

·中医药信息学·

基于网络药理学和 SPR 检测探讨生脉散治疗 2 型糖尿病合并冠心病的作用机制

陈沫良¹, 王晓珍², 许光辉^{1,2}, 李知瑾¹

(1.厦门市健康医疗大数据中心/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.福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122)

摘要:目的 探讨生脉散治疗 2 型糖尿病(T2DM)合并冠心病(CHD)的作用机制。方法 应用 TCMS、BATMAN-TCM 和 Uniprot 数据库检索生脉散药效成分及对应靶点, 应用 Genecards、Drugbank 和 TTD 数据库检索 T2DM 和 CHD 靶点基因, 运用 Venny2.1.0 工具得到疾病交集靶点, 采用 Cytoscape3.9.1 软件, 建立药效物质-成分-靶点的网络图谱, 通过 STRING 构建 PPI 网络, 并获取排名前 10 的关键靶点基因, 通过 R 语言 ClusterProfiler 包进行 GO 功能和 KEGG 通路分析, 使用 Discovery Studio 软件完成分子对接, 最后完成 SPR 检测实验验证。结果 获得生脉散 207 个药效成分, 对应 1643 个相关作用靶点; T2DM 疾病靶点 2663 个, CHD 疾病靶点 1206 个, 疾病-药物交集靶点 337 个; 最终获得 3 个关键靶点: AKT1、CTNNB1、ESR1; GO 和 KEGG 分析发现涉及的生物学通路主要有 MAPK、AGE-RAGE、TNF 等信号通路; 将上述得到的结果进行分子对接, 并选取 AKT1 蛋白和相关有效成分完成表面等离子共振 SPR 结合检测, 结果显示均有较好活性。结论 生脉散可能从多成分、多靶点和多途径调控糖脂代谢、改善氧化应激等方面来发挥治疗 T2DM 合并 CHD 的作用。

关键词: 2 型糖尿病; 冠心病; 生脉散; 网络药理学; SPR 检测

中图分类号: R259

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2024.20.001

文章编号: 1006-1959(2024)20-0001-10

Mechanism of Shengmaisan in Treating Type 2 Diabetes Mellitus with Coronary Heart Disease Based on Network Pharmacology and SPR Assay

CHEN Moliang¹, WANG Xiaozhen², XU Guanghui^{1,2}, LI Zhijin¹

(1.Xiamen Health and Medical Big Data Center/Xiamen Medicine Research Institute/Xiamen Key Laboratory of Natural Medicine
Research and Development, Xiamen 361008, Fujian, China;

2.College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of Shengmaisan on the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM) with coronary heart disease (CHD). Methods The TCMS, BATMAN-TCM and Uniprot databases were used to retrieve the active components and corresponding targets of Shengmaisan. The Genecards, Drugbank and TTD databases were used to retrieve the target genes of T2DM and CHD. The Venny2.1.0 tool was used to obtain the disease intersection targets. Cytoscape 3.9.1 software was used to establish a network map of active substances-components-targets. The PPI network was constructed by STRING, and the top 10 key target genes were obtained. GO function and KEGG pathway analysis were performed through the R voice ClusterProfiler package, and molecular docking was completed using Discovery Studio software. Finally, the SPR assay experiment was completed. Results There were 207 effective components in Shengmai Powder, corresponding to 1643 related targets. There were 2663 T2DM disease targets, 1206 CHD disease targets, and 337 disease-drug intersection targets. Finally, three key targets were obtained: AKT1, CTNNB1, ESR1; GO and KEGG analysis found that the biological pathways involved mainly include MAPK, AGE-RAGE, TNF and other signaling pathways; the above results were subjected to molecular docking, and AKT1 protein and related active ingredients were selected to complete the surface plasmon resonance SPR binding detection, and the binding results showed that all of them had good activity. Conclusion Shengmaisan may play a role in the treatment of T2DM complicated with CHD from the aspects of multi-component, multi-target and multi-channel regulation of glucose and lipid metabolism, improvement of oxidative stress, etc.

Key words: Type 2 diabetes mellitus; Coronary heart disease; Shengmaisan; Network pharmacology; SPR assay

基金项目: 厦门市医疗卫生指导性项目(编号: 3502Z20214ZD1304)

作者简介: 陈沫良(1988.8-), 男, 湖南武冈人, 博士, 助理研究员, 主要从事计算生物、中医药数据挖掘研究

糖尿病(diabetes mellitus, DM)已经成为继肿瘤之后对人类生命健康造成严重威胁的慢性非传染病,预计到 2040 年,全球将约有 6.4 亿糖尿病患者,而在我国目前糖尿病发病率高达 12%,给患者和家庭带来巨大的医疗负担^[1-3]。DM 主要是由胰岛素抵抗或胰岛素分泌不足引起的,而 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是糖尿病的主要类型,占糖尿病患者的 90%~95%,是目前全球流行的疾病之一,发病率越来越高^[4]。且 T2DM 作为心脏、血管、眼睛、肾脏和神经系统等疾病的危险因素,不可避免地增加死亡风险和社会医疗负担。研究表明^[5,6],T2DM 患者发生心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的风险是非 T2DM 患者的 2~6 倍,这表明了 T2DM 与心血管疾病之间存在强关联。心血管疾病主要包括冠心病(coronary heart disease, CHD)、脑卒中、心力衰竭等,CHD 是指心脏冠状动脉血管变得狭窄或阻塞,即出现了动脉粥样硬化病变,导致心肌缺血,从而引起心绞痛、心肌梗死等症状的一种心血管疾病,是我国居民死亡的主要病因之一^[7]。DM 患者的血糖水平与 CHD 密切相关,长期患 DM 的患者会对包括心脏在内的多个器官和系统造成伤害,引发大血管和微血管并发症^[8-11]。目前,两种疾病均无完全根治之法,仅能控制病情。研究表明^[12,13],患有 T2DM 的患者合并 CHD 的风险是非患有 T2DM 的患者的 2~4 倍,因此 T2DM 的死亡率大幅增加。现代临床西医主要使用降血糖药物、降压药、改善血脂和动脉介入等手段来治疗 T2DM 合并 CHD^[14],但这些方法普遍存在药物依赖性强、副作用等问题,导致临床疗效不佳。近年来,中医药在治疗 T2DM、CHD 等方面取得了重大进展,在这类疾病上以其整体观、辨证论治、中药多靶点的作用,体现其独特的治疗优势,可达到标本兼治的效果,显示出良好的前景。生脉散是由人参、麦冬、五味子三味中药组成的传统中医方剂。现代临床研究表明^[15-17],生脉散具有多种功能,包括扩张冠脉和增强心肌收缩力、提高心肌耐氧量等能力,可以用于治疗 CHD、心绞痛等心血管疾病。此外,生脉散还具有降血糖、调脂、改善血管微循环等作用,在 DM、高血脂等疾病的治疗中也有较好的效果^[18,19],其临床应用价值广泛。但由于中药复方各药物之间的复杂性和多样性,中药及复方治疗疾病的具体作用机制尚不明确。近年来,由于疾病、药物有关的数据不断增多,以及计算机技术、分析软件的

