

基于PI3K/Akt/FoxO1通路探讨大黄酸对2型糖尿病大鼠肾损伤的作用

乔进¹, 赵彦¹, 陈霞¹, 窦志华^{1*}, 孟国梁², 吴锋², 徐济良²

(1. 南通大学附属南通第三医院, 江苏南通 226006; 2. 南通大学, 江苏南通 226006)

摘要:目的 通过PI3K/Akt/FoxO1信号传导通路探讨大黄酸对链脲佐菌素诱导的2型糖尿病大鼠肾脏损伤的作用。方法 通过高脂饮食+小剂量STZ(35 mg/kg)造模,将2型糖尿病大鼠随机分为大黄酸低、高(75、150 mg/kg)剂量组,二甲双胍组(300 mg/kg),模型组,另设正常对照组。连续给药12周后,检测各组大鼠的血糖、体质量、肾脏指数、MDA水平、SOD和GSH-Px活性,HE染色观察各组大鼠肾组织病理形态学改变,Masson三色染色观察胶原表达,免疫组化法与Western blot法检测大鼠肾脏PI3K、Akt与FoxO1蛋白表达。**结果**与正常组比较,模型组大鼠体质量、SOD和GSH-Px活性、FoxO1蛋白表达降低($P<0.05$),血糖、肾脏指数、肾组织MDA水平和PI3K、Akt蛋白表达升高($P<0.05$),肾脏有明显病变损伤;与模型组比较,大黄酸各剂量组体质量、SOD和GSH-Px活性、FoxO1蛋白表达升高($P<0.05$),血糖、肾脏指数、肾组织MDA水平和PI3K、Akt蛋白表达降低($P<0.05$),肾脏病理损伤得到改善。**结论**大黄酸对2型糖尿病大鼠肾脏有保护作用,其机制可能与减轻肾脏氧化应激及调节肾脏PI3K/Akt/FoxO1信号转导通路有关。

关键词: 大黄酸; 2型糖尿病; 糖尿病肾病; PI3K/Akt/FoxO1信号通路; 氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)02-0609-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.048

糖尿病肾病是糖尿病患者容易发生的并发症之一,是发展为终末期肾病的主要病因,也是糖尿病患者致死的重要原因之一,大约有30%~45%的糖尿病患者会出现糖尿病肾病^[1-2]。糖尿病肾病在临床上缺少有效的治疗方法,至今为止,其发病机制尚不清楚。中药单体在糖尿病肾病的治疗中发挥一定作用,如姜黄素、丹酚酸B等^[3-6]。大黄蒽醌类化合物大黄酸在降血糖、抗氧化、抗炎、抗癌等方面有重要作用^[7-8]。大黄酸已被证实可通过TGF- β_1 /Smad信号转导途径对糖尿病肾病大鼠肾脏发挥保护作用^[9],本研究基于PI3K/Akt/FoxO1信号转导通路,通过构建STZ诱导的2型糖尿病大鼠模型,从氧化应激指标、肾组织病理形态学及目标蛋白表达等情况,进一步探讨大黄酸对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用。

1 材料

1.1 试剂与药物 大黄酸购自上海笛柏生物科技有限公司,纯度>98.0%,批号DK05,用含0.5%羟甲基纤维素钠(CMC)的0.9%NaCl溶液配置成相应剂量的混悬液;阳性对照药二甲双胍购自上海信宜天平药业有限公司,批号67100507。链脲佐菌素(STZ)购自美国Sigma公司,临用前用0.1 mol/L柠檬酸缓冲液配置成1%溶液;丙二醛

(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购自南京建成生物工程研究所; β -actin抗体购自上海康成生物工程有限公司;PI3K、Akt、FoxO1抗体购自美国CST公司;预染蛋白Marker购自美国New England Biolabs公司;蛋白浓度测定试剂盒购自海门碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器 One Touch血糖仪(美国强生公司);BH-NIC-B型倒置显微镜(日本Olympus公司);蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司);SH-100型凝胶图像分析仪(上海复旦高技术公司)。

