

基于网络药理学与细胞实验探讨葛连调糖丸对 2 型糖尿病的预防作用

樊俐慧<sup>1</sup>, 王志刚<sup>1,2\*</sup>, 杨 霞<sup>2\*</sup>

(1. 甘肃中医药大学中医临床学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 天水市中医医院, 甘肃 天水 741000)

**摘要:** **目的** 基于网络药理学方法预测葛连调糖丸对 2 型糖尿病 (T2DM) 的潜在靶点与信号通路, 并应用分子对接和体外实验验证。**方法** 通过 TCMSP 数据库检索葛连调糖丸药材成分, GeneCards 数据库预测 T2DM 的疾病靶点, Venny 2.1.0 获取葛连调糖丸与 T2DM 的交集靶点, STRING 数据库获取蛋白质相互作用网络, 运用 R 语言软件对核心靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, Cytoscape 3.9.1 软件构建“药材-活性成分-靶点”及“关键活性成分-核心靶点-通路”网络, 利用 Pymol 软件进行分子对接。将 20 只大鼠随机分为空白血清组和葛连调糖丸含药血清组, 每组 10 只, CCK-8 法筛选不同浓度含药血清对 HepG2 细胞活力的影响。采用含生理浓度葡萄糖 (5.5 mmol/L) 或高糖 (30 mmol/L) 培养液孵育 24 h, 诱导建立胰岛素抵抗细胞模型, 将对数生长期的 HepG2 细胞随机分为正常组、模型组、葛连调糖丸组、RAGE 激动剂 (D-Ribose) 组、葛连调糖丸+RAGE 激动剂组。收集细胞培养上清, CCK-8 法检测 HepG2 细胞活力, TUNEL 法检测 HepG2 细胞凋亡情况, 免疫荧光法检测 AGE 蛋白表达, Western blot 法检测细胞 RAGE、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达。**结果** 葛连调糖丸抗 T2DM 的活性成分有 200 个, 其中有 18 个关键活性成分, 16 个核心靶点; GO 功能富集分析得到 75 个生物过程; KEGG 富集分析得到 157 条信号通路, 其作用机制可能与糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、内分泌抵抗等通路相关。分子对接结果表明, 关键活性成分与核心靶点均可自发结合。细胞实验表明, 10% 葛连调糖丸含药血清干预成模后的 HepG2 细胞 24 h, 能提高细胞活力 ( $P<0.01$ ), 抑制细胞凋亡 ( $P<0.01$ ), 升高 Bcl-2 蛋白表达 ( $P<0.01$ ), 降低 AGE、RAGE、caspase-3、cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 而 RAGE 激动剂可逆转葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗细胞模型中 Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3 和 Bax 蛋白表达的改变 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 葛连调糖丸具有多成分、多靶点和多途径协同缓解 T2DM 的特点, 其作用机制可能与抑制 AGE-RAGE 信号通路, 促进细胞增殖, 降低细胞凋亡, 减轻胰岛素抵抗相关。

**关键词:** 葛连调糖丸; 2 型糖尿病; 网络药理学; 分子对接; 细胞实验; HepG2 细胞; AGE-RAGE 信号通路

**中图分类号:** R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)05-1720-09

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.05.049

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种以胰岛素抵抗和血糖水平升高为特征的慢性代谢性疾病<sup>[1]</sup>。研究已证实, T2DM 会对眼、足、口、心脏等多个器官造成损伤, 严重威胁患者生命健康<sup>[2-4]</sup>。中药复方药物活性成分复杂, 具有多成分、多靶点、多途径协同起效的作用特点, 广泛应用于 T2DM 的临床治疗。葛连调糖丸是天水市中医医院的院内制剂, 基于《伤寒论》经方葛根苓连汤加减而成, 组方包括葛根、黄芩、黄连、天花粉、山药、黄芪、茯苓、西洋参、三七、干姜、知母、水蛭、僵蚕、苦瓜 14 味药材。该方是利用传统中药炮制理念与现代制药工艺相结合, 优化制备而成的水丸, 临床用于治疗湿

热内蕴型 T2DM 及相关并发症, 疗效明确。纵观全方, 态靶结合, 标本兼治, 共奏清热化浊、益气养阴、活血通络的功效, 然而该方对 T2DM 的分子机制尚未阐明。

基于课题组前期临床试验结果提示<sup>[5]</sup>, 已经证实葛连调糖丸对湿热内蕴型 T2DM 疗效明确, 尚需进一步探讨该方发挥缓解 T2DM 的作用机制, 故本研究运用网络药理学方法预测葛连调糖丸干预 T2DM 的潜在机制, 并通过体外细胞实验对功能富集程度较强的关键信号通路进行验证, 以期为该方防治 T2DM 的临床应用与推广提供实验依据。

1 材料

1.1 数据库 TCMSP 数据库<sup>[6]</sup> (<http://tcmspw.com/>)

收稿日期: 2024-01-10

基金项目: 甘肃省中医药科研课题 (GZKP-2021-46); 甘肃省中医药综合防治重大疑难疾病科技攻关项目 (GZKZD-2018-01); 甘肃省产业支撑计划项目 (2021CYZC-03); 天水市科技支撑计划项目 (2020-SHFZJK-4207)

作者简介: 樊俐慧 (1992—), 女, 博士生, 从事内分泌及代谢病的中医药防治研究。E-mail: fanlihui806@163.com

\* 通信作者: 王志刚 (1965—), 男, 主任医师, 博士生导师, 从事内分泌及代谢病的中医药防治研究。E-mail: tsszyyy@163.com

杨 霞 (1986—), 女, 博士, 主治医师, 从事方药量效研究。E-mail: 905283653@qq.com

网络出版日期: 2024-04-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240425.1609.004.html>.

tcmsp. php)、BATMAN-TCM 数据库<sup>[7]</sup> (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)、SwissTargetPrediction 数据库<sup>[8]</sup> (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、Uniprot 数据库<sup>[9]</sup> (<https://www.UniProt.org/>)、GeneCards 数据库<sup>[10]</sup> (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库<sup>[11]</sup> (<http://www.omim.org/>)、Venny 2.1.0<sup>[12]</sup> (<http://www.liuxiaoyuanyuan.cn/>)、STRING 数据库<sup>[13]</sup> (<https://cn.string-db.org/>)、PubChem 数据库<sup>[14]</sup> (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Protein Data Bank (PDB) 数据库<sup>[15]</sup> (<https://www.rcsb.org/>)。

1.2 细胞与动物 人肝癌细胞株 HepG2 细胞购于中国科学院细胞库。SPF 级雄性 SD 大鼠, 10~12 周龄, 体质量 200~220 g, 由兰州大学实验动物中心提供 [动物质量合格证号 62000800000476, 实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2023-0003], 饲养于兰州大学 SPF 级动物实验室, 温度 20~26 ℃, 相对湿度 40~70%, 换气 ≥15 次/h, 噪声 ≤60 分贝。研究所涉及的动物实验经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审查批准 (伦理审查号 2023-588)。

