

本文引用: 孙医慧, 王祥斌, 李俊明, 陈光宇, 谢梦洲, 李亮. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学探讨黄精糕干预 2 型糖尿病的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1653-1663.

基于 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学探讨黄精糕干预 2 型糖尿病的作用机制

孙医慧^{1,2,3}, 王祥斌^{1,2,3}, 李俊明^{1,2,3}, 陈光宇^{1,2,3}, 谢梦洲^{1,2,3*}, 李亮^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学中医心肺病证辨证与药膳食疗重点实验室, 湖南长沙 410208; 3. 湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208

[摘要] 目的 运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)和网络药理学,并采用动物实验验证,探讨黄精糕干预 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的作用机制,为产品开发提供依据。方法 采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析黄精糕化学成分,网络药理学预测其干预 T2DM 的作用靶点与通路。将 72 只大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、二甲双胍组(112.5 mg/kg)及黄精糕低(2.7 g/kg)、中(5.4 g/kg)、高(10.8 g/kg)剂量组,每组 12 只。1 日 1 次,连续给药 30 d。除正常组外,其余大鼠参照保健食品“辅助降血糖功能评价方法”中的方案,采用高脂高糖饮食联合链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导 T2DM 大鼠模型。造模成功后,每隔 1 周大鼠尾静脉针刺采血测定血糖,末次给药后酶标仪比色法检测血清胰岛素、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量,ELISA 法检测血清胰岛素。结果 从黄精糕中鉴定出 87 个成分和 434 个作用靶点,与 T2DM 有 160 个交集作用靶点。蛋白质-蛋白质相互作用网络图显示,黄精糕可能通过 STAT3、SRC、MAPK3、VEGFA、MAPK1 等靶点,经 AGE-RAGE 信号通路干预 T2DM。动物实验结果显示,与正常组比较,模型组血清中 TC、LDL-C、TG 含量及血糖显著升高($P<0.01$),血清胰岛素显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组血清中 LDL-C、TG、TC、MDA 含量显著降低($P<0.01$),SOD 含量显著升高($P<0.01$);黄精糕低剂量组血糖降低($P<0.05$),黄精糕高剂量组血糖显著降低($P<0.01$);黄精糕低剂量组血清胰岛素升高($P<0.05$),黄精糕中、高剂量组血清胰岛素含量显著升高($P<0.01$)。结论 黄精糕可能通过多靶点、多通路干预 T2DM。黄精糕具有降血糖、降血脂、抗氧化的作用,可用于辅助治疗 T2DM 的功能食品开发。

[关键词] 黄精糕; 2 型糖尿病; 网络药理学; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.09.016

Mechanism of action of Huangjing Cake intervening T2DM based on UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology

SUN Yihui^{1,2,3}, WANG Xiangbin^{1,2,3}, LI Junming^{1,2,3}, CHEN Guangyu^{1,2,3}, XIE Mengzhou^{1,2,3*}, LI Liang^{1,2,3*}

1. Hunan Engineering Technology Research Center for Medicinal and Functional Food, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Provincial Key Laboratory of TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

3. Key Laboratory of TCM Heart and Lung Pattern Differentiation & Medicated Diet and Dietotherapy, Hunan

University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[收稿日期] 2023-04-12

[基金项目] 湖南省重点研发计划(2022SK2018); 2023 年度湖南省中医药科研课题(B2023134)。

[第一作者] 孙医慧, 女, 硕士研究生, 研究方向: 常见疾病辨证施膳研究。

[通信作者] * 谢梦洲, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: xiemz64@163.com; 李亮, 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: superlil-
iang@126.com。

[Abstract] Objective The mechanism of action of Huangjing Cake in the intervention of type 2 diabetes mellitus (T2DM) was investigated by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC–Q–TOF–MS) and network pharmacology, and it was also verified by animal experiments, so as to provide evidence for product development. **Methods** UPLC–Q–TOF–MS was used to analyze the chemical components of Huangjing Cake; network pharmacology was taken to predict the target and pathway of its intervention in T2DM. A total of 72 rats were randomly divided into normal group, model group, metformin group (112.5 mg/kg), and low-, medium-, and high-dose Huangjing Cake groups (2.7 g/kg, 5.4 g/kg, 10.8 g/kg), with 12 rats in each group. All rats were administered once daily, for consecutive 30 days. Except for the normal group, the other groups were induced as T2DM rat models by high-fat and high-sugar diet combined with streptozotocin (STZ) according to the scheme of "evaluation method of auxiliary hypoglycemic function" of health food. After successful modeling, blood glucose was measured every other week by blood sampling from the tail vein of rats. The content of serum insulin, low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) was determined by enzyme linked immunosorbent assay after the last dose. ELISA was used to check serum insulin. Results Totally 87 components and 434 targets were identified from Huangjing Cake, and 160 targets were interacted with T2DM. Protein–protein interaction network showed that Huangjing Cake may interfere with T2DM through AGE–RAGE signaling pathway through STAT3, SRC, MAPK3, VEGFA, MAPK1 and other targets. The animal experiments showed that compared with the normal group, in model group, the content of serum TC, LDL-C, and TG was significantly higher ($P<0.01$), the blood glucose was significantly elevated ($P<0.01$), and the serum insulin was significantly lower ($P<0.01$). Compared with the model group, in medication groups, LDL-C, TG, TC, and MDA in serum were significantly lower ($P<0.01$), and SOD content was significantly higher ($P<0.01$). Blood glucose in low-dose Huangjing Cake group decreased ($P<0.05$), and blood glucose in high-dose Huangjing Cake group significantly decreased ($P<0.01$). The serum insulin content in the low-dose Huangjing Cake group was higher ($P<0.05$), and the serum insulin content in the medium- and high-dose groups was significantly higher ($P<0.05$). **Conclusion** Huangjing Cake may intervene T2DM through multi-target and multi-pathway. With the effects of lowering blood glucose, lowering blood lipids, and anti-oxidation, Huangjing Cake can be used to develop functional food for the treatment of T2DM.