不断改进,使得网络药理学在中医药研究领域的应用日益广泛,并逐渐成为中医药研究热点^[20,21]。利用网络药理学技术对生脉散治疗疾病的具体作用机制进行的研究已经越来越多,其在 T2DM、CHD 等领域也已取得了一定成果^[22-25],但目前生脉散同时治疗 T2DM 和 CHD 两种紧密关联的疾病研究较少^[26,27]。本研究基于网络药理学和 SPR 实验检测,探索生脉散治疗 T2DM 合并 CHD 的作用机制,以期为其在临床上的运用提供理论依据,提高其在临床上的应用价值,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 网络药理学方法

1.1.1 筛选生脉散有效成分及靶点预测 在 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)和 BAT-MAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/bat-man-tcm/>)筛选生脉散活性成分,其中 TCMSP 数据库设置筛选参数口服利用度(oral bioavailability, OB)≥30%和生物利用度(drug-likeness, DL)≥0.18。BATMAN-TCM 数据库设置筛选参数未 Score cutoff≥20 及 P-value cutoff<0.05。将两个数据库所得到的生脉散活性成分以及相关蛋白靶点合并去重。使用 Uniprot 数据库将蛋白靶点名称标准化。

1.1.2 糖尿病和冠心病疾病靶点预测 根据 T2DM 和 CHD 两类疾病,利用关键词“type 2 diabetes mellitus”和“coronary heart disease”在 Genecards(<https://www.genecards.org/ds>)、Drugbank(<https://go.Drugbank.com/>)和 TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)数据库中检索,将结果合并去重获得 T2DM 和 CHD 疾病相关靶点。其中,在 Genecards 数据库中设置相关性得分≥20 进行筛选。利用 Venny2.1.0 在线绘图工具,将已获得的生脉散药物靶点与 T2DM、CHD 疾病靶点绘制韦恩图,取交集获得生脉散干预 T2DM 合并 CHD 的潜在靶点基因。

1.1.3 构建药物-成分-靶点网络图 使用 Cytoscape 3.9.1 软件(<http://www.cytoscape.org>),构建“药物-活性成分-共有靶点基因”关系网络。该网络中包含药物、成分和靶点节点,通过边表示药物-成分、成分-靶点之间的相互关系,并基于网节点络度值进行筛选前 10 个的活性成分节点。度值表示网络中节点连线的数量,节点度值越大,说明其参与作用越强。

1.1.4 构建蛋白质互作 PPI 网络 将筛选的生脉散与 T2DM 合并 CHD 的共有靶点基因导入 STRING 数

数据库(<https://www.string-db.org/>),选择“Multiple Proteins”,且物种选定为“Homo sapiens”,设置置信度分数(highest confidence)大于 0.9,并去除游离节点,其余参数均为默认值,构建蛋白质相互作用 PPI 网络图,并以此 PPI 网络为基础,根据网络中节点度值得得排名前 10 的关键靶点基因;另外,利用 Cytoscape 3.9.1 软件插件 cytohubba,根据最大集团中心度(maximal clique centrality,MCC)值筛选出前 10 的靶点基因节点,两者取交集后得到潜在治疗 T2DM 合并 CHD 的关键靶点基因。

1.1.5 GO 富集分析和 KEGG 通路富集 利用 R 语言中 ClusterProfiler 包对生脉散与 T2DM 合并 CHD 的共有核心靶点基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,设定 P 值 <0.05 。GO 分析主要包括生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF),以此来分析靶点主要是通过何种信号通路和生物功能调控 T2DM 和 CHD。

1.1.6 分子对接 根据上述分析结果,筛选得到核心成分及靶点基因,将药效成分作为配体,核心靶点作为对接位点完成分子对接。分子对接主要分为 3 个步骤:①准备靶点蛋白结构:利用蛋白质 PDB 结构数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载核心靶点蛋白 PDB 文件,再运用 Discovery Studio 软件将蛋白去除结晶水、加氢,并对蛋白进行几何结构优化。②准备小分子化合物:小分子化合物的二维结构从 TCMSP 数据库、PubChem 数据库中获得,TCMSP 数据库可直接获得化合物的 mol2 文件,但由于部分化合物 TCMSP 数据库中没有收录,需从 PubChem 数据库中获得化合物的 sdf 文件,再通过 OpenBabel 软件转换成 mol2 文件,最后再利用 Discovery Studio 软件对核心化合物成分进行加氢、能量最低化等优化处理。③分子对接:采用 Discovery Studio 软件中的 Dock Ligands(LibDock)进行分子对接,以验证上述流程得到的结论。