1.3 试剂与药物 葛连调糖丸由天水市中医医院药剂科提供 (批号 23051516, 规格 6 g×9 袋)。DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 10099-141、10099-141); CCK-8 试剂盒 (美国 APEX BIO 公司, 批号 K1018); D-Ribose 试剂 (上海翊圣生物科技有限公司, 批号 60608ES50); AGE 抗体、RAGE 抗体、Bcl-2 抗体、caspase-3 抗体、Bax 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 ab176173、ab216329、ab32124、ab32351、ab32503); β-actin 抗体 (美国 ImmunoWay 公司, 批号 YM3028)。

1.4 仪器 SKYJH-1112 二氧化碳细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PowerPac™ Western blot 电泳仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司); iMark 酶标仪、核酸蛋白检测仪 (美国 Bio-Rad 公司); ChemiDoc-IT610 化学发光成像系统 (美国 UVP 公司)。

## 2 方法

2.1 葛连调糖丸中药活性成分与相关靶点筛选 通过 TCMSP 数据库检索葛连调糖丸 (天花粉、山药、黄芪、茯苓、西洋参、三七、葛根、黄连、黄芩、干姜、知母、水蛭、僵蚕、苦瓜) 相关化学成分, 获得葛连调糖丸活性成分及其作用的蛋白靶点。其中未在 TCMSP 数据库收集到的中药水蛭、僵蚕、苦瓜, 则通过 BATMAN-TCM 数据库、化源网、文献收集其活性成分, 通过 SwissTargetPrediction 数据库, 选择物种 “*Homo sapiens*”, 条件设置为 “Probability>0.3”, 进行 ADME 筛选水蛭、僵蚕、苦瓜的有效活性成分和对应的蛋白靶点。合并药物靶点, 去除重复。通过 Uniprot 数据库, 物种设置为 “*Homo Sapiens*” 为提取规则, 将靶基因注释标注。

2.2 葛连调糖丸对 T2DM 作用靶点筛选 通过 GeneCards 数据库查找 2 型糖尿病的靶点数据, 以 “T2DM” “type 2 diabetes” “type 2 diabetes mellitus” 为关键词检索疾病相关

靶点, 以 Relevance score>2 作为 T2DM 有效靶点的筛选条件。通过 OMIM 数据库查找 T2DM 的靶点数据。合并疾病靶点, 删去重复。将在 GeneCards 数据库中检索得到的 T2DM 靶点与葛连调糖丸候选靶点在 Venny 2.1.0 中生成韦恩图, 映射筛选出共同靶点。

2.3 葛连调糖丸对 T2DM “药材-活性成分-靶点” 网络构建 将 “药材-活性成分” “活性成分-靶点” 的相互对应关系, 导入 Cytoscape 3.9.1 软件中, 构建葛连调糖丸对 T2DM 的 “药材-活性成分-靶点” 相互作用网络图, 通过 Cytoscape 软件的 Network Analyzer 工具进行拓扑参数分析, 筛选获得葛连调糖丸复方核心的活性成分。

2.4 PPI 网络构建及核心靶点筛选 使用韦恩图确定葛连调糖丸对 T2DM 的主要靶点, 将交集靶点导入 STRING 数据库, 物种设置为 “*Homo Sapiens*”, 进行蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析, 设定置信度为 0.9, 隐藏游离靶标, 利用 Cytoscape 软件的 Network Analyze 进行拓扑参数分析, 并运用 Cytoscape 软件绘制核心交集基因网络图。

2.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 运用 R 语言软件对葛连调糖丸对 T2DM 的核心交集靶点分别进行基因本体 (GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 以  $P<0.05$ ,  $Q<0.05$  为富集的筛选阈值<sup>[16]</sup>。

2.6 葛连调糖丸 “关键活性成分-核心靶点-通路” 网络构建 利用 Cytoscape 3.9.1 软件中的 Network Analyzer 插件对 “2.3” 项下筛选获得葛连调糖丸复方核心活性成分进行拓扑分析, 构建 “关键活性成分-核心靶点-通路” 网络图。

2.7 分子对接验证 运用分子对接模拟软件 AutoDock Vina 1.1.2 对 “2.5” 项下中 KEGG 富集分析结果中与糖尿病相关通路中的基因, 以及 “2.3” 项下得到的葛连调糖丸复方核心活性成分进行受体-配位对接模拟计算。关键活性成分作为小分子配体, 通过 PubChem 数据库搜索关键活性成分 CAS 号, 从 Chem3D19.0 中导出, 对其执行能量最低计算保存为 mol2 格式。核心靶点作为受体, 从 Protein Data Bank (PDB) 数据库下载核心靶点蛋白的 PDB 格式三维结构。利用 Pymol 软件对核心靶点蛋白进行去水、加氢处理, 分别与关键活性成分做分子对接。利用 GraphPad 软件用热图表示分子对接结果, 利用 LigPlus 和 PyMOL 软件分别对分子对接结果绘制 2D 和 3D 相互作用图。

## 2.8 体外实验验证

2.8.1 含药血清制备 取 20 只雄性 SD 大鼠, 随机分为空白血清组和葛连调糖丸含药血清组, 每组 10 只, 适应性喂养 7 d, 实验前禁食不禁水 12 h, 葛连调糖丸组灌胃给予 2.2 g/kg 葛连调糖丸混悬液 (按照正常成年人体质量 70 kg 计算, 相当于临床等效剂量的 2 倍), 给药体积 10 mL/kg, 每天 1 次, 连续 7 d, 空白组灌胃给予等体积蒸馏水。于末次给药 1 h 后, 腹主动脉采血, 放置于 EDTA 抗凝管中, 静置 30 min, 4 ℃、3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 分装于 EP 管中, 于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

2.8.2 细胞培养与传代 HepG2 细胞复苏后，加入配制好的完全培养基（高糖 DMEM 培养基+10% 胎牛血清+1% 青链霉素），置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁长满至 90%，用 0.25% 胰酶消化传代，取对数生长期的细胞用于实验。

2.8.3 CCK-8 法筛选含药血清浓度 取对数生长期 HepG2 细胞接种到 96 孔板中，在培养箱中培养 24 h 后加入不同浓度的含药血清，分组为对照组（10% 空白血清）、5%、10%、15%、20%、25%、30% 含药血清组，每组设置 3 个复孔，培养 24 h 后，加入 10 μL CCK-8 试剂，孵育 1 h，用酶标仪检测各组 450 nm 波长处吸光度值，筛选出适宜的含药血清浓度。

