

基于酶学、网络药理学及分子模拟分析黄芪葛根汤 对新冠肺炎合并糖尿病的作用机制

冯超颖,高璐,孙梅好,巩菊芳,蒲首丞*

浙江师范大学生命科学学院,金华 321000

摘要:基于酶学实验、网络药理学及分子模拟分析黄芪葛根汤对新冠肺炎合并糖尿病的作用机理及其通路。通过酶学实验和荧光光谱分析提取物的抑制作用;利用数据库筛选疾病相关靶点基因并构建蛋白相互作用关系网络,分析 degree 值以及 GO 功能和 KEGG 通路;将疾病的重要靶点与有效成分化合物进行分子对接和动力学分析。提取物对底物有一定的抑制效果,通过数据获得有效化合物 31 个,合并疾病相关靶点 196 个,化合物和疾病交集靶点 48 个。蛋白互作分析,得到 ATK1、IL6、TNF 等多个关键靶点,KEGG 和 GO 富集结果说明黄芪葛根汤有效成分主要作用于癌症通路和胰岛素抵抗通路,分子对接和分子动力学结果表明核心靶点与有效成分之间良好结合作用,多光谱分析显示提取物与靶蛋白发生互作。研究表明,黄芪葛根汤可以与新冠病毒和糖尿病的多靶点互作,有潜在的治疗新冠肺炎合并糖尿病的可能,其中重要靶点有 PIK3CA、PIK3R1、AKT1、EGFR 和 MAPK1 等,重要化合物有山柰酚、槲皮素、华良姜素、黄芪紫檀烷和 R-异微凸剑叶莎醇等。

关键词:黄芪葛根汤;新冠病毒肺炎;糖尿病;网络药理学

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024) Suppl-0133-15

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.S.016

Mechanism of Huangqi Gegen decoction on COVID-19 and diabetes mellitus based on enzymology, network pharmacology and molecular simulation

FENG Chao-ying, GAO Lu, SUN Mei-hao, GONG Ju-fang, PU Shou-cheng*

Zhejiang Normal University College of Life Science, Jinhua 321000, China

Abstract: Based on enzymatic experiments, network pharmacology and molecular simulation, the mechanism of action and pathway of Huangqi Gegen decoction on COVID-19 complicated with diabetes mellitus were analyzed. The inhibitory effects of extracts were performed by enzymatic experiments and fluorescence spectroscopy; The database was used to screen disease-related target genes and build protein interaction networks, and analyze degree values, GO functions and KEGG pathways. Molecular docking and dynamics of important targets of disease with active ingredient compounds were analyzed. The extract had a certain inhibitory effect, and 31 effective compounds, 196 disease-related targets, and 48 intersection targets of compounds and diseases were obtained through the data. The results of KEGG and GO enrichment showed that the active ingredients of Huangqi Gegen decoction mainly acted on cancer pathways and insulin resistance pathways. Molecular docking and molecular dynamics showed good binding between core targets and active ingredients, and multispectral analysis showed that extracts interacted with target proteins. The studies have shown that Huangqi Gegen decoction can interact with multiple targets of COVID-19 and diabetes, and has the potential to treat new coronary pneumonia and diabetes, among which important targets are PIK3CA, PIK3R1, AKT1, EGFR and MAPK1, and important compounds include kaempferol, quercetin, jaranol, astrapterocarpin and (R)-isomucronulatol.

Key words: Huangqi Gegen decoction; COVID-19; diabetes mellitus; network pharmacology

收稿日期:2023-09-12 接受日期:2023-11-20

基金项目:金华市公益类项目(2021-4-316)

* 通信作者 Tel:86-018329007237; E-mail: pusc@zjnu.edu.cn

糖尿病属于慢性疾病的一种,会造成严重的炎症反应甚至会引起复杂的并发症,是中国乃至世界都非常关注的疾病^[1]。新型冠状病毒肺炎(corona-

virus disease 2019, COVID-19) 是一种由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的疾病^[2], 该病自 2019 年起在全球范围内快速蔓延, 具有很强的传染性。研究发现, 糖尿病合并 COVID-19 患者的病情较为复杂, SARS-CoV-2 感染会使糖尿病人面临更大的感染和并发症的风险^[3], 而糖尿病也是促进 COVID-19 恶化的风险因子。患有合并症的病人, 其死亡率显著高于单一的 SARS-CoV-2 感染病人^[4]。由于糖尿病患者普遍会产生炎症反应和免疫力降低的情况, 这不仅会增强病人新冠肺炎的易感性, 也会进一步加重病人的临床症状。感染新冠病毒后会导致人体内炎症因子上升, 影响正常的胰岛功能, 造成胰岛素抵抗和高血糖的症状^[5]。急性新冠病毒诱发的不良反应可以叠加在糖尿病患者存在的炎症、器官病变上, 从而加重病情^[6]。与没有感染新冠病毒的糖尿病人相比, 新冠肺炎合并糖尿病的病人患慢性肾病几率更高^[7], 因此对新冠肺炎合并糖尿病的治疗有着一定的意义。

黄芪葛根汤是中医常见方剂, 其由黄芪与葛根两味药材组成, 具有生津止渴、健脾益气的功效^[8]。新冠期间多地的临床和预防方剂, 黄芪在其中作为主药存在, 在新冠病毒防治方面有着很大的潜力^[9]。研究表明, 葛根素有很好的防治糖尿病、降低炎症反应的功效, 在治疗 COVID-19 方面也有一定的潜在价值^[10]。

本文通过酶学实验、网络药理学及分子模拟等技术筛选黄芪葛根汤药物活性成分靶点和疾病靶点, 分析靶点基因网络、靶点蛋白互作关系、构建活性成分与靶点之间的网络图和信号通路, 探究黄芪葛根汤为 COVID-19 合并糖尿病的治疗提供潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄芪购于甘肃定西岷县药材市场, 产地甘肃岷县; 葛根购于金华磐安中药材市场, 产地大别山。由浙江师范大学吴智华副教授鉴定两种药材分别为蒙古黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.)) 的干燥根切片和野葛 (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi) 的干燥根。

阿卡波糖 (批号: S25M11X109783、HPLC \geq 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 5 U α -葡萄糖

苷酶 (批号: 11786430, 上海源叶生物科技有限公司); 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, PNPG) (批号: JS239376, 生物技术级 99%, 上海源叶生物科技有限公司); 无水乙醇 (批号: 20230607, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 无水碳酸钠 (批号: 20150417, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 新冠主蛋白 Mpro (Main protease) (本课题组进行载体构建, 并在大肠杆菌中进行原核表达从而获得目的蛋白); 冠状病毒 Mpro/3CLpro 荧光活性检测试剂盒 (Main protease /3C-like protease) (批号: P0313S, 碧云天生物技术有效公司); 主蛋白酶荧光底物 MCA/Dnp (MCA: (7-Methoxycoumarin-4-yl) acetyl, Dnp: 2, 4-dinitrophenyl) (批号: NJP81139, 南京肽业生物科技有限公司)。

1.2 仪器

UV-2550 紫外分光光度计 (SHIMADZU); SFX20: 0.55 超声细胞破碎仪 (EMERSON); FL1010M001 荧光分光光度计 (Agilent)。

1.3 实验数据库

TCMSP 数据库 (<https://old.tcm-sp.com/tcm-sp.php>); Pubchem 网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss Target Prediction 平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); Genecards (<https://www.genecards.org/>); Draw Venn Diagram 平台 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>); STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>); Metascape 平台 (<https://metascape.org/gp/index.html>); RCSB PDB 网站 (<https://www.rcsb.org>)。

1.4 样品制备

以 1:1、1:2、2:1 的比例分别取黄芪、葛根的干燥粉末, 按料液比 1:50 (g/mL) 加入 70% 乙醇浸泡后进行超声破碎 (480 W 超声 30 min), 4 °C 离心后上清即为黄芪葛根提取物。

