

本文引用:丁念,郑承红. 基于网络药理学和实验验证探讨降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2022,42(7): 1129-1138.

基于网络药理学和实验验证探讨降糖通脉方 治疗糖尿病肺损害的作用机制

丁念^{1,2}, 郑承红^{1,2}

(1.湖北中医药大学,湖北 武汉 430000;2.武汉市中医医院,湖北 武汉 430014)

[摘要] **目的** 通过网络药理学挖掘降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的可能活性成分及靶点,并在动物实验中验证降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的作用和机制。**方法** 应用 TCMSP 数据库及 BATMAN-TCM 数据库检索降糖通脉方中的活性成分及靶基因,通过 GeneCards 数据库筛选得到肺损害的疾病靶点,通过 GO 生物功能分析、KEGG 通路富集和 Cytoscape 3.7.2 软件构建药物-疾病-活性成分-信号通路互作网络图。观察降糖通脉方对糖尿病肺损害大鼠模型肺组织 TGF- β 1/Smads 信号通路上的相关蛋白表达的影响,验证降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的作用和机制。**结果** 降糖通脉方中共得到 36 个活性分子,作用靶点有 109 个,其中与糖尿病肺损害相关的作用靶点有 95 个,核心靶基因 Smad2、Smad3、Smad7、Skil 相关蛋白通过 TGF- β 1 信号通路、AGE-RAGE 信号通路以及 TNF 信号通路等干预糖尿病肺损害。动物实验表明,与模型组相比,降糖通脉方低、中、高剂量均能改善糖尿病肺损害,减少炎症细胞浸润,降低 Smad2/3 表达 ($P < 0.01$),上调 Smad7 水平 ($P < 0.05$),增加 SnoN 蛋白表达 ($P < 0.05$),减少 TGF- β 1 表达 ($P < 0.05$)。**结论** 降糖通脉方具有“多成分-多靶点”的网络作用效应,其发挥作用的机制可能与调控 SnoN 蛋白干预 TGF- β 1/Smads 信号通路相关。

[关键词] 降糖通脉方;糖尿病肺损害;网络药理学;TGF- β 1/Smads 信号通路;SnoN 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.012

Mechanism of Jiangtang Tongmai Recipe in treating diabetic lung damage based on network pharmacology and experimental verification

DING Nian^{1,2}, ZHENG Chenghong^{1,2}

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430000, China; 2. Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430014, China)

[Abstract] **Objective** To explore the possible active ingredients and targets of Jiangtang Tongmai Recipe in treating diabetic lung injury through network pharmacology, and to verify the effect and mechanism of Jiangtang Tongmai Recipe in treating diabetic lung injury in animal experiments. **Methods** The active components and target genes of Jiangtang Tongmai Recipe were retrieved through the TCMSP database and BATMAN-TCM database. The disease targets of lung damage were screened from GeneCards database. GO biological function analysis, KEGG pathway enrichment and Cytoscape 3.7.2 software were used to construct the drug-disease-active component-signaling pathway interaction network diagram. The effect of Jiangtang Tongmai Recipe on the expression of TGF- β 1/Smads signaling pathway in the lung tissue of diabetic rats with lung damage was observed, and the effect and mechanism of Jiangtang Tongmai Recipe on diabetic lung injury were verified. **Results** A total of 36 active molecules and 109 active targets were obtained in the Jiangtang Tongmai Recipe, including 95

[收稿日期] 2022-01-21

[基金项目] 湖北省自然科学基金重点项目(2019CFB633);武汉市卫生和计划生育委员会科研重点项目(WZ20A06);武汉中青年医学骨干人才培养工程(武卫计[2013]35号)。

[第一作者] 丁念,男,博士研究生,副主任医师,研究方向:中西医结合治疗内分泌代谢及免疫性疾病,E-mail:1468153352@qq.com。

active targets associated with diabetic lung damage. The core target genes Smad2, Smad3, Smad7 and SKIL-related proteins intervene in diabetic lung injury through TGF- β 1 signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway and TNF signaling pathway. Animal experiments showed that compared with the model group, the low, middle and high doses of Jiangtang Tongmai Recipe could improve the lung damage of diabetic rats, reduce inflammatory cell infiltration, reduce Smad2/3 expression ($P<0.01$), increase Smad7 level ($P<0.05$), increase SnoN protein expression ($P<0.05$) and reduce TGF- β 1 expression ($P<0.05$). **Conclusion** Jiangtang Tongmai Recipe has a "multi-components and multi-targets" network action effect, which may be related to the regulation of SnoN protein to interfere with TGF- β 1/Smads signaling pathway.

[**Keywords**] Jiangtang Tongmai Recipe; diabetic lung damage; network pharmacology; TGF- β 1/Smads signaling pathway; SnoN protein

1976年, Schuyler提出糖尿病肺损害属于糖尿病微血管病变,因肺脏血供丰富,所以肺脏也是糖尿病损害的靶器官之一^[1]。肺脏有丰富的血管系统,极易受到高糖状态的影响。糖尿病微血管病变是造成糖尿病肺损害的主要原因。彭丽媛等^[2]发现糖尿病患者的肺脏微血管通透性及肺脏结构破坏明显高于健康对照组。KODOLOVA等^[3]观察了不同严重程度和不同病程的糖尿病患者肺血管组织,发现这些肺血管组织的微血管病变与其他脏器(如肾脏)的微血管病性改变极其相似。糖尿病肺损害的基本病机是阴虚燥热、络脉瘀阻,阴虚为本,燥热、气滞、痰湿、瘀血为其标,而瘀血贯穿疾病的始终。针对“虚”“瘀”两个核心,临床采用降糖通脉方以滋阴清热、活血化瘀。降糖通脉方主药为女贞子 12 g、黄连 5 g、川芎 10 g,其中:女贞子补肝肾之阴、清虚热,发挥养阴之力,以治其本;消渴日久,脏腑虚弱,必生痰湿、瘀血等内毒,黄连清热解燥湿;川芎行气活血化瘀治其标。前期研究发现,降糖通脉方可以下调糖尿病大鼠 TGF- β 1 表达,减少细胞外基质的堆积,改善血管的超微病理结构来干预糖尿病微血管病变^[4]。临床研究也发现,降糖通脉方可以改善糖尿病患者的肺功能损害。为进一步探究降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的分子学机制,通过网络药理学的方法,探究降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的物质基础和作用机制,并结合糖尿病肺损害模型大鼠对其中的关键信号通路进行验证,可为后续基础研究和临床实践提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

