

基于网络药理学和分子对接技术探讨四君子汤治疗 2 型糖尿病的作用机制

唐路梅 杨玲芳 唐芳 刘杰彦*

湖南省永州市中心医院药学部 湖南永州 425000

摘要: 目的 探讨四君子汤 (Sijunzi decoction) 治疗 2 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus) 的作用机制。方法 利用中药系统药理学数据库分析平台 (TCMSP) 数据库查询四君子汤中 4 味中药活性成分及靶点, GeneCards 数据库搜集 Type 2 diabetes mellitus 相关治疗靶点, Uniprot 数据库使靶蛋白信息标准化, 制作交集靶点, 构建 PPI 网络, Cytoscape 软件分析, 得到度值前 5 位的活性成分和前 10 位的靶蛋白; 通过 David 数据库对四君子汤治疗 2 型糖尿病的潜在靶点进行 GO 分析和 KEGG 富集分析; 使用 Pymol 软件去水、去配体, Autodock 软件进行分子对接, 得到活性成分与靶点之间的结合能。结果 筛选得到四君子汤中有效成分 136 个, 成分对应的靶点 256 个, 2 型糖尿病相关靶点 2987 个, 药物治疗疾病的潜在靶点 175 个; GO 富集分析结果共得到 1009 条目; KEGG 富集结果得到 179 条通路。分子对接结果表明, 活性成分与靶点均能稳定结合。
结论 四君子汤是通过多成分、多靶点、多通路治疗 2 型糖尿病。

关键词: 四君子汤; 2 型糖尿病; 网络药理学; 分子对接

2 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是指机体对胰岛素敏感性下降, 不能有效利用, 导致血糖水平增高的一种慢性病。据调查, 我们约有全球的 1/4 糖尿病患者, 占居世界首位, 其中 90% 以上为 2 型糖尿病^[1], 给家庭和社会带来沉重负担。因此, 研究治疗 2 型糖尿病的药物具有重大意义。

目前, 治疗 2 型糖尿病的药物主要为西药, 以口服降糖药和胰岛素为主, 药物成分单一, 药物靶点单一, 长期使用易耐药, 且副作用明显。而中药具有多成分、多靶点、多途径的特点, 且中药的不良反应相对较少。故积极寻找中药治疗 2 型糖尿病具有重要研究意义。

中医药治疗糖尿病源远流长, 中医药将糖尿病归于“消渴”范畴, 其主要与气阴两虚^[2]、气虚湿热^[3] 相关, 中医药治疗糖尿病多以益气养阴、益气清热为主。四君子汤中包含人参、白术、茯苓、甘草 4 味中药, 具有益气健脾的作用, 是治疗气虚、脾虚的常用方剂, 现代医学也用于糖尿病的治疗^[4]。

目前, 四君子汤在临床上治疗糖尿病多与西药联用, 单用较少, 其主要原因是四君子汤作为中药复方, 其有效成

分复杂, 对于治疗 2 型糖尿病的物质基础研究

报道并不是很多, 以及有效成分与糖尿病的靶点结合情况并未得到阐释, 故本研究利用网络药理学研究方法, 以 2 型糖尿病为研究对象, 通过构建四君子汤治疗 2 型糖尿病的“活性成分-靶点-疾病”、“活性成分-靶点-通路”的拓扑网络结构, 阐述四君子汤治疗 2 型糖尿病的有效成分、靶点、通路以及生物学功能, 并使用分子对接技术验证其有效成分与靶点的结合活性, 预测四君子汤治疗 2 型糖尿病的潜在物质基础, 为后续深入研究四君子汤提供思路和参考。

1 研究方法

1.1 四君子汤化学成分的收集

使用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 筛选四君子汤 (人参、白术、茯苓、甘草) 4 味中药的活性成分, 并以药物的口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 为筛选条件, 将筛选出的活性成分与其潜在作用靶点通过 Uniprot 数据库将作用靶点转换为基因名称, 并与其活性成分进行配对, 删除重复项及无法转换的靶点, 得到四君子汤 4 味中药的主要活性成分及作用靶点