[Keywords] Huangjing Cake; type 2 diabetes mellitus; network pharmacology; ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry

糖尿病是以胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗造成慢性血糖水平增高为特点的代谢疾病^[1]。T2DM(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是糖尿病中最主要的类型,约占糖尿病患者总数的 90%^[2]。临床治疗糖尿病大致分为口服降糖药和注射胰岛素两个方案^[3],但使用时有着严格的适应证和禁忌证,长期服用多伴有毒副作用及不良反应^[4]。近年来,药食同源产品由于辅助治疗作用确切,安全性高且味道较好,适合长期服用,在市场上逐渐受到消费者的青睐,对大众保健、康复、营养起到了积极的作用^[5-6]。研发一款由药食同源中药组成且适用于T2DM及其并发症的产品,具有社会意义和经济价值。

黄精糕是由黄精、玉竹、山药、枸杞子、桑椹、覆盆子共 6 味药食同源中药组成,经提取、浓缩、干燥制成的干浸膏粉^[7]。T2DM 属中医学“消渴病”范畴,消渴病病机为阴虚燥热,治宜养阴生津、润燥清热。根据 2020 年版《中华人民共和国药典》^[8],黄精补气养阴、健脾、润肺、益肾;玉竹养阴润燥、生津止渴;枸

杞子滋补肝肾、益精明目;桑椹滋阴补血、生津润燥;山药补脾养胃、生津益肺、补肾涩精;覆盆子益肾固精缩尿、养肝明目。以上 6 味中药合用有补气养阴、润燥生津的功效,符合消渴病的病机、治则。据文献报道,黄精、玉竹、山药、枸杞子、桑椹中的多糖类成分、皂苷类成分及覆盆子中的覆盆子酮等成分皆有降血糖及降血脂作用^[9-16],山药、玉竹含有的黄酮类成分具抗氧化作用,可有效降低血糖水平^[17-18]。

中药复方的化合物成分多样,对应靶点多,通路多,作用机制不明确。超高效液相色谱–四极杆–飞行时间质谱(ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC–Q–TOF–MS)技术具有灵敏度高、精准度高、扫描范围广的特点,可以有效识别中药复方中的各种化学成分^[19]。网络药理学通过构建药物–药物、药物–靶标等网络,能够有效预测药物的功效^[20]。本实验采用 UPLC–Q–TOF–MS 和网络药理学分析黄精糕干预 T2DM 的作用靶点与通路,参照保健食品“辅助降

血糖功能评价方法”^[21]中的方案,研究黄精糕降血糖、降血脂、抗氧化的作用,为黄精糕产品开发提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Exion LC AD型超高效液相色谱仪、X-500R型飞行时间四极杆质谱仪(美国AB Sciex公司);i-MarK型酶标仪(伯乐生命医学产品上海有限公司);UV900B型紫外-可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器股份有限公司);GA-3型血糖仪、配套试纸条、一次性采血针(三诺生物传感股份有限公司)。

1.2 药物与主要试剂

链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)(北京索莱宝生物科技有限公司,批号:s5080,规格:1 g/瓶);盐酸二甲双胍缓释片(正大天晴药业集团,批号:201229302,国药准字:H20031104,规格:0.5 g×60片);生理盐水(江西科伦药业有限公司,批号:20050701,国药准字:H10983065,规格:500 mL);10%水合氯醛(福州飞净生物科技有限公司,批号:PH1818,规格:100 mL)。血糖试剂盒、总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒、低密度脂蛋白(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒、丙二醇(malondialdehyde, MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、胰岛素试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:F006-1、A111-1、A113-1、A110-1、A003-1、A001-3、H203-1)。

黄精、玉竹、山药、枸杞子、桑椹、覆盆子中药饮片购自湖南省新化县绿源农林科技有限公司,经湖南中医药大学王智老师鉴定为正品。

1.3 黄精糕样品制备

黄精糕由黄精 10 g、玉竹 4 g、山药 4 g、枸杞子 4 g、桑椹 4 g、覆盆子 4 g 组成,以上药材加入 12 倍量 70%乙醇提取 1 次,15 kPa 压力下 60 °C 提取 90 min,再分别加水 12 倍、10 倍提取 120 min、90 min(温度 90 °C,压力 7 kPa),得到黄精糕提取液。黄精糕提取液经 50 °C 减压浓缩至 1.05 g/mL,冷冻干燥制成黄精糕干浸膏粉。

2 方法

2.1 黄精糕化学成分分析

2.1.1 色谱条件和质谱条件 色谱条件:WATERS ACQUITY UPLC@BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μL),以甲醇溶液为流动相 A,以 0.1%甲酸为流

动相 B;柱温 25 °C;流速 0.3 mL/min;梯度洗脱:0~10 min,10% A;10~45 min,10%→90% A;45~49 min,90% A;49~50 min,90%→10% A;50~60 min,10% A。

质谱条件:采用电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI),正、负离子模式;除溶剂气体温度 550 °C;毛细管电压 5.0 kv;气帘气压力 35 psi;喷雾气压力 50 psi;辅助气压力 50 psi;扫描范围 100~1 000 m/z。

2.1.2 空白对照液与黄精糕供试液制备 空白对照液的制备:取超纯水,离心 10 min(12 000 r/min,离心半径 12 cm),即得;黄精糕供试液的制备:取黄精糕干浸膏粉约 0.1 g,精密加入 10 mL 水,超声(200 W, 50 Hz)60 min,高速离心 10 min(12 000 r/min 离心半径 12 cm),取上清液,即得。

2.1.3 质谱分析 精密吸取空白对照液、黄精糕供试液各 10 μL,注入液质联用仪,分析各供试液成分。黄精糕供试液的液质总离子流图(正、负离子),详见图 1。

2.2 网络药理学研究

2.2.1 黄精糕活性成分靶点筛选 在 PubChem 数据库下载各活性成分 sdf 文件,在 SwissTargetPrediction 数据库预测各活性成分作用靶点,删除重复值。

2.2.2 T2DM 靶点搜集与筛查 在 GeneCards 数据库以“diabetes mellitus type 2”为关键词筛选疾病靶点。用 Venny 2.1.0 将疾病靶点与黄精糕活性成分预测作用靶点去重并取交集。

2.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI)网络构建与分析 将共同基因导入 STRING 11.5,限制物种为“Homo sapiens”,置信度为 0.09,进行 PPI 分析。将药物与疾病共同靶点导入 Cytoscape 3.8.0 构建“成分-靶点”网络图。对节点度值进行分析、排序,确定黄精糕干预 T2DM 的核心靶点。

2.2.4 基因本体(gene ontology, GO)富集分析与京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析 将“2.2.3”获取的靶点导入 DAVID 6.8 平台进行 GO 功能与 KEGG 通路分析。

2.3 动物实验验证

2.3.1 动物与饲料 SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只,体质量 180~200 g,由湖南中医药大学实验动物中心订购[许可证号:SYXK(湘)2019-0009],饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心(伦理审批编号:LL2021061602)。高脂高糖饲料由湖南中医药大学实验动物中心订购,饲料组成为:10%猪油、20%蔗