选用健康的 SPF 级雄性 8 周龄 SD 大鼠 60 只,体质量 180~200 g,实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2018-0104,购于三峡大学实验动物中心。饲养

环境为温度 22~26 $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~60%,人工光照明、暗各 12 h。在本次实验过程中,按照《实验动物管理条例》等相关文件标准进行饲养与处置。

1.2 主要试剂

戊巴比妥钠(批号 P3761)、链脲佐菌素(STZ)(批号 S0130)均购自美国 Sigma 公司;二甲双胍(批号 M107827,阿拉丁试剂有限公司);二甲苯(批号 10023418)、无水乙醇(批号 10009218)、碳酸锂(批号 20022818)、冰乙酸(批号 10000218)均购自国药集团化学试剂有限公司;伊红(批号 E8090)、中性树脂(批号 G8590)、苏木素(批号 G1004)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;蛋白质 Marker(批号 X1109A,美国 Helix 公司);十二烷基硫酸钠(SDS)(批号 1019Y032)、TEMED(批号 CT29143440)、过硫酸铵(批号 603B0313)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 120720210514)、RIPA(强)组织细胞快速裂解液(批号 20201027)、Tween-20(批号 C2011141)均购自北京索莱宝科技有限公司;PVDF 转移膜(批号 R9JA64128)、化学发光试剂(批号 20345A4/20345A4)均购自德国 Millipore 公司;TGF- β 一抗(批号 20201014)、SnoN 一抗(批号 20200312)、Smad2 一抗(批号 20200525)、Smad3 一抗(批号 20200218)、Smad7 一抗(批号 20200622)、p-Smad2 一抗(批号 GR200003-85)均购自英国 Abcam 公司;p-Smad3 一抗(批号 15,CST)、p-Smad7 一抗(批号 20201012)、GAPDH 一抗(批号 20200525)、Goat anti-Rabbit IgG(批号 20200507)均购自华联科股份有限公司。

1.3 主要仪器

正置显微镜(型号 DM1000,德国徕卡显微系统有限公司);TB-718L 型生物组织包埋机-冷冻机、GNP-9080 型隔水式恒温培养箱均购自泰维科技股份有限公司;电泳仪(型号 mini protean 3 cell,美国 BIO-RAD 公司);全自动化学发光分析仪(型号

Tanon-5200,上海天能有限公司)。

2 方法

2.1 降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的网络药理学研究

2.1.1 药物有效活性成分的筛选 应用 TCMSp 数据库(<https://tcmsp-e.com/>)及 BATMAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)检索药物方中主要药物女贞子、黄连、川芎的所有活性成分。根据研究结果,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) >30%、类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为限制条件进行筛选,得到药物的有效活性成分。

2.1.2 药效成分-靶点互作网络构建 应用 TCMSp 数据库及 BATMAN-TCM 数据库平台检索药物所有活性成分的靶基因,并将 TCMSp 数据库筛选所得所有靶蛋白名称导入 DrugBank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>) 以及 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>),设置物种为人类(Homo sapiens),对得到的靶蛋白进行比对和基因名校正,转换成标准的基因名,并删除无对应基因名的靶蛋白。

2.1.3 糖尿病肺损害的疾病靶点筛选 设置检索词为“type 2 diabetes lung injury”,通过 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)进行检索,筛选得到糖尿病肺损害疾病靶点,并应用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)对疾病靶点进行标准化,获得 Swiss-Prot ID。

2.1.4 活性成分与疾病的共同靶点筛选及蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建 明确糖尿病肺损害相关靶点与药物潜在靶点之间的相互作用,应用 R 语言(<https://www.r-project.org/>)软件及 Perl 语言程序将疾病靶点与药物靶点进行交集,并输入 Venny 2.1 软件(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘制韦恩图。应用 STRING (<https://string-db.org/>) 插件构建共同靶点 PPI,将蛋白种类设置为“Homo sapiens”,将 Settings 设为“high confidence:0.9”,并隐藏无关系的靶点,其他参数保持默认设置,获得 PPI 网络。应用 count.R 插件获得共同蛋白靶点出现的频次。

2.1.5 GO 生物功能分析和 KEGG 富集 应用 R 语言(<https://www.r-project.org/>)软件中 clusterProfiler GO.R 包及 Perl 语言对活性成分与糖尿病肺损害的共同靶点进行 GO 分析,GO 分析主要用于描述基因

产物的功能,其中包括细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和生物学过程 (biological process, BP),并应用 clusterProfiler KEGG.R 包进行 KEGG 富集分析。利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建核心靶基因-信号通路互作网络图。根据富集因子值分析核心通路富集程度,查阅相关文献,基于构建的网络探讨降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的潜在机制。

2.2 降糖通脉方治疗糖尿病肺损害药理学实验验证

2.2.1 大鼠糖尿病肺损害模型的复制与鉴定 根据随机数字表法取 10 只大鼠作为正常对照组 (NC 组),另取 50 只大鼠作为糖尿病造模组。大鼠均予高糖高脂饲料(含蔗糖 10%、猪油 10%、蛋黄粉 10%、胆固醇 1.5%、胆酸钠 0.5%、全价饲料 68%)喂养 4 周,后造模,大鼠禁食不禁水 12 h 后,在配制好的 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH=4.2)的基础上,配制 1% STZ 溶液,按照 35 mg/kg 腹腔注射 1% STZ 溶液,72 h 后采尾静脉血及检测,随机血糖值大于 16.7 mmol/L、尿糖 ≥ (++++) 的大鼠为糖尿病造模成功^[5]。大量研究表明持续高糖环境可以直接引起糖尿病肺损伤^[6-8]。本实验研究,在制备出具有 2 型糖尿病特征的大鼠模型后,继续高糖高脂饲料喂养 8 周。在饲养第 8 周末,取大鼠肺组织做病理检查,发现肺泡腔减少,肺泡腔增厚,部分肺泡腔萎缩甚至塌陷,有大量炎性细胞渗透、纤维组织增生,纤维细胞浸润明显,说明已经成功复制了大鼠糖尿病肺损害模型。