1.3 动物 成年SD大鼠70只,雌雄各半,体质量160~180 g,饲养于南通大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2018-001,分笼饲养,每笼4只,环境温度24~26℃,相对湿度55%~60%,饲料与水充足。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 随机取10只大鼠为正常组,其余60只为造模组。正常组大鼠给予普通饲料,造模组大鼠先给予高脂饮食(普通饲料70%、蛋黄粉5%、奶粉5%、脂肪20%)4周后,在其胰岛素抵抗后禁食12 h,给予小剂量STZ(35 mg/kg)腹腔注射。1周后,大鼠空腹血糖值

收稿日期: 2021-08-27

基金项目: 江苏省南通科技计划项目(JCZ18124);江苏省药学会常州四药医院药学科研基金项目(ntyx1807);江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2018674)

作者简介: 乔进(1985—),男,硕士,副主任药师,从事药理学与临床药理学

*通信作者: 窦志华(1966—),男,博士,主任中药师,从事中药药理与药效研究

大于 11.1 mmol/L, 提示造模成功。取 48 只造模成功的大鼠随机分为模型组, 大黄酸高、低剂量组 (150、75 mg/kg), 二甲双胍组 (300 mg/kg), 每组 12 只, 继续给予高脂饮食, 每天给药 1 次, 正常组与模型组大鼠给予 0.9% NaCl 灌胃, 持续 12 周。

2.2 血糖测定 给药 12 周末, 各组大鼠禁食 12~14 h 后经尾静脉取血测空腹血糖。

2.3 体质量与肾脏指数测定 给药 12 周末, 取肾脏, 用 0.9% NaCl 溶液冲洗, 滤纸吸干, 称重并计算肾脏指数, 肾脏指数=双侧肾脏质量/大鼠体质量×100%。

2.4 肾组织 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性检测 按照试剂盒说明检测各组大鼠肾脏组织中 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性。

2.5 肾组织病理形态学观察 取肾脏置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋, 切片, 行 HE 与 Masson 染色, 通过光镜观察肾组织病理形态学变化, 拍照, 每只大鼠选取 5 个典型视野进行统计分析, 以系膜基质百分比为依据进行肾小球损伤评分。

2.6 免疫组化法检测 FoxO1 蛋白表达 组织切片后进行脱蜡, 使用柠檬酸缓冲液进行抗原修复, 3% 双氧水灭活, FoxO1 (1:200) 4℃ 孵育过夜, 37℃ 复温 30 min, PBS 洗涤, 二抗 (1:1000) 37℃ 孵育 30 min, 洗涤, DAB 显色, 苏木素复染, 透明, 封片, 采用 JEDA801D 型形态学软件测定阳性信号的面积与平均灰度。

2.7 Western blot 法检测 PI3K、Akt 与 FoxO1 蛋白表达 取 100 mg 肾组织, 组织裂解液提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量。用 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 随后转移至 PVDF 膜上, 置于 5% 脱脂牛奶 TBST 溶液中室温封闭 2 h,

分别加入一抗与 β -actin 抗体 4℃ 摇床孵育过夜, TBST 洗涤 2 次, 加二抗室温反应 1 h, TBST 洗涤 2 次后于暗室加入 ECL 试剂, X 线胶片曝光显影定影, 测定各组蛋白与内参 (β -actin) 条带灰度值的比值, 取平均值。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠空腹血糖变化 与正常组比较, 模型组大鼠空腹血糖升高 (P<0.05); 与模型组比较, 大黄酸高剂量组与二甲双胍组大鼠空腹血糖降低 (P<0.05), 见表 1。

表 1 各组大鼠空腹血糖比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)
正常组	—	10	4.37±0.26
模型组	—	12	20.54±0.84**
二甲双胍组	300	12	14.54±0.31 [#]
大黄酸高剂量组	150	12	12.89±0.72 [#]
大黄酸低剂量组	75	12	17.55±0.68