1.2 疾病靶点的筛选

在 GeneCards 数据库中检索关键词“Type 2 diabetes mellitus”来搜索与 2 型糖尿病相关的基因。在相对评分 ≥ 20 的情况下进行筛选, 获得 2 型糖尿病相关基因。

1.3 潜在作用靶点的获取与药物有效成分 - 疾病 - 共同靶点网络构建

将四君子汤所对应的靶点和 2 型糖尿病靶点分别导入 Venny 2.1 在线作图工具平台, 绘制韦恩图, 得到两者的交集, 即为四君子汤治疗 2 型糖尿病的潜在作用靶点即成分 - 疾病靶点。并通 Cytoscape3.9.0 软件进行可视化处理, 得到药物 - 有效成分 - 疾病靶点网络图。

1.4 蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建与核心靶蛋白筛选

将 Venny 图种的交集靶点导入 String 数据库, 设置物种为“homo sapiens”, 以置信度 > 0.4 为条件进行筛选, 隐藏不相关节点后得到蛋白质相互作用 (PPI) 网络图, 导出数据并转入 Cytoscape3.9.0 软件进行可视化处理及拓扑分析, 筛选得到核心靶蛋白。

1.5 GO 富集分析 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 对核心靶点进行 GO 分析, 探寻四君子汤治疗 2 型糖尿病的生物功能, GO 富集分析由生物过程、细胞组成和分子功能 3 个板块组成, P 值越小, 结果越显著; 通过 KEGG 通路富集分析, 探究四君子汤治疗 2 型糖尿病的主要信号通路, 以 $P < 0.01$ 为筛选标准。

1.6 四君子汤 - 活性成分 - 靶点 - 通路图的构建

将 KEGG 通路分析结果, 与四君子汤中的活性成分及相关的靶点一一对应建立在 excel 表中, 导入 Cytoscape3.9.0 软件进行分析。

1.7 有效成分与靶点的分子对接

选取 1.3 网络分析中度值 (Degree) 排在前 5 的药物有效成分与 1.4 PPI 网络分析中度值排在前 10 的靶蛋白进行分子对接。通过 PDB 数据库选取靶蛋白的 3D 结构, 同时将 TCMSp 数据库中主要活性成分的 MOL2 文件下载保存, 然后使用 Pymol 软件对核心靶蛋白进行去水去配体等操作, AutoDockTools1.5.6、AutoDockVina 软件中进行分子对接, 并记录下结合能。

2 研究结果

2.1 四君子汤中活性成分与靶点和潜在靶点信息

从 TCMSp 中检索, 按照 $OB \geq 30\%$ 与 $DL \geq 0.18$ 为条件进行筛选, 获得四君子汤 4 味中药的活性成分及靶点。从四君子汤中共收集到 136 种潜在活性成分, 其中人参 22 个、白术 7 个、茯苓 15 个、甘草 92 个。将上述 136 个活性成分所对应的药物靶点通过 Uniprot 进行规范, 删除重复项及无法转换的靶点, 共得出四君子汤有潜在影响的靶点蛋白共计 256 个。

2.2 疾病靶点获取结果

打开 GeneCards 数据库, 检索“Type 2 diabetes mellitus”, 共获得 2 型糖尿病相关靶点 2987 个。

2.3 四君子汤治疗 2 型糖尿病潜在靶点预测

将 2.1、2.2 中获取的四君子汤靶点数 256 个和 2 型糖尿病靶点数 2987 个导入在线 Venny2.1.0 平台获得韦恩图 (图 1)。交集靶点即为四君子汤治疗 2 型糖尿病的潜在靶点, 共 175 个, 将交集靶点与四君子汤中活性成分相对应共同输入 Cytoscape3.9.0 软件进行可视化处理, 共有 192 个节点, 365 条边。其中红色正方形代表四君子汤、2 型糖尿病, 浅蓝色六边形代表四君子汤中药物活性成分分子, 绿色圆形代表四君子汤与 2 型糖尿病的交集靶点 (图 2), 有图 2 可见, 治疗四君子汤治疗 2 型糖尿病是多成分、多靶点治疗。根据 Cytoscape3.9.0 软件 Analyze network 分析, 得到度值前 5 的活性成分 (表 2), 其中度值越大, 代表该节点越重要, 与该节点直接相连的边的数量越多。