2.2.2 动物分组和样本采集 造模成功后,将大鼠分为 6 组进行药物干预,每组 10 只大鼠。(1)NC 组:不给药,普通饲料喂养;(2)糖尿病模型组(DM 组):等体积生理盐水灌胃,每天灌胃一次,连续 8 周,继续使用高脂饲料喂养;(3)降糖通脉方低剂量组(JTTM 低剂量组):JTTM 63 mg/mL 混悬液灌胃给药 1 mL/(kg·d),持续 8 周后继续高脂饲料喂养;(4)降糖通脉方中剂量组(JTTM 中剂量组):JTTM 126 mg/mL 混悬液灌胃给药 1 mL/(kg·d),持续 8 周后高脂饲料喂养;(5)降糖通脉方高剂量组(JTTM 高剂量组):JTTM 252 mg/mL 混悬液灌胃给药 1 mL/(kg·d),持续 8 周后,高脂饲料喂养;(6)二甲双胍组(Met 组):二甲双胍 54.3 mg/mL 水溶液灌胃给药 1 mL/(kg·d),持续 8 周后,继续高脂饲料喂养。

于第 8 周末药物干预完成后,颈椎脱臼法处死各组大鼠,将血标本离心,取上清液置 -80 °C 冰箱保

存。取一侧肺组织用4%多聚甲醛固定,另一侧肺脏组织放入液氮保存。

2.2.3 HE染色观察大鼠肺组织形态学变化 石蜡切片,常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化至蒸馏水洗;苏木素染色8 min,自来水冲洗;盐酸乙醇分化30 s(提插数下);温水返蓝;置伊红液中2 min;常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片;观察肺组织的病理变化,拍照分析。

2.2.4 Western blot法检测大鼠肺组织中的TGF- β 1、Smad2、Smad3、Smad7和SnoN表达 将冻存于-80℃冰箱的肺组织取出备用,使用RIPA裂解液将细胞裂解,按说明书步骤配制总蛋白溶液,置于组织匀浆器中,13 800 r/min,离心15 min离心半径6 cm,取上清液,使用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。取总蛋白上样、电泳分离、切胶,转至PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭2 h,加入TGF- β 1一抗(1:1000)、Smad2一抗(1:1000)、Smad3一抗(1:1000)、Smad7一抗(1:1000)、p-Smad2一抗(1:1000)、p-Smad3一抗(1:1000)、p-Smad7一抗(1:1000)、GAPDH一抗(1:1000),4℃摇床过夜;PBST洗膜,加二抗(1:20 000),4℃摇床过夜,PBST洗膜,ECL发光试剂盒显色、显影,以GAPDH为内参蛋白,采用目标蛋白条带灰度值/GAPDH条带灰度值来表示目的蛋白相对表达水平。

2.2.5 统计分析 采用SPSS 21.0进行数据分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较使用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的网络药理学机制分析

3.1.1 降糖通脉方活性成分筛选 通过TCMSP、BATMAN-TCM数据库对女贞子、黄连、川芎的活性成分进行检索,并以OB>30%和DL \geq 0.18为限制条件进行筛选,其中得到川芎8种有效活性成分、黄连14种有效活性成分、女贞子14种有效活性成分。详见表1。

3.1.2 糖尿病肺损害的疾病靶点筛选 通过检索GeneCards数据库得到2型糖尿病肺损害的疾病治疗靶点,删去重复靶点后共得到584个与2型糖尿

病肺损害的疾病治疗靶点。

3.1.3 共同靶点筛选及PPI网络构建 得到的109个药物活性成分靶点与584个相关疾病靶点,分别导入在线韦恩图制作网站InteractiVenn,相匹配映射得到降糖通脉方治疗2型糖尿病肺损害的潜在作用靶点共95个,药物有效活性成分-疾病交集靶点Venny图(图1)。将95个潜在靶基因导入STRING在线分析网站(<https://string-db.org/>),设置隐藏未连接的靶点,设定最低互作评分中的“highest confidence>0.900”,并导出PPI结果数据(图2)。进一步通过Cytoscape 3.7.2软件得到潜在靶基因的PPI,运用其中的cytoHubba插件筛选Hub基因,使用Degree算法,得出排名前20位潜在核心靶基因(图3)。

3.1.4 活性成分-肺损害-靶点互作网络构建 采用Cytoscape 3.7.2软件在中药活性成分-2型糖尿病肺损害-靶点互作网络图中,共获得121个节点、415条边(靶点95个,活性成分24个)(图4)。

3.1.5 药物治疗糖尿病肺损害的生物功能(GO)分析及核心通路筛选 运用R语言中的Bioconductor包、clusterProfiler包对24个中药活性成分-疾病交集靶点进行GO和KEGG富集分析,结果显示:95个潜在靶基因GO分析可见其主要富集于DNA-转录因子结合、蛋白质异二聚化活性、配体激活的转录因子活性、SMAD结合等(图5)。而KEGG富集分析发现其主要集中于糖尿病并发症中的TGF- β 信号通路、AGE-RAGE信号通路以及TNF信号通路等(图6)。并对“3.1.3”中筛选得到的核心靶基因Smad2、Smad3、Smad7、Skil相关蛋白(Ski-related novel protein, SnoN)中富集的信号通路进行展示,利用Cytoscape 3.7.2软件构建核心靶基因-信号通路互作网络图(图7)。

3.2 降糖通脉方对糖尿病肺损害大鼠的干预作用

3.2.1 各组糖尿病大鼠肺组织病理结构的变化 NC组大鼠肺组织结构正常。与NC组相比,DM组的肺泡腔减少,肺泡腔增厚,部分肺泡腔萎缩甚至塌陷,有大量炎性细胞渗透,纤维组织增生。与DM组相比,JTTM各剂量组和Met组均有明显改善。随着JTTM剂量的增加,肺组织损害明显改善,炎症细胞浸润减少,纤维组织增生减少,肺泡间距恢复正常。详见图8。

