基于网络药理学及分子对接探讨苏木治疗糖尿病周围神经病变的作用机制

刘影哲[1],吕　蓉[2],夏兆晨[2,3],
王　岩[1],王　贺[1],兰冬雪[2],李喜伟[1],张莹琪[2],周亚滨[1*]

[1]黑龙江中医药大学附属第一医院;[2]黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040;[3]昆山市中医医院,昆山 215300

摘　要:采用网络药理学、分子对接和实验验证的方法探究苏木治疗周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy,DPN)的作用机制。通过化学专业数据库、ETCM 数据库及文献检索进行苏木成分查询,通过 SwissADME 平台筛选出苏木的活性成分,再利用 PharmMapper 数据库预测出潜在作用靶标,同时从 GeneCards、DrugBank、OMIM 数据库筛选与 DPN 疾病相关的靶点,取两者交集靶点;用 STRING 11.5 获得蛋白互作关系,并通过 Cytoscape 3.8.2 软件构建出成分-靶点蛋白相互作用网络;再通过 Metascape 数据库进行 GO、KEGG 富集分析及 Autodock 联合 Pymol 进行分子对接,同时对苏木提取物抗 DPN 炎症作用及氧化作用进行实验验证。最后共筛选出苏木共有 93 个活性成分,治疗 DPN 关键靶点 109 个,其中鼠李素、巴西苏木素、氧化巴西苏木素、苏木查尔酮、紫铆花素、槲皮素等成分具有改善周围神经病变的作用,其可能是通过雌激素受体 1(estrogen receptor alpha,ESR1)、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor-1,IGF1)、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase 3,CASP3)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ(peroxisome proliferator activator receptor gamma,PPARG)、基质金属蛋白酶-2(matrixmetalloproteinase-2,MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix-metalloproteinase-9,MMP-9)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)、蛋白激酶 B1(rac-alpha serine/threonine-protein kinase,AKT1)、血清白蛋白(albumin,ALB)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src(proto-oncogene tyrosine-protein kinase src,SRC)等靶点介导 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、HIF-1 信号通路、RAS 信号通路等发挥治疗作用。分子对接验证发现活性成分与 AKT1、CASP3、MMP-9 有较好的对接活性。实验发现苏木提取物可以降低血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、单核细胞趋化因子 1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)的含量,提升血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)的含量。本次研究发现苏木可通过多成分、多靶点、多途径起到干预治疗 DPN 的作用,为苏木治疗 DPN 的基础和临床研究提供新方向。

关键词:网络药理学;分子对接;苏木;糖尿病周围神经病变;信号通路

中图分类号:R285　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2024)Suppl-0094-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.S.013

Mechanism of Sappan Lignum in the treatment of diabetic peripheral neuropathy based on network pharmacology and molecular docking

LIU Ying-zhe[1],LYU Rong[2],XIA Zhao-chen[2,3],
WANG Yan[1],WANG He[1],LAN Dong-xue[2],LI Xi-wei[1],ZHANG Ying-qi[2],ZHOU Ya-bin[1*]

[1]*First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine*;
[2]*Heilongjiang University of Chinese Medicine,Harbin 150040,China*;
[3]*Kunshan Hospital of Traditional Chinese Medicine,Kunshan 215300,China*

Abstract:In this study,network pharmacology,molecular docking and experimental verification were used to explore the mechanism of Sappan Lignum in the treatment of diabetic peripheral neuropathy (DPN). The chemical professional database, ETCM database and literature were used to query the components of Sappan Lignum,the active components of Sappan Lignum

收稿日期:2023-08-04　　接受日期:2023-11-06
基金项目:黑龙江省中医药管理局中医药科研课题(ZHY2022-156);黑龙江省博士后科研启动金(LBH-Q13168)
*通信作者 E-mail:zhouyabin@hotmail.com

天然产物研究与开发

were screened by SwissADME platform, and the potential targets were predicted by PharmMapper database. At the same time, the targets related to DPN disease were screened from GeneCards, DrugBank and OMIM databases, and the intersection targets were selected. The protein interaction relationship was obtained by STRING11.5, and the component-target protein interaction network was constructed by Cytoscape 3.8.2 software. Then GO and KEGG enrichment analysis was carried out through Metascape database, and molecular docking was carried out by Autodock combined with Pymol, At the same time, the anti-DPN inflammation and oxidation effects of Sappan Lignum extract were experimentally verified. Finally, a total of 93 active components of Sappan Lignum were screened out, and 109 key targets for treating DPN were identified. Among them, rhamnetin, brazilin, brazilein, sappanchalcone, butein, quercetin and other components have the effect of improving peripheral neuropathy, which may be through estrogen receptor alpha (ESR1), insulin-like growth factor-1 (IGF1), Caspase 3 (CASP3), peroxisome proliferator activator receptor gamma (PPARG), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), epidermal growth factor receptor (EGFR), RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (Akt1), albumin (ALB), proto-oncogene tyrosine-protein kinase src (SRC) and other targets mediate PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway and HIF. Molecular docking verification showed that the active components had good docking activity with AKT1, CASP3 and MMP-9. It was found that Sappan Lignum extract could reduce the contents of serum tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and increase the content of serum SOD. This study found that Sappan Lignum played an intervention role in the treatment of DPN through multi-components, multi-targets and multi-pathways, which provides a new direction for the basic and clinical research of Sappan Lignum in the treatment of DPN.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Sappan Lignum; diabetic peripheral neuropathy; signaling pathway

糖尿病周围神经病变(diabetie peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病中最常见的一种并发症,主要表现为患者的四肢远端麻木、疼痛和感觉异常等,严重者可致糖尿病足,甚至截肢等。研究发现若DPN的病程超过10年及以上,将有超过50%的患者出现不同程度的周围神经损伤[1],其高发病率与致残率带给患者沉重的身体与精神痛苦,同时也增加了经济负担。DPN发病机制较为复杂,目前研究多认为与高糖毒性多元醇代谢通路活化、已糖胺和蛋白激酶-C(protein kinase C, PKC)途径激活、氧化应激、非酶糖基化和糖基化终产物形成等多种因素有关,传统治疗则围绕着血糖控制、神经修复、改善微循环、抗氧化应激等方面为主来缓解疼痛症状,但实际效果往往不够理想,患者接受程度参差不齐。

近年来,中药在治疗DPN方面显示出较为出众的疗效且副作用颇少,已广泛应用于临床防治。在中医学中,DPN属于"痹证"、"血痹"的范畴,发病主因消渴病日久耗伤气阴、气血亏虚,血行瘀滞、脉络痹阻所致,其痰浊、瘀血痹阻脉络,不荣不通。而苏木其性平味甘、辛、咸,有活血化瘀、消肿止痛的功效,《本草求原》记载苏木可"治一切腰腹胁痛、痹痛、胀满呕吐之由于败血者……"在治疗DPN中的处方中普遍运用[2],有很好的临床价值和发展前景,现代药理研究也证实其具有抗氧化、改善微循环、抗炎、免疫抑制等作用。针对长期的高血糖、高脂和氧化应激状态会引起机体血管内皮损伤和神经细胞病变,所在课题组前期研究[3-6]发现苏木提取物不仅能够抑制炎性因子的分泌,还能够改善AS模型大鼠腹主动脉的组织形态和内皮细胞功能,并且抑制基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)蛋白的表达,还能够下调内皮细胞损伤状态下*TLR4* mRNA和*NF-κB P65* mRNA的表达,抑制TLR4/NF-κB途径的活化,提升血清血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和血清谷胱甘肽(glutathione, GSH)的含量,降低血清血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor, TNF-α)、单核细胞趋化因子1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的含量,揭示其在糖尿病并发症中的内在影响。但目前对于苏木治疗DPN的机制研究尚不够全面,为了更好地了解其相关调控作用,本次研究采用网络药理学及分子对接的方法来探究苏木治疗DPN的作用机制,为后期的实验研究拓展了思路,也为临床治疗提供理论基础及参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 数据库与软件