1.5 α -葡萄糖苷酶抑制率测定

以 PNPG 为底物, 阿卡波糖为阳性对照, 测定不同比例的黄芪葛根提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。依次加入 0.01 mol/L pH = 6.8 的磷酸盐缓冲液、样品和底物混匀后 37 °C 孵育 10 min。再加入 0.2 U 的 α -葡萄糖苷酶溶液, 37 °C 反应 20 min 后加入 150 μ L 的 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应, 立即

测定 405 nm 处吸光度。每组均做多次平行实验,按照公式计算抑制率(R)。

$$R = \frac{(A_C - A_B) - (A_S - A_{SB})}{A_C - A_B} \times 100\%$$

式中, A_C :对照组吸光度; A_B :空白组吸光度; A_S :样品组吸光度; A_{SB} :样品空白组吸光度。

1.6 荧光共振能量转移探究抑制效果

在 96 孔板中加入 10 μL Mpro 蛋白、85 μL PH = 8 的磷酸缓冲溶液和 4 μL 不同比例的黄芪葛根提取物,孵育 10 min 后加入 1 μL 2 mmol/L 主蛋白酶荧光底物(MCA/Dnp),避光反应 20 min 后在多功能酶标仪中检测荧光值。以 Mpro、荧光底物、磷酸缓冲液混合作为 100% 酶活性对照,底物、缓冲液混合作为空白对照,多组重复实验,根据公式计算获得数值,根据数值大小比较不同比例黄芪葛根提取物对 Mpro 蛋白的抑制率(I)^[11,12],根据下列公式计算获得数值越高,说明抑制效果越好。

$$I = \frac{R_A - R_B}{R_A - R_C} \times 100\%$$

式中, R_A :100% 酶活性对照荧光值; R_B :样品荧光值; R_C :空白对照荧光值

1.7 荧光光谱测量

取 200 μL 5 U α -葡萄糖苷酶溶液于微量比色皿中,设置激发波长 280 nm,发射波长 300 ~ 450 nm;狭缝宽 20 nm,扫描荧光光谱。完成后重新设定激发和发射波长的差值为 15 nm 和 60 nm 进行同步荧光测定。加入 1 μL 提取物后,再次测定荧光。

1.8 活性成分及靶点挖掘

在 TCMSP 数据库中输入关键词“黄芪”“葛根”,筛选黄芪和葛根的有效成分:类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.15 、口服生物利用度(oral bio-availability, OB) ≥ 20 。在 Pubchem 网站查找化合物 SMILES 结构,输入到 Swiss Target Prediction 平台,筛选有效成分在人体中对应的靶点(物种属性“Homo sapiens”,Probability > 0.1)。与 UniProt 数据库中人的基因进行比对,再次选出人体所拥有的对应靶点及其基因,进一步分析。

1.9 疾病相关靶点获取及交集靶点的筛选

在 GeneCards 数据库网站上搜索疾病关键词“新型冠状病毒肺炎(COVID-19)”和“2 型糖尿病(type 2 diabetes)”统计去重后以 Relevance > 20 为标准筛选相关疾病靶点。运用 Draw Venn Diagram

平台,将获得的靶点和“1.8”中获得的活性成分靶点进行 Venn 作图,分析获得交集靶点,即为黄芪葛根汤治疗新冠病毒肺炎合并糖尿病的潜在药效靶点。

1.10 靶点相互作用网络分析

运用 String 数据库在 Multiple proteins 选项中输入交集靶点(物种属性“Homo sapiens”,minimum required interaction score = 0.9),构建交集靶点的蛋白网络互作关系图,并导出靶点蛋白互作图(protein protein interaction, PPI)和表格文件。

1.11 信号通路富集分析

运用 Metascape 平台富集分析“化合物-靶点”及其参与的生物学过程及信号通路(物种属性“Homo sapiens”,Min Overlap = 3, Min Enrichment = 1.5, $P < 0.01$)。结合两个数据库对化合物和疾病的重要靶点进行基因功能(GO)富集分析和京都基因和基因组数据库(KEGG)通路富集分析,并将结果整合进行可视化。利用 KEGG 富集分析结果得到相关通路,Cytoscape3.7.2 软件构建“活性成分-疾病靶点-通路”网络。

1.12 分子对接

使用 ChemDraw 绘制出配体小分子结构,保存为 mol 格式;用 Chem3D 打开,将其保存为 pdb 格式;在 AutodockTools 中对配体分子进行加氢处理后设为配体、确定扭矩中心、选择配体可扭转的键,并保存为 pdbqt 格式。

在 RCSB PDB 网站下载受体蛋白晶体结构,以 pdb 格式输出;使用 AutodockTools 软件对受体蛋白进行去水加氢处理,设置成受体后以 pdbqt 格式导出。通过 AutoDockTools 软件调整 GridBox 参数直至盒子包裹住对接位点;运行 AutoDock Vina 进行对接,并查看结果。最后利用 Pymol 和 Discovery Studio Visualizer 软件对对接结果进行可视化分析。

1.13 分子动力学

利用 Gromacs2023 软件包对分子对接结果中与配体分子结合能最高的药物受体靶点蛋白进行分子动力学模拟,得到其与配体的结合模式。模拟采用 Gromacs 自带的 amber03 力场,水模型采用 SPC (simple point charge)水模型。将分子对接结果作为初始结构,先做能量最小化处理,再在恒定条件下做分子动力学模拟,最后加入水溶液做的分子动力学模拟。模拟在 NVT(恒定粒子数、恒定体积、恒定温

度)条件下进行,温度 300 K,pH 为 7。

2 结果与分析

2.1 黄芪葛根提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率

将黄芪葛根混合物超声破碎后得到活性成分,检测其对 α -葡萄糖苷酶的抑制率(见图 1)。结果显示黄芪葛根提取物对 α -葡萄糖苷酶的活性具有一定抑制作用,黄芪、葛根比例为 2:1 时抑制的效果最好。

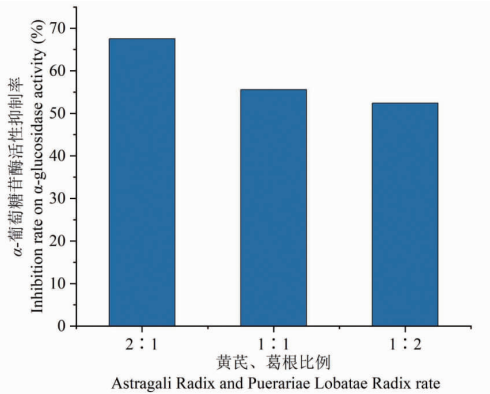


图 1 提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of extracts on α -glucosidase

2.2 荧光共振能量转移探究抑制效果

荧光共振能量转移法 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是一种非辐射能量跃迁,操作简单、检测灵敏、分析快速,目前是检测小分子物质对 Mpro 抑制效果的方法之一^[13]。整合荧光测量结果,分析数据得到不同浓度的黄芪葛根提取物对 Mpro 的抑制率(见图 2)结果显示,三种不同比例的提取物均有一定的抑制效果,其中黄芪葛根比例为 2:1 时,抑制效果最好。

2.3 荧光光谱分析

荧光结果显示 α -葡萄糖苷酶在 330 ~ 340 nm 处出现最大吸收峰(见图 3A)。加入黄芪葛根提取物后最大发射波长无明显变化,但最大吸收峰明显下

降。该结果表明黄芪葛根提取物与 α -葡萄糖苷酶发生相互作用导致色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸残基发生变化,从而使内源性荧光基团发生淬灭。