1.2 SPR 亲和力检测实验步骤和方法

1.2.1 材料和仪器 样品:通过分子对接结果,选择结合效果较好的蛋白和小分子化合物进行 SPR 亲和

力检测实验。材料仪器:CM5 芯片(厂家:Cytiva,货号:BR100530,批号:10329008),氨基偶联试剂盒(厂家:Cytiva,货号:BR100050,批号:31206),10 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH4.0)(厂家:Cytiva,货号:BR100349,批号:31483),自制的 PBS+(10×)pH7.4, DMSO (厂家:Sigma,货号:D4540-1L,批号:BC-CG1271)。

1.2.2 实验方法 ①试剂准备:配制 PBS(10×)缓冲液母液(20 mmol/L KH_2PO_4 ,1.37 mol/L NaCl,100 mmol/L Na_2HPO_4 ,27 mmol/L KCl,pH7.4),用超纯水将 PBS 母液稀释 10 倍,pH 调节至 7.4,作为运行缓冲液(2 mmol/L KH_2PO_4 ,137 mmol/L NaCl,10 mmol/L Na_2HPO_4 ,2.7 mmol/L KCl,pH7.4),0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜过滤后使用。氨基偶联试剂盒,包含:115 mg N-羧基丁二酰亚胺(NHS),750 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 10.5 ml 1 mol/L 乙醇胺(pH 8.5)。将每管 EDC 和 NHS 分别加入 10 ml 去离子水,分装保存到 -18°C 至更低温度,并在 2 个月内用完。②芯片准备:将配体蛋白以 10 mmol/L 醋酸钠(pH 4.0)稀释至 11.7 $\mu\text{g/ml}$ 。首先,在 10 $\mu\text{l/min}$ 的流速下,用 400 mmol/L EDC 和 100 mmol/L NHS 激活 CM5 芯片表面 480 s。接下来,以 10 $\mu\text{l/min}$ 的流速在实验通道(Fc)中多次加入 11.7 $\mu\text{g/ml}$ 的配体蛋白,固定量约 1000 RU。最后,使用 1 mol/L 乙醇胺将芯片进行封闭,封闭时间为 480 s,流速为 10 $\mu\text{l/min}$ 。参比通道(Fc1)与实验通道(Fc2)进行相同的操作。③亲和力测定:①配制 5% DMSO-PBS 作为运行缓冲液 2 (2 mmol/L KH_2PO_4 ,137 mmol/L NaCl,10 mmol/L Na_2HPO_4 ,2.7 mmol/L KCl,5% DMSO,pH 7.4);②配制不同 DMSO 浓度的溶剂校准品,见表 1;③先用 DMSO 将分析物溶解成 10 mmol/L 母液,再使用 PBS (10×)及超纯水将分析物配制成 500 $\mu\text{mol/L}$,缓冲液组分与运行缓冲液 2 保持一致(2 mmol/L KH_2PO_4 ,137 mmol/L NaCl,10 mmol/L Na_2HPO_4 ,27 mmol/L KCl,5% DMSO,pH7.4),将稀释后的分析物,在 60 s 内,以 30 $\mu\text{l/min}$ 的流速分别注入实验通道(Fc2)与参比通道(Fc1),并在 60 s 内进行解离,结合解离步骤均在运行缓冲液 2 中进行。

表 1 不同 DMSO 浓度的溶剂校准品配制

Buffer/Vial	1	2	3	4	5	6	7
4.5%DMSO(μl)	0	200	400	600	800	1000	1200
5.8%DMSO(μl)	1400	1200	1000	800	600	400	200

2 结果

2.1 生脉散潜在活性成分和靶点筛选 两个数据库有效成分并集后去重,其中人参 122 个、五味子 76 个、麦冬 18 个,最终三味药材合并去重,得到生脉散的有效成分共 207 个,有效成分对应的靶点基因 1643 个,见表 2。

2.2 疾病靶点筛选 通过 Genecards、Drugbank 和

TTD 三个数据库中筛选到的结果合并再删除重复靶点,得到 T2DM 相关靶点 2663 个,CHD 相关靶点 1206 个,见表 3。将生脉散有效成分的 1643 个作用靶点与 T2DM、CHD 相关靶点取交集绘制韦恩图,得到共有交集靶点基因 337 个,可认为是生脉散治疗 T2DM 合并 CHD 的潜在靶标基因集,见图 1。

表 2 生脉散中药-成分-靶点信息统计表

药物名称	TCMSP 有效 成分数量	预测靶点 个数	BATMAN 有效 成分数量	预测靶点 个数	并集成分 (去重后)	并集靶点 (去重后)
人参	17	89	112	1337	122	1372
五味子	8	17	69	936	76	942
麦冬	0	0	18	243	18	243
生脉散	去重后成分 207 个、靶点 1643 个					

表 3 糖尿病和冠心病疾病靶点信息统计表

疾病名称	Genecards 疾病靶点个数	Drugbank 疾病靶点个数	TTD 疾病靶点个数	合并三个数据库 结果并去重
T2DM	2591	162	92	2663
CHD	1177	35	9	1206