注: 与正常组比较, **P<0.01; 与模型组比较, [#]P<0.05。

3.2 各组大鼠一般状态、体质量与肾脏指数变化 正常组大鼠活动状态良好, 行动灵敏, 外表毛发整齐; 模型组与大黄酸低剂量组大鼠多数安静不动, 外表毛发脏乱; 大黄酸高剂量组与二甲双胍组大鼠活动状态良好, 行动灵敏, 毛发色泽较光亮。与正常组比较, 模型组大鼠体质量下降, 肾脏指数升高 (P<0.05); 与模型组比较, 大黄酸高剂量组与二甲双胍组大鼠体质量升高, 肾脏指数下降 (P<0.05), 见表 2。

表 2 各组大鼠体质量与肾脏指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	体质量/g	肾脏指数/(g·kg ⁻¹)
正常组	—	10	398.57±35.41	2.98±0.25
模型组	—	12	224.33±20.17*	6.54±0.78*
二甲双胍组	300	12	289.44±21.74 [#]	4.55±0.33 [#]
大黄酸高剂量组	150	12	305.27±23.49 [#]	4.02±0.47 [#]
大黄酸低剂量组	75	12	255.61±21.45	6.06±0.61

注: 与正常组比较, *P<0.05; 与模型组比较, [#]P<0.05。

3.3 各组大鼠肾脏 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性变化 与正常组比较, 模型组大鼠肾脏组织 MDA 水平升高, SOD、GSH-Px 活性降低 (P<0.01); 与模型组比较,

大黄酸各剂量组与二甲双胍组大鼠肾脏组织 MDA 水平降低, SOD、GSH-Px 活性升高 (P<0.05, P<0.01), 见表 3。

表 3 各组大鼠肾脏 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	MDA/(mmol·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/(kU·mL ⁻¹)
正常组	—	10	4.10±0.21	116.32±6.25	10.77±0.41
模型组	—	12	8.62±0.55**	60.08±4.04**	5.13±0.22**
二甲双胍组	300	12	6.04±0.35 [#]	98.63±5.88 [#]	8.08±0.20 [#]
大黄酸高剂量组	150	12	5.87±0.32 [#]	101.74±5.31 [#]	8.54±0.25 [#]
大黄酸低剂量组	75	12	7.58±0.46 [#]	70.58±5.09 [#]	5.36±0.19 [#]

注: 与正常组比较, **P<0.01; 与模型组比较, [#]P<0.05, ^{##}P<0.01。

3.4 各组大鼠肾组织病理形态学变化 肉眼观察正常组大鼠肾脏表面颜色为暗红色, 包膜清晰易剥离; 模型组大鼠肾

脏体积较大, 颜色较正常组苍白; 其余给药组大鼠肾脏外观性状介于正常组与模型组之间。HE 染色显示, 正常组大鼠

肾脏结构清晰, 间质无炎症细胞浸润; 模型组大鼠肾组织增生明显, 细胞外基质增多; 各给药组大鼠上述病变均有不同程度改善, 部分肾小球增大、系膜细胞增生等均可见不同程

度改善。通过肾小球损伤指数分析, 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织损伤加重 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 大黄酸各剂量组肾组织损伤减轻 ($P < 0.01$), 见图 1~2、表 4~5。

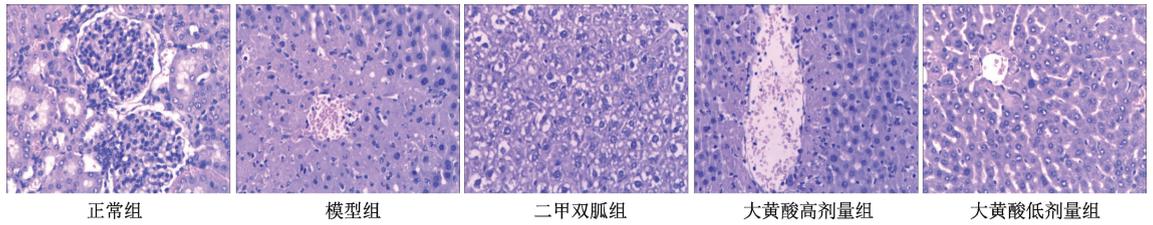


图 1 各组大鼠肾脏 HE 染色图 ($\times 100$)