ETCM数据库(http://www.tcmip.cn/ETCM/);化学专业数据库(https://www.organchem.nsdc.cn/scdb/default.asp);PharmMapper (https://lilab-ec-

天然产物研究与开发

ust. cn/pharmmapper/index. html); GeneCards (https://www. genecards. org/); DrugBank (https://go. drugbank. com/); OMIM (https://www. omim. org/); STRING (https://string-db. org/); Metascape (https://metascape. org/gp/index. html #/main/step1); 微生信在线平台(https://www. bioinformatics. com. cn/); Venny2. 1. 0 (https://bioinfogp. cnb. csic. es/tools/venny/); PDB 数据库(https://www. rcsb. org/#Category-search)。

Chem Draw、Cytoscape 3. 8. 2、AutodockTool 1. 5. 7、Pymol。

1. 1. 2 实验动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 210 ~ 230 g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心(许可证号 SYXK(黑)2013-012)。伦理审批号:201811200203,伦理审批单位:黑龙江中医药大学实验动物使用与管理委员会。

1. 1. 3 药材与试剂

苏木(原产地为云南,药材购于黑龙江省药材公司)。苏木提取物:中药苏木购于黑龙江省药材公司,经过生药鉴定,苏木提取物由黑龙江中医药大学制备。每 736 mg 苏木乙酸乙酯提取物干粉相当于 1. 15 g 苏木生药。药物制备完成后,每次实验所需溶液临时配置,将其溶于 5‰羧甲基纤维素钠溶液 10 mL 中,配制成含生药量浓度为 0. 115 g/mL 浓度的苏木乙酸乙酯溶液。

硫辛酸片(山东齐都药业有限公司,国药准字 H20100152,0. 3 g/片),按硫辛酸 20 mg 溶于 5‰羧甲基纤维素钠溶液 10 mL 中进行配制,浓度为 2 mg/mL 的硫辛酸溶液。

链脲佐菌素(STZ)(北京博奥拓达科技有限公司,批号:S6050);柠檬酸、柠檬酸钠(山东省中创柠檬生化有限公司,批号:A15IR15768A); TNF-α ELISA 试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号:TOPEL02868)、IL-6 ELISA 试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号:TOPEL02879)、SOD ELISA 试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号:S2515C)、MCP-1 ELISA 试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号:TOPEL02728)。

1. 2 实验方法

1. 2. 1 网络药理学及分子对接预测苏木治疗 DPN 的机制

1. 2. 1. 1 苏木活性成分的筛选及靶点

利用 ETCM 数据库、化学专业数据库并结合查阅文献对苏木的化学成分信息进行收集,将收集的化学成分逐一通过 ChemDraw 绘制分子结构图并以 sdf 的格式存储,并上传至 SwissADME 平台。设置潜在核心化合物的标准为:①肠胃吸收(Pharmacokinetics;GI absorption)为"High"②设置 5 类药性预测(Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge)结果中有 2 个及 2 个以上为"Yes"。再利用基于药效团匹配法的 PharmMapper 数据库获取潜在化合物的靶点。

1. 2. 1. 2 DPN 疾病靶点检索

以"diabetie peripheral neuropathy"为关键词,在 GeneCards、DrugBank、OMIM 疾病基因数据库进行检索与筛选,将得到的结果合并后去重,保留获得的唯一有关 DPN 疾病的靶点,并与"1. 2. 1. 1"中得到的作用靶点取交集,获得苏木治疗 DPN 的潜在作用靶点。

1. 2. 1. 3 构建"苏木-活性成分-靶点"网络

将中药、活性成分和关键靶点信息整理成 Excel 表上传至 Cytoscape 3. 8. 2 来构建"苏木-活性成分靶点"网络,用 node 来表示成分或靶点,用 edge 来表示它们之间的联系;用 NetworkAnalyzer 分析工具进行分析,得到 degree、betweenness 以及 closeness 等数值,以此来探讨成分与靶点之间的联系。

1. 2. 1. 4 关键作用靶点的筛选及蛋白相互作用(PPI)网络的构建

将关键作用靶点导入 STRING 数据库,选择的物种为人类,其余均为默认设置,剔除掉孤立的靶点,进而得到核心靶点。将得到的结果保存为 TSV 格式文件,将其导入到 Cytoscape 3. 8. 2 软件,构画出 PPI 网络图。利用 Cytoscape 3. 8. 2 中的 CytoHubba 及 MCODE 插件筛选治疗疾病的关键基因。CytoHubba 是 Cytoscape 软件中寻找核心靶点的一个插件,用于发现复杂网络中的关键目标,今利用其插件中的 MCC、MNC、Degree 算法得出核心靶点。MCODE 可以将基因网络中的关键靶点模块提取出来,发现 PPI 网络中相互作用的密集区域,即各聚集的模块,默认选择得分前二的模块作为分析对象,最后选取 Cytohubba 和 MCODE 插件聚类得到的交集基因作为核心靶点。其中,CytoHubba 和 MCODE 的参数均为默认设置。

1. 2. 1. 5 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

采用 Metascape 数据库对"1. 2. 1. 4"中的靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,并保存结果对其

进行可视化分析,以此探索相关的生物学通路,进而解释出苏木治疗 DPN 的作用机制。

1.2.1.6　药物核心成分与关键靶点基因的分子对接

将“1.2.1.3”获得的活性成分与“1.2.1.4”中得到的靶点蛋白进行分子对接,将活性成分的 sdf 结构通过 Chemdraw 及 Chem3D 将 2D 结构转换为 3D 结构,同时从 PDB 数据库获得靶蛋白并储存为 PDB 格式,利用 AutodockTool 1.5.7 软件对靶蛋白和化合物小分子进行去水、加氢、计算电荷等操作后进行分子对接,最后利用 pymol 将结果以图片形式输出。

1.2.2　苏木实验部分

1.2.2.1　动物模型制备与实验分组

60 只 SD 大鼠随机选取 15 只作为对照组,余下的 45 只大鼠禁食 12 h 后单次腹腔注射链脲佐菌素(STZ)50 mg/kg,注射前在闭光条件下将 STZ 粉与柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液按 1 g 比 10 mL 的比例配制。72 h 后给予大鼠尾静脉采血,检测血糖数值,将血糖≥16.7 mmol/L 的 45 只大鼠定为造模成功的大鼠,随机将其分成模型组、硫辛酸组和苏木组。硫辛酸组给予硫辛酸 20 mg/(kg·d)腹腔注射 8 周,苏木组给予苏木 0.15 g/(kg·d)灌服 8 周;对照组、模型组予等体积的生理盐水灌服 8 周。

1.2.2.2　观察指标

大鼠饲养 8 周后,分别向四组大鼠的腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉,腹主动脉取血,3 000 r/min,温度 4 ℃,离心 20 min,收集上层血清。采用 ELISA 法检测血清中 TNF-α、MCP-1 的含量,按照 IL-6 试剂盒方法测定其含量,采用黄嘌呤氧化酶法测定血清中 SOD 的含量。

1.2.2.3　统计学处理应用

SPSS22.0 软件进行统计学分析,所有数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　苏木活性成分及靶点预测