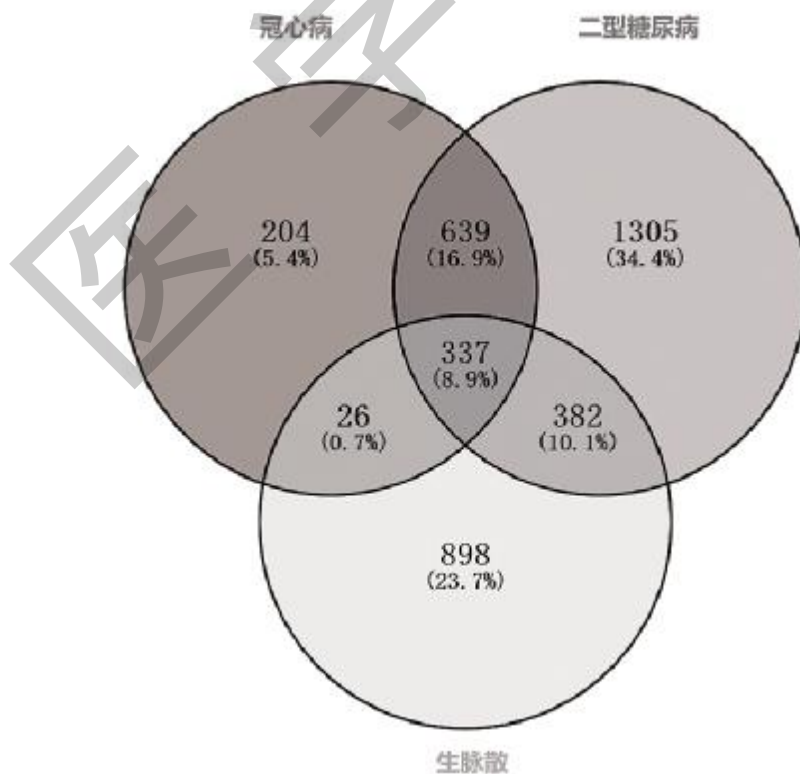
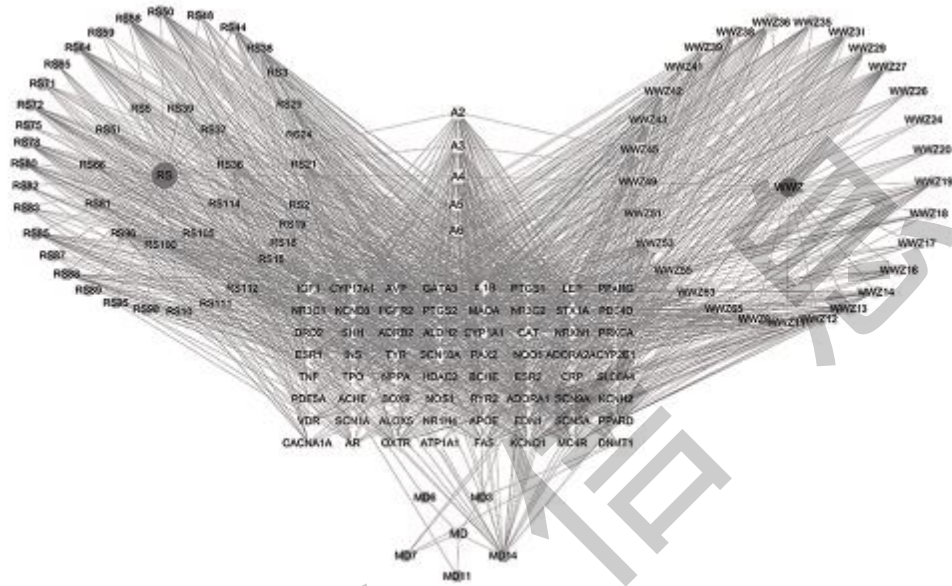


图 1 生脉散、T2DM、CHD 的共同靶点韦恩图

2.3 构建药物-成分-靶点网络图 将所获得的生脉散有效成分、对应疾病靶点基因导入 Cytoscape3.9.1 软件中,得到“药物-活性成分-作用靶点”网络,网络共有 546 个节点(3 个药物节点、106 个成分节点和 337 个交集基因节点)和 2464 条边,其中节点平均度值为 9.02。通过筛选网络中节点度值大于平均度值的节点,最终绘制“药物-活性成分-作用靶点”

网络图,见图 2。根据网络中节点度值,筛选排名前 10 的生脉散有效成分,分别是维生素 B₁(Vitamin B₁)、长叶烯(Longifolene)、月桂烯(Myrcene)、牛磺酸素(Tauremisin)、五味子酚[(+)-Gomisin K3]、去氧哈林通碱(Deoxyharringtonine)、麦芽糖(Maltose)、山奈酚(Kaempferol)、20(R)-人参皂苷 Rg3[20(R)-Ginsenoside Rg3]、戈米辛 L2[(-)-Gomisin L2],见表 4。