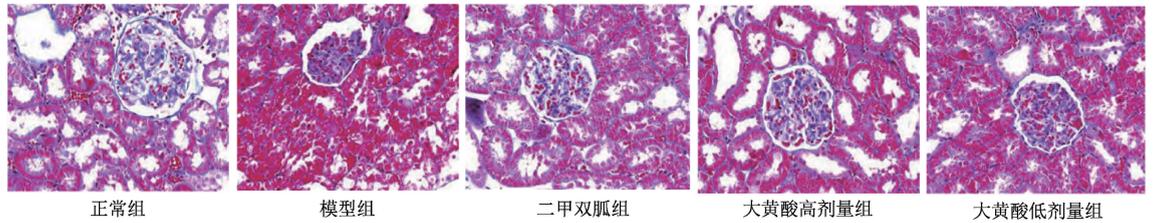


图 2 各组大鼠肾脏 Masson 染色图 ($\times 400$)

表 4 各组大鼠肾组织 HE 染色肾小球损伤指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物数/只	肾小球损伤指数
正常组	—	10	2.18 \pm 0.23
模型组	—	12	8.56 \pm 1.12**
二甲双胍组	300	12	4.69 \pm 0.54 ^{##}
大黄酸高剂量组	150	12	4.27 \pm 0.72 ^{##}
大黄酸低剂量组	75	12	6.34 \pm 0.60 ^{##}

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

3.5 各组大鼠肾组织 FoxO1 蛋白表达变化 与正常组比较, 模型组肾组织 FoxO1 表达增多 ($P < 0.05$); 与模型组

表 5 各组大鼠肾组织 Masson 染色肾小球损伤指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物数/只	肾小球损伤指数
正常组	—	10	2.09 \pm 0.21
模型组	—	12	8.37 \pm 1.15**
二甲双胍组	300	12	4.88 \pm 0.61 ^{##}
大黄酸高剂量组	150	12	4.42 \pm 0.55 ^{##}
大黄酸低剂量组	75	12	6.57 \pm 0.54 ^{##}

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

比较, 大黄酸高剂量组与二甲双胍组 FoxO1 表达降低 ($P < 0.05$), 见图 3、表 6。

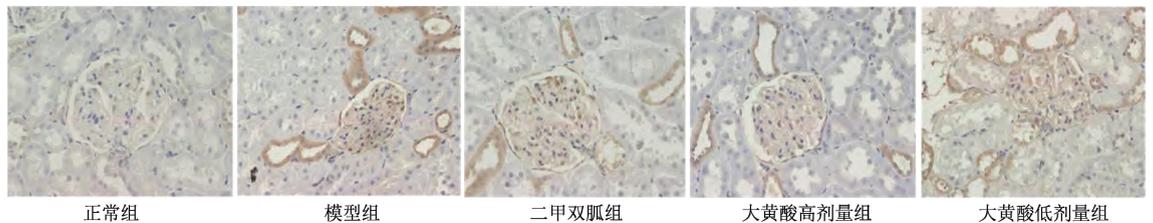


图 3 各组大鼠肾组织 FoxO1 蛋白免疫组化染色图 ($\times 400$)

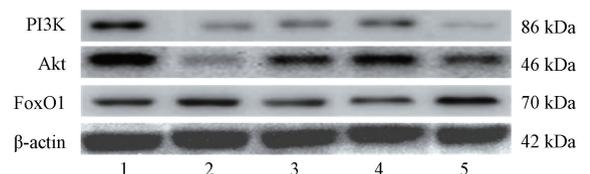
表 6 各组大鼠肾组织 FoxO1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物数/只	FoxO1/ β -actin
正常组	—	10	0.08 \pm 0.02
模型组	—	12	0.89 \pm 0.05**
二甲双胍组	300	12	0.45 \pm 0.02 ^{##}
大黄酸高剂量组	150	12	0.48 \pm 0.03 ^{##}
大黄酸低剂量组	75	12	0.33 \pm 0.02 ^{##}

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

3.6 各组大鼠肾组织 PI3K、Akt、FoxO1 蛋白表达变化 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织 PI3K、Akt 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), FoxO1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 大黄酸高剂量组与二甲双胍组大鼠肾脏组织 PI3K、Akt 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), FoxO1 蛋白表达降低

