2DM 的靶标信息

基因名称	基因 ID	疾病名称	疾病 ID	参考数
TNF	7124	T2DM	D003924	162
CASP3	836	T2DM	D003924	159
INS1	16333	T2DM	D003924	156
CAT	847	T2DM	D003924	155
IL6	3569	T2DM	D003924	155
BCL2	596	T2DM	D003924	152
IL1B	3553	T2DM	D003924	151
RELA	5970	T2DM	D003924	149
HMOX1	3162	T2DM	D003924	146
MAPK1	5594	T2DM	D003924	146
AKT1	207	T2DM	D003924	146
MAPK3	5595	T2DM	D003924	145
NOS2	4843	T2DM	D003924	144
INS	3630	T2DM	D003924	144
IFNG	3458	T2DM	D003924	142
BAX	581	T2DM	D003924	142
CYP1A1	1543	T2DM	D003924	141
TGFB1	7040	T2DM	D003924	139
NFE2L2	4780	T2DM	D003924	139
GSR	2936	T2DM	D003924	137
LEP	3952	T2DM	D003924	136
PPARG	5468	T2DM	D003924	135
CCL2	6347	T2DM	D003924	133
NOS3	4846	T2DM	D003924	132
ICAM1	3383	T2DM	D003924	131
PPARA	5465	T2DM	D003924	131
SERPINE1	5054	T2DM	D003924	131
FASN	2194	T2DM	D003924	131
MPO	4353	T2DM	D003924	131
NFKBIA	4792	T2DM	D003924	130

2.3 潜在靶标分子功能 30 个基因进行分子功能富集分析,选择靶标基因显著发挥作用的分子功能

($P < 0.05$),涉及的主要分子功能:亚铁血红素结合 (Heme Binding),酶结合 (Enzyme Binding),蛋白酶结合 (Protease Binding),转录因子结合 (Transcription Factor Binding),蛋白质结合 (Protein Binding) 等。即三黄汤治疗 T2DM 可能主要通过 8 项分子功能的相关靶标分子发挥治疗作用。采用 Cytoscape 3.5.1 软件建立分子功能-靶点网络模型,发现 NFKB1A, BCL2, TNF, RELA, TGFB1, PPARG, HMOX1 7 个基因涉及到 4 项及 4 项以上的分子功能。发挥重要作用,为主要靶标基因,将进一步进行分子对接分析。见图 1。

2.4 潜在靶标相互作用 30 个基因之间的相互作用关系采用 STRING 软件进行分析,获取衡量网络的拓扑参数。每一个节点代表一个基因,基因名称位于节点右上方,边 (edge) 表示基因和基因之间的功能性关联,其颜色不同代表不同的作用关系。相关参数为:节点数 (Number of Nodes): 29, 边数 (Number of Edges): 304, 平均节点度 (Average Node Degree): 21, avg. 局部聚类系数 (Avg. local Clustering Coefficient): 0.873, 预期边缘数 (Expected Number of Edges): 79, PPI 富集 p 值 (PPI Enrichment p-value): $< 1.0e-16$ 。相互作用结果和分子功能分析结果相一致, NFKB1A, BCL2, TNF, RELA, TGFB1, PPARG, HMOX1 7 个基因的 degree ≥ 15 。整个网络以 NFKB1A, BCL2, TNF, RELA, TGFB1, PPARG, HMOX1 等靶标基因为中心进行相关联,去掉关键基因,整个网络涣散。见图 2。