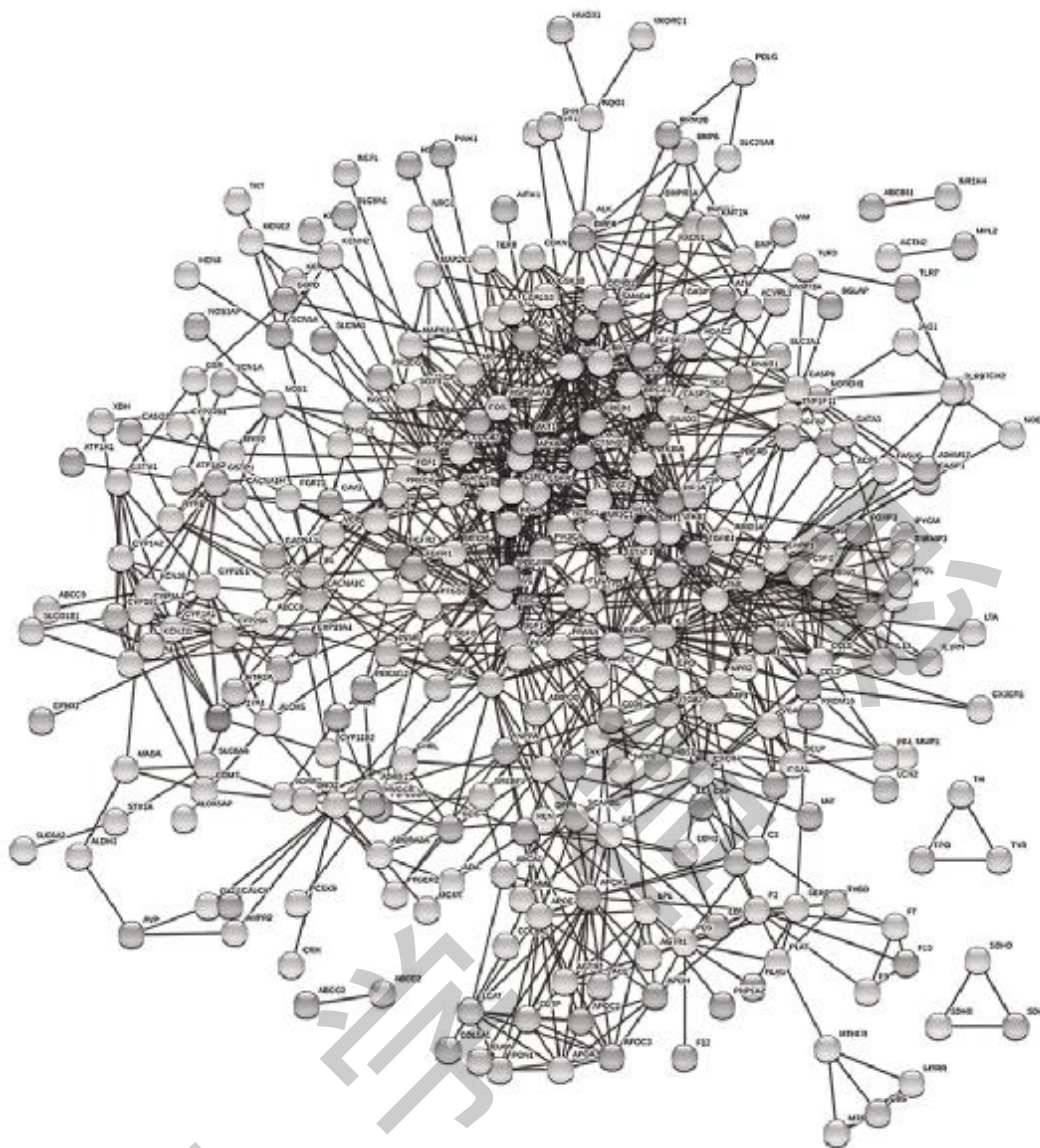


图 3 生脉散对 T2DM-CHD 作用靶点的 PPI 网络

表 5 不同方法获得的 Top10 关键靶点

MCC	靶点
MYC	AKT1
CTNNB1	CTNNB1
HIF1A	HSP90AA1
ESR1	CAV1
IL6	FOS
AKT1	EGFR
SRC	ESR1
SMAD4	AR
TNF	APOA1
IL10	CCND1

2.5 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析 通过 R 语言中 clusterProfiler 包,对 337 个共同靶点基因进行信号通路富集分析。GO 富集分析结果根据 *P* 值排序,分别筛选出 BP、CC 和 MF 中富集显著的前 10 个生物学功能,其中 BP 包括对外界刺激的反应、创伤修复、氧气水平调节、细菌源分子的反应、肌肉系统过程、脂多糖作用、上皮细胞增殖、氧含量降低的反应和血液循环的调节等;CC 包括膜微区、膜筏、神经元细胞体、囊腔、细胞质囊泡腔、内质网膜、质膜筏、阳离子通道配合物、小窝膜膜以及肌纤维膜等;MF 包括受体激活活性、受体配体活性、DNA 结合转录因子结合、细胞因子受体结合、细胞因子活性、四吡咯结合、生长因子活性、跨膜转运蛋白结合、血红素结合、类固醇结合等,见图 4。KEGG 通路富集得到 191

条结果,根据 P 值和基因数量选取前 20 的通路进行分析,发现生脉散治疗 T2DM 合并 CHD 的途径包括多种显著富集的信号通路,如糖尿病并发症中的 AGE-RAGE、MAPK、TNF、IL-17、HIF-1 信号通路和

脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化等,表明生脉散治疗 T2DM 合并 CHD 可能涉及代谢、凋亡等多方面信号通路的影响,见图 5。