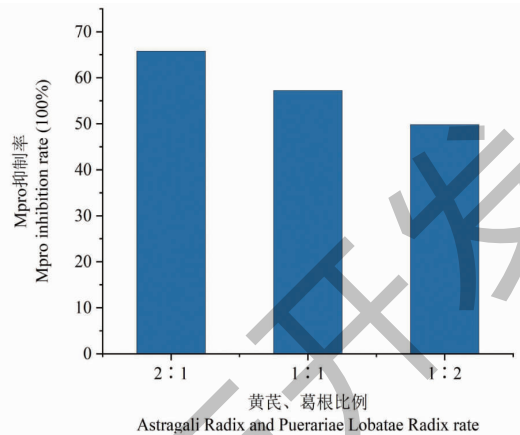
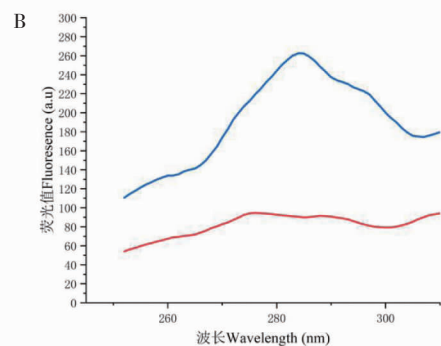
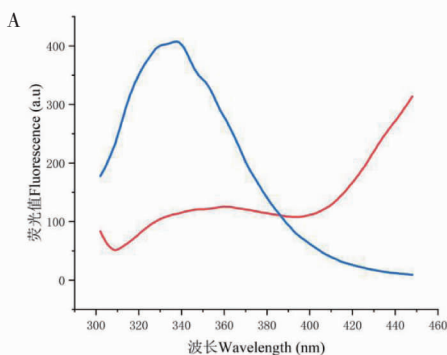


图 2 提取物对 Mpro 蛋白抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of extracts on Mpro

同步荧光光谱用于多组分分析,具有灵敏、干扰小等特点,目前已被广泛应用于分析分子微环境、氨基酸残基极性和亲水性测定。设置固定波长间隔检测酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光,从而分析分子微环境变化^[14]。如图 3B 所示加入提取物后同步荧光 $\Delta 15$ nm 发生了轻微的蓝移(284 nm \rightarrow 278 nm),说明提取物与 α -葡萄糖苷酶发生相互作用使蛋白构型发生变化,酪氨酸残基周围微环境向疏水性方向转变,极性减弱、疏水性增强。图 3C 显示加入提取物后同步荧光 $\Delta 60$ nm 发生轻微的红移(271 nm \rightarrow 280 nm),说明蛋白构象发生改变,色氨酸残基的微环境向亲水性方向改变,极性增强、疏水性减弱。在加入提取物后 280 nm 处的吸收峰明显下降,说明提取物中活性成分与蛋白相互作用,导致其荧光基团猝灭。推测其可能主要通过猝灭色氨酸残基的荧光来使蛋白的荧光下降,这与推测相符^[15-17]。



续图 3(Continued Fig.3)

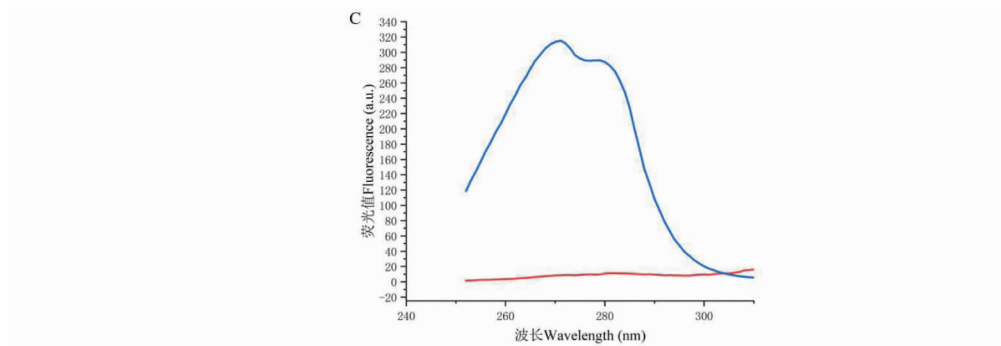


图3 荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra

注:图中蓝色曲线为 α -葡萄糖苷酶的荧光值,红色曲线为向 α -葡萄糖苷酶中加入提取物后混合物的荧光值;B为同步荧光 $\Delta 15$ nm 荧光值;C为同步荧光 $\Delta 60$ nm 荧光值 Note: The blue curve in the figure is the fluorescence value of α -glucosidase, and the red curve is the fluorescence value of the mixture after adding the extract to α -glucosidase; B is the synchronous fluorescence $\Delta 15$ nm fluorescence value; C is the synchronous fluorescence $\Delta 60$ nm fluorescence value.

2.4 黄芪葛根汤活性成分筛选结果

通过 TCMSPP 数据库查询及标准筛选,共得到黄芪有效活性成分 25 个、葛根有效活性成分 7 个,其

中两者共有活性成分为芒柄黄花素(formononetin),故黄芪葛根汤中共筛选出 31 个活性成分化合物(见表 1)。

表 1 黄芪葛根汤活性成分

Table 1 Active ingredients of Radix Pueraria Decoction

分子编号 Molecular number	成分 Ingredient	生物利用度 OB(%)	类药性 DL
MOL000211	丁香香薷 Mairin	55.38	0.78
MOL000239	华良姜素 Jaranol	50.83	0.29
MOL000295	多可甾醇 Alexandrin	20.63	0.63
MOL000296	常春藤皂苷元 Hederagenin	36.91	0.75
MOL000033	十二氢-1H-环戊醇[A]菲仑-3-醇(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-Dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	49.6	0.31
MOL000371	3,9-二-O-甲基尼森香豌豆紫檀酚 3,9-Di-O-methylnisosolin	53.74	0.48
MOL000374	5-羟基异微凸剑叶莎醇-2,5-二-O-葡萄糖苷 5'-Hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	41.72	0.69
MOL000378	7-O-甲基异木香茅醇 7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.3
MOL000379	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖 9,10-Dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside	36.74	0.92
MOL000380	黄芪紫檀烷 Astrapterocarpan (6aR,11aR)-9,10-Dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42
MOL000381	α -青蒿酸 13-Hydroxy-9,11-octadecadienoic acid	35.6	0.17
MOL000387	联苯双酯 Bifendate	31.1	0.67
MOL000392	芒柄黄花素 Formononetin	69.67	0.21
MOL000398	异黄酮 Isoflavone	109.99	0.3
MOL000407	黄芪皂苷 IV Astragaloside IV	22.5	0.15
MOL000417	毛蕊异黄酮 Calycosin	47.75	0.24

续表 1 (Continued Tab. 1)

分子编号 Molecular number	成分 Ingredient	生物利用率 OB(%)	类药性 DL
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24
MOL000433	叶酸 Folic acid	68.96	0.71
MOL000435	乙酰黄芪甲苷 I Acetylstragaloside I _{qt}	30.75	0.17
MOL000438	R-异微凸剑叶莎醇 (R)-Isomucronulatol	67.67	0.26
MOL000439	(3R)-3-(2-Hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl) chroman-7-ol 异微凸剑叶莎醇-7,2'-二-O-葡萄糖苷 Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	49.28	0.62
MOL000440	Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole _{qt}	23.42	0.79
MOL000442	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯 1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28
MOL000357	谷谷葡萄糖苷 Sitoglucoside	20.63	0.62
MOL000358	β -谷甾醇 β -sitosterol	36.91	0.75
MOL002959	3-甲氧基大豆苷元 3'-Methoxydaidzein	48.57	0.24
MOL003629	黄豆苷元葡萄糖苷 Daidzein-4,7-diglucoside	47.27	0.67
MOL012297	葛根素 Puerarin	24.03	0.69
MOL004631	7,8,4'-三羟基异黄酮 7,8,4'-Trihydroxyisoflavone	20.67	0.22

2.5 黄芪葛根汤治疗疾病预测潜在靶点结果

将获得的活性成分输入 Swiss Target Prediction 平台预测潜在靶点,按照标准筛选并去除重复项,获得黄芪药物靶点 1 025 个,葛根药物靶点 99 个。进一步将药物靶点合并去重获得黄芪有效药物靶点 419 个,葛根有效药物靶点 54 个。