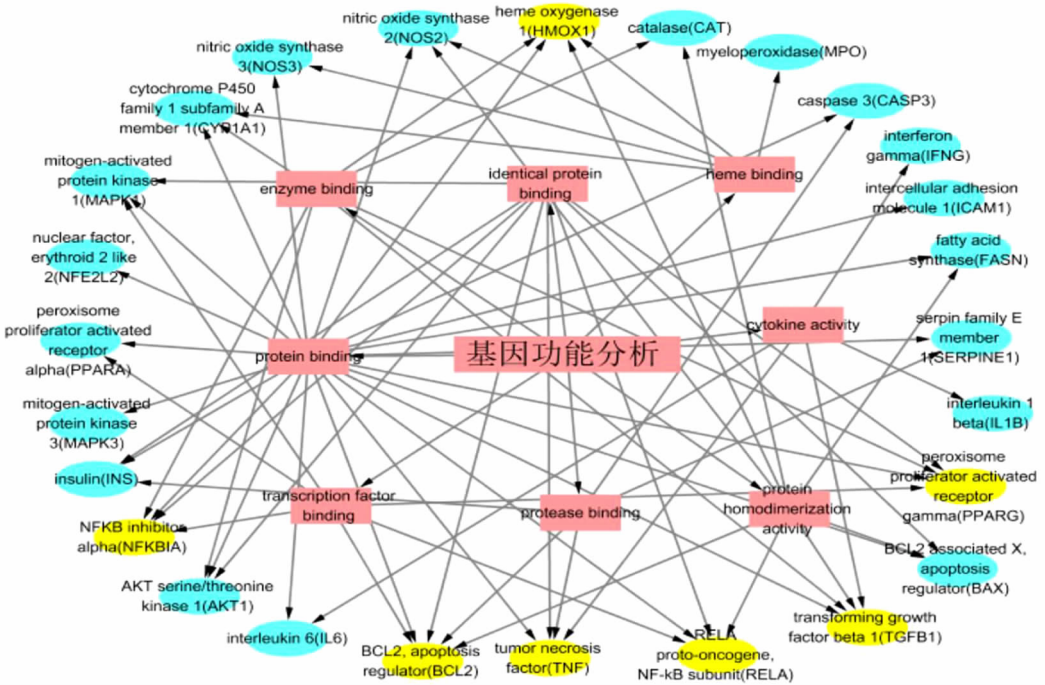


图 1 分子功能-靶标作用网络

注:红色节点表示分子功能,蓝色节点表示靶标,黄色节点表示 degree ≥ 4 的关键靶标

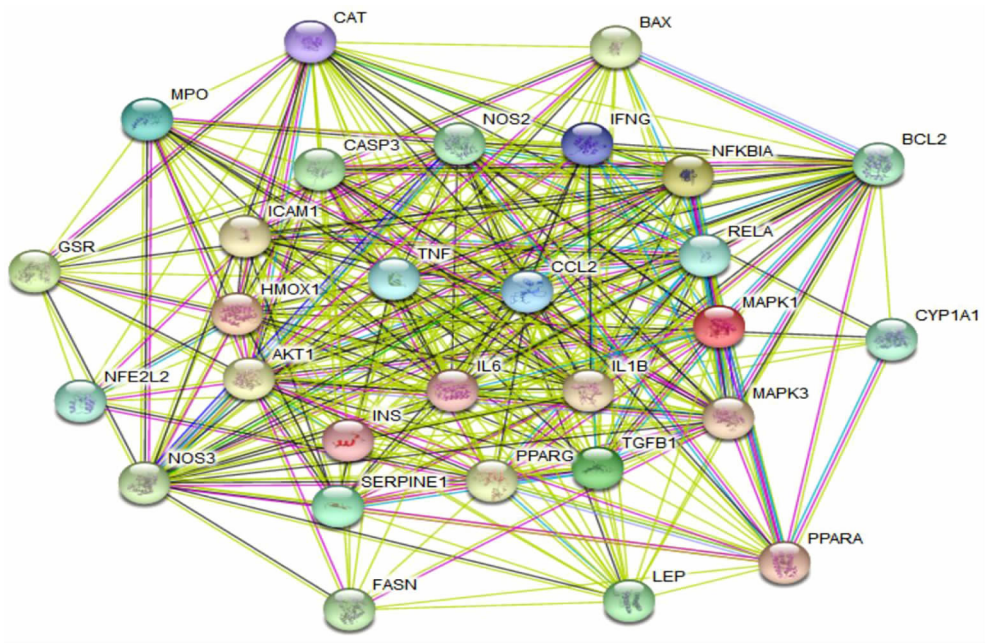


图 2 基因相互作用

注:红线:融合的证据;绿线:共同相邻蛋白;蓝线:证据存在;紫色:实验室数据;黄线:文献检索;淡蓝色:相关性联系;黑色:共表达

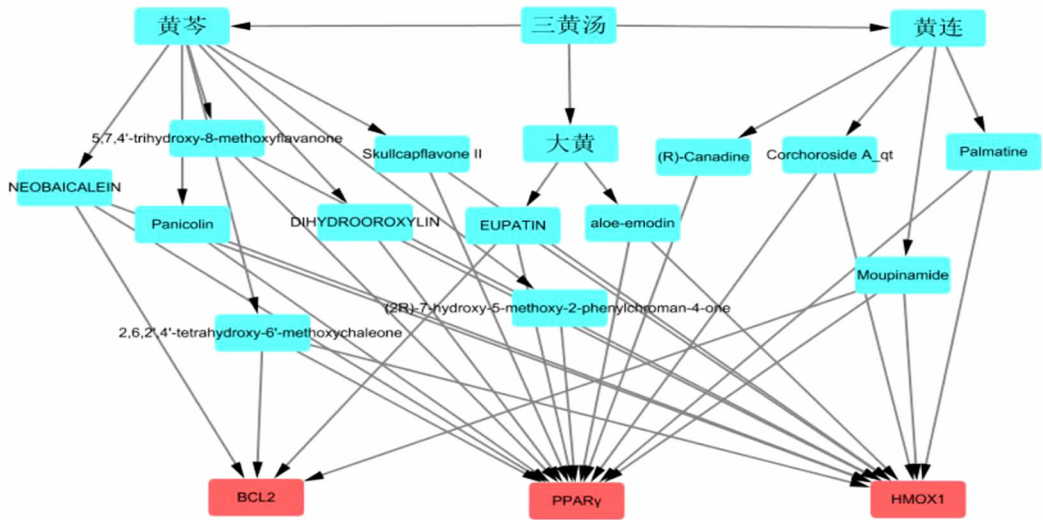


图 3 三黄汤多成分-关键靶点网络模型

注:红色-关键靶标,蓝色-化学成分

2.5 靶标验证 选择 T2DM 关键靶标 (BCL2, PPARG, HMOX1) 基因与三黄汤 14 个有效化学成分进行分子对接。靶标基因的三维结构下载于 PDB 数据库。分别为 BCL2 (4MAN), PPARG (3U9Q), HMOX1 (1N45)。表 3 列出三黄汤化学成分与关键靶标对接后的数值。评价标准以结合能 (affinity) 为主,结合能越小越稳定。为了使结果更清晰,构建了化学成分-靶点网络图 (图 3),其中 13 个化学成分与 PPAR 结合,(R)-Canadine 为结合能量最低;4 个化学成分与 BCL2 结合,NEOBAICALEIN 为结合能量最低;14 个化学成分与 HMOX1 结合,NEOBAICALEIN 为结合能量最低。

3 讨论