3.2.2 各组TGF- β 1/Smads信号通路上的相关蛋白

表 1 有效活性成分信息表

中药	分子编号	活性成分名称	OB/%	DL
川芎	MOL000433	FA	68.960	0.705
	MOL002140	Perlolyrine	65.947	0.270
	MOL002151	Senkyunone	47.600	0.240
	MOL002157	Wallichilide	42.310	0.706
	MOL001494	Mandenol	41.996	0.193
	MOL002135	Myricanone	40.597	0.512
	MOL000359	Sitosterol	36.913	0.751
黄连	MOL002202	Tetramethylpyrazine	49.876	0.258
	MOL001454	Berberine	36.861	0.776
	MOL013352	Obacunone	43.280	0.767
	MOL002894	Berberrubine	35.735	0.726
	MOL002897	Epiberberine	43.092	0.776
	MOL002903	(R)-Canadine	55.366	0.774
	MOL002904	Berlambine	36.680	0.815
	MOL002907	Corchoroside A _{qt}	104.954	0.775
	MOL000622	Magnograndiolide	63.708	0.188
	MOL000762	Palmidin A	35.358	0.650
	MOL000785	Palmatine	64.601	0.645
	MOL000098	Quercetin	46.433	0.275
	MOL001458	Coptisine	30.671	0.856
	MOL002668	Worenine	45.833	0.865
	MOL008647	Moupinamide	86.712	0.264
女贞子	MOL000358	Beta-sitosterol	36.913	0.751
	MOL000422	Kaempferol	41.882	0.240
	MOL004576	Taxifolin	57.841	0.273
	MOL005146	Lucidumoside D	48.867	0.709
	MOL005147	Lucidumoside D _{qt}	54.408	0.474
	MOL005169	(20S)-24-ene-3 β ,20-diol-3-acetate	40.229	0.815
	MOL005190	Eriodictyol	71.792	0.243
	MOL005195	Syrin resinol diglucoside _{qt}	83.122	0.799
	MOL005209	Lucidusculine	30.105	0.747
	MOL005211	Olitoriside	65.454	0.228
	MOL005212	Olitoriside _{qt}	103.230	0.775
	MOL000006	Luteolin	36.162	0.245
	MOL000098	Quercetin	46.433	0.275
	MOL005188	Nuezhenide	39.950	0.504

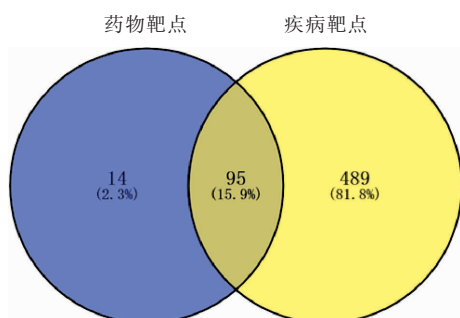


图 1 药物活性成分靶点与 2 型糖尿病肺损害疾病靶点 Venny 图

表达与 NC 组相比,DM 组的 Smad2、Smad3 和 Smad7 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而 p-Smad2 和 p-Smad3 在 DM 组中显著升高 ($P<0.01$)。p-Smad2 和 p-Smad3 在 JTTM 组和 Met 组中的表达均较 DM 组降低 ($P<0.05$)。随着 JTTM 剂量的增加, p-Smad2 和 p-Smad3 表达水平显著降低 ($P<0.05$)。而 p-Smad7 在 DM 组中的表达低于 NC 组, JTTM 组和 Met 组 p-Smad7 水平高于 DM 组, 随着 JTTM 剂量的增加, p-Smad7 表达水平显著升高 ($P<0.05$)。DM 组 SnoN 的表达低于 NC 组 ($P<0.01$), 但 JTTM 组和 Met 组

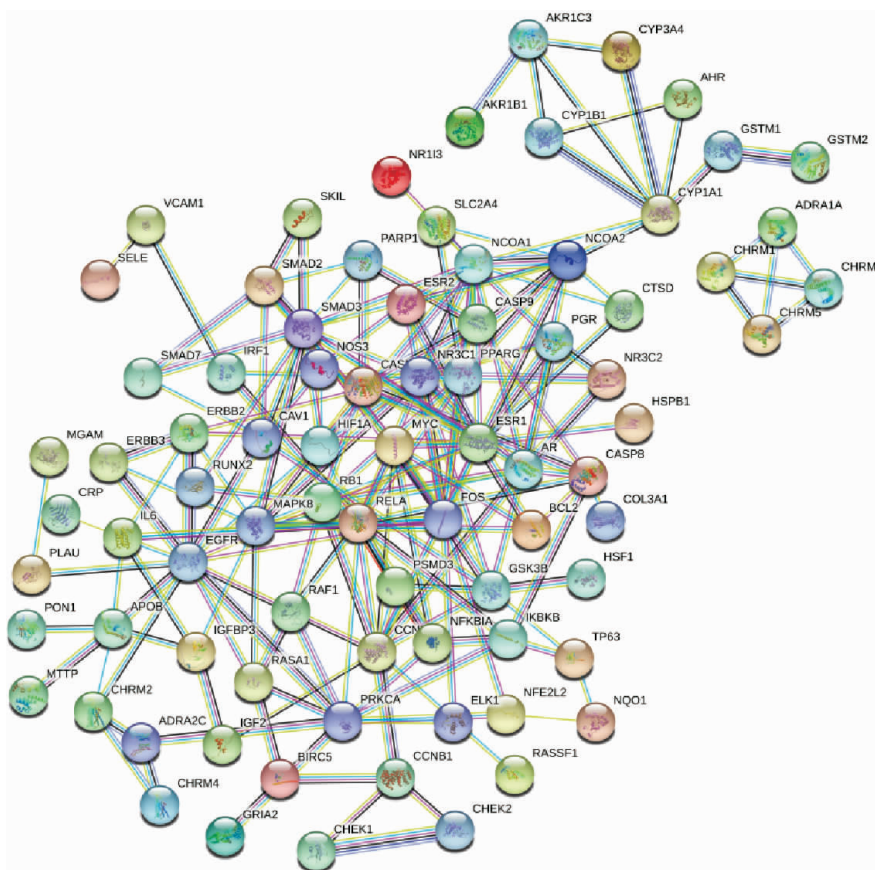


图 2 共同靶点的 PPI 网络图

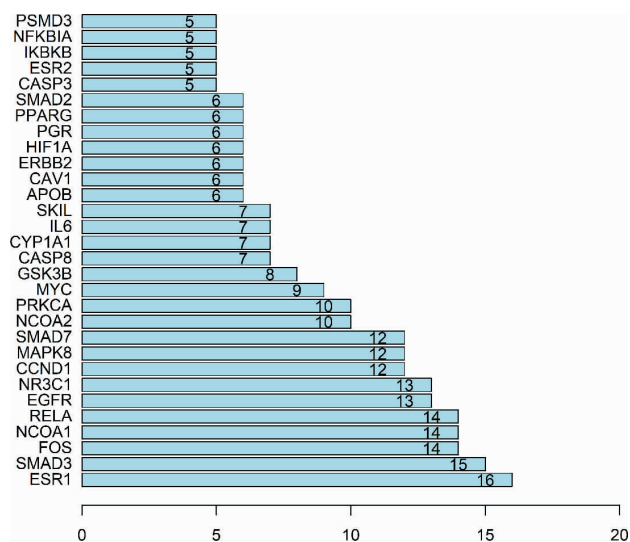


图 3 Degree 值排名前 20 的靶点

SnoN 表达较 DM 组增加 ($P < 0.05$), 与 p-Smad7 的表达相一致。与 DM 组相比, JTTM 各剂量组中 TGF- β 1 降低 ($P < 0.05$)。详见图 9。