2.8.4 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型建立 参考文献 [17] 报道建立胰岛素抵抗细胞模型，取对数生长期的 HepG2 细胞，按每孔 1×10<sup>6</sup> 个的密度接种于 12 孔板中，于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，待细胞贴壁后，吸弃上清培养基，加入无血清培养基饥饿培养 12 h，吸弃上清培养基，PBS 洗涤 2 次，分别用含生理浓度葡萄糖（5.5 mmol/L）或高糖（30 mmol/L）培养液孵育 24 h，建立高糖诱导的 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型。

2.8.5 细胞分组与干预 将 HepG2 细胞分成正常组、模型组、葛连调糖丸组、RAGE 激动剂组、葛连调糖丸+RAGE 激动剂组。除正常组外，其余各组以 30 mmol/L 高糖干预 24 h 进行造模，正常组和模型组加入 10% 空白血清；葛连调糖丸组加 10% 葛连调糖丸含药血清；RAGE 激动剂组加 50 mmol/L D-Ribose、葛连调糖丸+RAGE 激动剂组分别用 10% 含药血清和 50 mmol/L D-Ribose 进行处理，于培养箱中培养 24 h。

2.8.6 CCK-8 法检测 HepG2 细胞活力 细胞按“2.8.5”项下分组处理后，弃去培养基，PBS 清洗 1 次，每孔加入含 10% CCK-8 的培养基，于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 2 h，在 450 nm 波长处检测吸光度，计算细胞存活率。

2.8.7 TUNEL 法检测细胞凋亡情况 细胞按“2.8.5”项下分组处理后，各组细胞爬片用 PBS 洗涤 2 次，每次 5 min，4% 多聚甲醛固定细胞 30~60 min，加入 TUNEL 检测液，37℃ 下避光孵育 60 min。将细胞爬片浸入 PBS 中，室温放置 5 min，重复洗涤 3 次，用抗荧光淬灭封片液封片后于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

2.8.8 免疫荧光法检测细胞 AGE 蛋白表达 细胞按“2.8.5”项下分组处理后，各组细胞爬片 PBS 清洗细胞 3 次，4% 多聚甲醛室温固定 10~20 min，弃去多聚甲醛，加入 1 mL PBS 清洗细胞 2 次，每孔加入 1 mL 0.5% Triton X-100，室温静置 10 min，加入 1 mL PBS 清洗 2 次，封闭。向爬片上滴加 AGE 一抗（1：200），置于 4℃ 孵育过夜，加入 1 mL PBS 清洗细胞 5 次，加封闭液二抗（1：400）室温避光孵育 1 h，加入 1 mL PBS 清洗细胞 5 次，DAPI 染色，于激光显微镜下随机选取每张切片 3 个视野，通过 Image J 软件分析阳性面积比。

2.8.9 Western blot 法检测细胞 RAGE、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达 细胞按“2.8.5”项下分组处理后收集各组细胞，用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞，提取蛋白，BCA 法进行蛋白定量，加入蛋白上样缓冲液后变性，冷冻保存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶，各组取等量蛋白上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% BSA 室温封闭 1 h，分别加入 RAGE、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3、Bax、β-actin 抗体（1：1 000），4℃ 孵育过夜，次日加二抗（1：4 000）室温孵育 2 h，使用化学发光图像分析系统显影，用 Quantity one 图像分析软件进行扫描分析，读取条带的灰度值，以 β-actin 为内参，通过 Image J 软件计算蛋白相对表达量。

2.8.10 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，计量资料以 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 葛连调糖丸对 T2DM “药材-活性成分-靶点”网络构建 利用 Cytoscape 3.9.1 软件处理得到“药材-活性成分-靶点”网络，见图 1。运用 Network Analyzer 计算该化合物-靶点网络分析，该网络有 1 012 个节点，4 128 条边，各节点表示药材、成分、靶点，各节点间的边代表“药材-成分”“成分-靶点”之间的对应关系，网络中平均相邻节点数为 6.836，网络密度 0.007，网络异质性为 2.202，网络中心度 0.138。结果表明葛连调糖丸对 T2DM 的作用是基于多成分、多靶点的复杂协同调控。

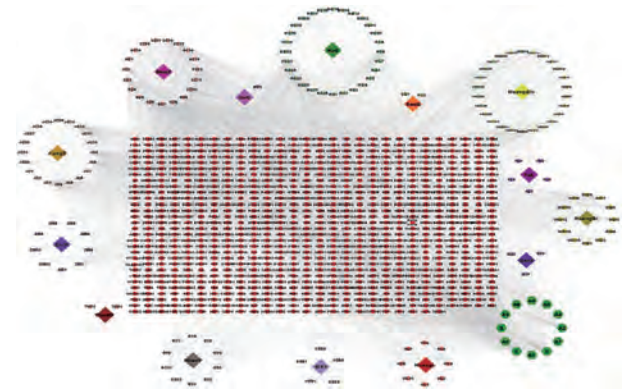


图 1 葛连调糖丸“药材-活性成分-靶点”网络

3.2 葛连调糖丸中药材活性成分与相关靶点筛选 TCMSP 数据库检索得到葛连调糖丸中天花粉 2 个活性化合物，5 个有效靶点；山药 12 个活性化合物，124 个有效靶点；黄芪 16 个活性化合物，416 个有效靶点；茯苓 6 个活性化合物，27 个有效靶点；西洋参 7 个活性化合物，69 个有效靶点；三七 7 个活性化合物，227 个有效靶点；葛根 3 个活性化合物，82 个有效靶点；黄连 11 个活性化合物，263 个有效靶点；黄芩 32 个活性化合物，431 个有效靶点；干姜 5 个活性化合物，35 个有效靶点；知母 12 个活性化合物，171 个有效靶点。利用 SwissTargetPrediction 数据库进行活



性成分靶点预测，发现水蛭 39 个有效成分，1 129 个有效靶点；僵蚕 20 个有效成分，480 个有效靶点；苦瓜 28 个有效成分，498 个有效靶点。复方共计检索获得 200 个活性化合物，合并药物靶点，去除重复，共得到 823 个药物靶点。

3.3 葛连调糖丸对 T2DM 作用靶点筛选 在 GeneCards 数据库中检索 T2DM 的靶点数据，共得到 15 834 个相关靶标，以大于 2 倍疾病相关系数进行筛选共得到 2 036 个有效疾病靶点。在 OMIM 数据库中查找 T2DM 的靶点数据，共得到 518 个相关靶标。合并疾病靶标，删去重复，共检索获得 2 396 个疾病靶标基因。将在 Genecards 数据库中检索得到的 T2DM 靶点与葛连调糖丸全方候选靶点在 Venny 2.1.0 中生成韦恩图，映射筛选出 357 个共有靶点，作为葛连调糖丸对 T2DM 的主要作用靶点，见图 2。