2.6 新冠合并糖尿病靶点基因及交集靶点筛选结果

在 Genecards 数据库搜索新冠肺炎及 2 型糖尿病关键词,整合得到新冠肺炎相关靶点基因 9 494

个,2 型糖尿病相关靶点基因 12 597 个。通过进一步筛选去重获得新冠肺炎靶点基因 196 个,2 型糖尿病靶点基因 341 个,合并两种疾病靶点基因去重共得到 496 个疾病相关靶点基因。运用 Draw Venn Diagram 网站,将疾病相关靶点基因与黄芪葛根汤活性成分作用靶点基因进行作图查找相关交集靶点,获得黄芪活性成分与疾病交集靶点 48 个,葛根活性成分与疾病交集靶点 10 个,活性成分与疾病的共靶点 48 个(见图 4)。

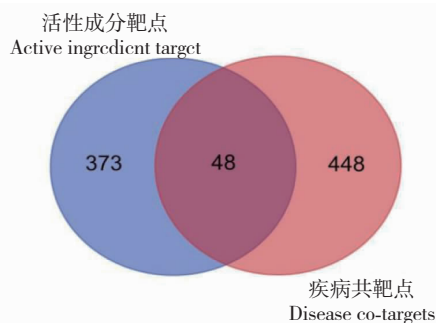


图 4 活性成分与新冠和糖尿病疾病的交集靶点韦恩图

Fig. 4 Venn diagram of intersection targets of active ingredient with COVID-19 and diabetes

2.7 靶点蛋白相互作用网络分析

将活性成分与疾病共靶点运用 String 平台进行蛋白互作分析,并借助 Cytoscape 平台对相关靶点进行相互作用的 degree 值分析,得到黄芪葛根汤活性成分作用于新冠和糖尿病的关键靶点蛋白,排名前

十的为蛋白激酶(AKT1)、白细胞介素(IL6)、肿瘤坏死因子(TNF)、表皮生长因子受体(EGFR)、热休克蛋白(HSP90AA1)、信号转导与转录激活因子 3(STAT3)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(MTOR)、核受体过氧化物酶体增生激活受体(PPARG)、胱天蛋白

酶 3 (CASP3)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1) (见 图 5)。

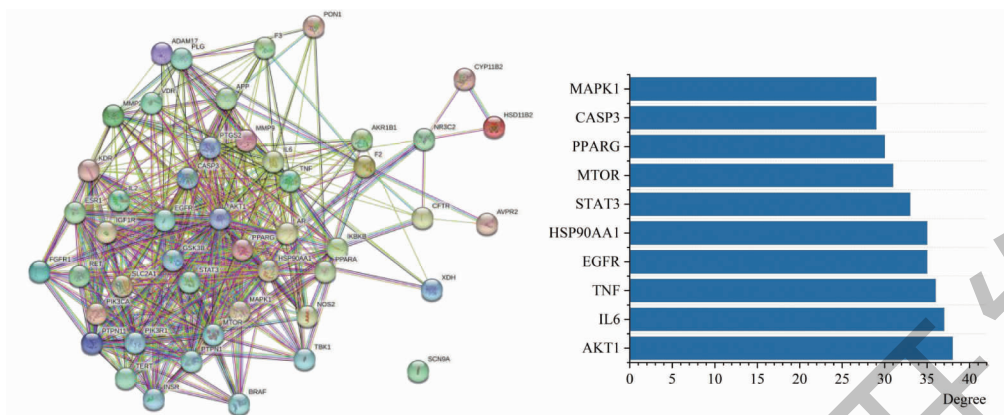


图 5 活性成分与新冠和糖尿病交集靶点蛋白互作网络图(左)和关键蛋白 degree 值(右)

Fig. 5 PPI network diagram of interaction between active ingredients ,COVID-19 and diabetes intersection targets (left) and key protein degree (right)

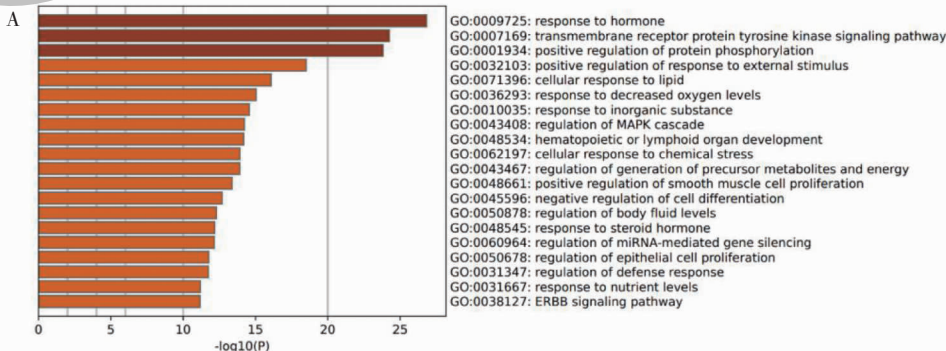
2.8 GO 功能与 KEGG 通路富集结果分析

在 Metascape 平台对活性成分与疾病的交集靶点进行 GO 功能的生物学过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和 KEGG 通路的富集分析。绘制分析可以得到排名前位的 GO 分析条形图和 KEGG 信号通路富集分析图,筛选得到黄芪葛根汤主要参与作用并治疗新冠肺炎合并糖尿病的几个方面的过程和重要通路解释作用机制。

根据 GO-BP 富集结果分析,得到 20 条重要 BP 通路,其中黄芪葛根汤治疗新冠肺炎合并糖尿病的主要生物学过程包括对细胞激素的反应、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、蛋白质磷酸化的正向调节、细胞对外部刺激反应的正向调节、细胞对脂质的反应、细胞对氧气水平降低的反应、细胞对无机物的反应、MAPK 级联的调节等多种生物学过程 (见图 6A)。通过 GO-CC 富集分析,得到重要 CC 通路 14 条,其中活性成分主要作用的细胞成分为膜筏和受

体复合物(见图 6B)。通过 GO-MF 富集分析得到重要 MF 通路 16 条,主要的分子功能有蛋白激酶活化、核受体活化、一氧化氮合酶调节活化、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活化、胰岛素受体结合等 (见图 6C)。KEGG 信号通路富集后得到 16 条重要通路,其中主要的信号通路包括癌症通路、癌症的蛋白聚糖通路、前列腺癌通路、胰岛素抵抗通路、阿尔兹海默病通路和 IL-17 信号通路等多种不同信号通路 (见图 6D)。

对化合物和疾病的关键靶点进行 KEGG 信号通路富集分析,共得到 143 条信号通路 ($P < 0.01$),这表明糖尿病和新冠肺炎与黄芪葛根汤关联度较高。KEGG 富集结果表明,hsa05200 癌症通路、hsa05205 癌症的蛋白激酶通路、hsa05215 前列腺癌通路和 hsa04931 胰岛素抵抗通路是最重要的四条通路,除此之外黄芪葛根汤还通过 hsa04657 IL-17 信号通路、hsa04020 钙离子信号通路、hsa04714 产热通路等多种不同的通路来影响新冠肺炎和糖尿病。



续图 6(Continued Fig.6)