通过查阅文献及数据库,发现苏木主要包括原苏木素、巴西苏木素、高异黄酮、苏木查尔酮等类成分,还含有二苯类和其他类成分。通过 SwissADME 筛选出 93 种活性最高的成分(见表 1)。利用 PharmMapper 预测靶点,去除所有重复基因后共有 428 个预测靶点。

表 1　苏木活性成分

Table 1　Active components of Sappan Lignum

编码 Encode	化合物 Compound	编码 Encode	化合物 Compound	编码 Encode	化合物 Compound
SM1	3-(3′,4′-二羟基苯亚甲基)-7-羟基色烷-4-酮 3-(3′, 4′-Dihydroxybenzylidene)-7-hydroxychroman-4-one	SM32	7-羟基-3-(3′,4′-二羟基苯亚甲基)-色烷-4-酮 7-Hydroxy-3-(3′, 4′-dihydroxybenzylidene)-chroman-4-one	SM63	氧化苏木精 Hematein
SM2	3-(3′,4′-二羟基苯甲基)-3,7-二羟基色烷-4-酮 3-(3′, 4′-Dihydroxybenzyl)-3, 7-dihydroxychroman-4-one	SM33	3,7-二羟基-3-(4′-羟基)-4-色原酮 3, 7-Dihydroxy-3-(4′-hydroxybenzyl)-chroman-4-one	SM64	3′-甲基巴西苏木素 3′-*O*-Methylbrazilin
SM3	3-(3′,4′-二羟基苯甲基)-7-羟基色烷-4-酮 3-(3′, 4′-Dihydroxybenzyl)-7-hydroxychroman-4-one	SM34	7-羟基-8-甲氧基-3-(4′-甲氧基)-4-色原酮 7-Hydroxy-8-methoxy-3-(4′-methoxybenzylidene)-chroman-4-one	SM65	10-*O*-甲基原苏木素 B 10-*O*-Methyl protosappanin B
SM4	3-去氧苏木酮 B 3-Deoxysappanone B	SM35	7-羟基-3-(4′-羟基)-4-色原酮 7-Hydroxy-3-(4′-hydroxybenzylidene)-chroman-4-one	SM66	4-*O* 甲基木素 4-*O*-Methylsappanol
SM5	没食子酸 Gallic acid	SM36	3-(3′,4′-二羟基)-7-羟基-4-色原酮 3-(3′, 4′-Dihydroxybenzyl)-7-hydroxychroma-4-one	SM67	巴西苏木素 Protosappanin B
SM6	7-羟基-3-(4′-羟基苯亚甲基)-色烷-4-酮 7-Hydroxy-3-(4′-hydroxybenzylidene)-chromaN-4-one	SM37	3,8,9-三羟基-6H-苯并[c]色烯-6-酮 3,8,9-Trihydroxy-6h-benzo[c]chromen-6-one	SM68	原苏木素 C Protosappanin C
SM7	苏木查尔酮 2′-Methoxy-3,4,4′-trihydroxychalcone	SM38	3,9-二羟基-8-甲氧基-二苯并[b,d]吡喃-6-酮 3,9-Dihydroxy-8-methoxy-dibenzo[b,d]pyran-6-one	SM69	苏朽木酚 Sappanin

天然产物研究与开发

续表 1(Continued Tab. 1)

编码 Encode	化合物 Compound	编码 Encode	化合物 Compound	编码 Encode	化合物 Compound
SM8	原苏木素 A Protosappanin A	SM39	7,4′-二甲氧基增异黄烷酮 7,4′-Dimethoxyhomoisoflavanone	SM70	巴西苏木素 Brazilin
SM9	苏木素 A 二甲缩醛 Protosappanin A dimethyl acetal	SM40	7,3′,5′-三羟基二氢黄酮 7,3′,5′-Trihydroxydihydroflavone	SM71	3′-去氧苏木醇 3′-Deoxysappanol
SM10	四乙酰基巴西灵 Tetraacetylbrazilin	SM41	5,7-二羟基-4′-甲氧基二氢异黄酮 5, 7-Dihydroxy-4′-methoxydihydroisoflavone	SM72	4-*O*-甲基表苏木醇 4-*O*-Methyl episappanol
SM11	3′-去氧苏木酮 B 3′-Deoxysappanone B	SM42	7,3′,4′-三羟基二氢异黄酮 7,3′,4′-Trihydroxydihydroisoflavone	SM73	原苏木素 Sappanol
SM12	槲皮素 Quercetin	SM43	7,3′,4′-三羟基二氢黄酮 7,3′,4′-Trihydroxydihydroflavone	SM74	表苏木醇 Episappanol
SM13	苏木查尔酮 Sappanchalcone	SM44	7,3′,4′-三羟基异黄酮 7,3′,4′-Trihydroxyisoflavone	SM75	异原苏木素 B Isoprotosappanin B
SM14	商陆素 Ombuin	SM45	(-)-Dalbergiphenol	SM76	10-*O*- Methylisoprotosappanin B
SM15	7-羟基-8-甲氧基-3-(4′-甲氧苯亚甲基)色烷-4-酮 7-Hydroxy-8-methoxy-3-(4′-methoxybenzylidene)chroman-4-one	SM46	(-)-Latifolin	SM77	氧化巴西苏木素 Brazilein
SM16	鼠李素 Rhamnetin	SM47	Neoprotosappanin	SM78	苏木精 Hematoxylin
SM17	3′-*O*-甲氧基巴西苏木素 3′-*O*-methoxybrazilin	SM48	(*S*)-7-(二羟甲基)-7,8-二氢-6H-二苯并[b,d]噁辛英-3,7,10,11-四醇 (*S*)-7-(Dihydroxymethyl)-7,8-dihydro-6H-dibenzo[b,d]oxocine-3,7,10,11-tetraol	SM79	4′-甲基巴西苏木素 4′-*O*-Methylbrazilin
SM18	8-羟基巴西苏木素 8-*O*-hydroxylbrazilin	SM49	3-去氧苏木查尔酮 3-Deoxysappanchalcone	SM80	4′-羟基巴西苏木素 4′-*O*-Hydroxylbrazilin
SM19	Brazilide A	SM50	2′-羟基-3,4,4′-三甲氧基查尔酮 2′-Hydroxy-3,4,4′-trimethoxychalcone	SM81	3,7,3′4′-四羟基黄烷酮 3,7,3′4′-Tetrahydroxy flavanone fustin
SM20	Brazilane	SM51	4,4′-二羟基-2′-甲氧基查尔酮 4,4′-Dihydroxy-2′-methoxychalcone	SM82	3,7-二羟基-色烷-4-酮 3, 7-Dihydroxy-chroman-4-one
SM21	Brazilide	SM52	(αR)-α,3,4,2′,4′-五羟基二氢查尔酮 (αR)-α,3,4,2′,4′-Pentahydroxydihydrochalcone	SM83	3,4,7-三羟基-3-(4′-羟基苯甲基)-色烷-4-酮 3, 4, 7-Trihydroxy-3-(4′-hydroxybenzyl)-chroman-4-one
SM22	苏木酮 A Sappanone A	SM53	(+)-南烛木树脂酚(+)-Lyoniresinol	SM84	3,7,3′,4′-四羟基-4-甲氧基高异黄烷醇 3,7,3′,4′-Tetrahydroxy-4-dimethoxy-homoisoflavans

天然产物研究与开发

续表 1(Continued Tab. 1)