4 讨论

现代研究认为, 糖尿病引起的免疫功能下降、氧化应激和微血管病变均可导致肺损伤, 高血糖会导致肺泡慢性损伤, 而细胞外基质 (ECM) 沉淀增多, 破

坏肺泡的正常结构, 使其顺应性降低, 最终导致肺通气和弥散功能丧失而危及生命^[9]。中医学认为其病位在肺, 涉及脾肾, 属本虚标实之证, 本虚以肺脾肾亏虚为主, 而阴虚血瘀贯穿糖尿病微血管病变始终, 在治疗糖尿病肺损害的过程中以滋阴化痰为主要治法^[10]。降糖通脉方以女贞子滋阴、黄连清热、川芎活血化瘀, 标本兼顾, 共奏滋阴化痰之效, 与糖尿病肺损害的病机对应。

通过网络药理学研究方法, 建立了“化合物-靶点”的关系网络, 为降糖通脉方多成分的复杂性、多靶点的不确定性、多通路的交叉性提供了科学依据。由“3.1.4”可知降糖通脉方的活性成分中阿魏酸、川芎嗪、小檗碱和女贞苷等与糖尿病肺损害的关系程度明显高于其他。研究表明, 川芎提取物对 STZ 诱导的糖尿病大鼠具有明显降血糖作用^[11]。阿魏酸通过抑制 JAK2/STAT6 免疫信号通路抑制肺癌细胞增殖和转移^[12]。川芎嗪可有效阻断大鼠气道壁中 III 型胶原的合成, 抑制网状基底膜增厚, 进而抑制气道重塑早期纤维化的发生^[13]。小檗碱通过 cAMP/GP 信号通路可改善 2 型糖尿病小鼠的肝糖原结