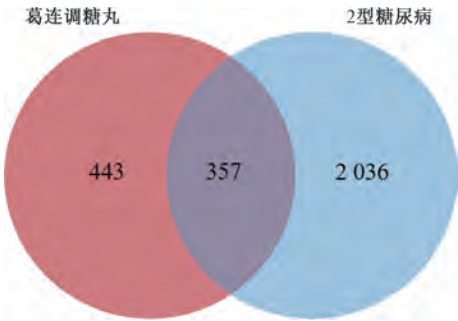


图 2 葛连调糖丸对 T2DM 靶点的 Venn 图

3.4 PPI 网络构建及核心靶点筛选 对 357 个核心靶点进行 PPI 网络分析，发现此网络共有 355 个节点，20 456 条边，节点代表靶点，每条边则代表靶点互作关系，节点的大小与颜色代表靶点的度值，节点越大，颜色越深，表明作用越关键，见图 3。利用 Cytoscape 软件对 357 个交集基因进行拓扑参数分析，根据大于连接度（Degree）的中位数 232，来分析筛选出 38 个核心交集基因，并绘制核心交集基因网络图，见图 4。38 个核心交集基因在葛连调糖丸对 T2DM 的作用靶点中处于核心位置，可能在葛连调糖丸对 T2DM 中起到重要作用，见表 1。

3.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 运用 R 语言软件对 38 个核心交集基因进行 GO 富集分析，得到 75 个生物过程，选取 *P* 值最小的前 10 个 GO 条目作图。富集的基因数排名靠前主要包括为细胞因子受体结合、磷酸酶结合、蛋白磷酸酶结合、细胞因子活性、蛋白酶结合、生长因子受体结合、泛素样蛋白连接酶结合、核激素受体结合、RNA 聚合酶 II 转录因子结合。生物过程、细胞成分、分子功能按 *P* 值排序，选取排名前十的项目进行可视化展示，绘制 GO 功能注释分析，见图 5。

运用 R 语言软件对 38 个核心交集基因进行 KEGG 富集分析，通过分析得到 157 条信号通路，其中与 T2DM 有关的通路主要为糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、内分泌抵抗等通路。其中，TNF、AKT1、IL-6、IL-1β、STAT3、JUN、caspase-3、BCL2、MAPK3、

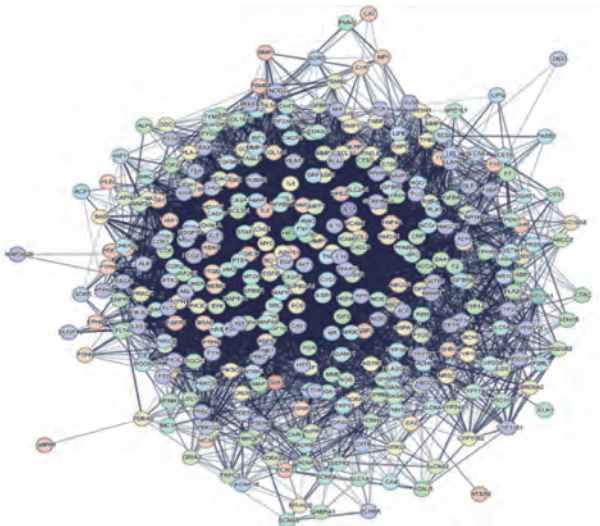


图 3 葛连调糖丸对 T2DM 交集靶点 PPI 网络图

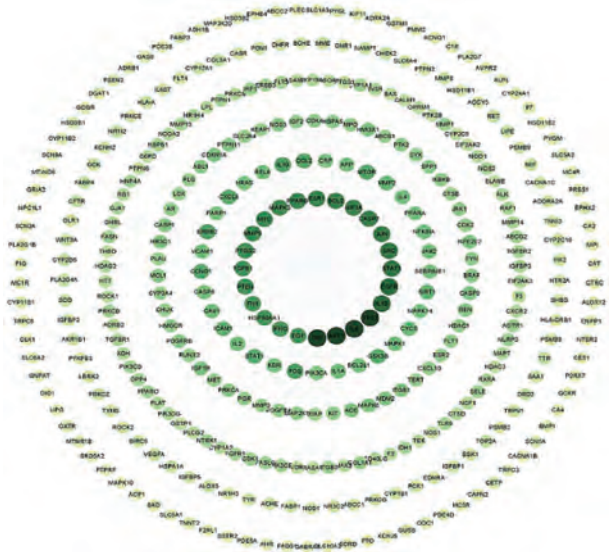


图 4 葛连调糖丸对 T2DM 的潜在靶点图

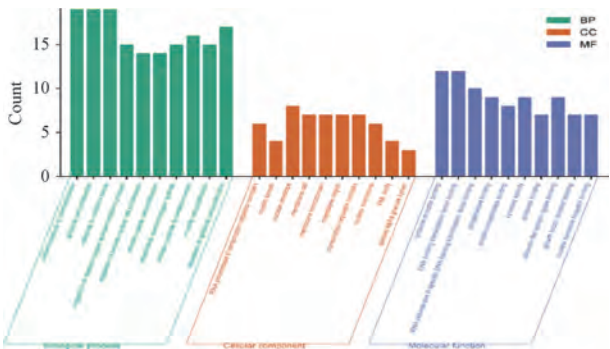


图 5 葛连调糖丸对 T2DM 的核心靶点的 GO 富集分析

TGFβ1、FN1、CCL2、CCND1、CXCL8、STAT1、ICAM1、MMP2、IL-1α 出现在葛连调糖丸对 T2DM 的糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路中，见图 6，推测在葛连调糖丸对 T2DM 中可能发挥重要作用。选取排名前二十的项目进行可视化，绘制 KEGG 功能注释分析直方图，见图 7。

表 1 葛连调糖丸对 T2DM 的核心交集靶点

靶点	度值	中间值	亲密值	靶点	度值	中间值	亲密值
TNF	462	5 175. 526	0. 742	PTEN	316	1 114. 342	0. 638
AKT1	458	4 715. 168	0. 739	FN1	314	1 293. 577	0. 637
IL-6	458	4 497. 896	0. 738	HSP90AA1	312	1 262. 893	0. 637
TP53	416	2 949. 535	0. 704	EGF	312	1 250. 622	0. 634
IL-1β	406	2 856. 400	0. 700	IFNG	312	1 007. 456	0. 634
EGFR	392	3 044. 955	0. 691	FOS	296	1 472. 470	0. 629
STAT3	378	1 476. 152	0. 681	IL-10	294	820. 423	0. 624
SRC	374	4 216. 539	0. 677	ERBB2	290	663. 276	0. 623
JUN	358	1 699. 430	0. 667	CCL2	282	1 110. 248	0. 620
CASPASE3	358	1 307. 288	0. 665	MTOR	280	578. 328	0. 620
BCL2	356	1 403. 988	0. 664	CCND1	276	514. 004	0. 614
HIF1α	352	1 264. 009	0. 664	CXCL8	272	802. 708	0. 614
ESR1	348	2 850. 573	0. 660	GSK3β	264	1 182. 271	0. 611
PPARG	344	2 903. 184	0. 658	STAT1	258	479. 307	0. 599
MAPK3	334	1 798. 924	0. 650	ICAM1	256	466. 862	0. 605
MMP9	334	1 279. 355	0. 647	SIRT1	248	744. 427	0. 602
MYC	332	1 290. 977	0. 648	MMP2	248	443. 79	0. 600
PTGS2	324	2 283. 802	0. 646	CYCS	236	2 201. 901	0. 595
TGFβ1	320	970. 264	0. 642	IL-1α	236	387. 819	0. 593