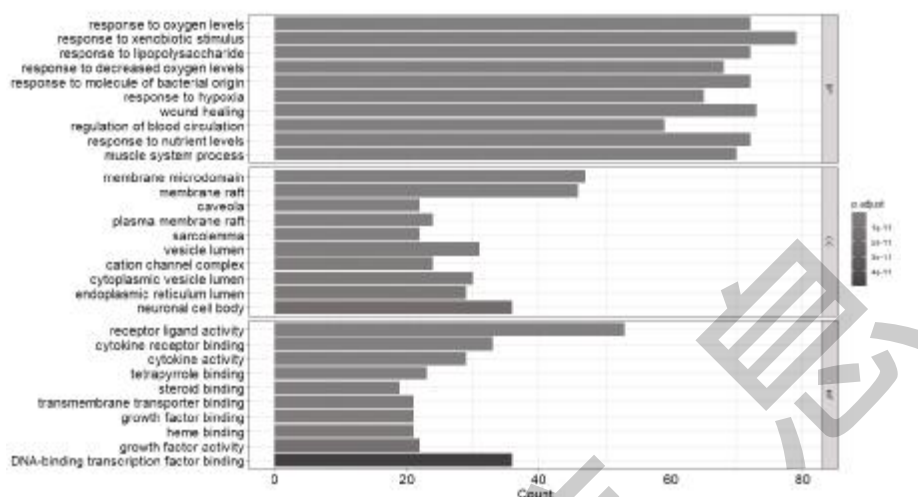


图 4 生脉散 GO 基因功能富集分析

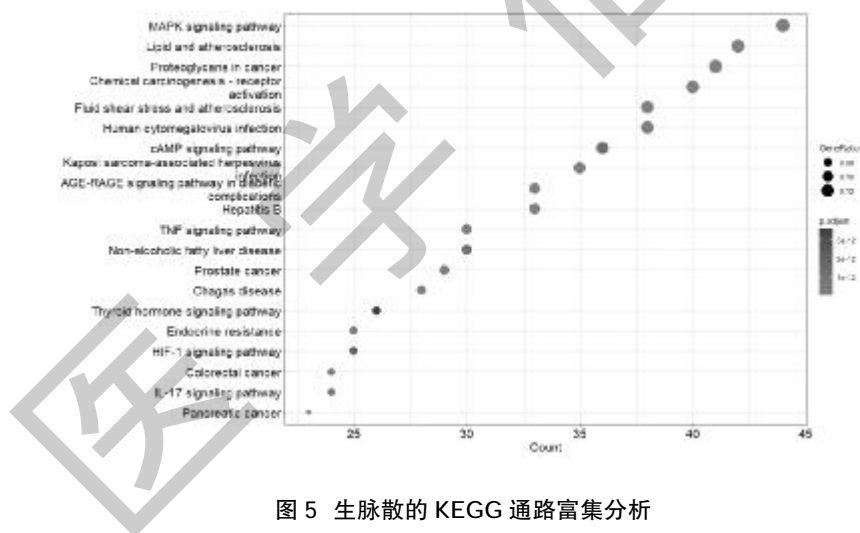


图 5 生脉散的 KEGG 通路富集分析

2.6 分子对接分析 利用 Discovery Studio 软件进行蛋白质和小分子化合物的计算机模拟对接,对接结果得到绝对自由能、相对自由能、对接姿势数和 LibDockScore 综合分数。将从药物-成分-靶点网络图中筛选出的度值排名前 10 的化学成分与 3 个关键靶点进行分子对接,结果显示 20(R)-Ginsenoside Rg3、Deoxyharringtonine、Kaempferol、Maltose 与 AKT1、CTNNB1、ESR1 均有较好活性,见表 6。生脉散中的 4 种活性化合物 [20(R)-Ginsenoside Rg3、

Deoxyharringtonine、Kaempferol、Maltose] 与 T2DM 合并 CHD 的 3 个核心靶点(AKT1、CTNNB1、ESR1)通过静电作用、氢键、范德华力、 π - π 相互作用等分子间作用力很好地结合,形成稳定的结构,具体结果见图 6。基于分子对接结果推测该研究可能通过作用于上述几种关键靶点发挥治疗 T2DM 合并 CHD 的作用,同时阐明了生脉散调控 T2DM 合并 CHD 具有“多成分、多靶点、多通路”的机制特点。

表 6 受体蛋白与配体分子对接详细参数

受体蛋白	小分子化合物配体	绝对自由能	对接姿势数	相对自由能	LibDockScore
AKT1	20(R)-Ginsenoside Rg3	152.139	3	4.20946	141.697
	Deoxyharringtonine	117.91	36	17.502	125.19
	Kaempferol	35.3869	1	0	99.8233
	Maltose	43.5064	184	17.9923	99.7188
CTNNB1	20(R)-Ginsenoside Rg3	155.264	5	7.33391	156.209
	Deoxyharringtonine	108.875	9	8.46713	90.7231
	Kaempferol	35.3869	1	0	109.755
	Maltose	41.2601	140	15.7459	113.686
ESR1	20(R)-Ginsenoside Rg3	166.255	18	18.3256	117.921
	Deoxyharringtonine	109.151	10	8.74296	125.656
	Kaempferol	35.3869	1	0	97.24
	Maltose	43.8466	190	18.3324	116.085

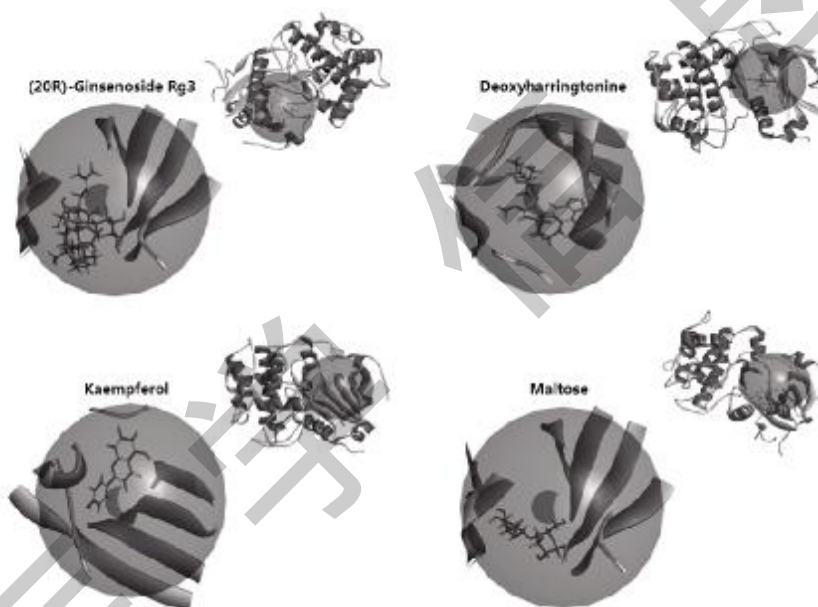


图 6 (20R)-Ginsenoside Rg3、Deoxyharringtonine、Kaempferol、Maltose 与 AKT1 配体-蛋白互动图

2.7 SPR 亲和力检测

2.7.1 实验样品选择 基于分子对接结果，选取 AKT1 蛋白进行 SPR 实验验证，由于小分子化合物 Deoxyharringtonine 有毒性，目前无市售，因此选择购买 Maltose、(20R)-Ginsenoside Rg3、Kaempferol 这三种小分子化合物。蛋白：AKT1(厂家：义翘神州，目录编号：10763-H08B)；小分子化合物：Maltose (厂家：上海源叶，货号：B20834-20mg)、(20R)-Ginsenoside Rg3 (厂家：MCE，货号：HY-N1376)、Kaempferol(厂家：上海源叶，货号：B21126-20mg)。

2.7.2 实验结果 ①AKT1 蛋白偶联结果：配体偶联

量约为 12 000 RU。②化合物单浓度筛选结果：使用分析软件 Biacore T200 Evaluation Software 对不同分析物结合信号进行标准化处理，检测得到 3 种化合物的结合散点图，筛选得到结合值大于 cutoff 的化合物有 2 个，即 Kaempferol 和(20R)-Ginsenoside Rg3，见图 7；通过分析物与配体结合传感图，发现以上 2 个小分子化合物解离速度都较快，见图 8。从传感图可知，Kaempferol 与 AKT1 蛋白结合要高于(20R)-Ginsenoside Rg3 与 AKT1 结合，与 AKT1 有明显结合信号。