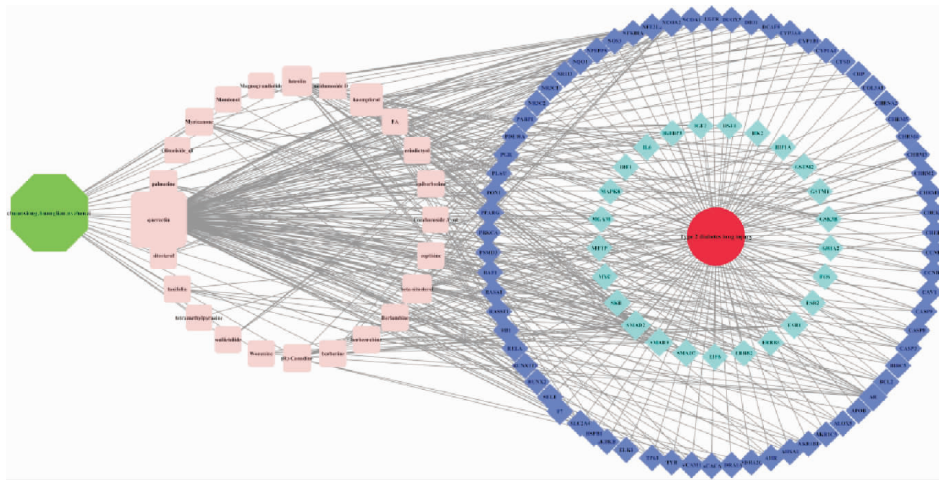


图4 中药活性成分-2型糖尿病肺损害-靶点交互网络

注:绿色代表中药,红色代表疾病,粉色代表药物活性成分,蓝色、天蓝色代表作用靶点。节点越大,关联度越大。

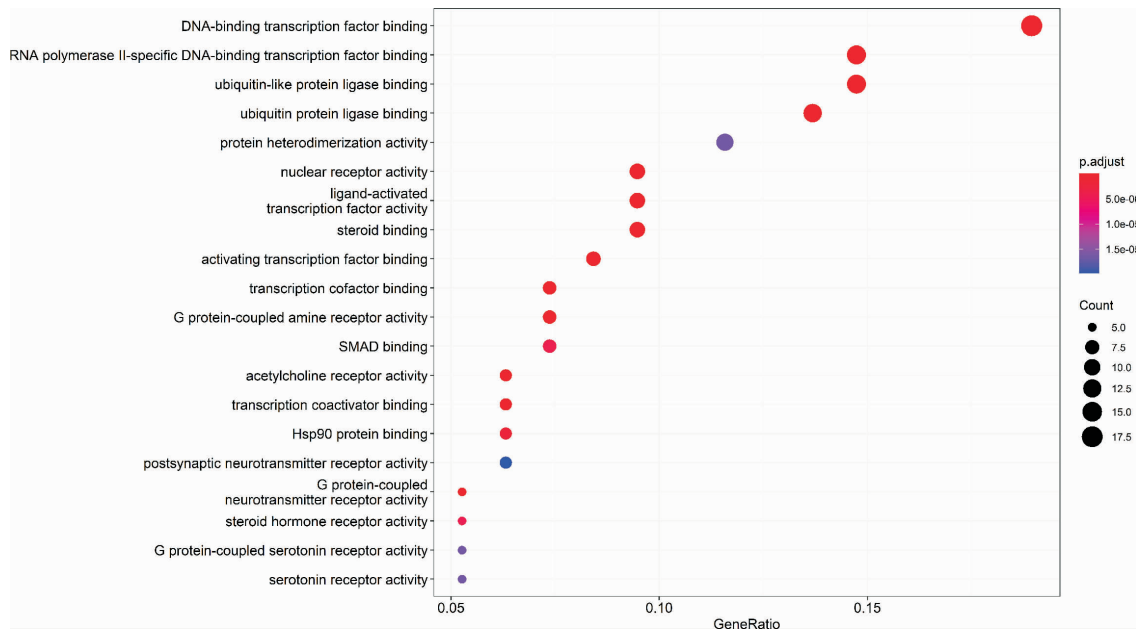


图5 GO 生物功能分析气泡图

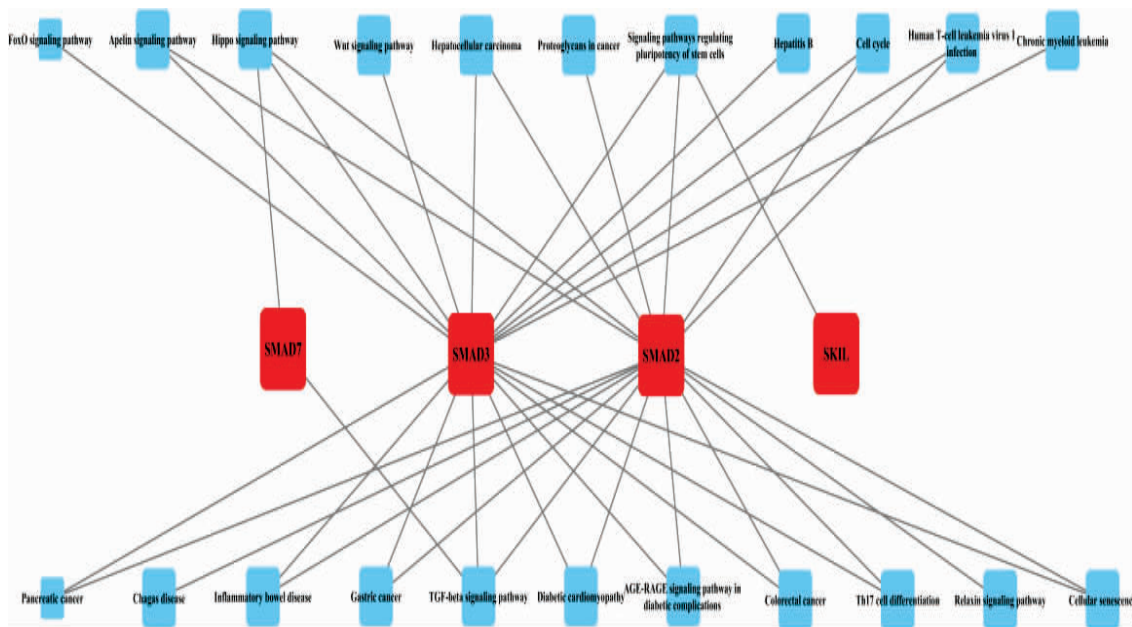


图6 KEGG 富集分析气泡图

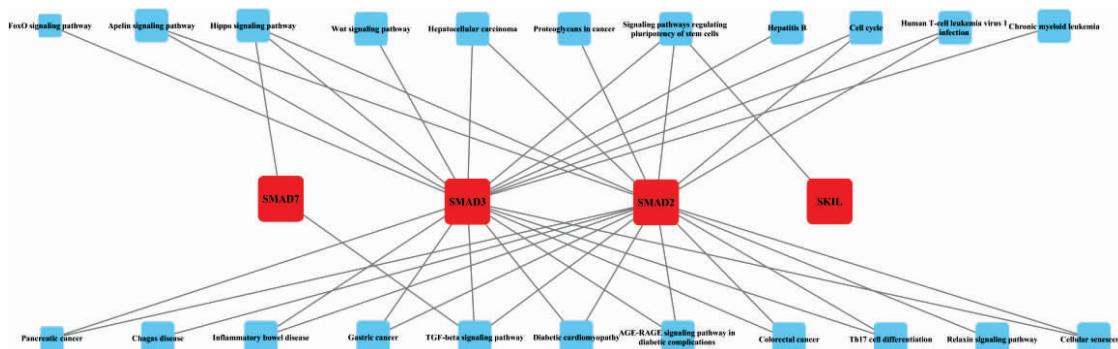


图 7 核心靶点与 2 型糖尿病相关性肺损害信号通路之间的关系

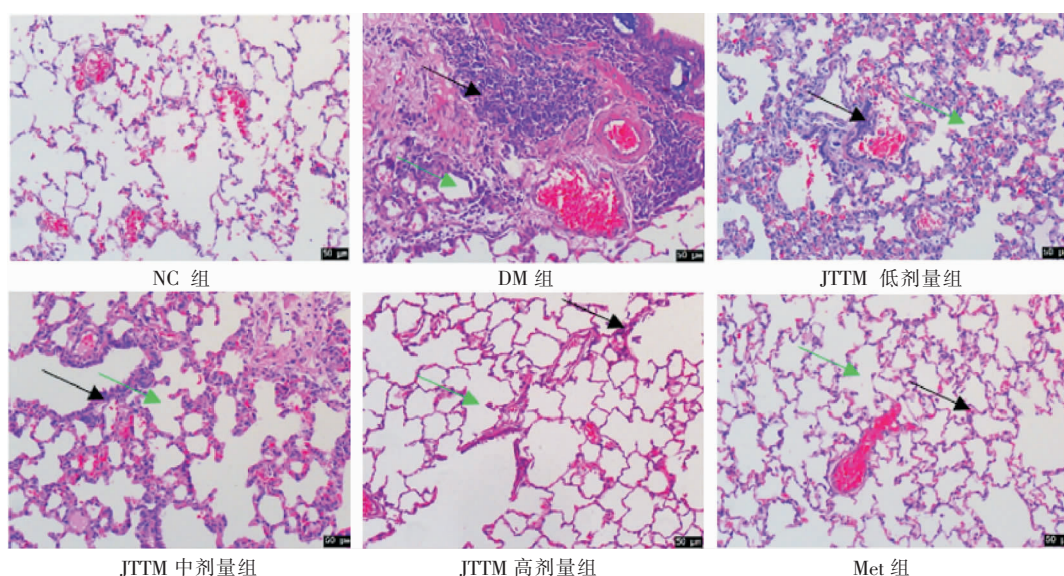


图 8 各组大鼠肺组织 HE 染色病理结构改变(200×)