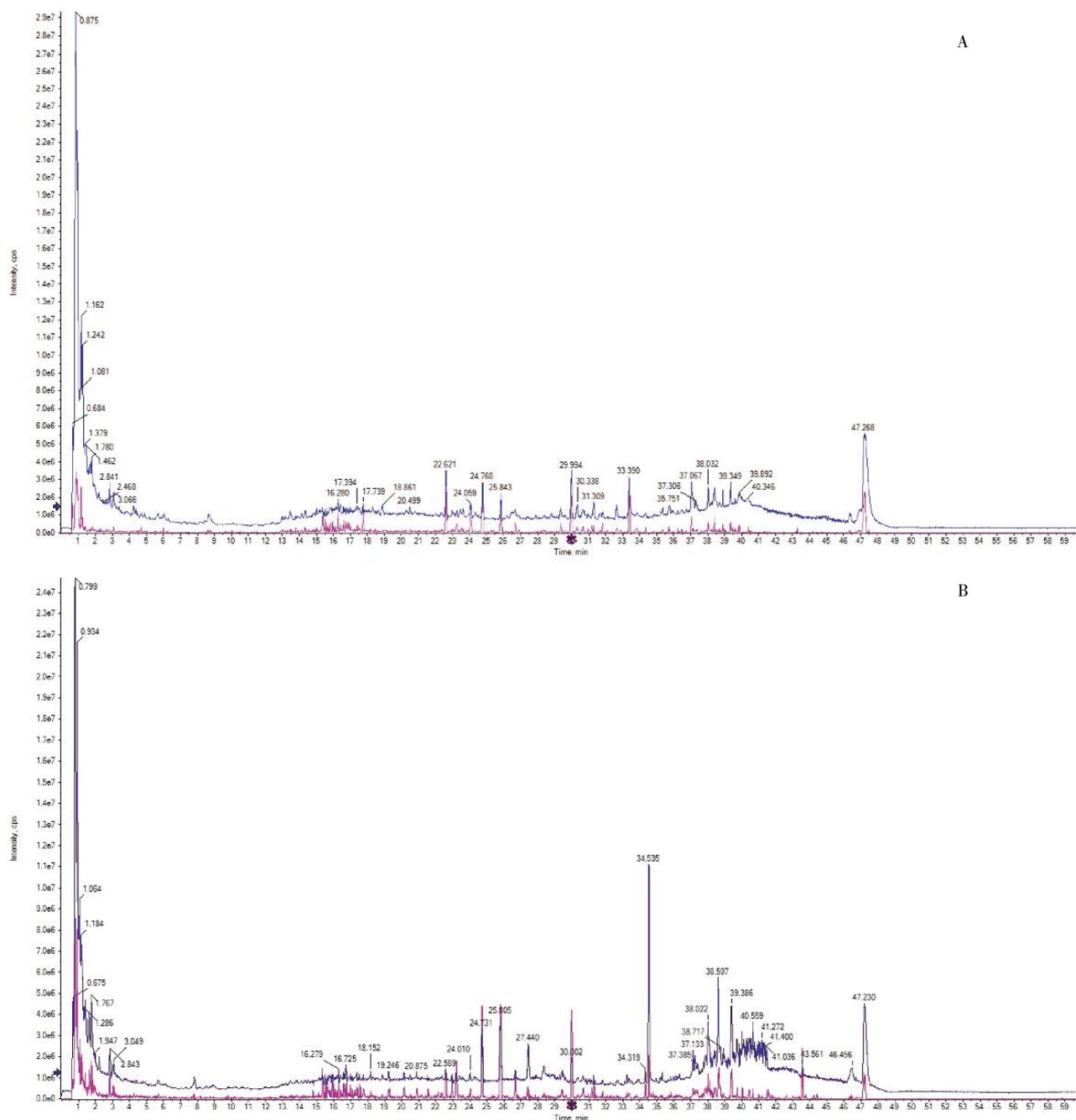


图1 黄精糕供试液的液质总离子流图

注:A.负离子模式;B.正离子模式。

糖、10%蛋黄粉、1%胆固醇、0.2%胆酸钠、58.8%鼠维持料。

2.3.2 T2DM 大鼠模型的构建 72只雄性大鼠给予普通饲料适应性饲养3d后,随机选取12只作为正常组,给予普通饲料喂养,剩余60只给予高脂高糖饲料喂养30d后,禁食(不禁水)12h,于次日称重。以40mg/kg的剂量腹腔注射STZ溶液,继续高脂高糖饲料喂养3d后,再次禁食(不禁水)12h,尾静脉采血测定空腹血糖。大鼠造模成功的标准为:空腹血糖 ≥ 11.1 mol/L^[21]。未造模成功的大鼠,继续高脂高糖饲料喂养3d后禁食,检测空腹血糖。仍未达标者,再次腹腔注射等剂量的STZ溶液,直至所有

大鼠造模成功。

2.3.3 分组与给药 造模成功的大鼠随机分成模型组,黄精糕低、中、高剂量组,二甲双胍组(成人1日1次最大剂量2000mg,最低剂量500mg,取中剂量1250mg,换算成大鼠的灌胃量为112.5mg/kg)。大鼠黄精糕灌胃剂量通过人-动物体表面积换算公式^[23],全方30g,按照70kg成人的临床剂量为30g/70kg,换算为大鼠用量2.7g/kg,此剂量作为低剂量,中、高剂量分别为5.4、10.8g/kg。黄精糕低、中、高剂量组给予黄精糕提取液,二甲双胍组给予二甲双胍溶液,模型组、正常组给予生理盐水(10mL/kg),每日定时给药1次,连续给药30d。

2.3.4 指标检测 造模成功后,所有大鼠每隔1周进行空腹血糖检测。检测时,提前禁食(不禁水)12 h,尾静脉针刺采血测定血糖。腹主动脉取血5 mL,3 000 r/min离心10 min,离心半径8 cm,分离得到血清。按照各试剂盒要求,酶标仪比色法分别测定LDL-C、TG、TC、MDA、SOD指标,ELISA法测定血清胰岛素含量。

2.3.5 数据分析 各样品检测结果用DPS统计软件进行异常值检验,剔除各组异常指标后再进行统计。符合正态性和方差齐性者采用完全随机设计多样本单因素方差分析,不符合正态性或方差齐性采用多样本秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄精糕主要化学成分

通过UPLC-Q-TOF-MS技术分析得到黄精糕中87个成分,主要包括柠檬酸、甜菜碱、D-蔗糖、D-葡萄糖、葡萄糖酸等,详见表1。预测87个成分可以作用于1 113个靶点,筛除重复靶点后剩余434个靶点。

3.2 T2DM与黄精糕交集靶点的获取

在GeneCards数据库获得T2DM靶点1 186个。用Venny 2.1.0将疾病靶点与黄精糕活性成分作用靶点去重取交集,获得160个交集靶点。详见图2。

3.3 PPI网络的构建与分析

根据PPI网络图,获取黄精糕治疗T2DM的核心靶点,根据靶点的度值进行排序,前10位分别为:STAT3、SRC、MAPK3、VEGFA、MAPK1、TNF、PPA-RA、NR3C1、RXRG、HSP90AA1。详见图3。

3.4 GO富集分析与KEGG通路富集分析

GO功能分析得到基因生物过程(biological process, BP)571条,主要涉及ERK1和ERK2级联的正向调控、MAP激酶活性的正向调节、药物反应、低氧反应、平滑肌细胞增殖的正向调节等;获得细胞组成(cell composition, CC)78条,主要为质膜、细胞外分泌体、膜筏面等;获得分子功能(molecular function, MF)144条,主要为酶结合位点、转录因子活性、蛋白结合等;根据 P 值进行排序后,取前5位进行可视化。详见图4。