($P < 0.05$), 见图 4、表 7。



注: 1 为正常组, 2 为模型组, 3 为二甲双胍组, 4 为大黄酸高剂量组, 5 为大黄酸低剂量组。

图 4 各组大鼠肾组织 PI3K、Akt、FoxO1 蛋白条带图

4 讨论

糖尿病肾病是糖尿病人群较重要的并发症之一, 慢性高血糖及肾小球滤过增高导致的蛋白尿是其主要的临床表

表7 各组大鼠肾组织PI3K、Akt、FoxO1蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin	FoxO1/ β -actin
正常组	—	10	0.90±0.06	0.98±0.05	0.22±0.01
模型组	—	12	0.21±0.01**	0.26±0.02**	0.91±0.05**
二甲双胍组	300	12	0.47±0.05##	0.69±0.04###	0.48±0.02###
大黄酸高剂量组	150	12	0.67±0.02##	0.81±0.05###	0.42±0.03###
大黄酸低剂量组	75	12	0.25±0.01	0.38±0.04###	0.77±0.04###

注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，### $P < 0.01$ 。

现，严重者甚至引起肾衰竭，危及生命。微量白蛋白尿是诊断糖尿病肾病的标志^[9]。中草药在糖尿病治疗中的运用逐年增多，在治疗由糖尿病引起的各种并发症方面有着独特的疗效。大黄酸对糖尿病大鼠的肾脏病变具有预防和保护作用^[10-14]。本实验结果显示，模型组大鼠的高血糖状态直接影响了其肾脏的功能。氧化应激指标检测发现，模型组大鼠肾组织MDA水平均升高，SOD与GSH-Px活性降低，提示模型大鼠肾脏可能处于氧化应激损伤的状态，导致肾脏损害。给药干预12周后，大黄酸高剂量组肾脏组织MDA水平降低，SOD与GSH-Px活性升高，提示大黄酸可减轻糖尿病对肾脏带来的损害。

PI3K/Akt/FoxO1信号转导通路是胰岛素信号转导的主要途径，是生物体内调控血糖的主要信号转导通路^[15]，其通过减轻高脂、高能量饮食带来的胰岛素抵抗，促进外周组织对葡萄糖的摄取。FoxO1为一种多功能的蛋白，它是Forkhead大家族中的一个蛋白亚群，在胰腺 β 细胞与肝细胞中均有表达。FoxO1可以抑制 α 细胞向 β 细胞转化，保护 β 细胞免受氧化应激损伤，维持 β 细胞终末分化状态以及抑制胰腺祖细胞分化为 β 细胞^[16]。Akt是胰岛素信号转导途径中一个重要的下游分子，活化状态的Akt可促进机体葡萄糖转运与糖原合成，提高机体对胰岛素的敏感，发挥降糖作用。同时，活化的Akt使FoxO1磷酸化而失去活性，降低糖异生基因G6P及PEPCK水平，从而减少糖异生，使血糖降低^[17]。当2型糖尿病患者体内胰岛素受体表达降低，干扰PI3K活化，间接影响Akt的活化，出现血糖升高。当PI3K/Akt/FoxO1信号通路上任何一个因子代谢出现异常均可导致体内的胰岛素抵抗，极有可能诱发2型糖尿病^[18-19]。通过肾组织病理形态学观察，模型组大鼠肾组织增生明显，细胞外基质增多；而各给药组大鼠肾小球增大、肾小球系膜细胞增生等病变有所改善，其中以大黄酸高剂量组最为明显。大黄酸高剂量组与二甲双胍组大鼠肾脏组织PI3K与Akt表达升高，FoxO1表达降低，表明其可能通过干预肾脏PI3K/Akt/FoxO1信号转导通路，降低血糖，保护肾脏。

参考文献：

[1] 高亚斌, 王珍, 聂安政, 等. “以热为本, 以期为纲”论治早期糖尿病肾病[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(11): 5210-5212.
[2] 高亚斌, 王耀献, 郭敬, 等. “以热为本, 以期为纲”论治中期糖尿病肾病[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34