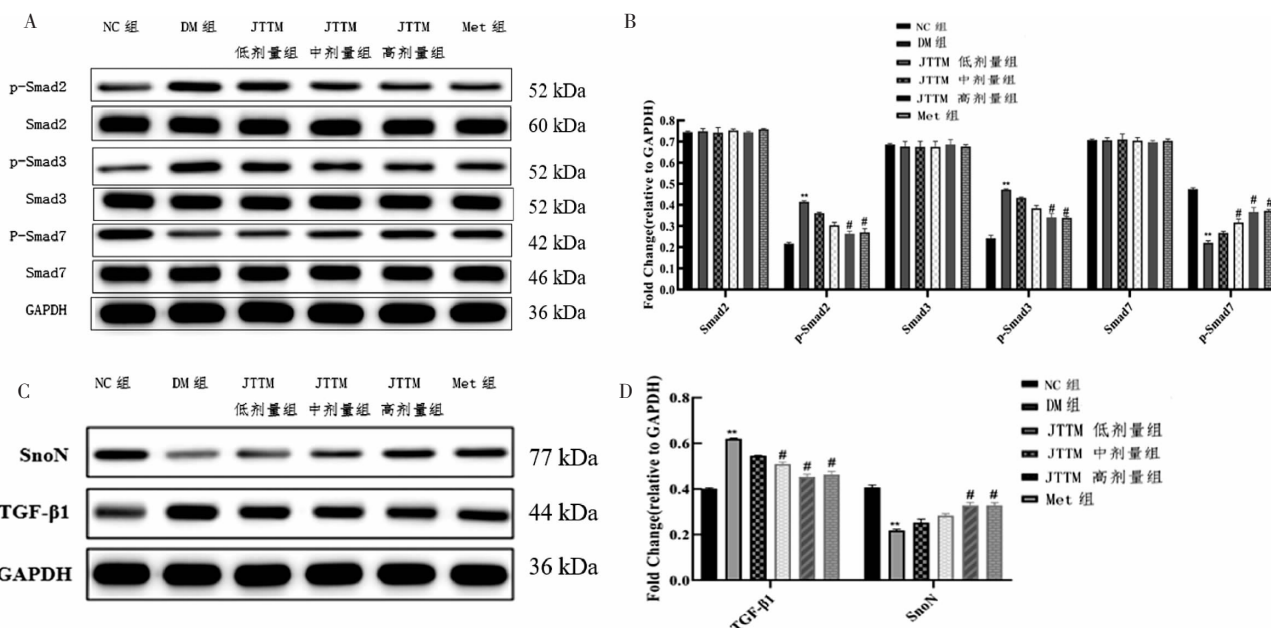


图 9 各组大鼠 TGF-β1/Smads 信号通路上的相关蛋白表达

注:A、B 为各组中 Smad2、Smad3 和 Smad7 及磷酸化 Smad2、Smad3 和 Smad7 的表达水平;C、D 为各组中 SnoN 和 TGF-β1 的表达水平。与 NC 组比较, ** $P < 0.01$; 与 DM 组比较, # $P < 0.05$ 。

构,修复受损糖原结构以调节肝糖代谢,从而发挥降糖作用^[14]。小檗碱可能通过与 Ang II 诱导 IL-1β/

NF-κB 通路介导的促炎性反应显著降低 2 型糖尿病小鼠血糖^[15]。黄连素可抑制 LPS 刺激下大鼠 II 型肺泡

上皮细胞促凝及纤溶抑制相关因子表达凝和纤溶抑制^[16]。女贞苷通过提高细胞中 AMP 与 ATP 浓度的比值激活 AMPK 通路从而促进脂联素的高聚化,而脂联素的高聚化对于提高葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性具有重要意义^[17]。女贞子通过上调 T-bet 基因表达和下调 GATA3 基因表达,调节 Th1/Th2 之间的平衡,抑制 IgE 生成和炎性细胞因子表达,减轻肺和气道的炎症反应^[18]。由此可以发现,降糖通脉方的活性成分在治疗糖尿病肺损害方面可能发挥了重要的作用。

根据网络药理学 PPI 网络分析筛选得到的核心基因 Smad2、Smad3、Smad7、SnoN (Skil) 等靶点与文献报道相一致^[19]。GO 生物功能分析中,与降糖通脉方作用靶点即相关联的有 DNA-转录因子结合、蛋白质异二聚化活性、配体激活的转录因子活性、Smad 结合等。KEGG 信号通路分析得出,降糖通脉方作用靶点主要通过 TGF- β 信号通路、AGE-RAGE 信号通路以及 TNF 信号通路等干预糖尿病肺损害,同时也与糖尿病其他微血管并发症存在密切的关系^[20]。

通过数据库及文献筛选,降糖通脉方中共得到 36 个活性分子、作用靶点有 109 个,其中与糖尿病肺损害相关的作用靶点有 95 个。PPI 网络中主要节点有 Smad2、Smad3、Smad7、SnoN (Skil) 等。分析结果显示,降糖通脉方主要通过蛋白质异二聚化活性、配体激活的转录因子活性、Smad 结合等 BP 参与糖尿病肺损害,通过 TGF- β 信号通路、AGE-RAGE 信号通路以及 TNF 信号通路等干预糖尿病肺损害。前期研究发现,此方可以下调 TGF- β 1 基因表达来干预糖尿病血管损害^[21-22]。相关研究也表明,SnoN (Skil) 和 TGF- β 1/Smads 通路与糖尿病肺损害最为密切,可能是其危险因素或共用信号通路^[23]。

动物实验结果表明,DM 组肺组织病理结果发现大鼠肺组织的肺泡腔缩小,炎性细胞浸润,肺泡腔被破坏增厚,大量胶原纤维增生,显示早期肺纤维化表现,这与文献报道的糖尿病肺损害大鼠肺组织病理结果是一致的^[24-26]。随着 JTTM 药物干预剂量的增加,各炎症因子的表达逐渐减少,降糖通脉方可以减轻糖尿病肺损害,有助于糖尿病肺损害的治疗和预后。Smads 作为 TGF- β 1 家族的下流信号分子,也是 TGF- β 1 的唯一底物^[27]。在外界刺激下,TGF- β 1 受体 I 直接磷酸化 Smad2 和 Smad3,最后与 Smad4 形

成三聚体,并在内部转移到细胞核参与调节靶基因转录^[28]。Smad7 是一个抑制 Smads 的蛋白,可降低 TGF- β 1 的表达,通过负反馈调节 TGF- β 1 信号转导,对糖尿病肺组织起到保护作用^[29]。

本研究表明,DM 组 TGF- β 1 蛋白水平明显高于 NC 组,提示糖尿病肺损害与 TGF- β 1 的过度表达密切相关。糖尿病大鼠 Smad2/3 表达增加、Smad7 表达降低,提示 TGF- β 1 参与糖尿病的肺损害的机制是上调 Smad2/3 的表达和下调 Smad7 表达。各组经 JTTM 干预后,Smad2/3 表达降低、Smad7 表达上调^[30-32]。

SnoN 蛋白属于 Ski 蛋白家族,它最重要的功能是通过结合 Smad 蛋白相互作用,以负向调控 TGF- β 1 信号转导,有效抑制糖尿病肺损害的发生^[33]。未受 TGF- β 1 刺激时,SnoN 蛋白与 Smad4 结合在 DNA 特异性结合位点(Smad binding element, SBE)上,SBE 是 Smad2、Smad3、Smad4 多聚体与 Smad7 基因启动因子的结合位点;反之,SnoN 会与 SBE 分离,而 Smad2、Smad3、Smad4 多聚体与 SBE 结合,使负调控因子 Smad7 基因的转录蛋白启动,Smad7 表达增多从而抑制 TGF- β 1 信号转导^[34-35]。在本研究中,当糖尿病肺损害发生时,TGF- β 1/Smads 信号通路与 SnoN 蛋白相互作用,可以抑制炎症信号。