编码 Encode	化合物 Compound	编码 Encode	化合物 Compound	编码 Encode	化合物 Compound
SM23	苏木酮 B Sappanone B	SM54	1,2-二(4-羟基-3-甲氧苯基)乙烯 1,2-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) ethylene	SM85	3′-*O*-Methylsappanol
SM24	鸢尾苷 Tectorigenin	SM55	紫铆花素 Butein	SM86	3′-*O*-甲基表苏木醇 3′-*O*-Methylepisappanol
SM25	8-Methoxybonducellin	SM56	Intricatinol	SM87	3′-去氧-4-甲氧基表苏木醇 3′-Deoxy-4-*O*-methylepisappanol
SM26	3,7-羟基-3-(3′,4′-羟基苯甲基)-苯并二氢-4-酮 3,7-Hydroxy-3-(3′,4′-hydroxybenzyl)-benzodihydro-4-one	SM57	(-)-丁香树脂酚(-)-Syringaresinol	SM88	(-)-5-*O*-Methyllatifolin
SM27	3′,4′,7-三羟基异黄烷酮 3′,4′,7-Trihydroxyisoflavanone	SM58	己二酸二甲酯 Dimethyl adipate	SM89	7,3′,4′-三羟基-3-苯甲基-2氢-色烯 7,3′,4′-Trihydroxy-3-benzyl-2h-chromene
SM28	(±)-7,3′,4′-三羟基黄烷酮 (±)-7,3′,4′-Trihydroxyflavanone	SM59	棕榈酸 Palmitic acid	SM90	3,2′,4′-三羟基-4-甲氧基查尔酮 3,2′,4′-Trihydroxyl-4-methoxychalcone
SM29	3′,4′,7-三羟基异黄酮 3′,4′,7-Trihydroxyisoflavone	SM60	芥子酸 Sinapic acid	SM91	2′,4′,3,4-四羟基-β-羟基查尔酮 2′,4′,3,4-Tetrahydroxy-β-hydroxychalcone
SM30	3,7-二羟基色原酮 3,7-Dihydroxy-chromen-4-one	SM61	大黄酚 Chrysophanol	SM92	云实品 J Caesalpin J
SM31	5,7-二羟基-4′-甲氧基异黄酮 5,7-Dihydroxy-4′-methoxyisoflavone	SM62	3′-去氧-4-甲氧基苏木醇 3′-Deoxy-4-*O*-methylsappanol	SM93	新云实苦素 A Neocaesalpin A

2.2　DPN 疾病相关靶点获取

通过 GeneCards、DrugBank、OMIM 数据库分别获得有关 DPN 疾病靶点为 1 283 个、12 个、475 个,合并筛选并去重后共得到 1 652 个与 DPN 疾病相关的靶点。将苏木作用靶点与 DPN 疾病靶点共同导入到 Venny 2.1.0 在线工具绘制韦恩图,最后获得的交集靶点有 109 个(见图 1)。

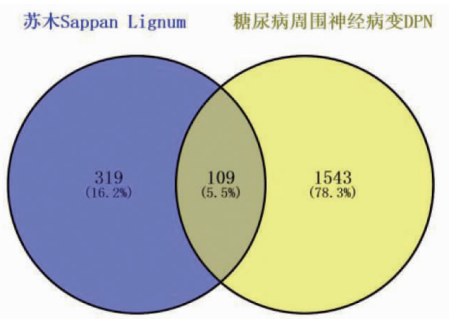

图 1　药物靶点和疾病靶点韦恩图

Fig. 1　Venn plot of drug targets and disease targets

2.3　"苏木-活性成分-靶点"网络构建和分析

运用 Cytoscape 3.8.2 对苏木的活性成分及其作用靶点的进行分析,共得到 522 个节点与 20 403 条关系(见图 2),并绘制出网络图。Degree 较高的化合物有鼠李素(rhamnetin)、巴西苏木素(brazilin)、氧化巴西苏木素(brazilein)、苏木查尔酮(sappanchalcone)、紫铆花素(butein)、槲皮素(quercetin)等。

天然产物研究与开发

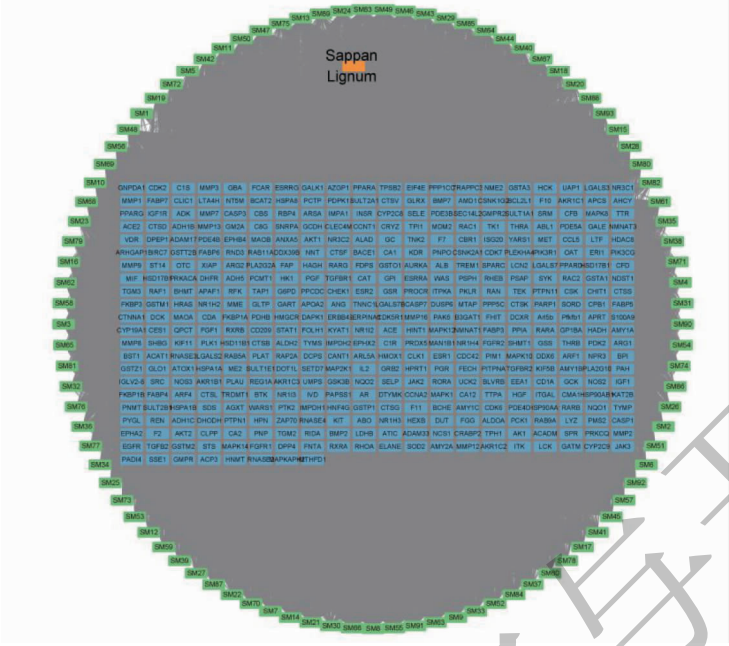

图 2 苏木-活性成分-靶点网络图

Fig. 2 Sappan Lignum-active components-targets network diagram

2.4 苏木治疗 DPN 的 PPI 网络构建

将苏木治疗 DPN 的 109 个作用靶点导入到 STRING 数据库,进行蛋白间作用分析后,将得到的结果保存为 TSV 文件,并将其导入 Cytocape 3.8.2 软件绘制 PPI 网络(见图 3)。隐藏游离靶点,最后图中共有 107 个节点,2 382 条边,PPI 的富集显著性 $P < 1.0e^{-16}$。其中,节点越大,颜色越深,该节点与其他节点的连接数量越多,表示该节点在整个网络中的 degree 越大,说明药物与其有较高的结合活性。CytoHubba 分析获得胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor-1,IGF1)、CASP3、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)、蛋白

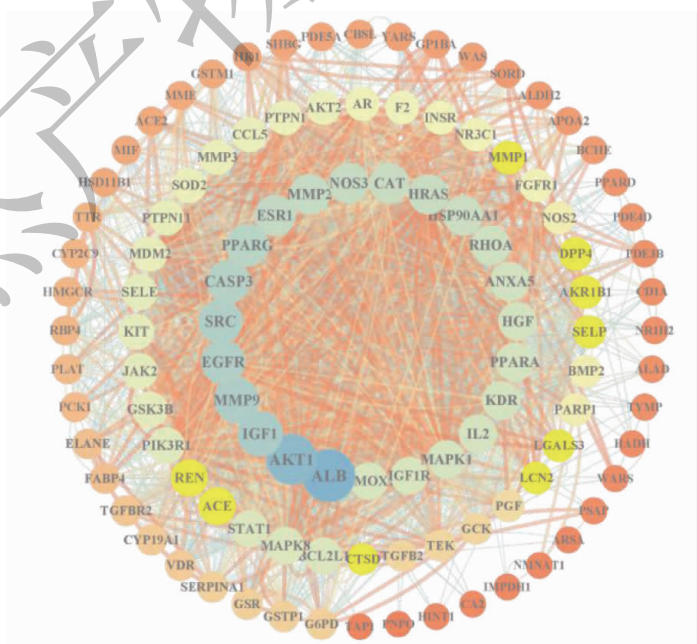

图 3 苏木治疗 DPN 的 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram of Sappan Lignum in treating DPN