(12): 5723-5725.
[3] 杨敏, 翟光喜. 姜黄素对糖尿病及其并发症的作用及机制研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2019, 38(20): 65-70.
[4] Su L, Wang Y, Chi H. Effect of curcumin on glucose and lipid metabolism, FFAs and TNF- α in serum of type 2 diabetes mellitus rat models [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2017, 24(8): 1776-1780.
[5] 王钦汶, 戴新新, 项想, 等. 丹酚酸和丹参酮干预糖尿病肾病的分子机制研究进展[J]. 药学学报, 2019, 54(8): 1356-1363.
[6] 张旭, 朱元美, 唐保露, 等. 丹酚酸B对糖尿病大鼠肾纤维化的改善作用及其机制[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(1): 51-55.
[7] 施岚尔, 聂课朝, 张文婧, 等. 基于网络药理学探讨大黄黄连泻心汤治疗2型糖尿病作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 160-166.
[8] 黄晓佩, 秦秉玉, 代荣钦, 等. 大黄逐瘀汤内服与灌肠治疗重症急性胰腺炎病毒互结证的临床疗效及对血清炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 86-91.
[9] 乔进, 陈敏, 窦志华, 等. 转化生长因子- β_1 /Smad信号转导途径在大黄酸保护糖尿病大鼠肾脏中的机制探讨[J]. 药学实践杂志, 2017, 35(5): 402-406.
[10] 李彩, 魏洁, 甄永占, 等. 赖氨大黄酸对KK/HIJ糖尿病小鼠胰岛素抵抗的改善作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2017, 43(6): 1074-1079.
[11] 段晓星, 常永丽, 张国光, 等. 基于Notch1-RBP-Jk/Msx2信号通路探讨大黄酸对糖尿病肾病主动脉钙化的作用及机制研究[J]. 临床肾脏病杂志, 2020, 20(1): 51-56.
[12] 乔进, 窦志华, 吴锋, 等. 灵芝多糖联合二甲双胍对糖尿病大鼠胸主动脉晚期糖基化终末产物与结缔组织生长因子的干预作用[J]. 中草药, 2014, 45(20): 2939-2945.
[13] 乔进, 窦志华, 施忠, 等. 灵芝多糖联合二甲双胍对2型糖尿病模型大鼠氧化应激的影响[J]. 医药导报, 2015, 34(6): 718-721.
[14] 乔进, 窦志华, 吴锋, 等. 灵芝多糖联合二甲双胍对2型糖尿病大鼠心肌结构及血流动力学的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(7): 1012-1016.
[15] 肖政华, 杨辉, 王和强, 等. 凌湘力教授之糖通饮方的相关研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 1865-1868.
[16] Jiang Z, Tian J, Zhang W, et al. Forkhead protein FoxO1 acts as a repressor to inhibit cell differentiation in human fetal pancreatic progenitor cells [J]. *J Diabetes Res*, 2017,

2017: 6726901.

- [17] 周琦, 朱向东, 仝小林, 等. 葛根芩连汤对2型糖尿病模型大鼠胰岛细胞 IRS-2/PI3K-Akt 通路的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(11): 973-977.
- [18] 杜立娟, 孙敏, 谈钰濛, 等. 半夏泻心汤对过氧化氢叔丁醇诱导的 MIN6 细胞凋亡及 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路

的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(1): 63-67.

- [19] Wang Q, Hu J, Liu Y, et al. Aerobic exercise improves synaptic-related proteins of diabetic rats by inhibiting FOXO1/NF- κ B/NLRP3 inflammatory signaling pathway and ameliorating PI3K/Akt insulin signaling pathway [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 69(1): 28-38.