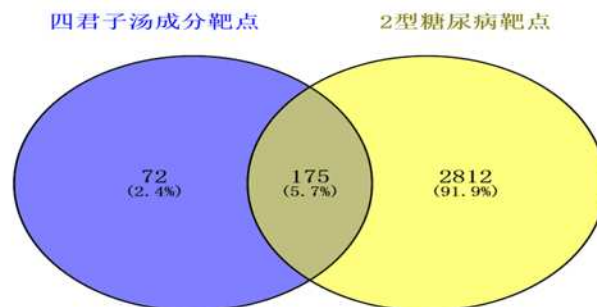


图 1 药物 - 疾病交集靶点韦恩图

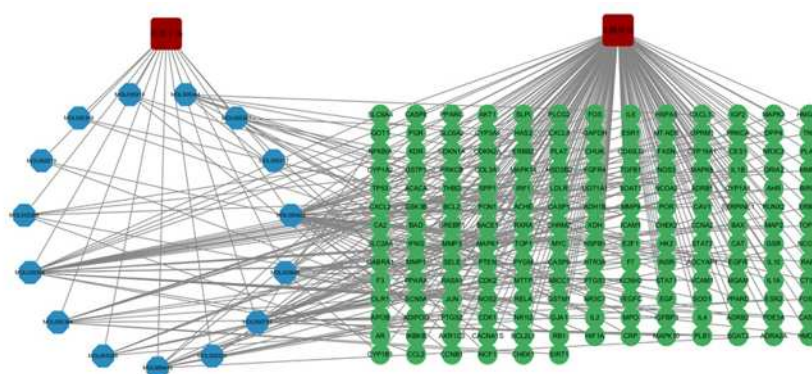


图 2 药物 - 有效成分 - 疾病靶点图

表 1 药物成分的度值

MOL ID	成分名称 Target name	Degree	来源
MOL000422	山萘酚 kaempferol	43	人参
MOL000358	β - 谷甾醇 beta-sitosterol	29	人参
MOL000787	富马林 Fumarine	26	人参
MOL003648	Inermin	17	人参
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	15	人参

2.4 PPI 网络构建及网络拓扑分析

将 2.3 韦恩图得到的交集靶点导入 string 数据库, 设置置信度 > 0.4, 去掉不相关节点后得到蛋白质互作网络图 (PPI 网络图) (见图 3)。并将 PPI 网络图数据以 tsv 格式导出, 将导出的 tsv 数据导入 Cytoscape3.9.0 软件可视化处理及拓扑分析。得到 PPI 网络中含有 175 个节点、4171 条边, 每个节点连接边的平均数 (average node degree) 为 47.669, 节点的平均聚集程度 (local clustering coefficient) 为 0.656, 表明各节点 (靶点) 间关联性较强, 运用 Analyze network 分析计算得到度值排序居前 10 位的活性成分为 AKT1 (degree=134)、GAPDH (degree=130)、TNF (degree=123)、TP53 (degree=123)、IL6 (degree=122)、JUN (degree=118)、IL1B (degree=116)、ESR1 (degree=115)、CASP3 (degree=114)、EGFR (degree=112)。