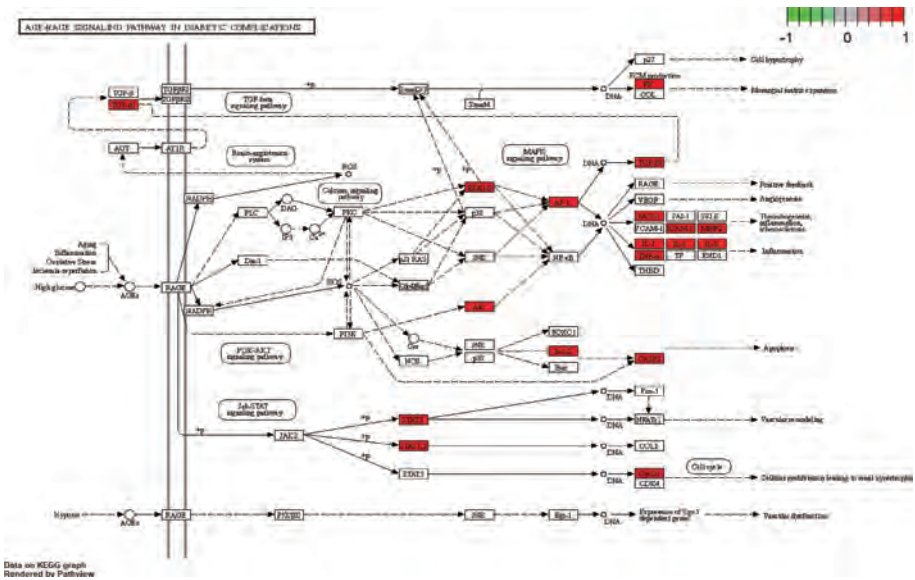


图 6 葛连调糖丸对 T2DM 的并发症中的 AGE-RAGE 信号通路

3.6 葛连调糖丸“关键活性成分-核心靶点-通路”网络构建 利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“关键活性成分-靶点-通路”网络图，并将结果可视化，网络中共有 159 个节点，709 条边。运用 Network Analyze 插件进行拓扑分析，该网络中平均相邻节点数为 7.610，网络密度为 0.048，网络异质性为 1.225，网络中心度为 0.458，网络结果显示存在 1 个分子与多个核心靶点蛋白的相互作用，也存在不同分子作用于同 1 个靶点蛋白的现象，同时也显示了 1 个核心靶点对应多条信号通路，表明葛连调糖丸可能通过多成分、多靶点、多通路防治 T2DM，初步阐释了葛连调糖丸对 T2DM 的主要药效物质基础和作用机制，见图 8。

3.7 分子对接验证 利用 PyMOL 软件对核心靶点蛋白进行去水、加氢处理，分别与关键活性成分做分子对接。葛

连调糖丸的核心活性成分包括苦楝酸、含苦木西碱 A、苦瓜素 I、苦木西碱 S、水黄皮次素、表黄连碱、黄芩素、丁香酚、菠菜甾醇、龙舌兰素、槲皮素、水杨酰苯胺、山柰酚、六角黄素、β-谷甾醇、5-羟基色胺、黄芪素、水胺硫磷和富集在糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路中的 16 个核心交集基因（AKT1、STAT3、JUN、Bcl2、MAPK3、TGFβ1、CCND1、CXCL8、STAT1、ICAM1、MMP2、IL-1α、IL-1β、TNF、FN1、CCL2）进行分子对接并绘制图形，结果显示 IL-1β 与表黄连碱的分子结合能最小，为-7.531 2 kJ/mol，MAPK3 与苦瓜素I的分子结合能最大，为-56.065 6 kJ/mol。配体和受体结合能越低，结合越稳定，发生作用的可能性越大。如图 9 所示，18 种关键活性成分与 AGE-RAGE 信号通路中的 16 个核心交集基因均可自发结合。选



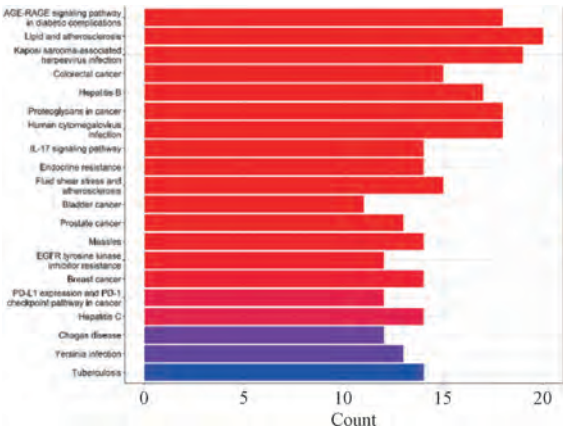
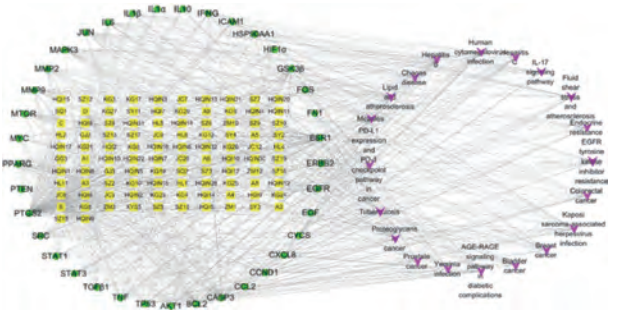