天然产物研究与开发

激酶 B1(rac-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1)、血清白蛋白(albumin, ALB)、MMP-9、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src(proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, SRC)共 7 个核心靶点。MCODE 分析后获得了得分最高的两个模块,得分分别是 24.444 和 5.333,取最后交集得到雌激素受体 1(etrogen receptor alpha, ESR1)、IGF1、CASP3、过氧化物酶体增殖激活受体 γ(peroxisome proliferator activator receptor gamma, PPARG)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9、EGFR、AKT1、ALB、SRC、HSP90AA1、ANXA5、HRAS 共 13 个核心靶点(见图 4)。

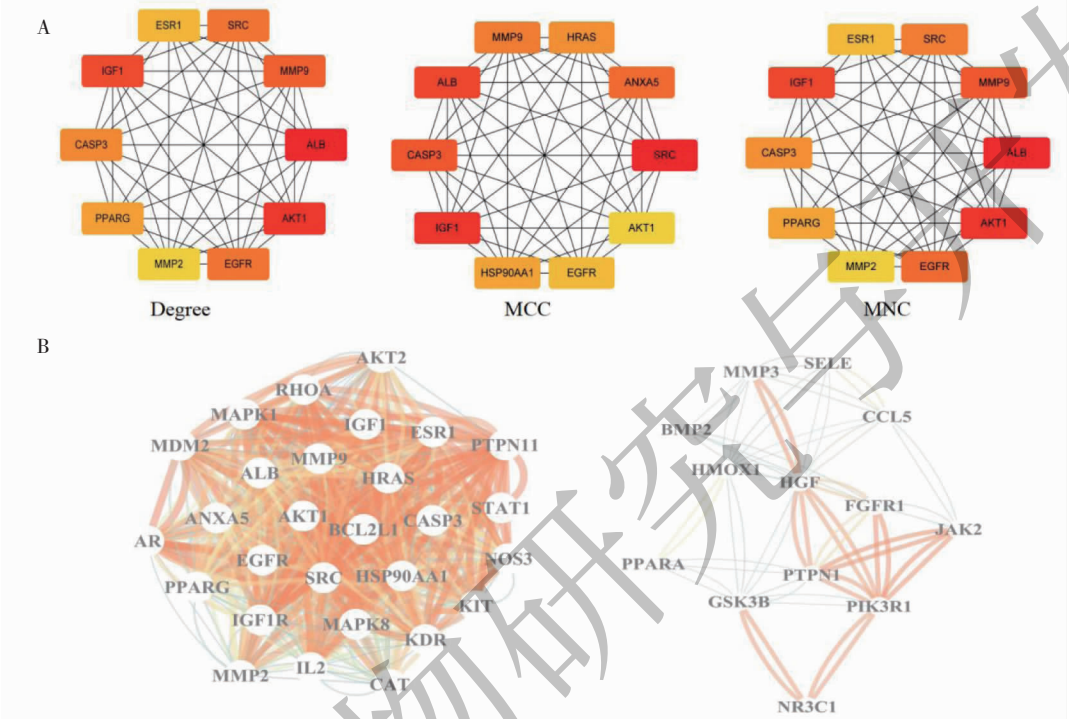

图 4　CytoHubba 和 MCODE 分析核心靶点

Fig. 4　CytoHubba and MCODE analysis of core targets

注:A 为 CytoHubba 按 Degree、MCC 和 MNC 对 PPI 网络进行分析,B 为 MCODE 分析 2 个最显著的模块,Degree 越大,节点越大,颜色越深。

Note: A is Cytohubba analysis of PPI network according to degree, MCC and MNC, and B is MCODE analysis of the two most significant modules. The higher the degree, the larger the node and the darker the color.

2.5　苏木治疗 DPN 通路富集分析可视化

利用 Metascape 平台对关键靶点进行富集分析,包括了 GO 的生物过程(biological process, BP))、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)以及 KEGG 通路,保存数据结果,按照 P 值由小到大的顺序选取排名前 20 的结果,将其导入微生信在线作图工具,对其进行可视化分析(见图 5、图 6)。GO 富集分析中主要包括细胞对激素刺激的反应、激酶活性的调节、细胞迁移的正向调节、蛋白质磷酸化的正调节、磷脂酰肌醇 3-激酶信号的正向调节、酶联受体蛋白信号通路、对氧水平的反应等生物过程;蛋白质同源二聚活性、跨膜受体蛋白激酶活性、核受体活性、氧化还原酶活性、胰岛素受体结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、血红素结合等分子功能;膜筏、膜微区、细胞外基质、胞质囊腔、分泌颗粒内腔等细胞组成。KEGG 富集分析主要包括磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway)、晚期糖基化终末产物及其受体信号通路(AGE-RAGE signaling pathway)、缺氧诱导因子 1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、肉瘤基因信号(RAS signaling pathway)等。

2.6　分子对接结果

将得的活性成分分别与靶点蛋白进行分子对接,对接最低结合能如表 2 所示。当有效化合物配体与蛋白受体对接结合自由能 < -5 kcal/mol 时,表明二者结合活性较好,结合自由能越低,二者的结合

天然产物研究与开发

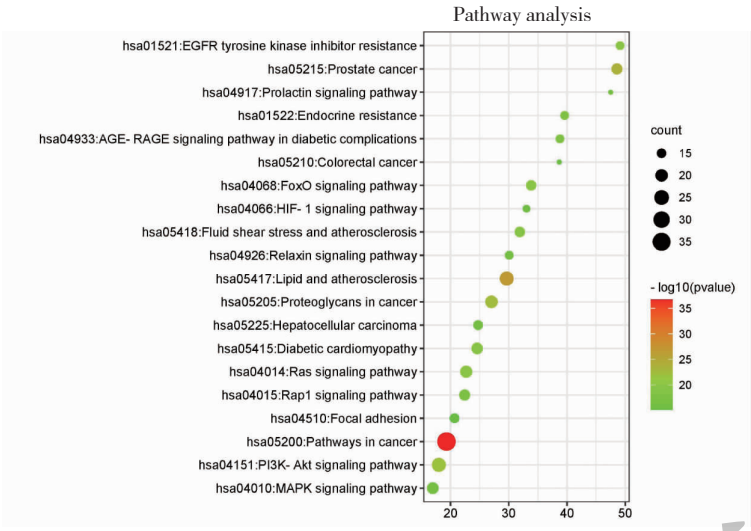

图 5　苏木治疗 DPN 作用靶点的 KEGG 富集分析

Fig. 5　KEGG pathway enrichment analysis of targets of Sappan Lignum for treating DPN