将KEGG通路富集分析按显著性排序,取前10位进行展示。共同靶点主要与脂质和动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的AGE-RAGE等信号通路相关(图5)。由此可见,黄精糕可以通过多个生物机制达到治疗T2DM的效果。其中糖尿病并发症中的AGE-RAGE

信号通路可能为关键作用通路(图6)。

3.5 黄精糕对T2DM大鼠血脂的影响

与正常组比较,模型组血清中TC、LDL-C、TG含量显著升高($P<0.01$),说明造模成功。与模型组比较,各给药组血清中TC、LDL-C、TG含量均显著降低($P<0.01$)。与二甲双胍组比较,黄精糕低剂量组TG降低($P<0.05$)。详见图7。

3.6 黄精糕对T2DM大鼠血糖及血清胰岛素的影响

与正常组相比,模型组血糖显著升高($P<0.01$),说明造模成功。与模型组相比,黄精糕高剂量组、二甲双胍组血糖显著降低($P<0.01$),黄精糕低剂量组血糖降低($P<0.05$)。

与正常组相比,模型组血清胰岛素显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,黄精糕中、高剂量组及二甲双胍组血清胰岛素均显著升高($P<0.01$),黄精糕低剂量组血清胰岛素升高($P<0.05$)。详见图8。

3.7 黄精糕对T2DM大鼠血清SOD、MDA的影响

与正常组相比,模型组血清中SOD含量显著降低、MDA含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组血清中SOD含量显著升高、MDA含量显著降低($P<0.01$)。详见图9。

4 讨论

T2DM是一种以糖脂代谢紊乱为特征的疾病,主要由环境因素及遗传因素引起,目前认为其主要发病机制为胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞功能障碍^[24]。中医学认为,消渴病多饮、多食、多尿、体重减轻、神疲乏力等症状的病机是阴液亏损,燥热偏盛。黄精糕有补气养阴、润燥生津的功效,符合消渴病治则。且T2DM有明显高发性和低龄化趋势^[25],药食同源产品在早期干预与长期调理中无毒副作用的独特优势。

本研究通过UPLC-Q-TOF-MS技术联合网络药理学和动物实验验证的方式,证明了黄精糕有降血糖、降血脂、抗氧化的作用,并从有效成分、蛋白靶点和通路等方面综合探索、预测黄精糕干预T2DM的机制。在UPLC-Q-TOF-MS技术分析得到的黄精糕成分中,柠檬酸、甜菜碱、D-蔗糖、D-葡萄糖峰面积百分比比较高。动物实验证明,柠檬酸可以改善高脂血症动物的糖代谢紊乱^[26],甜菜碱可降低瘦素受体缺陷型小鼠血糖、血脂水平^[27]。本文分析出D-蔗糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、阿拉伯糖、五水棉子糖、果糖等不同糖成分。其中D-蔗糖、D-葡萄糖是黄精多糖中的单糖和寡糖成分^[28],D-甘露糖、D-葡萄糖、半乳糖、

表 1 黄精糕中化学成分

编号	保留时间/(Rt/min)	相对分子质量/(m/z)	化合物	峰面积百分比/%	来源
1	1.24	192.019	柠檬酸	23.26	负离子
2	0.81	117.084	甜菜碱	17.95	正离子
3	0.90	684.222	D-蔗糖	15.73	负离子
4	0.78	216.032	D-葡萄糖	8.31	负离子
5	0.82	196.050	葡萄糖酸	7.02	负离子
6	0.88	192.056	奎宁酸	6.89	负离子
7	2.85	165.083	苯丙氨酸	6.00	正离子
8	22.62	610.144	芦丁	5.59	正、负离子
9	17.36	448.099	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	3.87	正离子
10	2.86	126.036	5-羟甲基糠醛	3.39	正离子
11	31.30	506.283	氰氟虫脒	3.33	正离子
12	1.00	134.014	L-苹果酸	3.22	负离子
13	1.01	135.059	腺嘌呤	1.96	正离子
14	1.69	131.099	亮氨酸	1.92	正离子
15	26.91	594.149	山奈酚-3-O-芸香糖苷	1.92	正、负离子
16	1.56	116.004	马来酸	1.89	负离子
17	1.30	129.035	L-焦谷氨酸	1.83	正、负离子
18	1.24	174.009	乌头酸	1.61	负离子
19	0.98	176.036	维生素 C	1.58	正离子
20	19.67	164.040	对香豆酸	1.46	负离子
21	38.89	280.232	亚油酸	1.35	负离子
22	1.83	151.053	鸟嘌呤	1.32	正离子
23	16.74	354.087	绿原酸	1.30	正、负离子
24	32.23	286.231	维生素 A	1.26	正离子
25	1.43	135.073	安非他明	1.15	正离子
26	23.00	301.998	鞣花酸	1.08	负离子
27	0.95	150.045	L(+)-阿拉伯糖	1.08	负离子
28	18.87	192.046	6-羟基-7-甲氧基香豆素	1.01	正离子
29	2.86	165.071	苯丙氨酸	0.95	负离子
30	4.86	142.031	曲酸	0.91	正离子
31	18.87	204.082	L-色氨酸	0.90	正、负离子
32	4.40	154.019	3,4-二羟基苯甲酸	0.90	负离子
33	18.01	164.051	对羟基肉桂酸	0.80	正离子
34	20.50	452.164	瑞格列奈	0.69	正离子
35	1.45	181.066	L-络氨酸	0.69	正、负离子
36	14.86	354.087	隐绿原酸	0.67	负离子
37	0.85	208.050	羟基柠檬酸	0.65	负离子
38	2.21	170.014	没食子酸	0.63	负离子
39	24.02	448.092	紫云英苷	0.62	负离子
40	16.89	288.065	香橙素	0.60	正离子
41	6.63	276.113	解草酮	0.58	正离子
42	0.95	550.165	D(+)-五水棉子糖	0.54	负离子
43	13.78	516.145	4,5-二咖啡酰奎宁酸	0.53	正离子
44	16.73	348.176	双咪茶脲	0.52	正离子
45	33.85	534.346	积雪草酸	0.50	负离子
46	29.66	696.202	长梗冬青苷	0.47	负离子
47	5.84	354.087	新绿原酸	0.47	负离子
48	1.25	130.019	戊烯二酸	0.45	负离子
49	1.36	244.062	尿苷	0.45	正、负离子
50	22.32	434.111	蒟蒻苷	0.44	负离子