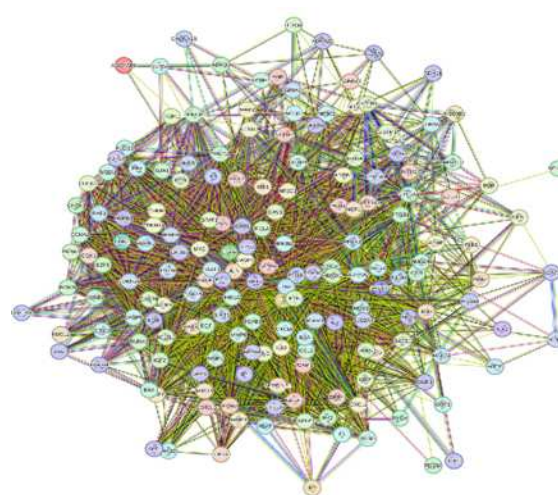


图 3 PPI 网络图

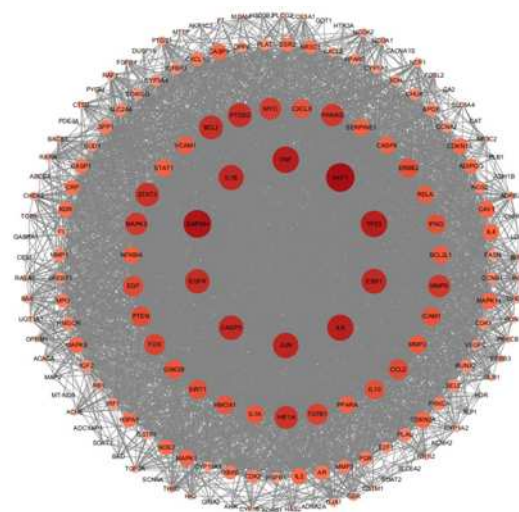


图 4 PPI 核心靶点图

2.5 GO 分析和 KEGG 分析

2.5.1 GO 功能富集分析

析根据 P<0.01 为筛选条件, 从 DAVID 数据库中筛选

GO 富集分析得到 GO 条目共 1009 个,其中细胞组成(cellular component, CC) 条目 87 个, 生物过程 (biological process, BP) 条目 776 个, 分子功能 (molecular function, MF) 条目 146 个。

通过 微生信平台对结果进行可视化分析, 得到 GO 富集分析气泡图 (图 5), 其中纵坐标表示富集的名字, 气泡的大小表示富集个数, 气泡的颜色表示 P 值大小。由图 5

可知, 四君子汤治疗 2 型糖尿病, 生物过程 (BP) 参与最多的条目分别为: 基因表达的正向调控、对外在刺激的反应、RNA 聚合酶 II 的正向调控转录; 细胞过程 (CC) 参与最多的条目分别为: 细胞外区、高分子复合物、细胞液; 分子功能 (MF) 参与最多的条目分别为: 酶结合、同蛋白结合、蛋白结合)。