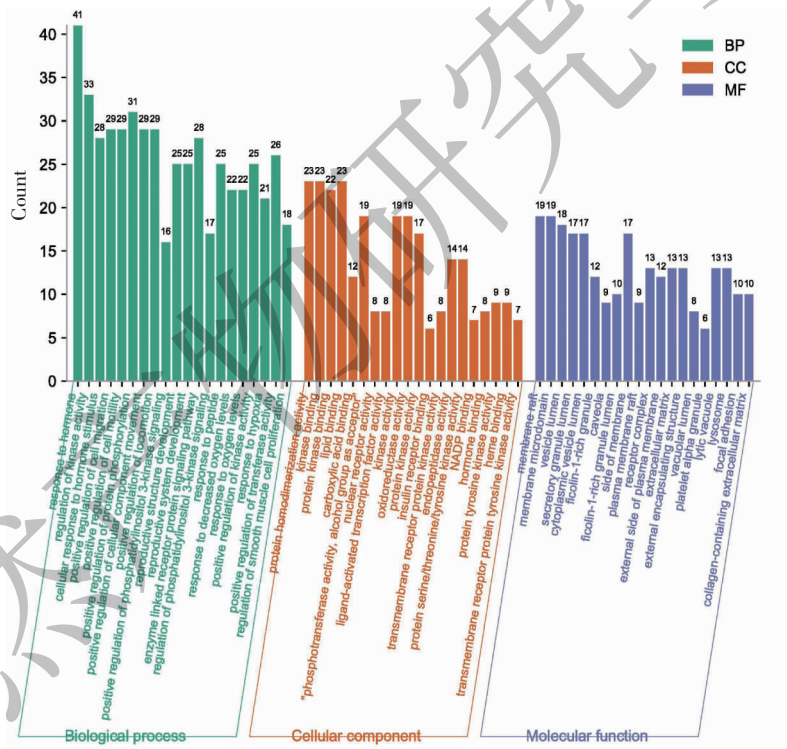

图 6　苏木治疗 DPN 作用靶点 GO 富集分析

Fig. 6　GO enrichment analysis of targets of Sappan Lignum for treating DPN

性能越好,结构越稳定。分子对接结果显示结合能均 < -5 kcal/mol,其中 CASP3 与槲皮素的结合自由能最低,形成的结构更稳定。将结合能力小的靶蛋白与活性分子进行三维可视化对接展示(见图 7),均具有较好的亲和力,可能为苏木治疗 DPN 的关键成分。

2.7　各组大鼠治疗后血清中 TNF-α、IL-6、SOD、MCP-1 含量的比较

与空白对照组比较,模型组大鼠血清 TNF-α、IL-6、MCP-1 含量升高,SOD 的含量明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,硫辛酸组、苏木组中大鼠血清TNF-α、IL-6、MCP-1含量明

天然产物研究与开发

表 2　关键活性成分-靶蛋白分子对接结果

Table 2　Molecular docking results of key active ingredient and target protein

化合物 Compound	结合能 Binding energy(kacl/mol)												
	ESR1	IGF1	CASP3	PPARG	MMP-2	MMP-9	EGFR	AKT1	ALB	SRC	HSP90AA1	ANXA5	HRAS
槲皮素 Quercetin	-6.54	-7.02	-8.2	-6.4	-7.41	-6.96	-6.57	-6.44	-5.91	-6.66	-6.25	-6.51	-6.41
氧化巴西苏木素 Brazilein	-6.24	-7.07	-6.84	-7.14	-7.46	-7.63	-6.58	-7.14	-7.14	-6.78	-6.31	-7	-6.68
巴西苏木素 Brazilin	-5.73	-7.15	-6.64	-7.46	-7.3	-7.23	-6.18	-7.53	-6.04	-6.7	-5.91	-6.77	-6.35
紫铆花素 Butein	-7.28	-6.58	-7.22	-7.14	-7.43	-7.4	-6.3	-6.25	-5.86	-6.72	-5.71	-7.15	-5.85
鼠李素 Rhamnetin	-6.01	-6.4	-6.2	-6.88	-6.91	-7.73	-5.59	-6.2	-6.34	-7.17	-5.82	-5.77	-6.14
苏木查尔酮 Sappanchalcone	-6.2	-6.23	-7.71	-6.81	-7.03	-7.6	-6.64	-5.69	-6.45	-6.66	-5.48	-6.63	-5.77

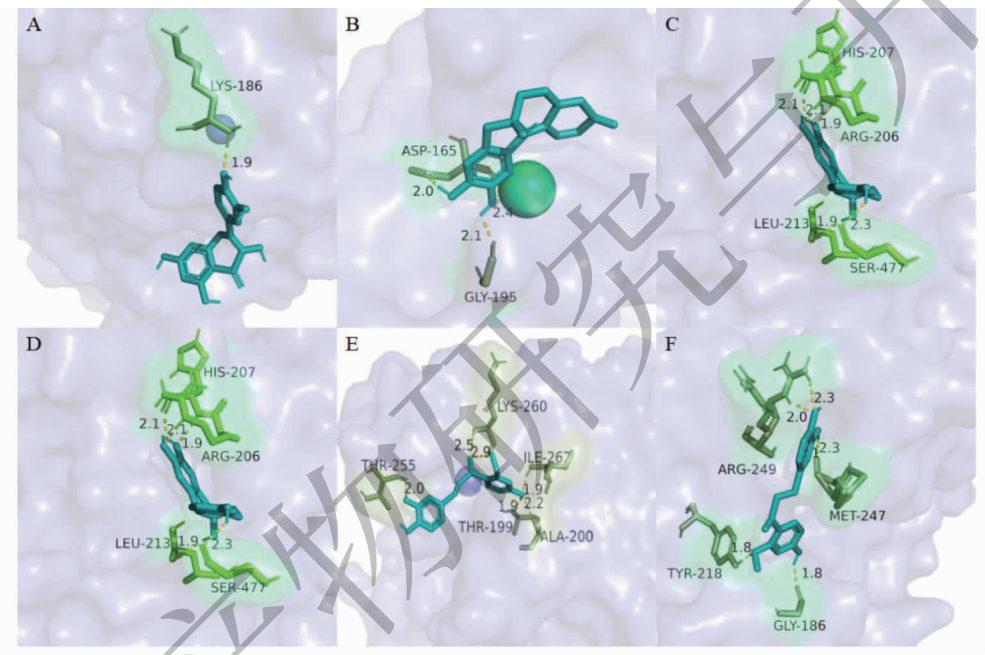

图 7　分子对接模式图

Fig. 7　Molecular docking pattern

注:A. 槲皮素-CASP3;B. 氧化巴西苏木素-MMP-9;C. 巴西苏木素-AKT1;D. 鼠李素-MMP-9;E. 苏木查尔酮-CASP3;F. 苏木查尔酮-MMP-9。

Note:A. Quercetin-CASP3;B. Brazilein-MMP-9;C. Brazilin-AKT1;D. Rhamnetin-MMP-9;E. Sappanchalcone-CASP3;F. Sappanchalcone-MMP-9.

显降低,而 SOD 含量则明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),但硫辛酸组和苏木组的大鼠血清 TNF-α 含量比较差异无统计学意义($P>0.05$),具体结果见表 3。

表 3　各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、SOD、MCP-1 含量的变化

Table 3　The content change of TNF-α, IL-6, SOD and MCP-1 in serum of rats in each group

组别 Group	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	SOD(U/mg)	MCP-1(ng/mg)
空白组 Control group	$127.76\pm15.20^{\#\#}$	63.11 ± 23.02	$77.95\pm8.49^{\#}$	$178.47\pm48.47^{\#\#}$
模型组 Model group	$180.45\pm20.42^{**}$	$90.72\pm14.94^{*}$	$63.15\pm7.79^{*}$	$294.53\pm41.20^{**}$
苏木组 Sappan Lignum group	$132.10\pm13.35^{\#\#}$	$68.95\pm9.19^{\#}$	$73.17\pm10.49^{\#}$	$196.70\pm80.08^{\#}$
硫辛酸组 Thioctic acid group	$135.52\pm23.22^{\#\#}$	$68.66\pm20.17^{\#}$	$75.41\pm10.80^{\#}$	$195.31\pm80.08^{\#}$

注:与空白组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与模型组比较,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$。