续表 1

编号	保留时间/(Rt/min)	相对分子质量/(m/z)	化合物	峰面积百分比/%	来源
51	1.33	112.032	尿嘧啶	0.43	正离子
52	1.20	123.037	烟酸	0.41	正离子
53	8.62	516.139	1,5-二咖啡酰奎宁酸	0.38	负离子
54	0.78	260.022	半乳糖-1-磷酸	0.37	负离子
55	29.39	824.393	太子参环肽 B	0.36	负离子
56	23.40	510.168	虱螨脲	0.35	正离子
57	10.73	122.029	对羟基苯甲醛	0.33	负离子
58	0.75	132.082	L-天冬酰胺	0.33	负离子
59	12.39	350.098	三苯基氢氧化锡	0.30	正离子
60	19.64	138.024	对羟基苯甲酸	0.29	负离子
61	1.54	118.019	丁二酸	0.27	负离子
62	1.84	283.084	鸟苷	0.27	正、负离子
63	13.26	168.035	香草酸	0.26	负离子
64	21.55	568.303	海洛酸	0.26	正离子
65	4.01	219.103	D-泛酸	0.24	负离子
66	22.62	464.087	金丝桃苷	0.23	负离子
67	23.60	514.178	替米沙坦	0.22	正离子
68	1.41	180.056	D-甘露糖	0.20	负离子
69	37.13	494.334	常春藤皂苷元	0.20	正离子
70	13.29	610.144	新橙皮苷	0.19	负离子
71	11.33	290.071	表儿茶素	0.19	负离子
72	0.75	174.104	精氨酸	0.19	正、负离子
73	31.06	288.222	雌三醇	0.18	负离子
74	0.81	226.061	果糖	0.17	负离子
75	3.43	132.035	戊二酸	0.17	负离子
76	5.87	634.071	柯里拉京	0.16	负离子
77	1.41	345.039	鸟嘌呤核糖苷-3,5	0.15	负离子
78	2.81	154.019	2,5-二羟基苯甲酸	0.15	负离子
79	22.04	540.178	灵芝酸 C2	0.15	正离子
80	1.68	313.094	腺苷	0.15	负离子
81	28.87	182.050	高香草酸	0.13	负离子
82	24.36	624.160	异鼠李素-3-O-新橙皮苷	0.12	正、负离子
83	4.92	150.036	左旋香芹酮	0.10	正离子
84	26.90	594.132	槲树苷	0.10	正离子
85	23.85	462.078	木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	0.10	正离子
86	23.89	462.071	野黄芩苷	0.09	负离子
87	17.49	198.045	没食子酸乙酯	0.09	负离子

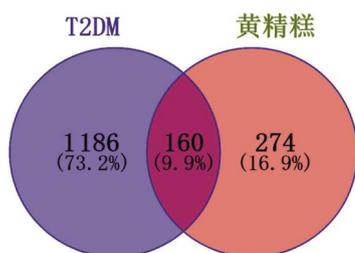


图 2 T2DM 与黄精糕交集靶点的 Venn 图

阿拉伯糖是玉竹多糖组成成分^[29],阿拉伯糖、D-甘露糖、D-葡萄糖是山药多糖的组成成分^[30]。黄精、玉竹、

山药的多糖可有效降低血糖、血脂^[9-11]。鞣花酸是 2020 版《中华人民共和国药典》中覆盆子鉴别质量的成分之一,可降低糖尿病模型小鼠的血糖水平^[31]。以上都是黄精糕发挥降血糖、血脂作用的关键成分。

通过 PPI 网络分析得出, SRC、STAT3、VEGFA、TNF、PPARA 5 个靶点排名靠前,与黄精糕中的活性成分结合度较高。说明黄精糕的活性成分与以上靶点结合度较高。研究发现,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 作为细胞因子,可以参加多种炎症与免疫反应,诱导胰岛 β 细胞凋亡^[32],进而