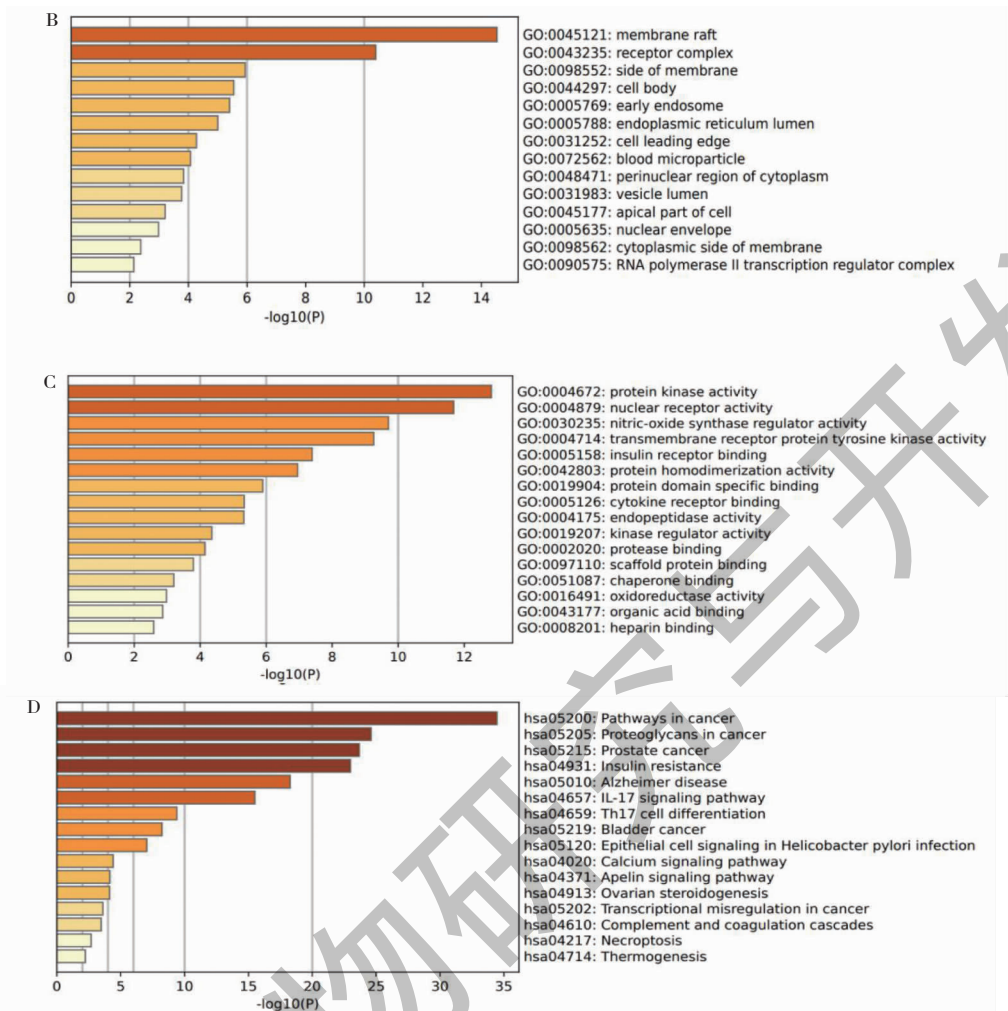


图6 黄芪葛根汤活性成分治疗疾病工作靶点富集图

Fig. 6 Co-target enrichment map of Huangqi Gegen decoction active ingredients for disease treatment

注:A为GO-BP分析;B为GO-CC分析;C为GO-MF分析;D为KEGG分析。Note: A shows GO-BP analysis; B shows GO-CC analysis; C shows GO-MF analysis; and D shows KEGG analysis.

2.9 黄芪葛根汤活性成分-靶点-通路网络构建图

将关键靶点与信号通路导入 Cytoscape 构建活

性成分-靶点-信号通路网络构建图,并对其关键节点进行 degree 值分析(见图7、图8)。结果显示靶

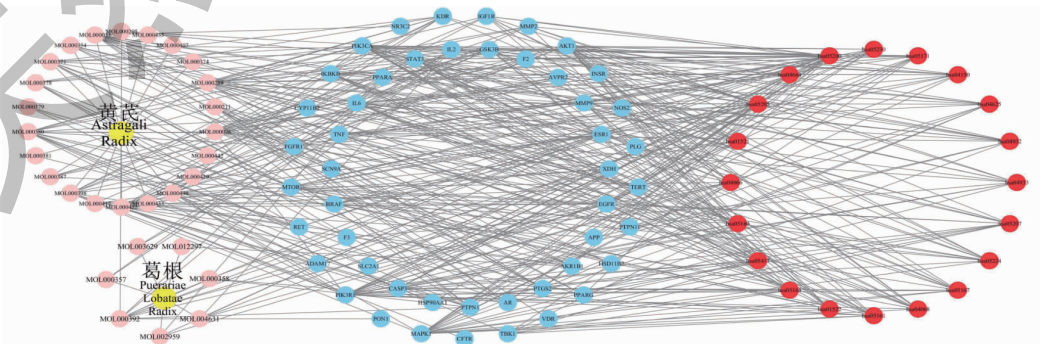


图7 黄芪葛根汤活性成分-新冠合并糖尿病靶点通路网络图

Fig. 7 Active ingredient of Huangqi Gegen decoction -target pathway network of COVID-19 with diabetes

注:黄色圆形为药物;粉色圆形为活性成分;蓝色圆形为靶点;红色圆形为通路。Note: The yellow circle is the drug; the pink circle is the active ingredient; the blue circle is the target; and the red circle is the pathway.

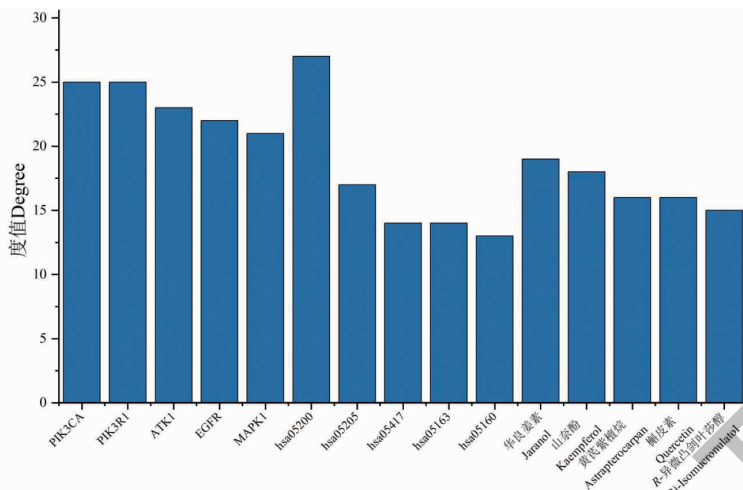


图8 关键成分-靶点-通路网络关系 degree 值

Fig. 8 Degree value of network of component-target-pathway

点 PIK3CA 和 PIK31 的 degree 值最高为 25、AKT1 的 degree 值为 23、EGFR 的值为 22、MAPK1 的值为 21,信号通路中 hsa05200 癌症通路值为 27,活性成分中华良姜素的 degree 值最高为 19。筛选得到黄芪葛根汤活性成分主要作用于 PIK3CA 靶点和 PIK31 靶点以及 hsa05200 癌症通路。

2.10 分子对接

根据网络药理学通路 degree 值筛选,糖尿病主要核心靶点有磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶 (PIK3CA)、磷酸肌醇-3-激酶 (PIK3R1)、MAPK1 和新冠疾病靶点 AKT1、EGFR,重要活性成分有山柰

酚、槲皮素、华良姜素、黄芪紫檀烷和 R-异微凸剑叶莎醇。对重要核心靶点与中药化学成分进行分子对接 (见图 9),结合能越低越易结合,其中靶点蛋白 MAPK1 和配体小分子结合最好 (结合能-9.1 kcal/mol)。分子对接结果表明化学成分与靶点之间主要作用力包括常规氢键、范德华力、 π -Anion、 π -Alkyl、 π -Sigma 相互作用等。EGFR-黄芪紫檀烷分子对接 (见图 10A) 显示有 3 个氢键,配体与 Leu777、Cys775、Lys745 形成氢键作用,这些作用力使结合能降低,亲和力增加,从而形成稳定的复合物。AKT1-槲皮素分子对接结果 (见图 10B) 表明 AKT1 与槲皮