Note:Compared with control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; Compared with model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

天然产物研究与开发

3 讨论与结论

现代医学将 DPN 归属于中医消渴病痹证范畴，多认为其因消渴日久，耗气伤阴，病久入络，致瘀血阻滞经脉使其失养而发病。现代医家也多认为瘀血是 DPN 发生与发展的病理基础，贯穿糖尿病病程始终。有临床研究表明 DPN 患者明显存在血管内皮功能障碍，影响相应器官的血流供应，这一发现进一步证实了 DPN 与瘀血密切相关。而苏木有活血化瘀、消肿止痛的功效，现代药理学研究也发现苏木是一种抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、降血糖、抗微生物、抗病毒、抗肿瘤、促进血液流动的解痉活性的植物。因此，研究苏木对于 DPN 的治疗具有一定的意义。

通过本次网络药理学及分子对接研究，发现苏木中可能作用于 DPN 的活性成分主要包括鼠李素、巴西苏木素、氧化巴西苏木素、苏木查尔酮、紫铆花素、槲皮素等。鼠李素可通过调控 MAPK 通路和环氧合酶-2(COX2)通路而发挥抗炎作用，故其可能通过抗炎达到治疗 DPN 的效果。巴西苏木素可能通过 PI3K/Akt 和 ERK 通路诱导血红素氧合酶 1(HO-1)表达、抑制脂多糖诱导的巨噬细胞中 NO、PGE2 和 TNF-α 的产生而减轻炎症反应；还可能通过降低 PKC 的活性及调节肝脏中的糖异生和乙二醇的分解达到降糖的作用，且其对醛糖还原酶活性有抑制作用[7]，故其对于糖尿病及其并发症的治疗有一定意义。氧化巴西苏木素可降低白细胞介素-1 受体相关激酶 4(IRAK4)蛋白的表达使得 MAPK 信号和 IKKβ 的抑制，以及随后 NF-κB 和 COX2 的失活，从而促进巨噬细胞下游靶向促炎细胞因子如 IL-1β、MCP-1、MIP-2 和 IL-6 的表达，故其可能通过调节 IRAK4 活性减轻炎症反应从而改善 DPN。同时本次实验结果也显示硫辛酸组和苏木组对 TNF-α、IL-6、MCP-1 等具有抑制作用，且作用相似，证明苏木可通过减轻炎症反应对 DPN 有一定的治疗作用。苏木查尔酮通过诱导核因子-E2 相关因子 2(Nrf2)依赖性 HO-1 的表达及激活 p38MAPK 途径，增加对谷氨酸诱导的氧化损伤的细胞抗性，基于其抗氧化作用，其可能作为治疗 DPN 的化合物。紫铆花素可以通过 PI3K/Akt 途径上调 Nrf2/ARE 介导的 HO-1 表达及通过体外抑制醛糖还原酶活性以及在体内组织中抑制山梨糖醇的积累而参与神经保护作用[8]。槲皮素可通过激活 Nrf2/HO-1 通路，清除 ROS，抑制 NF-κB 激活，减少背根神经节神经元凋亡[9]；还能通过抑制 mTOR/p70S6K 通路来降低突触可塑性或减少背根神经节卫星胶质细胞中 $P2X_4$ 受体的上调，从而抑制 $P2X_4$ 受体介导的 p38MAPK 激活[10]来减轻糖尿病性神经病理性疼痛从而减轻 DPN 症状。其中机体内因有害刺激产生的过量 ROS 可被 SOD 清除，以此减轻氧自由基对细胞造成的损害，同时修复受损细胞，从而起到抗氧化的作用，而本次实验结果也显示苏木可以提升 SOD 的含量，其治疗作用与硫辛酸相当，故苏木可能具有抗氧化作用。这些活性成分都能够通过自身或协同作用，延缓 DPN 进程，起到治疗 DPN 的目的。

通过进行核心靶点的筛选，得到 13 个核心靶点，而目前研究多集中在 ESR1、IGF1、CASP3、PPARG、MMP-2、MMP-9、EGFR、AKT1、ALB、SRC 靶点，苏木可能是通过调控这些关键靶点来发挥保护周围神经的作用，通过分子对接也验证了这一点。其他靶点如 HSP90AA1、ANXA5、HRAS 等与活性成分的相关性较高，但目前的研究并未提及，可为此提供新的研究方向。雌激素受体(ESR1)通过保护线粒体功能和抑制内质网应激保护胰岛β细胞免于凋亡，还可通过调节 *SLC2A4* 基因的表达、激活 Nrf2、抑制活性氧的产生，增加胰岛素的敏感性[11]，故其可能过调节胰岛细胞进而影响糖代谢达到治疗 DPN 的效果。*IGF-1* 基因表达在糖尿病的坐骨神经组织中下调，其通过激活 Akt，刺激 AMPK 通路提高神经元线粒体功能，或促进雪旺细胞增殖和迁移及髓鞘再生或控制解偶联蛋白 3 的表达调节 MMP 来保护高血糖诱导的氧化应激和神经元损伤；有研究提出提高 IGF-1 的水平可能被证明是治疗糖尿病性周围神经病变的一种非常有效的治疗方法[12]。CASP3 可逆转神经病理性疼痛，研究发现靶向 CASP3 的治疗可通过减少凋亡途径防止神经细胞的损伤。PPARG 可通过减少 NF-κB 的激活对神经病理性疼痛产生有益作用，其可通过激活 PPARG-AMPK-ACC/PGC-1a-eNOS-NO 通路[13]来改善神经和内皮损伤并最终改善 DPN。MMPs 是在神经系统的结构发育和维持中起重要作用的蛋白水解酶家族，研究发现 MMP-9 在髓鞘形成期间升高，表明其在髓鞘形成中的有益作用；也有一些报道说升高的 MMP-9 参与神经炎症、髓鞘异常及中枢脊髓敏化，通过抑制 MMP-9 活性和增加 MMP-2 活性可显著抑制糖尿病神经病理性疼痛[14]。研究发现 EGFR 家族成员 Erb B2 的激活增强可导致 DPN 的发展。

天然产物研究与开发

AKT1 通过介导胰岛素诱导的 SLC2A4/GLUT4 葡萄糖转运蛋白向细胞表面的移位或丝氨酸磷酸化和糖原合酶激酶-3 的失活、增加胰岛细胞中 Akt 的表达进而减少胰岛细胞凋亡,通过调控血糖延缓 DPN 的发生发展;研究还发现 Akt/mTOR 通路的下调介导脑源性神经营养因子降低,可使周围神经的再生能力下降[15]。ALB 可能发挥抗氧化和抗炎作用,低血清白蛋白引起的炎症和氧化应激增加可能是血清白蛋白与 DPN 相关的主要机制。SRC 通过增强靶向介导的 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体,抑制了炎症反应和神经性疼痛,还可加强 TRPV1 通道的磷酸化使感觉神经元敏化,故其可能成为管理 DPN 感觉异常提供潜在的治疗靶点。以上的核心靶点在 DPN 的治疗中均发挥着重要的作用。