图 7 KEGG 富集分析结果直方图



注：黄色为关键活性成分，绿色为核心靶点，紫色为通路。

图 8 “关键活性成分-核心靶点-通路”网络图

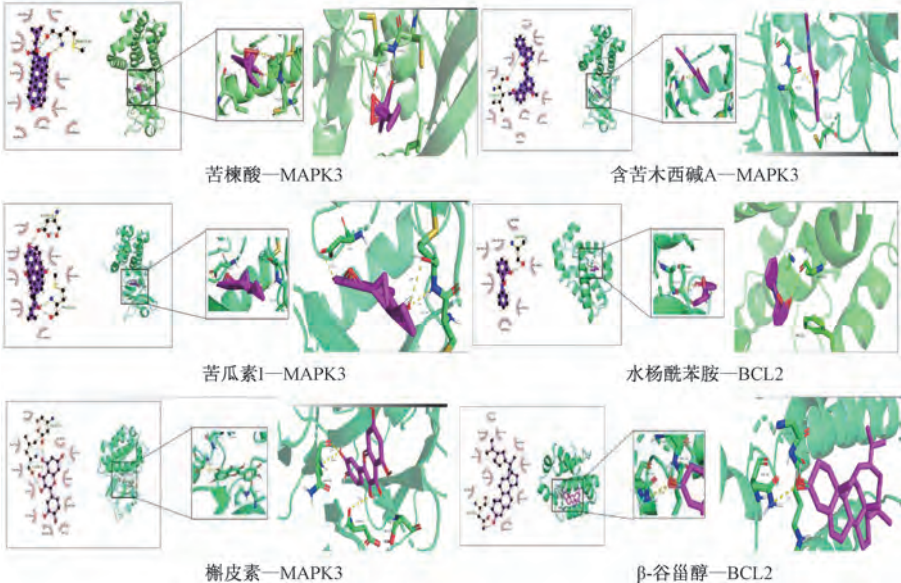


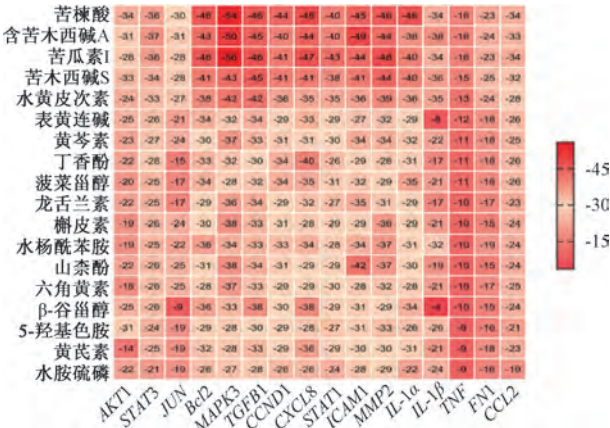
图 10 关键活性成分与核心靶点分子对接图

表 2 不同体积分数含药血清对 HepG2 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	细胞活力
对照组	1.000±0.040
5% 含药血清组	0.984±0.147
10% 含药血清组	1.005±0.042
15% 含药血清组	1.104±0.045 *
20% 含药血清组	1.109±0.031 *
25% 含药血清组	1.150±0.082 *
30% 含药血清组	1.113±0.124 *

注：与对照组比较，\*  $P<0.05$ 。

取 6 种关键活性成分与各自对应打分最高的核心蛋白可视化，其结合模式见图 10。



注：从浅色到深色代表分子对接结合能的不断升高。

图 9 分子对接结合能的热图分析

3.8 体外实验验证结果

3.8.1 不同体积分数含药血清对 HepG2 细胞活力的影响  
与对照组比较，5%、10% 含药血清对细胞活力的影响无明显变化 ( $P>0.05$ )，随着含药血清药物体积分数的升高，细胞活力逐渐升高 ( $P<0.05$ )。由于对照组培养液中胎牛血清的体积分数为 10%，为避免血清体积分数不同带来的影响，故后续实验以 10% 含药血清作为干预浓度，见表 2。

3.8.2 葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗 HepG2 细胞活力的影响  
与正常组比较，模型组细胞活力降低 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，葛连调糖丸组细胞活力升高 ( $P<0.01$ )，RAGE 激动剂组细胞活力降低 ( $P<0.01$ )；与葛连调糖丸组比较，葛连调糖丸+RAGE 激动剂组细胞活力降低 ( $P<0.05$ )，见表 3。

3.8.3 葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗 HepG2 细胞凋亡的影响  
与正常组比较，模型组细胞凋亡升高 ( $P<0.01$ )；

表 3 葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗 HepG2 细胞活力的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	细胞活力
正常组	1.000±0.046
模型组	0.706±0.054 <sup>##</sup>
葛连调糖丸组	0.893±0.070 <sup>**</sup>
RAGE 激动剂组	0.530±0.060 <sup>**</sup>
葛连调糖丸+RAGE 激动剂组	0.816±0.030 <sup>▲</sup>

注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ；与葛连调糖丸组比较，<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。  
与模型组比较，葛连调糖丸组细胞凋亡降低 ( $P<0.01$ )，RAGE 激动剂组细胞凋亡升高 ( $P<0.01$ )；与葛连调糖丸组

比较，葛连调糖丸+RAGE 激动剂组细胞凋亡升高 ( $P<0.01$ )，见表 4、图 11。

表 4 葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗 HepG2 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	细胞凋亡
正常组	7.000±1.097
模型组	28.000±1.846 <sup>##</sup>
葛连调糖丸组	16.500±1.425 <sup>**</sup>
RAGE 激动剂组	38.400±2.696 <sup>**</sup>
葛连调糖丸+RAGE 激动剂组	26.400±3.457 <sup>▲▲</sup>

注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ；与葛连调糖丸组比较，<sup>▲▲</sup> $P<0.01$ 。

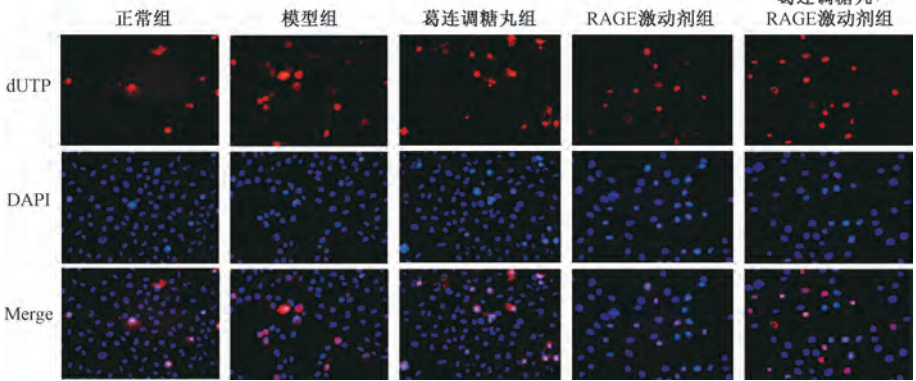


图 11 各组细胞凋亡情况 ( $\times 200$ )

3.8.4 葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗 HepG2 细胞中 AGE 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组 AGE 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，葛连调糖丸组 AGE 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ )，见表 5、图 12。  
3.8.5 葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗 HepG2 细胞中 RAGE、Bcl-2、Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组细胞 RAGE、Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )，Bcl-2 蛋