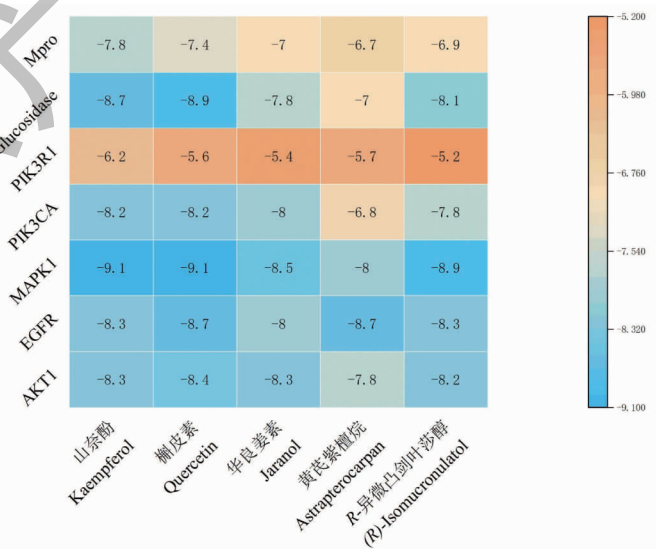
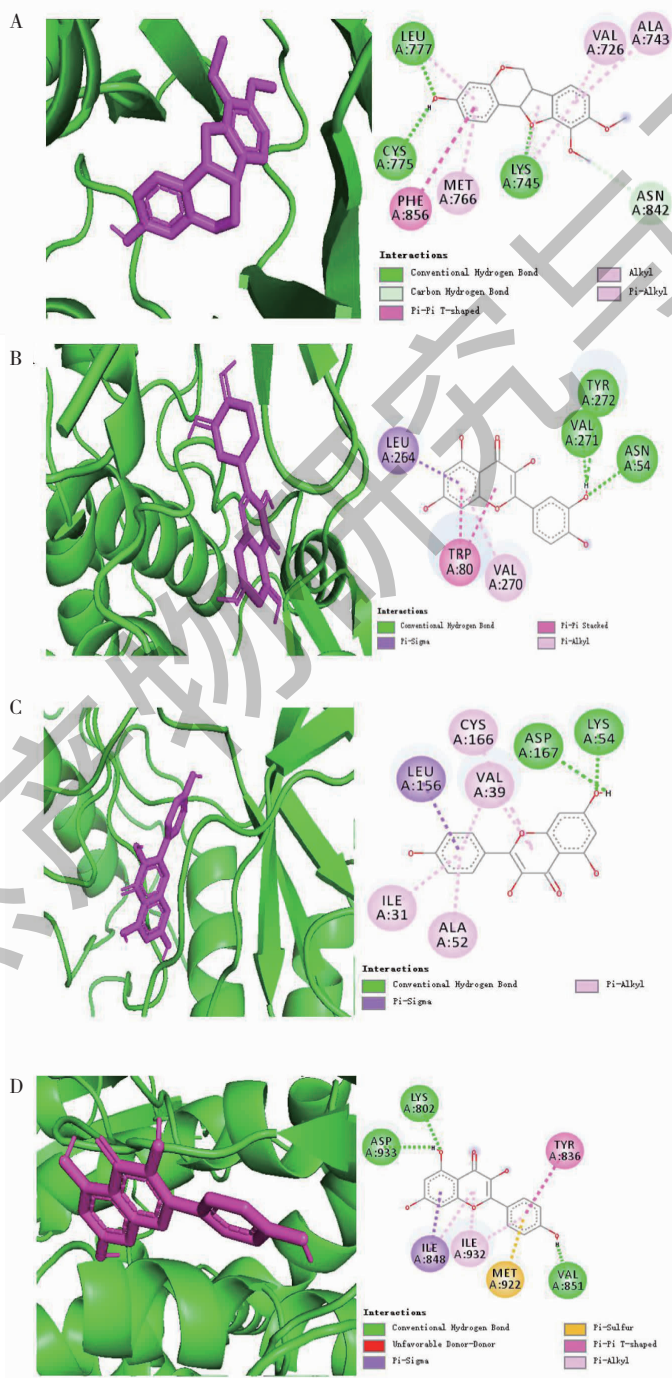


图9 对接结合能聚类热图

Fig. 9 Binding energy clustering heat map

素之间主要作用力包括常规氢键等,配体与 Tyr272、Val271、Asn54 形成氢键作用,与 Trp80 形成 π - π 堆积,这些作用力使结合能降低,亲和力增加,形成稳定的复合物。MAPK1-山柰酚(见图 10C)之间主要作用力包括常规氢键,配体与 Asp167、Lys54 形成氢键作用。PIK3CA-山柰酚(见图 10D)之间主要作用力包括常规氢键,配体与 Asp933、Lys802 和 Val851 形成氢键作用。PIK3R1-山柰酚(见图 10E)之间主

要作用力包括常规氢键,配体与 Arg37 和 Ser39 形成氢键作用。 α -葡萄糖苷酶和 Mpro 分别是糖尿病药物靶点和新冠药物靶点, α -葡萄糖苷酶-山柰酚(见图 10F)之间主要作用力包括常规氢键,配体与 Asp1279 和 His1584 形成氢键作用;Mpro-山柰酚(见图 10G)之间主要作用力包括常规氢键,配体与 Ayr54 形成氢键作用。



续图 10(Continued Fig.10)

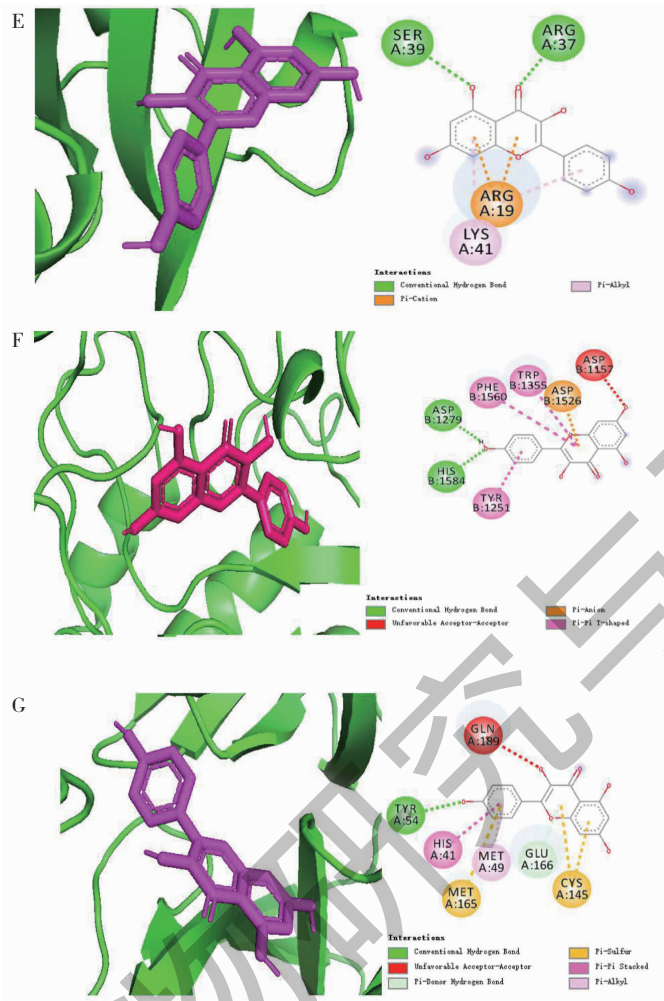


图 10 分子对接图

Fig. 10 Molecular docking diagram

注:A为EGFR-黄芪紫檀烷;B为AKT1-槲皮素;C为MAPK1-山柰酚;D为PIK3CA-kaempferol,E为PIK3R1-山柰酚;F为 α -葡萄糖苷酶-山柰酚;G为Mpro-山柰酚。Note:A is EGFR-Astrapterocarpan;B is AKT1-quercetin;C is MAPK1-kaempferol;D is PIK3CA-kaempferol and E is PIK3R1-kaempferol.