基于 UPLC-MS 法及网络药理学预测紫红参质量标志物

林源¹, 朱雪艳², 黄豆豆³, 黄宝康², 王宏瑞², 卜其涛^{2*}, 张成中^{2*}

(1. 温岭市中医院, 浙江 温岭 317500; 2. 中国人民解放军海军军医大学药理学系, 上海 200433; 3. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

摘要: **目的** 基于 UPLC-MS 法及网络药理学预测紫红参潜在的质量标志物。**方法** 基于 UPLC-Q/TOF-MS 法研究紫红参中人参皂苷类成分的变化, 运用多元统计分析解析炮制前后差异化合物, 运用多种数据库通过网络药理学的方法构建“紫红参-成分-靶点-通路”网络关系, 预测潜在的质量标志物。**结果** UPLC-MS 检测发现, 紫红参含有较多其原药材不具有的稀有皂苷, 根据其质谱特征鉴定出 7 个稀有皂苷类化合物, 结合数据库文献分析, 选择紫红参中皂苷类差异性化合物, 通过网络药理学预测发现这些成分具有较好的药理活性, 是紫红参潜在的质量标志物。**结论** 基于 UPLC-MS 及网络药理学预测发现人参皂苷 Rg5、Rk1、Rh3、compound K 等是紫红参中的差异性化合物, 与 EGFR、VEGFA、JUN、Akt、PIK3CA、MAPK、MTOR、STAT 等关键指标相关, 可作用于癌症通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路等信号通路, 发挥抗癌、降糖等多种药理作用, 这些差异性化合物可作为紫红参潜在的质量标志物。

关键词: 紫红参; 质量标志物; 多元统计分析; 网络药理学; UPLC-Q/TOF-MS

中图分类号: R284.1; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)02-0613-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.049

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 是传统的名贵补益中药, 始载于《神农本草经》, 其炮制方法及炮制工艺众多, 形成生晒参、红参、糖参等。紫红参又称黑参, 其制备工艺主要有生物发酵法和多次蒸晒法^[1-2], 在加工炮制过程中, 其有效成分人参皂苷等发生水解、脱羧、异构化等^[3]变化。经测定, 生人参与含量较高的人参皂苷 Rb1、Rg1、Re 等在紫红参中无法检出或含量降低^[4], 稀有皂苷如人参皂苷 Rg3、Rg5、Rg6 等含量升高^[5-7]。研究发现, 紫红参相比生晒参、红参具有更好的降血糖^[8]、降血脂^[9]、减肥^[10]、抗癌^[11]、保肝^[12]、抗病毒^[13]等作用。中药炮制“生熟异用”, 紫红参与生晒参、红参在化学成分及药理作用上具有差异, 其质量控制、药理作用也应有别于红参等。目前, 紫红参的炮制工艺尚无统一标准, 质量控制、活性成分、药理作用等方面尚较大的研究空间^[14]。刘昌孝院士提出中药质量标志物 (Q-marker) 的新概念^[15], 中药 Q-marker 从生源途径、化学物质基础、炮制加工过程、药效

研究、中医理论等层面, 将中药物质基础、有效性、质量控制密切关联。本实验采用 UPLC-Q/TOF-MS 法测定紫红参及其原料药人参之间的化合物差异, 通过多元统计分析解析炮制对人参皂苷种类的影响, 鉴定紫红参中差异性稀有皂苷, 基于网络药理学^[16]与分子对接^[17]技术对所鉴定的差异化合物进行验证, 研究紫红参差异化合物的药理活性及其作用机制, 预测紫红参潜在 Q-marker, 以期为紫红参后续研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 1290 UPLC 型液相色谱仪串联 6530 Q/TOF 型高分辨质谱 (美国安捷伦公司); SK7200H 型超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); RH-600A 型高速多功能粉碎机 (江苏荣洁医疗科技有限公司); XS105DU 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); Centrifuge5810R 型高速台式冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 电蒸锅 (浙江苏泊尔股份有限公司); 鼓风式干燥箱 (上海般诺生物科

收稿日期: 2022-05-15

基金项目: 温岭市科技局社会性项目 (2020S0010021); 海军院校建设项目 (XLTJ2018009)

作者简介: 林源 (1984—), 男, 主管中药师, 从事中药炮制与调剂研究。E-mail: 61046888@qq.com

* 通信作者: 卜其涛 (1985—), 女, 硕士, 讲师, 从事药用植物与鉴定研究。E-mail: bujenny@163.com

张成中 (1984—), 男, 博士, 讲师, 从事中药炮制与调剂研究。E-mail: zhanchzh09@163.com