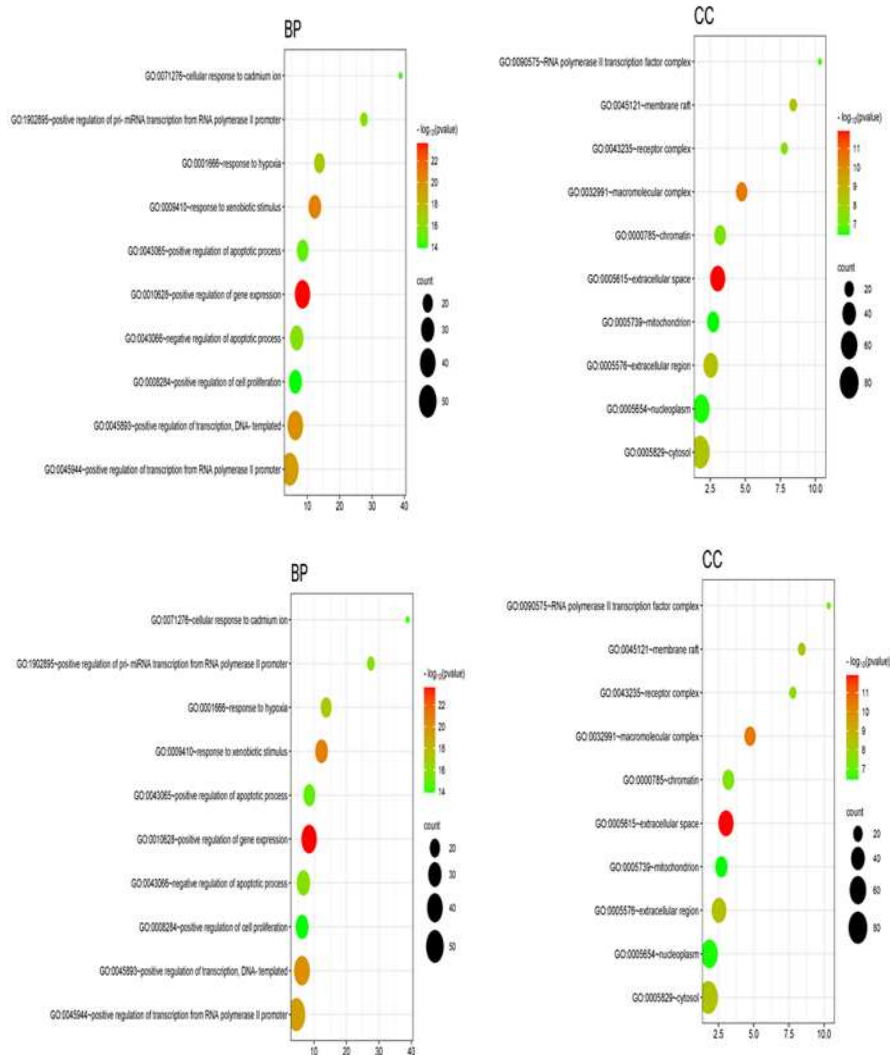


图 5 GO 富集分析和 KEGG 通路分析图

2.5.2 KEGG 通路分析

KEGG 通路富集筛选得到 179 个富集条目 ($P < 0.01$), 如图 5 所示。四君子汤治疗 2 型糖尿病的机制可能与脂质和动脉粥样硬化、癌症通路、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、乙型肝炎和 IL-17 信号通路等相关通路条目有关。

2.6 四君子汤 - 活性成分 - 靶点 - 通路图分析

将整理后的四君子汤活性成分和相对应的靶点及 KEGG 通路数据导入 Cytoscape3.9.0 软件进行分析 (图 6)。红色正方形代表四君子汤、通路, 玫红色菱形代表活性分子, 绿色圆形代表靶点。由图直观可见, 四君子汤是通过多成分、多靶点、多通路治疗 2 型糖尿病。

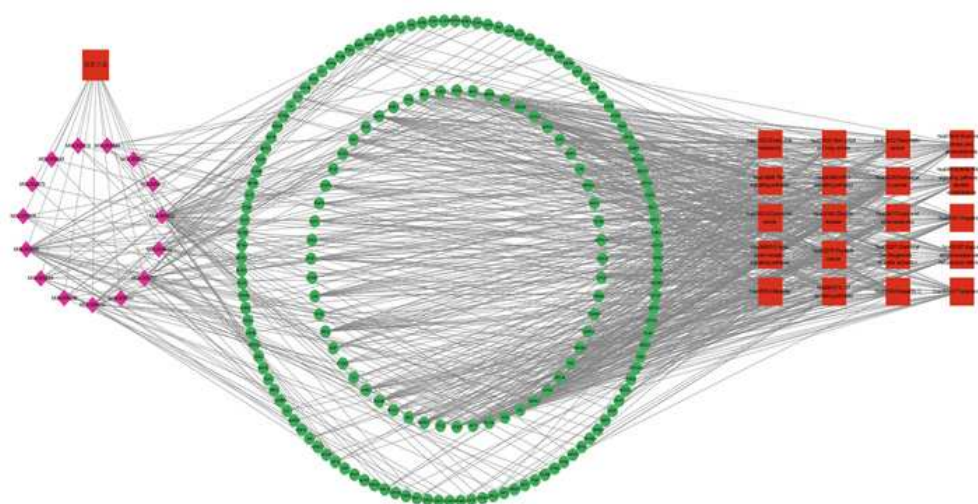


图 6 四君子汤 - 活性成分 - 靶点 - 通路网络图

2.7 活性成分与靶点蛋白的分子对接验证

选择 2.3 得到度值前 5 的活性成分与 2.4 得到度值前 10 的靶点基因进行分子对接验证。使用 AutoDock 软件进行结合能力预测，其中结合能越低则构象越稳定，（结合能 < 0 kcal/mol 说明分子间可以结合，结合能 < -5.0 kcal/mol 说明

分子间结合稳定）。将 5 种活性成分与 10 个靶蛋白对接后，得到的结合能活性均为负数，说明分子间可结合，部分分子间结合能小于 -5.0 kcal/mol，说明能稳定结合（表 2）。使用 Pymol 软件对靶点蛋白与成分进行构象可视化，以 AKT1 为例，构象图如下（图 7）。

表 2 分子对接结合能 (kcal/mol)