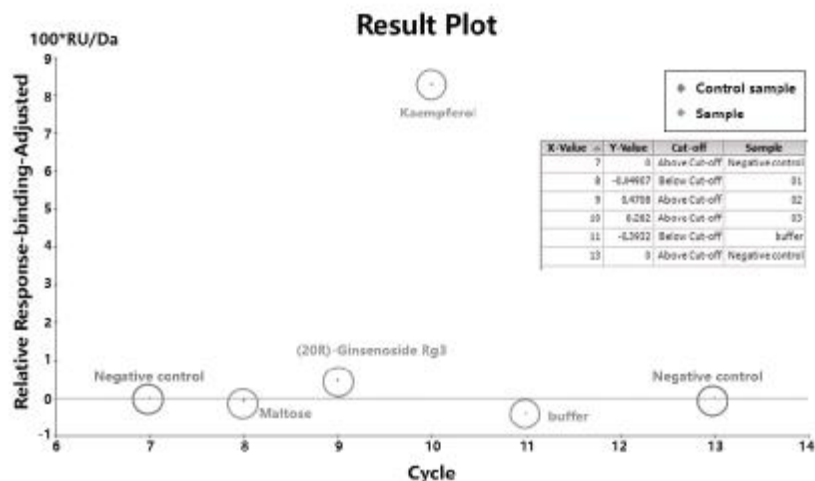


图 7 分析物与配体结合信号

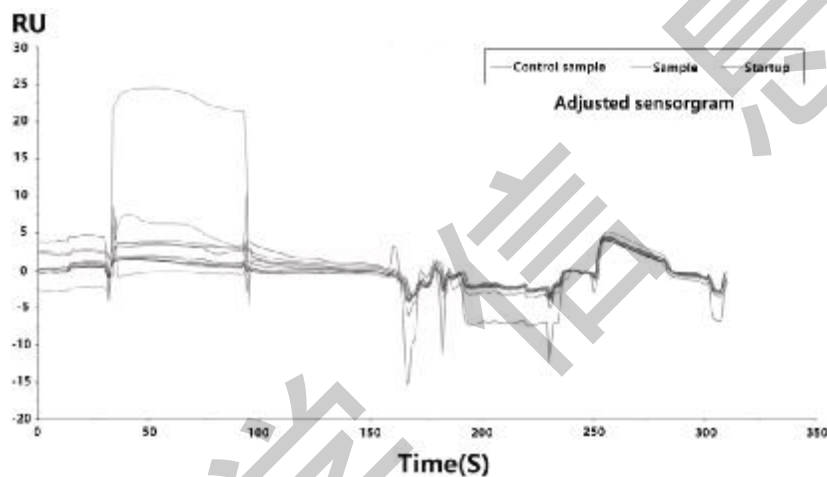


图 8 分析物与配体结合传感图

3 讨论

中医疗法注重扬长避短,毒副作用小,辨证论治与整体观念独具特色,使得中医药在治疗 T2DM 合并 CHD 上发挥了强大的作用。但中药复方各药物之间的药效机制较复杂,难证实中药复方中的活性成分通过多途径、多环节、多靶点来治疗疾病^[2]。因此,本研究运用网络药理学对生脉散干预 T2DM 合并 CHD 的药效物质基础及可能作用的靶点和通路进行了深入研究,并对其可能作用机制进行初步探讨,发现生脉散中的多个药效物质不仅可以对一个靶点发挥作用,也可对多个靶点发挥作用,表现其多途径的协同增效作用。

本研究筛选了生脉散 106 个复方成分,药物疾病共同作用靶点 337 个,通过分析得到可能起治疗作用的核心化合物有维生素 B₁(Vitamin B₁)、长叶烯(Longifolene)、月桂烯(Myrcene)、牛磺酸素(Tau-remisin)、五味子酚[(+)-Gomisin K3]、去氧哈林通碱(Deoxyharringtonine)、麦芽糖(Maltose)、山奈酚

(Kaempferol)、20(R)-人参皂苷 Rg3[20(R)-Ginsenoside Rg3]、戈米辛 L2[(-)-Gomisin L2],通过作用于 RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT1)、儿茶素 β -1(CTNNB1)、雌激素受体(ESR1)等关键靶点,根据调控 MAPK 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、HIF-1 信号通路、脂质与动脉粥样硬化等多个途径,来调节血糖血脂水平,改善氧化应激等,从而对 T2DM 合并 CHD 进行干预。网络药理学与我国中医药学中的系统整体观和辨证论治理念不谋而合,将其运用到中医药研究可为疾病的控制和用药提供更多选择和可能性,也为中药复方新药的研发及医学现代化发展提供技术支持^[23]。

基于网络药理学的分析结果,本研究采用了分子对接技术,选取生脉散中的 4 种活性化合物[20(R)-Ginsenoside Rg3、Deoxyharringtonine、Kaempferol、Maltose]与 T2DM 合并 CHD 的 3 个核心靶点(AKT1、CTNNB1、ESR1)完成分子对接,根据绝对自由能、相

对自由能、对接姿式数和 LibDockScore 综合分数这几个参数来评估成分与蛋白质靶标的亲和程度,结果均显示对接成功。基于分子对接的结果,本研究另通过 SPR 亲和力检测实验,使用 Biacore T200 检测 AKT1 蛋白与分析物 Maltose、(20R)-Ginsenoside Rg3、Kaempferol 的结合情况,根据分析物与配体结合信号散点图所示,在运行缓冲液 2 稀释分析物时,Maltose 和 (20R)-Ginsenoside Rg3 在 200 $\mu\text{mol/L}$ 时可溶,Maltose 与 AKT1 无明显结合信号,(20R)-Ginsenoside Rg3 与 AKT1 结合信号较弱;Kaempferol 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 时可溶,与 AKT1 有明显结合信号。分析物与配体结合传感图得知,Kaempferol 和 (20R)-Ginsenoside Rg3 的解离速度都较快,通过比较响应值可知,Kaempferol 与 AKT1 蛋白结合要高于 (20R)-Ginsenoside Rg3 与 AKT1 结合。