综上所述,本研究通过网络药理学预测降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的作用机制,并通过动物实验对降糖通脉方治疗糖尿病肺损害的作用效果和潜在的信号通路进行验证,为中医药治疗糖尿病肺损害提供了新的思路。

参考文献

- [1] SCHUYLER M R, NIEWOEHNER D E, INKLEY S R, et al. Abnormal lung elasticity in juvenile diabetes mellitus[J]. The American Review of Respiratory Disease, 1976, 113(1): 37-41.
- [2] 彭丽媛,王海澜,翟芳龙,等.糖尿病大鼠肺脏微循环通透性的变化及其意义[J].中国医药导报,2014,11(3):23-26,169.
- [3] KODOLOVA I M, LYSENKO L V, SALTYSKOV B B. Changes in the lungs in diabetes mellitus[J]. Arkhiv Patologii, 1982, 44(7): 35-40.
- [4] 郑承红,柯淑红,马威,等.降糖通脉方对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢影响的实验研究[J].中华中医药杂志,2006,21(5):309-310.
- [5] 杨架林,李果,刘优萍,等.长期高脂饮食加小剂量链脲佐霉素建立人类普通 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J].中国实验动物学报,2003,11(3):138-141.
- [6] 周蕾,房辉,田金莉,等.糖尿病大鼠肺损伤的发病机制[J].中国老年学杂志,2015,35(8):2186-2188.

- [7] 周德鹏,梁英杰,曹东华,等.糖尿病大鼠肺组织 PI3K/Akt 表达的变化及意义[J].解剖科学进展,2016,22(4):426-428.
- [8] 张静萍,李静波,杨光,等.糖尿病大鼠肺病理改变及同期肾脏病理变化对比[J].中国医科大学学报,2004,33(4):312-313,316.
- [9] 张洁,郭立新.糖尿病与肺部疾病[J].中国糖尿病杂志,2015,23(2):185-188.
- [10] 刘增运.从阴虚血瘀论治糖尿病探析[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(5):14-15.
- [11] 姜信正,战春光,池中求,等.川芎提取物对链脉佐菌素诱导糖尿病模型大鼠血糖的影响[J].山东中医杂志,2011,30(3):194-196.
- [12] 郭风,赵瑞敏,李景亮,等.阿魏酸通过调控 JAK2/STAT6 免疫信号通路抑制肺癌细胞增殖和转移[J].中国免疫学杂志,2021,37(4):459-462.
- [13] 赵健嫦.中药川芎中有效成分川芎嗪的药理作用研究[J].海峡药学,2015,27(8):145-146.
- [14] 马林,刘小翠,邓斌.小檗碱通过影响糖原结构调节肝糖代谢研究[J].中草药,2020,51(16):4259-4265.
- [15] 薛瑞,李芳,李凡,等.小檗碱降血糖作用及其机制的实验研究[J].陕西中医,2014,35(12):1678-1679.
- [16] 李想,杨贵霞,沈锋,等.黄连素剂量依赖性抑制脂多糖刺激下大鼠 II 型肺泡上皮细胞促凝和纤溶抑制因子的表达[J].中华危重病急救医学,2021,33(1):53-58.
- [17] 郭文文.女贞苷和 TBC1D1 调控脂联素高聚化的机制研究[D].北京:清华大学,2015.
- [18] 张明发,沈雅琴.女贞子及其活性成分防治呼吸系统疾病的药理作用研究进展[J].药物评价研究,2020,43(11):2349-2362.
- [19] 贾哲,杨文文,杨雅昊,等.转化生长因子- β 在糖尿病微血管病变发病中作用的机制研究进展[J].山东医药,2019,59(30):103-106.
- [20] 王劲松.TGF- β 1/CTGF 在增生性糖尿病视网膜病变患者血清中的表达及意义[J].临床眼科杂志,2014,22(5):464-466.
- [21] 郑承红,柯淑红,马威,等.降糖通脉方干预肾组织细胞外基质表达的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(5):303-305,256.
- [22] 曹萍.降糖通脉方对糖尿病大鼠心肌病变影响的实验研究[D].武汉:湖北中医学院,2007.
- [23] 张秀莉,李万成. SnoN 在肺纤维化 TGF- β 1/Smad 通路中的作用[J].生命的化学,2018,38(2):236-240.
- [24] IRFAN M, JABBAR A, HAQUE A, et al. Pulmonary functions in patients with diabetes mellitus[J]. Lung India, 2011, 28(2): 89.
- [25] TAHASHI Y, MATSUZAKI K, DATE M, et al. Differential regulation of TGF- β signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury[J]. Hepatology, 2002, 35(1): 49-61.
- [26] DUMITRU R, GAMA V, FAGAN B M, et al. Human embryonic stem cells have constitutively active bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis[J]. Molecular Cell, 2012, 46(5): 573-583.
- [27] HILLS C E, SQUIRES P E. The role of TGF- β and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2011, 22(3): 131-139.
- [28] MA Y, ZOU H, ZHU X X, et al. Transforming growth factor β : A potential biomarker and therapeutic target of ventricular remodeling[J]. Oncotarget, 2017, 8(32): 53780-53790.
- [29] LEE C M, PARK J W, CHO W K, et al. Modifiers of TGF- β 1 effector function as novel therapeutic targets of pulmonary fibrosis[J]. The Korean Journal of Internal Medicine, 2014, 29(3): 281-290.
- [30] GUO Y J, GUPTA M, UMBARKAR P, et al. Entanglement of GSK-3 β , β -catenin and TGF- β 1 signaling network to regulate myocardial fibrosis[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2017, 110: 109-120.
- [31] MENG X M, TANG P M K, LI J, et al. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis[J]. Frontiers in Physiology, 2015, 6: 82.
- [32] YING Q D, WU G Z. Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: An update[J]. Renal Failure, 2017, 39(1): 474-483.
- [33] DEHEUNINCK J, LUO K X. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signaling[J]. Cell Research, 2009, 19(1): 47-57.
- [34] WU J W, KRAWITZ A R, CHAI J J, et al. Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein ski: Insights on ski-mediated repression of TGF- β signaling[J]. Cell, 2002, 111(3): 357-367.
- [35] SUZUKI H, YAGI K, KONDO M, et al. C-Ski inhibits the TGF- β signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements[J]. Oncogene, 2004, 23(29): 5068-5076.

(本文编辑 苏维)