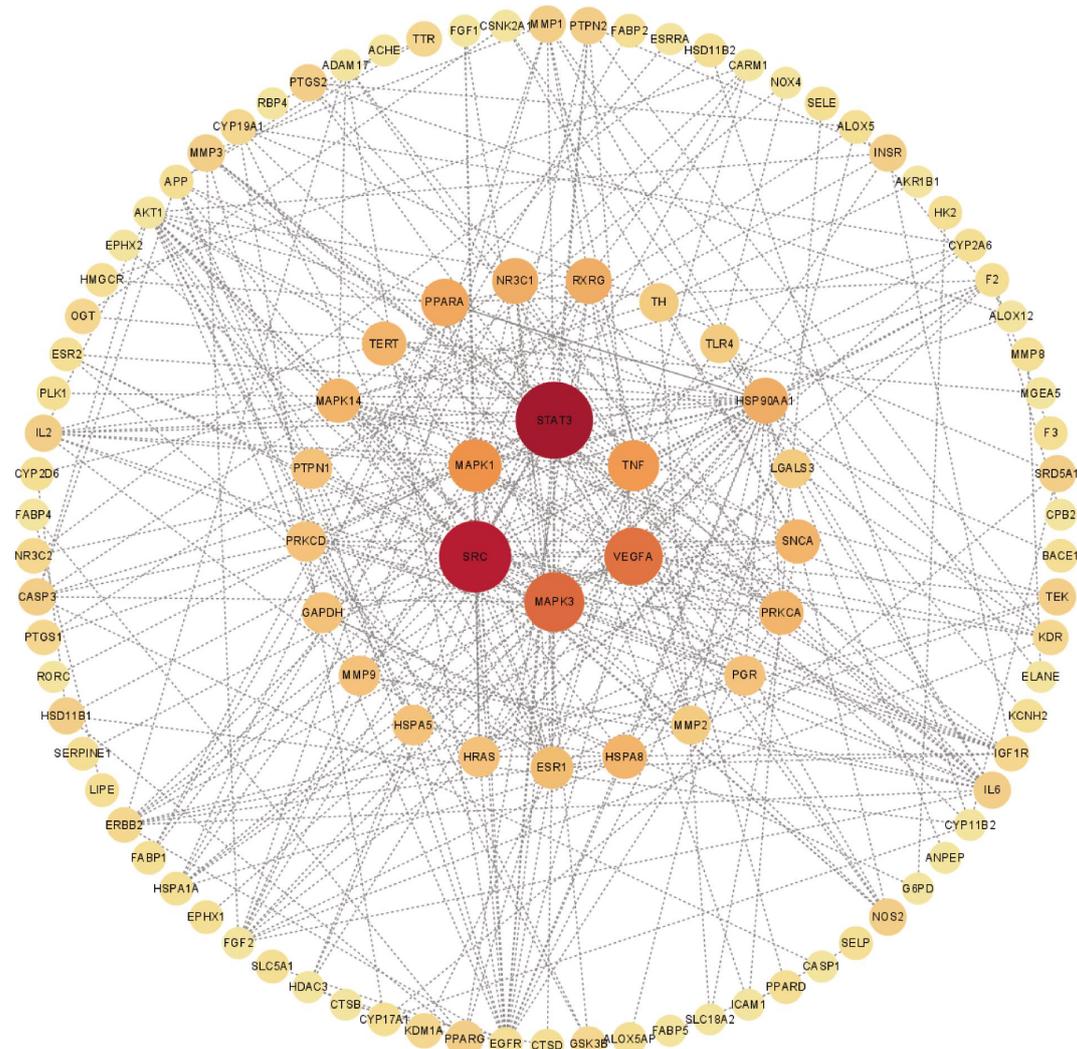


图 3 黄精糕化合物作用于 T2DM 靶点的 PPI 网络图

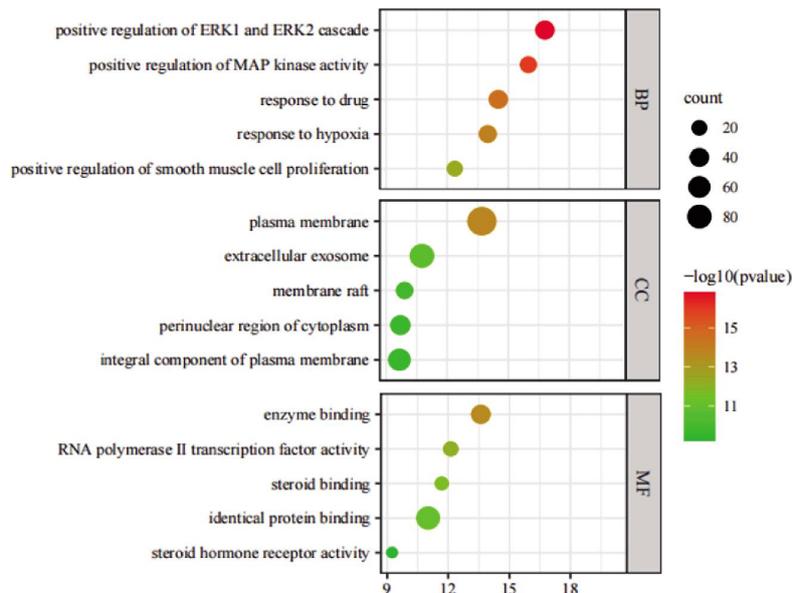


图 4 黄精糕潜在干预 T2DM 靶点的 GO 富集分析

引发 T2DM。PPARA 是过氧化物酶体增殖物激活受体中的一个亚型,与脂代谢关系密切,PPARA 可以调节血糖稳态,维持脂质代谢平衡^[33]。VEGFA 是内

皮细胞在体内和体外的生存因子,GAO 等^[34]通过实验证明,VEGFA 与高糖诱导“代谢记忆”存在关联,参与 T2DM 的病理过程。SRC 在细胞增殖、分化等