Target protein	MOL ID	MOL000422	MOL000358	MOL000787	MOL003648	MOL000449
AKT1		-5.37	-5.23	-6.27	-5.51	-6.24
GAPDH		-4.14	-5.6	-5.7	-5.88	-6.84
TNF		-3.76	-4.92	-6.73	-4.49	-5.54
TP53		-5.45	-7.87	-6.65	-6.23	-7.57
IL6		-3.78	-7.25	-5.86	-6.02	-4.21
JUN		-4.56	-5.19	-5.92	-6.25	-5.23
IL1B		-6.01	-6.82	-7.43	-7.08	-8.62
ESR1		-6.09	-7.07	-7.04	-6.4	-6.61
CASP3		-4.41	-7.49	-6.25	-5.64	-6.59
EGFR		-5.02	-5.69	-6.08	-5.49	-5.8

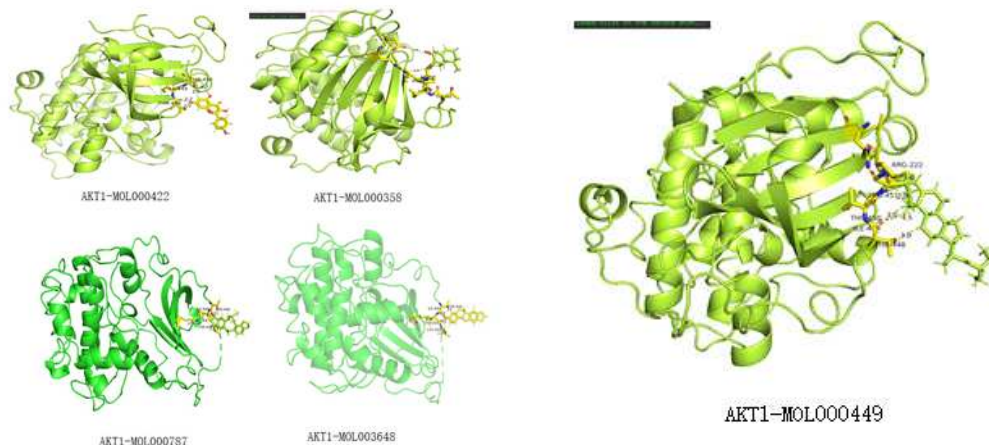


图 7 分子对接模式图

3 讨论

糖尿病在中医范畴属于“消渴证”，其发病与脾胃密切相关。中医药治疗糖尿病早有记载，并根据糖尿病的不同情况作了不同的命名，如“脾瘕”等，《黄帝内经》记载“脾为太仓，胃为谷道，津液别行，下输于肾，上布于胃，横行经络，脉度营卫，别输精明”，故津液的输布跟脾胃密切相关。而四君子汤由人参、茯苓、白术、甘草组成，是脾虚的常用方剂，并且由四君子汤组成的加减方在临床上治疗糖尿病也得到验证其具有降血糖的作用^[5]。

四君子汤治疗糖尿病临床上早有应用，但是对其主要停留在降血糖的临床疗效观察上^[6]，对之降血糖的成分和作用机制鲜少报道。故本研究利用网络药理学的数据分析和分子对接模拟验证技术，探究四君子汤治疗2型糖尿病的具体有效成分、作用靶点以及通路，从分子角度阐述四君子汤治疗2型糖尿病的作用机制。

药物有效成分-疾病-共同靶点网络分析结果显示，四君子汤治疗2型糖尿病的有效成分主要是山萘酚、 β -谷甾醇、原阿片碱、山槐素、豆甾醇等，其中人参就含有此5种成分，解释了四君子汤中的君药为人参。研究证实山萘酚具有抗炎、抗癌、抗氧化、降血糖作用，能有效改善糖尿病的内皮功能障碍^[7]。 β -谷甾醇能有效抑制糖尿病的发生^[8]。豆甾醇与胆固醇化学结构相似，可减少胆固醇的吸收，有抗炎、抗癌、降血糖的作用^[9]。