表 5 葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗 HepG2 细胞中 AGE 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	AGE
正常组	1.000±0.127
模型组	3.067±0.221 <sup>##</sup>
葛连调糖丸组	1.780±0.126 <sup>**</sup>
RAGE 激动剂组	3.122±0.213
葛连调糖丸+RAGE 激动剂组	1.780±0.126

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

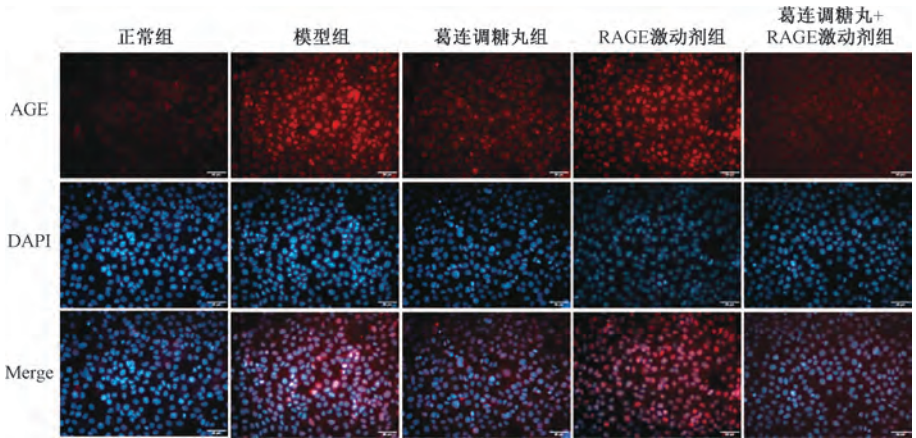


图 12 各组细胞 AGE 蛋白表达情况 (免疫荧光染色,  $\times 200$ )

白表达降低 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，葛连调糖丸组细胞 RAGE、Bax、Caspase-3、cleaved-Caspase-3 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，Bcl-2 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )，

RAGE 激动剂组 RAGE 蛋白表达无明显变化 ( $P>0.05$ )，Bax、Caspase-3、cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )，Bcl-2 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )；与葛连调糖丸组

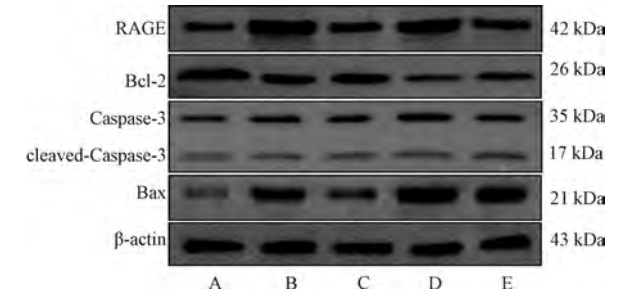


比较，葛连调糖丸+RAGE 激动剂组 RAGE 蛋白表达无明显变化 ( $P>0.05$ )，Bax、Caspase-3、cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，Bcl-2 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ )，见表 6、图 13。

表 6 葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗 HepG2 细胞中 RAGE、Bcl-2、Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	RAGE	Bcl-2	Caspase-3	cleaved-Caspase-3	Bax
正常组	0.443±0.032	1.305±0.070	0.501±0.019	0.345±0.014	0.220±0.027
模型组	1.219±0.062 <sup>##</sup>	0.869±0.026 <sup>##</sup>	0.776±0.034 <sup>##</sup>	0.518±0.008 <sup>##</sup>	0.732±0.039 <sup>##</sup>
葛连调糖丸组	0.676±0.024 <sup>**</sup>	1.137±0.046 <sup>**</sup>	0.677±0.011 <sup>*</sup>	0.437±0.013 <sup>*</sup>	0.456±0.073 <sup>**</sup>
RAGE 激动剂组	1.111±0.070	0.649±0.042 <sup>*</sup>	1.100±0.021 <sup>**</sup>	0.677±0.057 <sup>**</sup>	1.125±0.047 <sup>**</sup>
葛连调糖丸+RAGE 激动剂组	0.643±0.028	0.822±0.033 <sup>▲▲</sup>	0.827±0.018 <sup>▲</sup>	0.539±0.025 <sup>▲</sup>	0.737±0.049 <sup>▲▲</sup>

注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ；与葛连调糖丸组比较，<sup>▲</sup> $P<0.05$ ，<sup>▲▲</sup> $P<0.01$ 。



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为葛连调糖丸组，D 为 RAGE 激动剂组，E 为葛连调糖丸+RAGE 激动剂组。

图 13 各组细胞 RAGE、Bcl-2、Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白条带图

4 讨论

T2DM 发病机制复杂，胰岛素抵抗是其发生和发展的核心机制之一<sup>[18]</sup>。胰岛素是一种由胰腺 β 细胞产生的主要合成代谢激素，通过促进细胞对葡萄糖的摄取和利用来降低血糖水平<sup>[19]</sup>。胰岛素抵抗造成细胞对胰岛素的反应降低，尤其是肝脏、肌肉和脂肪细胞<sup>[20]</sup>。本研究以 HepG2 细胞为研究对象，采用含生理浓度葡萄糖（5.5 mmol/L）或高糖（30 mmol/L）培养液孵育 24 h，能成功诱导 HepG2 胰岛素抵抗细胞模型，结果显示 10% 葛连调糖丸含药血清能使胰岛素抵抗 HepG2 细胞活力增强。

AGE-RAGE 信号通路是 KEGG 功能富集分析程度较高的通路，糖基化终产物（AGEs）是一类由蛋白质、脂质和核酸等分子与还原糖类反应形成的化合物<sup>[21]</sup>。AGEs 的积累被认为是糖尿病及其并发症、动脉粥样硬化等疾病的重要因素<sup>[22]</sup>。高糖基化终产物受体（RAGE）是一种跨膜受体蛋白，主要存在于多种细胞表面<sup>[23]</sup>。RAGE 可以与其配体 AGEs 相结合，形成 AGE-RAGE 复合物，激活细胞内的信号传导通路<sup>[24]</sup>。当 AGEs 与 RAGE 结合时，能触发一系列信号传导，激活炎症、氧化应激和凋亡等细胞反应<sup>[25-26]</sup>。

糖尿病与糖尿病并发症会导致 AGE 水平升高，氧化应激反应增加及 AGE-RAGE 信号传导促进的促炎通路被激活，RAGE 基因的多态性可能会影响 AGE-RAGE 相互作用及其下游信号传导，这在糖尿病及其并发症的疾病进展中至关重要<sup>[27]</sup>。AGE-RAGE 信号通路的激活可进一步引起细胞凋亡<sup>[28]</sup>。因此，本研究在胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型中运用 RAGE 通路的激动剂 D-核糖，确证葛连调糖丸通过调