2.11 分子动力学

均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)可以反映药物配体分子与靶点蛋白结合稳定性^[18],图11A是Mpro-山柰酚在SPC模型水盒子中状态,图11B为初始状态,图11C为末状态,初末态空间高级构象有明显差异。如图12A所示,Mpro-山柰酚体系在前45 ns模拟时间中,RMSD值变化幅度大,45 ns后RMSD值变化幅度减小,84 ns下波动后,波动变化继续减小,表明山柰酚可以稳定地结合到新冠Mpro靶点蛋白中。均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)表现了每个原子或分子基团在一定时间内位置波动的大小,波动幅度较大,反映了在MD模拟过程中对蛋白质的氨基酸残基有较大的位

置波动,残基柔性变化较大。RMSF可以反映药物与靶点蛋白结合的柔韧性,如图12B所示,Mpro-山柰酚体系中的306为残基波动最大,其次是222和154残基等。

图13A是 α -葡萄糖苷酶-山柰酚在SPC模型水盒子中状态,图13B为初始状态,图13C为末状态,初末态复合体空间高级构象也有差异。RMSD可以反映 α -葡萄糖苷酶-山柰酚体系的结合稳定性,如图14A所示, α -葡萄糖苷酶-山柰酚体系在前50 ns模拟时间中,RMSD值变化幅度大,50 ns后RMSD值变化幅度减小,表明山柰酚可以稳定地结合到 α -葡萄糖苷酶靶点蛋白中。RMSF可以反映 α -葡萄糖苷酶-山柰酚体系的柔韧性,如图14B所示, α -葡萄

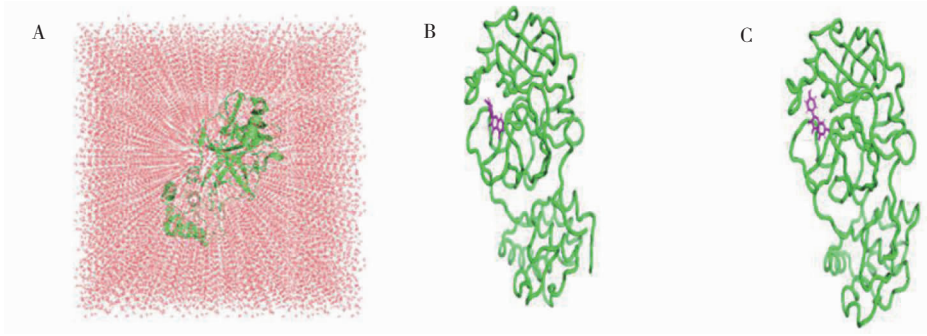


图 11 Mpro-山柰酚分子动力学初末态

Fig. 11 Mpro-kaempferol molecular dynamics initial and final states

注:A 为 Mpro-山柰酚复合物在 SPC 水盒子中状态;B 为初始状态;C 为末状态. Note:A is the state of the Mpro-kaempferol complex in the SPC water box;B is the initial state;C is the final state。

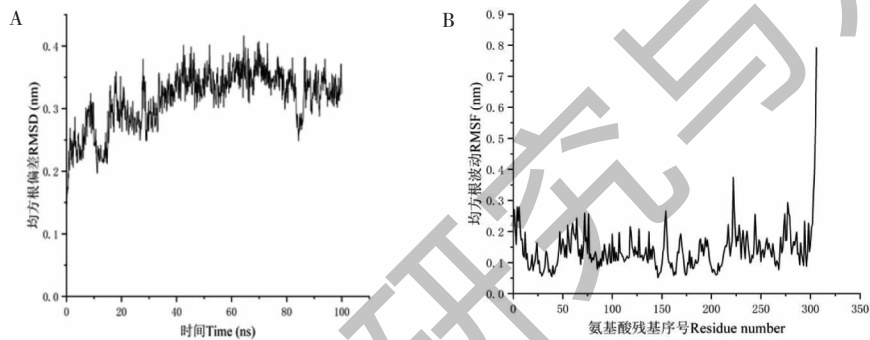


图 12 Mpro-山柰酚复合物的 RMSD 及 RMSF

Fig. 12 RMSD and RMSF of Mpro-kaempferol complex

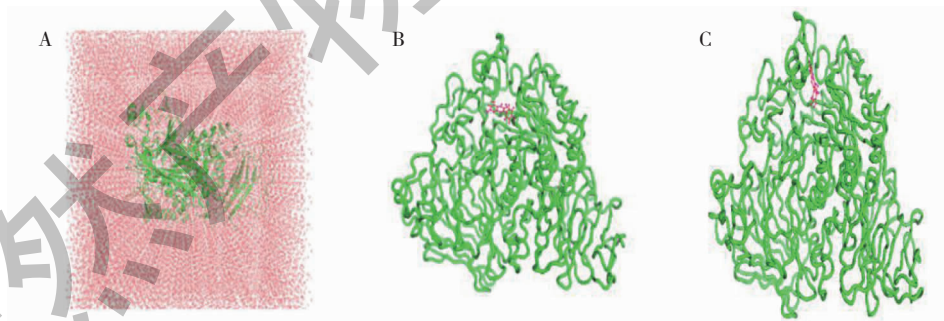


图 13 α -葡萄糖苷酶-山柰酚分子动力学初末态

Fig. 13 α -Glucosidase-kaempferol molecular dynamics initial and final states

注:A 为 α -葡萄糖苷酶-山柰酚复合物在 SPC 水盒子中状态;B 为初始状态;C 为末状态. Note:A is the state of the α -glucosidase-kaempferol complex in the SPC water box;B is the initial state;C is the final state.

糖苷酶-山柰酚体系中的 405 为残基波动最大,其次是 406、407、403、404、1 和 181 为残基等。RMSF 值较小的原因可能是酶与配体小分子产生紧密稳定的复合物,氨基酸残基柔性较小。 α -葡萄糖苷酶-山柰酚体系中 Arg418 和 Gln413 形成氢键作用,418 和 413 为残基波动就小。

蛋白质回旋半径(radius of gyration, R_g)是复合体在模拟体系过程中的质权平均半径,能反映配体与蛋白结合体体积形状的膨胀或紧凑程度。Mpro-山柰酚复合体的回旋半径随着时间从膨胀到紧凑状态,如图 15A 所示,可能是配体与受体蛋白分子间作用力拉紧了整体复合体的体积; α -葡萄糖苷酶-山