在研究药物-疾病的交集靶点，根据交集靶点的度值筛选了10种核心靶蛋白为AKT1、GAPDH、TNF、TP53、IL6、JUN、IL1B、ESR1、CASP3、EGFR。据文献报道，AKT1可通过影响PI3K/Akt信号通路增强糖酵解实现，有效改善胰岛B细胞代谢^[10]，发生降血糖作用。最新研究表明，GAPDH在能量代谢中具有多种功能而不是其他作用的影响，是糖酵解的一种重要酶^[11]。TNF属于炎症因子，TNF- α 通过介导胰岛素受体丝氨酸/苏氨酸磷酸化以降低受体酪氨酸激酶的活性，影响底物磷酸化及下游PI3K/AKT通路的传导、GLUT4转位，而GLUT4是肌肉摄取葡萄糖的主要转运蛋白^[12]，因此改善炎症因子TNF，可以改善葡萄糖的转运，从而改善血糖。IL6、IL1B、TNF- α 属于炎症因子，而机体的炎症反应直接与糖尿病患者的糖脂代谢相关^[13]。JUN家族成员包括JunB、c-Jun、JunD和v-Jun，可激活或抑制多种靶基因转录^[14]，研究发现，糖尿病患者体内c-Jun

会升高，因此，抑制JUN的表达，可改善胰岛素信号通路、脂肪代谢^[15]。

本研究将得到的175个交集靶点成分即四君子汤治疗2型糖尿病的潜在靶点输入到david数据库中，得到GO富集分析结果显示，四君子汤治疗2型糖尿病的生物过程主要在于基因表达的正向调控、对外在刺激的反应、RNA聚合酶II的正向调控转录等方面；主要场所在：细胞外区、高分子复合物、细胞液等；通过调节酶结合、同蛋白结合、蛋白结合来实现治疗2型糖尿病的作用。

KEGG结果表明，KEGG通路富集数目最多的为：脂质和动脉粥样硬化、癌症通路、AGE-RAGE信号通路在糖尿病并发症中的作用、乙型肝炎和IL-17信号通路等相关通路有关。杨毅^[16]等在文献中报道，动脉粥样硬化(AS)的发生发展与炎症因子关系密切，并可诱导IL-6、IL1B和TNF- α 等炎症因子释放，因此，四君子汤可通过阻断脂质和动脉粥样硬化通路阻断炎症因子IL-6、IL1B和TNF- α 的释放来改善血糖。癌症通路主要与调控细胞周期、细胞生长和凋亡有关，包括RTK/RAS通路、PI3K通路、Wnt通路等，多数研究表明，药物可通路PI3K通路调节2型糖尿病胰岛素 β 细胞的功能^[17]。郑一意等在研究中发现AGEs-RAGE信号通路是糖尿病心脏病发生发展的重要因素之一，可通过阻断AGEs-RAGE信号通路的任一途径都可有效减缓糖尿病的发生^[18]。乙型肝炎(Hepatitis B)也可调控PI3K/Akt通路来增强糖酵解过程^[19]。张笑蕊等研究证实通过抑制IL-17信号通路，可抑制炎症反应，改善糖脂代谢水平和胰岛素分泌水平^[20]。从四君子汤-活性成分-靶点-通路图分析中可见，五种活性成分可通过10种靶蛋白来调控通路，从而发挥治疗疾病的作用。

从分子对接结果可见，5种有效成分与10种核心靶蛋白结合时的结合能皆 < 0 kcal/mol，且结合能 ≤ -5 kcal/mol，说明活性成分与靶点能有效结合，且大部分能有效结合。证实了四君子汤治疗2型糖尿病多成分、多靶点的特点。