综上所述,本研究初步探讨了生脉散治疗 T2DM 合并 CHD 的作用机制,为阐述中药方剂生脉散治疗 T2DM 合并 CHD 的作用机制提供了重要数据,即通过生脉散中的多种活性成分介导 T2DM 及 CHD 相关的多靶点、多通路来发挥作用,实现“靶标-受体-配体-复合物-靶标-受体”的相互作用和作用机制的可视化,对网络药理学方法得出结果的精确性进行验证,从而揭示生脉散治疗 T2DM 合并 CHD 的药效基础,为后续的细胞及动物实验研究提供思路和参考依据,为临床提供理论依据。

参考文献:

- [1]杨静,任星,付国静,等.中医药治疗糖尿病足的临床研究证据图分析[J].中国中药杂志,2022,47(14):3943-3949.
- [2]胡远樟,肖丽,余泽芸,等.基于数据挖掘的“真实世界”中医糖尿病症药关系研究[J].成都中医药大学学报,2020,43(1):62-65.
- [3]张美珍,郝晓晖,卜祥伟,等.调枢法在糖尿病中的应用[J].中国中医基础医学杂志,2023,29(5):833-835.
- [4]DeForest N,Majithia AR.Genetics of Type 2 Diabetes:Implications from Large-Scale Studies[J].Curr Diab Rep,2022,22(5):227-235.
- [5]Shu L,Chan KHK,Zhang G,et al.Shared genetic regulatory networks for cardiovascular disease and type 2 diabetes in multiple populations of diverse ethnicities in the United States [J].PLoS Genet,2017,13(9):e1007040.
- [6]Berbudi A,Rahmadika N,Tjahjadi AI,et al.Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System [J].Curr Diabetes Rev,2020,16(5):442-449.
- [7]国家心血管中心.中国心血管健康与疾病报告 2019[M].北京:科学出版社,2020.
- [8]熊伟,孙丽妹,苏珊珊.冠心病合并糖尿病患者肠道菌群特点及与冠脉粥样硬化的相关性[J].临床和实验医学杂志,2023,22(1):98-102.
- [9]Chawla A,Chawla R,Jaggi S.Microvascular and macrovascular

complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum?[J].Indian J Endocrinol Metab,2016,20(4):546-551.

- [10]阚春婷,曹长春.糖尿病、冠心病患者 MetrnI 水平与糖脂代谢指标和部分炎性标志物水平的关系[J].国际检验医学杂志,2021,42(17):2113-2117.
- [11]丁林,吕肖锋,武晋晓,等.2 型糖尿病合并冠心病患者血糖波动与冠状动脉病变的相关性研究[J].重庆医学,2015,44(17):2344-2346,2350.
- [12]付永波,朱冬梅,胡绍波,等.冠脉 CTA 与血管超声评估 T2DM 合并 CHD 患者颈动脉与冠脉粥样硬化的关系[J].中国 CT 和 MRI 杂志,2020,18(1):48-50,68.
- [13]于凯,王媛.冠心病合并糖尿病患者冠状动脉造影特点及冠状动脉支架置入术治疗的临床疗效观察[J].贵州医药,2020,44(5):708-709.
- [14]薛强,苑媛,孙静,等.中西医结合治疗对 T2DM 合并 CHD 患者血糖、血脂及血管内皮功能的影响[J].现代生物医学进展,2017,17(32):6299-6303.
- [15]李晶.复方生脉散治疗冠心病 PCI 术后再发稳定型心绞痛(气阴两虚,心脉瘀阻证)的临床观察[D].昆明:云南中医药大学,2020.
- [16]冉俊生,陈朝阳,冯君,等.基于网络药理学探讨生脉散治疗快速性心律失常气阴两虚证作用机制[J].陕西中医,2021,42(3):383-388,397.
- [17]李艳秋,崔文旺.玉泉丸合生脉散对气阴两虚证 2 型糖尿病临床疗效及心血管主要危险因素的影响[J].吉林中医药,2023,43(3):304-307.
- [18]陈雅,刘昆,刘薇,等.生脉散对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用机制的研究[J].广东医学院学报,2022,40(3):259-262.
- [19]沈亚云,盛兰兰.生脉散合丹参饮加减治疗糖尿病性心肌病疗效及对心肌纤维化程度的影响[J].新中医,2022,54(5):62-66.
- [20]Hopkins AL.Network pharmacology[J].Nature Biotechnology,2007,25(10):1110-1111.
- [21]韦明君.基于网络药理学和分子对接方法研究真武汤治疗糖尿病肾病的作用机制[D].广州:华南理工大学,2020.
- [22]吕佳誉,崔向宁,苏文革.基于网络药理学探讨生脉散治疗心律失常作用机制[J].中医学报,2021,36(1):153-159.
- [23]欧阳效强,饶炼,雷敏,等.基于网络药理学探讨生脉散治疗动脉粥样硬化的作用机制[J].中成药,2021,43(1):241-246.
- [24]郝秀华,张莉,赵丽颖,等.基于网络药理学和分子对接技术探讨生脉散治疗糖尿病的作用机制[J].特产研究,2023,45(6):70-79.
- [25]黄聪,孙明杰,崔海峰,等.基于网络药理学探讨生脉散降低钙泄漏保护糖尿病大鼠心肌收缩功能的机制研究[J].药理学报,2022,57(10):3115-3123.
- [26]赵烨敏.生脉散汤剂治疗 2 型糖尿病气阴两虚证合并冠心病心绞痛患者的效果及安全性观察[J].贵州医药,2021,45(3):410-411.
- [27]汤晓.生脉散治疗糖尿病合并冠心病心绞痛临床观察[J].光明中医,2022,37(3):373-374.

收稿日期:2023-09-28;修回日期:2023-10-19

编辑/杜帆