控 AGE-RAGE 信号通路防治 T2DM 的作用机制。结果发现，10% 葛连调糖丸含药血清能够促进细胞增殖，降低凋亡水平，而 D-核糖可逆转葛连调糖丸含药血清诱导的胰岛素抵抗 HepG2 细胞增殖和凋亡抵抗。本研究进一步检测了 AGE-RAGE 信号通路及其下游凋亡相关因子水平。结果表明，葛连调糖丸含药血清能够升高 Bcl-2 蛋白表达，降低 AGE、RAGE、Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白表达，D-核糖可逆转葛连调糖丸含药血清对胰岛素抵抗 HepG2 细胞中 Bcl-2、Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白表达的改变。以上结果提示，葛连调糖丸可以调控凋亡相关因子升高 Bcl-2 蛋白表达，降低 Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白表达，抑制 AGE/RAGE 信号通路，诱导 HepG2 细胞发生凋亡，减轻胰岛素抵抗进而延缓 T2DM 的疾病进展。

参考文献：

[ 1 ] Demir S, Nawroth P P, Herzig S, *et al.* Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(18): e2100275-e2100298.

[ 2 ] Yang R, Chen J W, Jia Q, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate ameliorates renal endoplasmic reticulum stress-mediated inflammation in type 2 diabetic rats[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2022, 247(16): 1410-1419.

[ 3 ] Hanaguri J, Nagai N, Yokota H, *et al.* Fenofibrate nano-eyedrops ameliorate retinal blood flow dysregulation and neurovascular coupling in type 2 diabetic mice[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(2): 384-400.

[ 4 ] Jin C, Tan K, Yao Z, *et al.* A novel anti-osteoporosis mechanism of VK2: Interfering with ferroptosis via AMPK/SIRT1 pathway in type 2 diabetic osteoporosis[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(6): 2745-2761.

[ 5 ] 杨 婕, 王志刚, 杨 霞, 等. 葛连降糖丸治疗湿热内蕴型 T2DM 临床观察[J]. *光明中医*, 2023, 38(11): 2058-2062.

[ 6 ] 蒋 勇, 钟淑欣, 何升华, 等. 基于网络药理学探究防风中生物活性成分及对类风湿关节炎的作用机制[J]. *中草药*, 2023, 54(17): 5601-5618.

[ 7 ] 郝文杰, 杨文明, 魏涛华, 等. 基于生物信息学和细胞实验探讨肝豆扶木汤调控铁死亡治疗肝豆状核变性的作用[J]. *中成药*, 2023, 45(10): 3461-3468.

[ 8 ] 赵少磊, 原 震, 朱艳茹, 等. 基于网络药理学和分子对



接探究地骨皮调血脂的作用机制[J]. 中草药, 2023, 54(5): 1487-1497.

[ 9 ] 毛美玲, 卢健棋, 谢丽钰, 等. 基于网络药理学、分子对接探讨强心汤治疗慢性心力衰竭的潜在作用机制[J]. 中医杂志, 2023, 64(20): 2132-2137.

[10] 孙东霞, 李晓颖, 陈嫣儒, 等. 基于网络药理学及分子对接研究黄连温胆汤治疗缺血性脑梗死作用机制[J]. 中国急救医学, 2023, 43(10): 806-813.

[11] 黄丽荣, 程 莎, 侯 菁, 等. 基于网络药理学及实验验证探究廖氏化风丹抗白血病活性[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(11): 1575-1585.

[12] 梁 娇, 茆文莉, 张力升, 等. 基于网络药理学及体内外实验探讨粉防己碱抗黑色素瘤增殖、迁移、侵袭的作用及机制[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34 ( 12 ): 1743-1752.

[13] 陈玉林, 蒋虎刚, 王新强, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨芪参益心颗粒治疗射血分数保留型心力衰竭的作用机制[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2023, 28 ( 10 ): 1081-1092.

[14] 余 炜, 魏 丞, 余 辉, 等. 基于网络药理学和分子对接研究“乌药蜜饮”对治疗结直肠癌的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(23): 3486-3490.

[15] 李 新, 韩彦琪, 张祥麒, 等. 基于网络药理学的痹祺胶囊治疗类风湿性关节炎的配伍规律研究[J]. 中草药, 2023, 54(23): 7607-7617.

[16] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, *et al.* ClueGO: A cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1091-1093.

[17] Zhou M, Hou Y L, Wu J, *et al.* miR-93-5ppromotes insulin resistance to regulate type2 diabetes progression in HepG2 cells by targeting HGF[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5): 329-343.

[18] Yang W B, Jiang W, Guo S D. Regulation of macronutrients in insulin resistance and glucose homeostasis during type 2 diabetes mellitus[J]. *Nutrients*, 2023, 15(21): 4671-4694.

[19] Xing J J, Chen C. Hyperinsulinemia: beneficial or harmful or both on glucose homeostasis[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2022, 323(1): E2-E7.

[20] Lee J, Lee S H. New mediators in diabetes pathogenesis: Exosomes and metabolites[J]. *J Diabetes Invest*, 2021, 12 (11): 1931-1933.

[21] Bhattacharya R, Alam M R, Kamal M A, *et al.* AGE-RAGE axis culminates into multiple pathogenic processes: a central road to neurodegeneration[J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 5 (16): 1155175-1155186.

[22] Schalkwijk C G, Micali L R, Wouters K. Advanced glycation endproducts in diabetes-related macrovascular complications: focus on methylglyoxal[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34 (1): 49-60.

[23] Jangde N, Ray R, Rai V. RAGE and its ligands: from pathogenesis to therapeutics[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2020, 55(6): 555-575.

[24] Leerach N, Harashima A, Munesue S, *et al.* Glycation reaction and the role of the receptor for advanced glycation end-products in immunity and social[J]. *Glycoconj J*, 2021, 38(3): 303-310.

[25] Khalid M, Petroianu G, Adem A. Advanced glycation end products and diabetes mellitus: Mechanisms and perspectives [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(4): 542-559.

[26] Reddy V P, Aryal P, Soni P. RAGE inhibitors in neurodegenerative diseases[J]. *Biomedicines*, 2023, 11 ( 4 ): 1131-1148.

[27] Chaurasiya A H, Khilari A A, Kazi R, *et al.* Nanopore sequencing of RAGE gene polymorphisms and their association with type 2 diabetes[J]. *ACS Omega*, 2023, 8 ( 29 ): 25727-25738.

[28] Zhuang S T, Zhou X, Yang X W, *et al.* Dendrobium mixture ameliorates hepatic injury induced by insulin resistance *in vitro* and *in vivo* through the down regulationof AGE/RAGE/Akt signaling pathway[J]. *Heliyon*, 2023, 9(11): 22007-22019.