综上所述，四君子汤可通过多成分、多靶点、多通路来实现治疗2型糖尿病，符合中药复方成分多样性的特点。本研究基于挖掘网络药理学的数据和分子对接技术验证，系统的分析了四君子汤治疗2型糖尿病的活性成分、靶点、通路等，为进一步研究四君子汤治疗2型糖尿病提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 吴瑞瑞, 赵志超, 朱伟伟. 基于网络药理学和分子对接研究黄芩治疗 2 型糖尿病的作用机制 [J]. 海峡药学, 2024, 36(4):11-17.
- [2] 徐初, 唐蕾. 王不留行子耳穴贴压联合胰岛素治疗超重 2 型糖尿病的效果 [J/OL]. 辽宁中医杂志. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20240606.1701.135>
- [3] 谭丽, 龙江兰, 曾志华等. 基于网络药理学和代谢组学探讨黄芪四妙汤治疗 2 型糖尿病的作用机制 [J/OL]. 中国中药杂志. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20240429.502>
- [4] 李辉, 谢金洙, 樊若溪等. 四君子汤对 2 型糖尿病小鼠肠屏障的影响 [J/OL]. 中国中药杂志. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20240429.401>
- [5] 王洪亮. 四君子汤加味治疗糖尿病合并慢性胃炎的效果 [J/OL]. 糖尿病新世界. <https://doi.org/10.16658/j.cnki.1672-4062.2022.19.093>.
- [6] 蔡虹颜. 芪连四君子汤治疗老年 2 型糖尿病合并衰弱 (气虚血瘀证) 的临床疗效观察 [D]. 山东: 山东中医药大学, 2023; 1-59.
- [7] 雷晓青, 陈鳌, 刘毅等. 山萘酚药理作用的研究进展 [J]. 微量元素与健康研究, 2017, 34(2): 1-2.
- [8] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉等. β -谷甾醇药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2021,37(1): 1-6.
- [9] 黄涛, 豆甾醇对运动性疲劳大鼠肠道微生物群和能量代谢的影响 (R), 分子植物育种, 2024,22(2): 601-607.
- [10] 李雨欣, 韩思雨, 易梦雅等. 丝胶通过 PI3K/Akt 信号通路对受损 INS-1 细胞糖酵解的调控作用 [J]. 承德医学院学报, 2024, 3(41): 1-4.
- [11] Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2012 Aug;39(8):674-9. doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x. PMID: 21895736.
- [12] 赵思晨, 梁永林, 朱向东等. 基于 RXRA/TNF- α /GLUT4 通路探讨大黄糖络丸改善 2 型糖尿病骨骼肌胰岛素抵抗的分子机制 [J/OL]. 中药药理与临床. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyy.20240425.001>
- [13] 魏晨曦, 闫丽欣, 杨阳, 等. 消渴健脾方联合常规治疗与生酮饮食管理对气阴两虚证 2 型糖尿病患者的效果评价 [J]. 中国医药, 2024,19(6):904.908. DOI: 10.3760/j.issn.1673.4777.2024.06.023.
- [14] 范潇龙, 侯秋霞, 罗桃红等. Jun 转录因子家族与肝细胞癌的研究进展 [J]. 中国医药大学, 2023, 13(5): 49-52.
- [15] 胡燕琳, 魏琦等. 恩格列净通过 c-Jun 氨基末端激酶信号通路改善 2 型糖尿病性骨质疏松症的机制研究 [J]. 临床内科杂志, 2024,41(3):197-202.
- [16] 杨毅, 李若冰, 黄丽娜, 等. 基于脂质与动脉粥样硬化通路探讨侯氏黑散治疗脑缺血再灌注损伤的机制研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(4): 675-688.
- [17] 李楠, 刘师伟, 段瑞雪等. 鸢尾素经 PI3K/AKT/mTOR 通路调节自噬对 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞功能的影响 [J]. 中国生物制品学杂志, 2024,37(5):577-586.
- [18] 郑一意, 周迪夷. 基于 AGEs-RAGE 信号通路探索从脾论治糖尿病心肌病的科学内涵 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2024,34(2):182-185.
- [19] 盛盼, 张荣贵, 黄涛等. miR-203 靶向 PI3K/Akt 通路抑制乙型肝炎病毒感染肝癌细胞迁移、侵袭的机制 [J]. 中华医院感染学杂志, 2024,34(11):1611-1616.
- [20] 张笑蕊, 石岩. 基于网络药理学探讨益糖康治疗 T2DM 机制及关于 IL-17 信号通路实验验证 [M]. 辽宁: 辽宁中医药大学, 2014: 1-65.

作者简介:

唐路梅 (1989—), 女, 湖南永州, 汉族, 硕士研究生, 永州市中心医院, 主管中药师, 研究方向为: 中药药剂学、中药药理学。