素酚复合体的回旋半径随着时间从膨松到紧凑状态,再回到膨胀状态,如图 15B 所示,可能配体在不

停调整自己构象与受体蛋白之间结合模式,最后回到稳定的膨松状态。

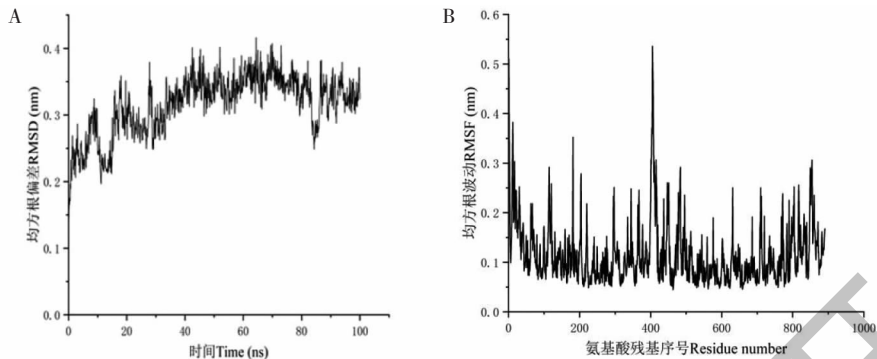


图 14 α -葡萄糖苷酶-山柰酚复合物的 RMSD 及 RMSF

Fig. 14 RMSD and RMSF of α -glucosidase-kaempferol

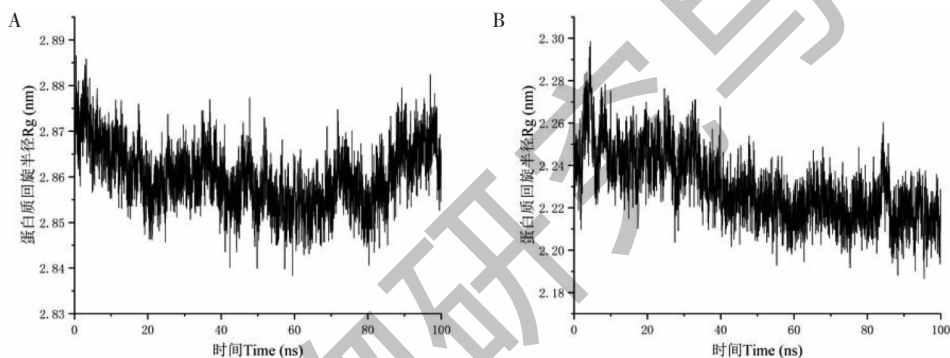


图 15 Mpro-山柰酚(A)与 α -葡萄糖苷酶-山柰酚(B)复合体的蛋白质回旋半径

Fig. 15 Rg of Mpro-kaempferol(A) and α -glucosidase-kaempferol(B) complex

3 结论

通过对黄芪葛根汤活性成分获取、化合物靶点筛选、靶点蛋白互作、GO 和 KEGG 通路进行分析,共得到有效成分 31 种,化合物和疾病交集共靶点 48 个。其中华良姜素和山柰酚两种有效活性成分均属植物类黄酮物质,其所对应的疾病靶点较多。黄酮类化合物具有广泛的抗肿瘤、消炎的作用。研究发现,华良姜素具有潜在抑制新冠病毒复制的作用和良好的抗癌效果^[19],山柰酚是新冠病毒主蛋白 Mpro 的有效抑制剂^[20]。通过靶蛋白互作关系图可以得到几种关键的靶蛋白,包括 AKT1、IL6、TNF、EGFR 等。新冠病毒可以引起人体的免疫反应进而导致人体产生一系列的炎症反应^[21]。IL6 是人体内一种多效性细胞因子^[22],可以发挥促炎或抗炎的作用,活性成分化合物可以作用于 IL6 关键靶蛋白从而达到治病的效果。GO 富集分析结果显示黄芪葛根汤主要作用于细胞膜筏和受体,参与蛋白激酶活

化、一氧化氮合酶活化等生物学过程。KEGG 信号通路富集分析结果表明活性成分主要作用于癌症通路、胰岛素抵抗通路和前列腺癌通路等多种信号通路,其中影响癌症通路的蛋白有 ATK1、AR、EGFR、IL2 和 IL6 等,影响胰岛素抵抗通路的蛋白有 ATK1、IL6、PIK3CA、TNF 等,影响前列腺癌通路的有 ATK1、EGFR、MMP9、PIK3CA 等多种靶蛋白。

医学研究发现,糖尿病患者胰岛素抵抗信号通路受损且表现出低度的炎症反应,这使得促炎细胞因子 IL6、TNF 等处于高表达状态^[23],从而进一步加剧胰岛素抵抗。新冠病毒感染后产生的一系列炎症反应,更会加剧胰岛素的抵抗使糖尿病患者的病情加重。并且由于糖尿病患者自身免疫能力较差,这就导致了其比普通人更易感染新冠病毒。黄芪和葛根均具有降血糖和消炎的作用,黄芪葛根汤通过其活性成分与相关靶点的结合来影响癌症通路、胰岛素抵抗通路、IL-17 信号通路等,从而达到治疗的目的。

酶活性抑制实验显示,加入各种比例的黄芪葛根提取物后,酶活性都有一定程度的下降,通过多组不同比例的复配实验发现黄芪与葛根比例为 2:1 时抑制效果最好。荧光光谱结果表明,黄芪葛根活性成分的加入使得 α -葡萄糖苷酶中酪氨酸残基与色氨酸残基的内源荧光基团发生猝灭,这表明氨基酸残基微环境发生改变,导致 α -葡萄糖苷酶的构象也有所改变,从而起到抑制其酶活的作用。分子对接实验进一步验证了这一结果,其结果显示提取物中的小分子通过氢键、范德华力等作用力与 α -葡萄糖苷酶活性中心的氨基酸残基相互作用形成稳定的化合物占据其催化中心,从而阻挡了底物与 α -葡萄糖苷酶活性中心的正常结合,达到了抑制酶活性的作用。

综上所述,本研究通过对黄芪葛根汤进行网络药理学、分子模拟和光谱分析,了解靶点蛋白间的相互作用和有效成分作用于疾病的靶点及信号通路机制,重要靶点有 PIK3CA、PIK3R1、AKT1、EGFR 和 MAPK1 以及药物靶点等,中药关键配体活性成分有山柰酚、槲皮素、华良姜素、黄芪紫檀烷和 R-异微凸剑叶莎醇等,以及主要信号通路 hsa05200 癌症通路;分子对接和分子动力学表明复方汤药关键成分与靶点蛋白有良好结合;光谱分析结果表明汤药对靶点蛋白的猝灭作用。这为找出关键活性成分群作用于人体疾病的机制,从而为疾病的治疗和药物的使用提供新的思路和实践依据。

参考文献

- Shi Q, Zhou F, Mei J, et al. The Effect of type 2 diabetes mellitus on neuropsychological symptoms in Chinese early Alzheimer's disease population [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16: 829-836.
- Xie J, Ding C, Li J, et al. Characteristics of patients with coronavirus disease (COVID-19) confirmed using an IgM-IgG antibody test [J]. *J Med Virol*, 2020, 92: 2004-2010.
- Metwally AA, Mehta P, Johnson BS, et al. COVID-19-induced new-onset diabetes: trends and technologies [J]. *Diabetes*, 2021, 70: 2733-2744.
- Barrera FJ, Shekhar S, Wurth R, et al. Prevalence of diabetes and hypertension and their associated risks for poor outcomes in COVID-19 patients [J]. *J Endocr Soc*, 2020, 4: bvaa102.
- Kazakou P, Lambadiari V, Ikonomidis I, et al. Diabetes and COVID-19; abidirectional interplay [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 780663.
- Feldman EL, Savelieff MG, Hayek SS, et al. COVID-19 and diabetes: a collision and collusion of two diseases [J]. *Diabetes*, 2020, 69: 2549-2565.
- Maddaloni E, D'Onofrio L, Alessandri F, et al. Clinical features of patients with type 2 diabetes with and without COVID-19: a case control study (CoViDiab I) [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2020, 169: 108454.
- Ding S, Wang W, Song X, et al. Based on network pharmacology and molecular docking to explore the underlying mechanism of Huangqi Gegen decoction for treating diabetic nephropathy [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 9928282.
- Zhu LJ, Huang QY, Wu JM. Research advances in *Astragalus membranaceus* and its components in viral diseases [J]. *J Southwest Med Univ (西南医科大学学报)*, 2020, 43: 528-533.
- Liang W, Li X, Wang H, et al. Puerarin: a potential therapeutic for SARS-CoV-2 and Hantavirus co-infection [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 892350.
- Wang YJ. Structure small molecule inhibitors based on 3CL protease screening of broad-spectrum anti coronavirus [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology (北京化工大学), 2022.
- Chen YY, Fu ZZ, Yan GG, et al. Optimization of expression conditions and determination the proteolytic activity of codon-optimized SARS-CoV-2 main protease in *Escherichia coli* [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2021, 37: 1334-1345.
- Qi HY, Yan GG, Fu ZH, et al. Miniaturized high-throughput screening assays for the discovery of SARS-CoV-2 main protease inhibitors [J]. *Chem Life (生命的化学)*, 2021, 41: 207-214.
- Tang H, Huang L, Sun C, et al. Exploring the structure-activity relationship and interaction mechanism of flavonoids and alpha-glucosidase based on experimental analysis and molecular docking studies [J]. *Food Funct*, 2020, 11: 3332-3350.
- Peng X, Zhang G, Liao Y, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on alpha-glucosidase [J]. *Food Chem*, 2016, 190: 207-215.
- Liu JL, Kong YC, Miao JY, et al. Spectroscopy and molecular docking analysis reveal structural specificity of flavonoids in the inhibition of alpha-glucosidase activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 152: 981-989.
- Phan MAT, Wang J, Tang J, et al. Evaluation of α -glucosidase inhibition potential of some flavonoids from *Epimedium brevicornum* [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2013, 53: 492-498.