本研究通过 KEGG 通路富集结果显示,苏木治疗 DPN 主要涉及以下几个信号通路:PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、HIF-1 信号通路、RAS 信号通路等。PI3K-Akt 信号通路:在细胞增殖、细胞周期控制、代谢、分化和凋亡中起着关键作用,其通过抑制 Bax/Bcl-2 和 CASP3 的表达,从而减少神经元凋亡、促进神经元存活,并参与神经系统中神经营养蛋白逆行轴突运输的调节[16];该通路抑制介导高糖诱导的 DNA 甲基转移酶 1 和 DNA 甲基转移酶 3a 过表达,通过硫氧还蛋白相互作用蛋白上调导致 DPN 中雪旺细胞的细胞自噬抑制和凋亡[17];研究还发现在 DPN 动物模型中,该通路被抑制后,神经形成相关因子的表达下调[18]。Chen 等[19]还提出激活 PI3K/Akt 通路有望治疗 DPN,因为它能够控制慢性疼痛。因此,激活 PI3K/Akt 信号通路对 DPN 的治疗有一定的效果。MAPK 信号通路:在持续激活在细胞增殖、促凋亡蛋白表达和 ROS 产生的调节中起重要作用。MAPK 的磷酸化,产生一系列胞内外信号转导,如 p38MAPK、ERK 和 JNK,在 STZ 诱导的糖尿病大鼠实验中发现背根神经节神经元中 ERK、p38MAPK 和 JNK 均上调[20]。其中,ERK 或 p38MAPK 还通过其下游激酶 MNK1/2 向 elF4E 发出信号,参与了疼痛过敏的产生,尤其 ERK 是控制病理性疼痛的主要信号靶点,另外,MAPK 抑制剂作为疼痛治疗剂也已被广泛研究;Lai 等[21]提出可通过调节 Bcl-2 家族蛋白、JNK 应激及氧化应激反应介导的 p38MAPK 的激活来改善凋亡级联反应,从而达到保护神经的作用。因此,可以通过干预 MAPK 信号通路改善 DPN 的发生。AGE-RAGE 信号通路:研究发现 AGEs 和与其受体(RAGE)结合快速激活 NADPH 氧化酶,增加线粒体氧化应激水平或通过上调 NF-κB 及激活 p38MAPk 的表达调节炎症和凋亡反应。因此,通过调控该通路对 DPN 的防治有一定效果。HIF-1 信号通路:通过抑制 ROS 水平和诱导 VEGF 的表达,在抑制高糖诱导的神经损伤中发挥保护作用。因此,可能通过激活该通路防御氧化应激的发生来改善 DPN。RAS 信号通路(RAS signaling pathway):研究发现下调 Ras 表达,可抑制下游 Raf-1、ERK 的磷酸化,减少致炎因子产生,改善糖代谢;还有研究发现该通路负责调节轴突生长所需的基因表达,在细胞损伤后的神经元存活中也起了作用。

本次实验研究探寻了苏木对 DPN 大鼠的 TNF-α、IL-6、SOD、MCP-1 水平的影响,结果显示苏木提取物可以降低血清 TNF-α、IL-6、MCP-1 的含量,可以提升血清 SOD 的含量,其治疗作用与硫辛酸相当。

综上所述,本次研究通过网络药理学、分子对接及实验验证对苏木治疗 DPN 的作用机制进行了初步的探索,结果显示,苏木可以通过多成分、多靶点、多通路的途径来治疗 DPN,为苏木治疗 DPN 的临床应用提供了新的思路,也为进一步的研究提供了新的方向。

参考文献

1 Vinik AI. Diabetic sensory and motor neuropathy[J]. N Engl J Med,2016,374:1797.

2 Kang X,Jin D,Zhang Y,et al. Systematic elucidation of the mechanism of in the treatment of diabetic peripheral neuropathy based on network pharmacology[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2021,2021:5528018.

3 Wang H. Study on anti-atherosclerosis mechanism of ethyl acetate extract from sappan based on TLR4/NF-κB signal pathway[D]. Harbin: Heilongjiang University Of Chinese Medicine(黑龙江中医药大学),2017.

4 Yang JF,Wei L,Zhang JY. Effect of ethyl acetate extract of sappan wood on blood lipid and MMP-9 in atherosclerotic model rats[J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息),2017,34:14-16.

5 Liu YZ,Xia ZC,Wen YT,et al. Effect of Caesalpinia Sappan on the serum GSH and IL-6 levels in rats with diabetic macroangiopathy[J]. Jilin J Chin Med(吉林中医药),2019,39:1221-1224.

6 Liu YZ,Wen YT,Yan BX,et al. Effect of Caesalpinia Sappan

天然产物研究与开发

on the serum SOD, TNF-α, MCP-1 levels in rats with diabetic macroangiopathy[J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展),2018,18:2637-2640.

7 Moon CK, Yun YP, Lee JH, et al. Inhibition of lens-aldose reductase activity by brazilin and haematoxylin[J]. Planta Med,1985,1:66-67.

8 Lim SS, Jung SH, Ji J, Shin KH, et al. Synthesis of flavonoids and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues[J]. J Pharm Pharmacol,2001,53:653-668.

9 Shi Y, Liang XC, Sun Q, et al. Combination of quercetin, cinnamaldehyde and hirudin protects rat dorsal root ganglion neurons against high glucose-induced injury through Nrf-2/HO-1 activation and NF-κB inhibition[J]. Chin J Integr Med,2017,23:663-671.

10 Yang R, Li L, Yuan H, et al. Quercetin relieved diabetic neuropathic pain by inhibiting upregulated P2X4 receptor in dorsal root ganglia[J]. J Cell Physiol,2019,234:2756-2764.

11 Gregorio KCR, Laurindo CP, Machado UF. Estrogen and glycemic homeostasis: the fundamental role of nuclear estrogen receptors ESR1/ESR2 in glucose transporter GLUT4 regulation[J]. Cells,2021,10:99.

12 Chu Q, Moreland R, Yew NS, et al. Systemic Insulin-like growth factor-1 reverses hypoalgesia and improves mobility in a mouse model of diabetic peripheral neuropathy[J]. Mol Ther,2008,16:1400-1408.

13 Cho YR, Lim JH, Kim MY, et al. Therapeutic effects of fenofibrate on diabetic peripheral neuropathy by improving endothelial and neural survival in db/db mice[J]. PLoS one, 2014,9:e83204.

14 Deng X, Ma P, Wu M, et al. Role of matrix metalloproteinases in myelin abnormalities and mechanical allodynia in rodents with diabetic neuropathy[J]. Aging Dis, 2021, 12: 1808-1820.

15 Song YX, Role of Notch1 modulating PTEN/Akt/mTOR signaling pathway in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy[D]. Jining: Jining Medical University(济宁医学院),2020.

16 Yan T, Zhang Z, Li D. NGF receptors and PI3K/AKT pathway involved in glucose fluctuation-induced damage to neurons and α-lipoic acid treatment[J]. BMC Neurosci, 2020, 21:38.

17 Zhang X, Zhao S, Yuan Q, et al. TXNIP, a novel key factor to cause Schwann cell dysfunction in diabetic peripheral neuropathy, under the regulation of PI3K/Akt pathway inhibition-induced DNMT1 and DNMT3a overexpression[J]. Cell Death Dis,2021,12:642.

18 Wang W, Hao Y, Li F. Notoginsenoside R1 alleviates high glucose-evoked damage in RSC96 cells through down-regulation of miR-503[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol,2019, 47:3947-3954.

19 Chen S, Zhou Y, Liu D, et al. PI3K/Akt pathway: a potential therapeutic target for chronic pain[J]. Curr Pharm Des, 2017,23:1860-1868.

20 Dewanjee S, Das S, Das AK, et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets[J]. Eur J Pharmacol,2018,833:472-523.

21 Lai MC, Liu WY, Liou SS, et al. The protective effects of moscatilin against methylglyoxal-induced neurotoxicity via the regulation of p38/JNK MAPK pathways in PC12 neuron-like cells[J]. Food Chem Toxicol,2020,140:111369.

天然产物研究与开发