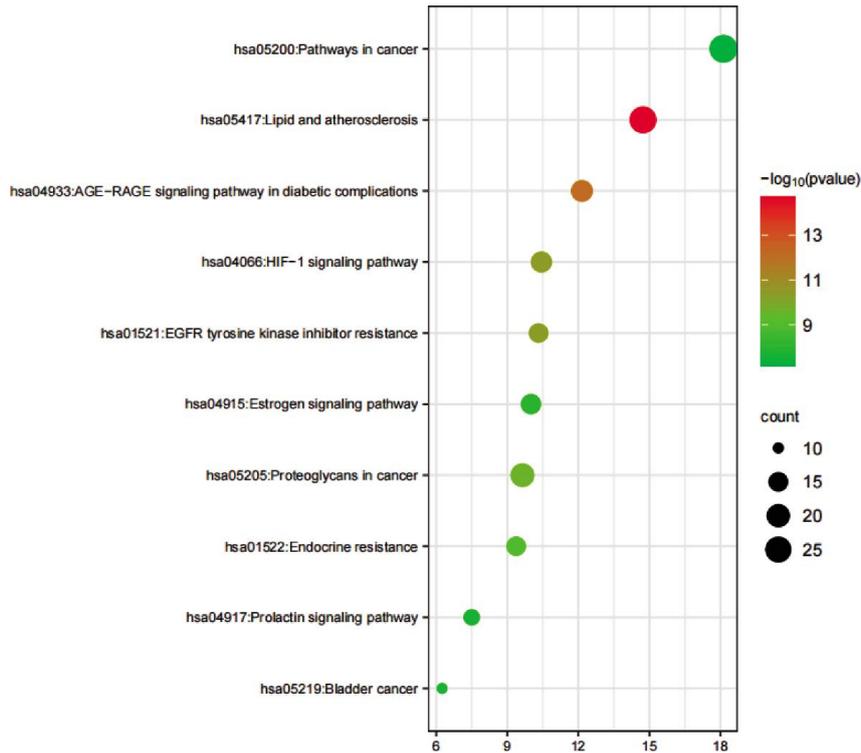


图 5 黄精糕潜在干预 T2DM 靶点的 KEGG 富集分析

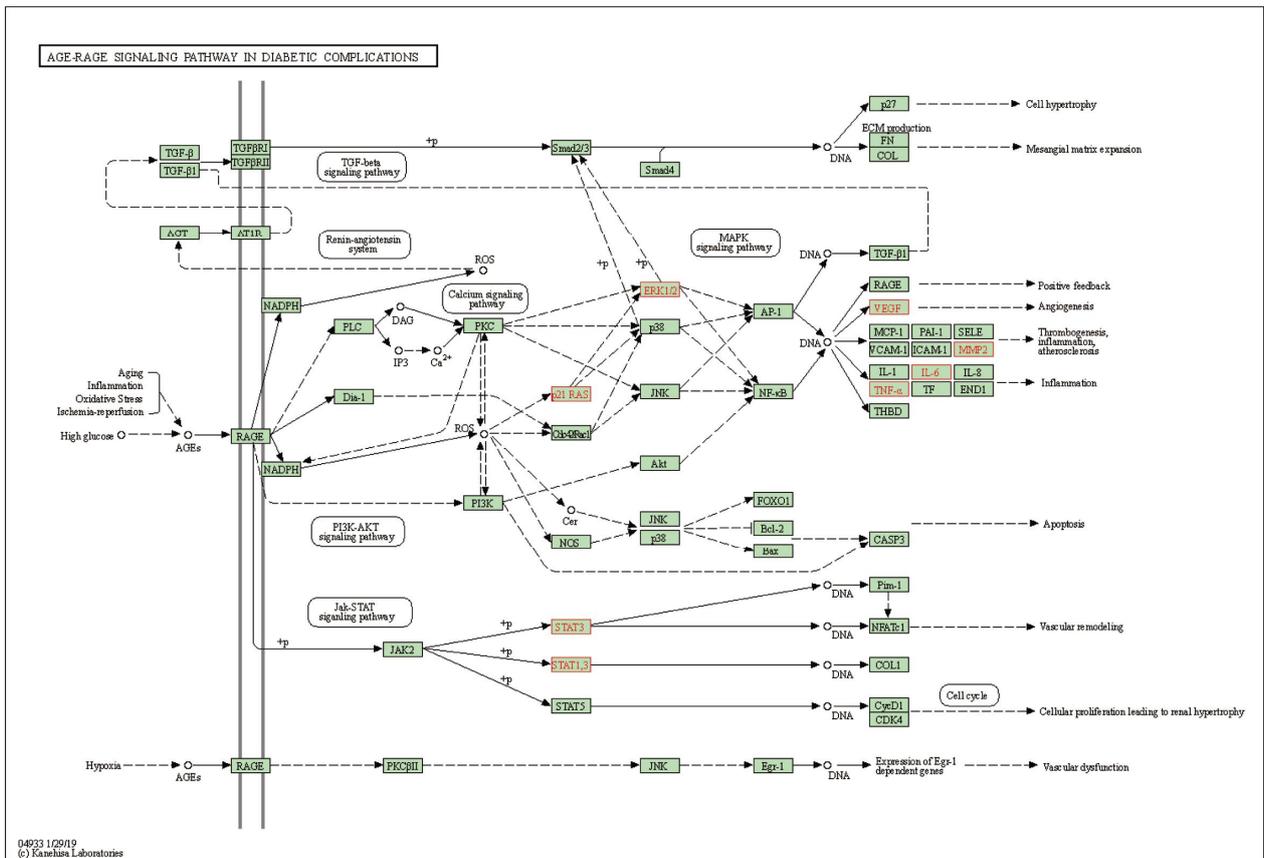


图 6 黄精糕成分作用于 T2DM 并发症中的 AGE-RAGE 信号通路的作用靶点

细胞过程中发挥作用,核受体共激活因子 1(nuclear receptor coactivator 1, SRC1)不仅是肥胖的潜在治疗靶点,也是糖尿病的潜在治疗靶点^[35]。研究表明,

抑制 STAT3 的活化可以改善由高血糖引起的心脏功能障碍和心脏纤维化^[36]。根据以上研究,证明 PPI 网络筛选出的靶点与 T2DM 关系紧密,TNF、VEG-

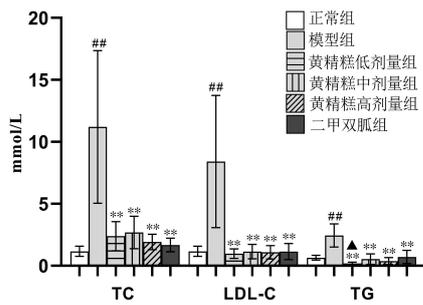


图7 各组大鼠血脂比较

注:与正常组比较, $^{\#}P<0.01$;与模型组比较, $^{**}P<0.01$;与二甲双胍组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

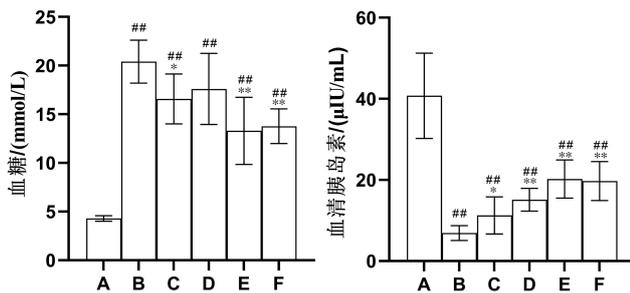


图8 各组大鼠血糖及血清胰岛素比较

注:A.正常组;B.模型组;C.黄精糕低剂量组;D.黄精糕中剂量组;E.黄精糕高剂量组;F.二甲双胍组。与正常组比较, $^{\#}P<0.01$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

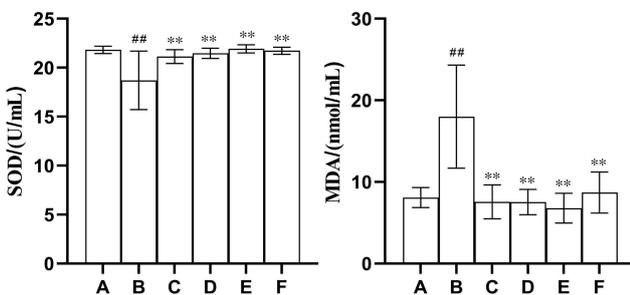


图9 各组大鼠血清中SOD、MDA比较

注:A.正常组;B.模型组;C.黄精糕低剂量组;D.黄精糕中剂量组;E.黄精糕高剂量组;F.二甲双胍组。与正常组比较, $^{\#}P<0.01$;与模型组比较, $^{**}P<0.01$ 。

FA、SRC、STAT3、PPARA可能是黄精糕干预2型糖尿病的关键靶点。KEGG通路富集结果表明,黄精糕与T2DM的共同靶点主要与脂质和动脉粥样硬化、癌症、雌激素、AGE-RAGE在糖尿病并发症中的信号通路、HIF-1等信号通路相关。实验证明,胰岛素抵抗大鼠模型的骨骼肌中AGE、RAGE的表达量上调,说明高血糖状态下可以导致AGE、RAGE的积累,AGE、RAGE广泛参与多种生理、病理过程^[37]。根据AGE-RAGE信号通路结果可以得出,AGE/RAGE信号引发多种细胞内信号通路的激活,导致NF- κ B活性增强,NF- κ B再促进促炎细胞因子和多种动脉

粥样硬化相关基因的表达,最终引发糖尿病并发症。AGE-RAGE信号介导的糖尿病并发症包括糖尿病神经病变、糖尿病肾病、糖尿病血管并发症和糖尿病足综合征。

动物实验结果表明,黄精糕能显著降低T2DM大鼠血清中的LDL-C、TG、TC含量,有显著的降脂作用,黄精糕各剂量组的降脂效果与二甲双胍组的效果相当。黄精糕各剂量组对T2DM大鼠有升高血清胰岛素含量、降低血糖的作用。黄精糕可提高SOD活力、降低MDA含量,有效改善T2DM大鼠的抗氧化能力,这也是降低血糖的机制之一。TC是指血液中各种脂蛋白所含胆固醇的总和,当TC单独升高,可以诊断为高胆固醇血症。载脂蛋白糖化LDL-C后会促进巨噬细胞对其的吞噬,从而加速血管壁的斑块形成,增加心脑血管疾病风险。TG是长链脂肪酸和甘油形成的脂肪分子,TG升高是心血管剩留风险的重要组成部分,美国国立卫生研究院资助的控制糖尿病心血管患者风险行动中的血脂分享研究显示,在T2DM患者中,TG增高和高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)降低的患者与TG正常人群相比,心血管剩留危险增加70%^[38]。心血管疾病是T2DM患者主要和最常见的死亡原因,因此,T2DM患者除血糖外还要重点关注自身LDL-C、TG、TC水平。

结合网络药理学预测结果,黄精糕可能通过多靶点、多环节调节糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路,从而降低血糖、血脂水平,降低糖尿病并发症的风险,起到干预T2DM的作用。