T2DM 的发病率逐年上升,与肥胖、血脂异常、代谢异常等诸多疾病关系密切。影响人们的身心健康,所以预防和治疗 T2DM 当今难题^[14]。目前,主要采用调节胰岛素、控制血糖等进行治疗,但是往往会出现一些不良反应及并发症^[15]。三黄汤 (黄连、大黄、黄芩) 为临床清热燥湿常用方剂,药理作用广泛,人们对三黄汤药理作用机制研究逐渐深入。而三黄汤对糖尿病的治疗临床上有较好的效果,但是机制不明确,本研究初步筛选 T2DM 的关键靶标,对其关键靶标进行深入研究。对接结果发现三黄汤中的 14 个有效化学成分,13 个化学成分与 PPAR 结

合,4 个化学成分与 BCL2 结合,14 个化学成分与 HMOX1 结合。因此,三黄汤中 14 种化学成分通过相互协同治疗 T2DM。Bcl2 (BCL2, Apoptosis Regulator)是主要的细胞凋亡调控基因。已经有研究表明,与空白对照组比较,模型组(2 型糖尿病)大鼠胰腺 Bcl2 基因表达降低^[16]。葡萄糖与胰岛 B 细胞相互影响,长时间处于高葡萄糖状态,导致 B 细胞的凋亡,其凋亡与 BCL 基因家族中的平衡相关;血红素加氧酶 1(HMOX1)为降解血红素的限速酶^[17-18]。主要在细胞增殖、氧化、凋亡等方面发挥重要作用,已经有报道 HMOX1 对脂肪细胞的分化有调节作用。过氧化物酶体增植物激活受体- γ (PPAR- γ)主要调节脂肪的生成^[19]。HMOX1 和 PPAR- γ 相互影响,PPAR- γ 的异位表达影响脂肪细胞分化,HMOX1 表达不断降低。BCL2,PPARG,HMOX1 在 2 型糖尿病的发生、发展中起到了关键作用。