综上所述,经动物实验验证,黄精糕可以改善T2DM大鼠血糖、血脂水平等指标发挥干预T2DM的作用。根据UPLC-Q-TOF-MS及网络药理学结果分析,黄精糕可能由多种活性成分如黄精多糖、玉竹多糖、鞣花酸等,通过调节TNF、VEGFA、SRC、STAT3、PPARA等靶点,调控AGE-RAGE信号通路、干预T2DM。本研究可为黄精糕产品研发提供依据,为后续研究提供思路。

参考文献

- [1] 施岚尔, 聂课朝, 张文婧, 等. 基于网络药理学的小陷胸汤治疗2型糖尿病的药理机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 198-206.
- [2] 褚煜, 陈海, 吕宏阳, 等. 基于网络药理与分子对接研究4味药食两用中药治疗2型糖尿病的机制[J]. 中成药, 2022, 44(10): 3360-3365.
- [3] 朱菲, 吴梅, 孔向军, 等. 金线莲干预2型糖尿病的“关键成分-潜在靶标-核心通路”网络挖掘及实验验证[J]. 中草药,

- 2022, 53(12): 3720-3729.
- [4] 丁宁, 黄吉东, 亓鲁光. 基于《内经》“无毒治病”理论探讨药食同源方怀春膏对自发性2型糖尿病小鼠血糖及内脏组织的影响[J]. 四川中医, 2022, 40(1): 41-44.
- [5] 杨春红, 潘琳, 唐茜, 等. 辅助降血糖功能的药食同源原料的应用概况[J]. 中药与临床, 2022, 13(1): 103-107, 114.
- [6] 任蓁, 刘思莹, 穆琢莹, 等. 具有降脂作用的药食同源物质中补阴药的研究进展[J]. 中医药学报, 2021, 49(4): 88-92.
- [7] 李俊明, 向茗, 陈光宇, 等. 黄精糕减压提取与常压提取降血糖活性成分的比较研究[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(12): 28-35.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 30, 86, 260, 313, 319, 399.
- [9] 曹语珈, 王凯, 王子丽, 等. 多花黄精多糖对斑马鱼2型糖尿病合并骨质疏松症模型的药效学研究[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6545-6551.
- [10] 周骏, 惠晓亮, 毛滢, 等. 玉竹多糖对2型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(10): 1181-1187.
- [11] 张文杰, 赖星海, 陈佳薇. 山药多糖治疗肥胖糖尿病肾病大鼠的效果观察及其对肾功能和肠道微生态的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(1): 37-42.
- [12] 张娜, 唐富天. 枸杞多糖对糖尿病肾损伤的保护作用和机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(11): 1237-1243.
- [13] 王强, 王睿, 王存, 等. 桑椹多糖调节血糖代谢及体外抗氧化效果研究[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 260-264.
- [14] 彭静. 黄精皂苷对糖尿病肾病大鼠肾损伤的保护作用及Wnt/ β -catenin信号通路的影响[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2518-2521.
- [15] 郭常润, 戴平, 张欣, 等. 玉竹总皂苷降血糖作用实验研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(4): 19-21.
- [16] 谢欣梅, 庞晓斌, 李晓婷. 覆盆子酮对糖尿病模型小鼠的降血糖作用及其机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(23): 1899-1904.
- [17] 何凤玲, 叶小利, 李学刚, 等. 山药中降糖活性成分的筛选与比较[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 373-375.
- [18] 王京京, 佐月, 殷乐, 等. 玉竹总黄酮的研究进展[J]. 人参研究, 2019, 31(6): 53-56.
- [19] 卫瑞, 杨琳娇, 秦雪梅, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS和分子网络技术快速鉴定芦笋茎皮中的化学成分[J]. 药学学报, 2022, 57(9): 2839-2850.
- [20] 张彦琼, 李梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883-892.
- [21] 国家市场监督管理总局. 保健食品功能检验与评价方法[EB/OL]. (2022-01-13)[2023-03-21]https://www.samr.gov.cn/hd/zjdc/art/2023/art_b9d0712d43524224945af6ef21903403.html.
- [22] 袁李佳龙, 洪陈亮, 王珍, 等. 适度游泳运动对链脲佐菌素所致2型糖尿病小鼠骨骼肌自噬的影响[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(7): 915-919.
- [23] 王鑫国. 中药药理学实验教程[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 8.
- [24] 郭婉容, 刘维, 黄莉吉, 等. 中医药基于炎症信号通路调控防治2型糖尿病的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(22): 249-256.
- [25] 叶雄伟. 格列齐特与格列喹酮联合二甲双胍在糖尿病患者中的应用疗效对比[J]. 糖尿病新世界, 2023, 26(10): 89-91, 103.
- [26] 王妙颖. 柠檬酸对高脂血症动物糖代谢紊乱的改善作用及机理补步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2020.
- [27] 黄敏. 甜菜碱对糖尿病db/db小鼠肾病早期损伤的保护作用及相关机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [28] 张艳雪, 周巧, 张学兰, 等. 黄精炮制前后寡糖与单糖类成分含量变化与转化机制研究[J]. 中药材, 2020, 43(2): 318-322.
- [29] 柳婷. 基于甜味受体的玉竹多糖降血糖作用机理研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2022.
- [30] 于海芬. 铁棍山药多糖的纯化、结构及胃肠调节活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
- [31] 骆静方, 魏巍, 乔楠, 等. 鞣花酸对四氧嘧啶糖尿病小鼠的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(07): 649-651.
- [32] 魏爽, 李冀, 韩东卫, 等. 基于网络药理学探讨黄芪-葛根药对对T2DM模型大鼠PI3K/Akt/FoxO1信号通路的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 157-168.
- [33] 张璇. 细胞极性调控因子PAR-1显著调控秀丽隐杆线虫的衰老[D]. 南京: 南京大学, 2016.
- [34] GAO J, AILIFEIRE M, WANG C, et al. MiR-320/VEGFA axis affects high glucose-induced metabolic memory during human umbilical vein endothelial cell dysfunction in diabetes pathology[J]. *Microvascular Research*, 2020, 127: 103913.
- [35] FENG X T, WANG T Z, LENG J, et al. palmitate contributes to insulin resistance through downregulation of the Src-mediated[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2012, 76: 1356-1361.
- [36] LO S H, HSU C T, NIU H S, et al. Ginsenoside Rh2 improves cardiac fibrosis via PPAR δ -STAT3 signaling in type 1-like diabetic rats[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7): 1364.
- [37] 于嘉祥, 张瀚文, 杨宇峰, 等. 基于AGEs-RAGE信号通路研究中复方益糖康改善大鼠骨骼肌胰岛素抵抗的作用机制[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 25-30, 260-270.
- [38] ELAM M, LOVATO L, GINSBERG H. The ACCORD-Lipid study: implications for treatment of dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus[J]. *Clinical Lipidology*, 2011, 6(1): 9-20.