表 3 三黄汤与关键靶标对接结果 (kcal/mol)

三黄汤和化合物	HMOX1	BCL2	PPAR- γ
阳性药			
二甲双胍	-65	-72	-67
黄连			
Magnograndiolide	-89	-66	-87
Moupinamide	-90	-92	-93
Palmatine	-95	-85	-96
(R)-Canadine	-89	-79	-112
Corchoroside A _{qt}	-94	-87	-94
大黄			
aloe-emodin	-93	-79	-97
EUPATIN	-100	-95	-110
黄芩			
(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	-85	-83	-94
DIHYDROOROXYLIN	-93	-89	-105
2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone	-95	-91	-92
Skullcapflavone II	-94	-84	-105
5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	-95	-83	-93
Panicolin	-103	-85	-94
NEOBAICALEIN	-111	-97	-96

参考文献

[1]何慧晶,曹立春,付娟. 2 型糖尿病患者颈动脉斑块形成的危险因素分析[J]. 西部中医药,2017,30(10):57-60.

[2]张家林,裴瑞霞. 银花蒲公英颗粒治疗 2 型糖尿病合并高尿酸血症疗效观察[J]. 西部中医药,2014,27(1):106-108.

[3]柳红芳,全小林,王庆国. 中医药防治 2 型糖尿病胰岛素抵抗的思路和方法[J]. 北京中医药大学学报,2002,25(5):56-59.

[4]马红,王海红,蒲小庆,等. 中西医结合治疗 2 型糖尿病 68 例[J]. 西部中医药,2014,27(8):95.

[5]井中旭,滕林,周海纯,等. 五味子多糖对胰岛素抵抗大鼠脂代谢的影响[J]. 中医药信息,2015,32(2):14-15.

[6]李淑贞,杨晓晖,崔茂香,等. 通络玉液汤对 2 型糖尿病心脏病大鼠脂代谢及氧化指标的影响[J]. 西部中医药,2016,29(6):4-6.

[7]叶丽芳,王旭,尚文斌,等. 三黄汤对肥胖 2 型糖尿病胰岛素抵抗和炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):289-291.

[8]张文娟,王永华. 系统药理学原理、方法及在中医药中的应用[J]. 世界中医药,2015,10(2):280-286.

[9]Ru J, Peng L, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014,6(13):1-6.

[10]唐羽,李敏. 基于 Cytoscape 的蛋白质网络可视化聚类分析插件[J]. 生物信息学,2014,12(1):38-45.

[11]陈海燕,李秉佳,史胜楠. 虚拟筛选预测固本止咳膏的作用靶标[J]. 中成药,2014,36(3):559-561.

[12]陈亮,王鑫,冯心池,等. 分子对接技术筛选石菖蒲中 γ -氨基丁酸转氨酶抑制成分[J]. 沈阳药科大学学报,2015,32(3):204-207,244.

[13]林桂源,姚华聪,郑细娜,等. 基于分子对接技术的常用降糖中药有效成分虚拟筛选[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):202-206.

[14]Bansal D, Bhansali A, Kapil G, et al. Type 2 diabetes and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2013,16(2):151-158, S1.

[15]朱友文,宋灿,霍海如,等. 中药在 2 型糖尿病中的治疗和胰岛素抵抗中的研究进展[J]. 世界中医药,2015,10(1):135-137.

[16]王立新,王元松,田风胜,等. 复荣通脉胶囊对糖尿病大鼠坐骨神经 Bax 及 Bcl-2 表达的影响[J]. 中国医药导报,2016,13(12):24-27,封 4.

[17]Vanella L, Sodhi K, Kim DH, et al. Increased heme-oxygenase 1 expression in mesenchymal stem cell-derived adipocytes decreases differentiation and lipid accumulation via upregulation of the canonical Wnt signaling cascade[J]. Stem Cell Res Ther, 2013,4(2):28.

[18]Dulak J, Jozkowicz A. Novel faces of heme oxygenase-1: mechanisms and therapeutic potentials[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(11):1673-1676.

[19]肖音,肖斌,赵娜,等. 分子对接技术筛选黑沙蒿中黄酮类化合物的 PPAR- γ 激动活性成分[J]. 中国药房,2018,29(1):58-61.

(2018-02-22 收稿 责任编辑:杨觉雄)