

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.15.013

2 型糖尿病阴虚证病证结合分子网络模型的构建与初证

郭航¹, 战丽彬^{2✉}, 孙晓霞¹, 陈宁¹, 翁泽斌¹

1. 南京中医药大学中医学院/中西医结合学院, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023; 2. 辽宁中医药大学

[摘要] **目的** 运用网络生物学方法构建 2 型糖尿病 (T2DM) 阴虚证病证结合分子网络, 探究其生物学基础, 并进行实验验证。**方法** 整合 DisGeNET、DrugBank、TTD、MalaCards、OMIM、CTD、GEO 数据库信息, 获得 T2DM 疾病相关基因。运用社团发现算法将 STRING 数据库中的 PPI 网络划分为拓扑模块, 将疾病相关基因映射至模块中获得 T2DM 疾病模块。将从 SymMap、HPO、GeneCards 数据库获取的阴虚证症状对应基因映射至疾病模块, 从而筛选出 T2DM 阴虚证病证结合模块。再通过对 T2DM 西药对应靶点与模块靶点对应关系, 以及滋阴方剂靶点与病证结合模块的相关性分析, 验证结果的可靠性。借助 Metascape 平台对分子网络进行 GO 和 KEGG 富集分析。最后采用温热伤阴法构建病证结合小鼠模型, 分为正常对照组、单纯阴虚证组、2 型糖尿病组、2 型糖尿病阴虚证组, 取血清和下丘脑组织对预测的关键靶点进行验证。**结果** 筛选出 1514 个 T2DM 疾病相关基因以及 1547 个 T2DM 阴虚证相关基因, 确定了 19 个与 T2DM 密切相关的疾病模块, 并将其中的 7 个与阴虚证相关的模块定义为 T2DM 阴虚证病证结合模块。经过西药靶点、滋阴方剂的验证, 最终确立 T2DM 阴虚证病证结合核心模块 Mem3、5、39。富集分析揭示生物学基础可能涉及糖脂代谢紊乱、免疫炎症、内分泌紊乱等诸多病理过程。对 Mem5 及 Mem39 的核心靶点白细胞介素 6 (IL-6) 及鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 q 多肽 (GNAQ) 介导通路相关蛋白即异源三聚体鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 (Gq)、磷脂酶 C β 1 (PLC β 1)、磷脂酶 C β 3 (PLC β 3) 蛋白进行验证, 结果提示 2 型糖尿病阴虚证组小鼠血清中 IL-6 水平及下丘脑 Gq、PLC β 1 蛋白表达显著高于正常对照组和 2 型糖尿病组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** G 蛋白信号转导系统、糖脂代谢、免疫功能、炎症反应、内分泌紊乱等是 2 型糖尿病阴虚证核心生物学过程。

[关键词] 2 型糖尿病; 阴虚证; 网络生物学; 病证结合模块

国际糖尿病联盟发布的第 10 版全球糖尿病地图显示, 2021 年全球糖尿病患者人数约 5.37 亿, 到 2045 年患病人数预计增长 46%, 且在临床中, 2 型糖尿病 (T2DM) 患病比例最高^[1]。T2DM 在中医学中归属于“消渴”“脾瘅”“消瘅”等范畴, 中华医学会糖尿病分会发布的《中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 版)》中明确了中医药在降糖、缓解症状、延缓并发症中的重要作用^[2]。临床中以辨证为主、注重症状改善的中医治疗, 较以调节血糖

为主的现代医学疗法有明显优势^[3]。阴虚证是 T2DM 的基础证型之一^[4], 有研究运用因子分析法对 2501 例 T2DM 患者证候要素进行分析, 发现核心病性证素为阴虚, 病位涉及肝、脾、肾, 符合中医学对消渴“阴虚为本, 燥热为标”的病机学认识^[5]。然而, 对于阴虚证的科学内涵, 以及证候与西医疾病之间复杂效应的研究, 尚需要多学科介入寻找新的研究方法。

2004 年 Barabási 等^[6]提出“网络生物学”的概念, 其可揭示更加全面的疾病表型影响因素, 可对疾病状态中至关重要的生物分子相互作用的网络及相关子网络进行描述。“网络药理学”一词在 2007 年由 Hopkins 提出, 被誉为药物发现的下一个

基金项目:国家重点研发计划 (2018YFC1704400); 国家中医药管理局 2021 年岐黄学者支持项目; 江苏省研究生科研创新计划 (KY-CX21_1642)

✉ 通讯作者: zlbilin2021@163.com

范式^[7-8]。李梢等^[9-10]率先报道了中医寒热证的生物分子网络差异及基于生物网络调控的方剂研究模式,并提出以表型组合为基础构建“证候生物分子网络标志”,开辟了利用网络生物学研究中医证候生物学基础的研究模式。本研究运用网络生物学方法,构建T2DM阴虚证病证结合分子网络,探究其生物学基础,报告如下。

1 材料和方法

1.1 T2DM 疾病相关基因预测

在 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、MalaCards (<https://www.malacards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、CTD (<https://ctdbase.org/>) 数据库以“Type 2 diabetes mellitus”OR “Type 2 diabetes”为检索词,整理获得T2DM疾病靶点。其中CTD数据库筛选标准为推理分数(Inference Score) > 50。同时,借助 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据库,分别下载编号为 GSE20966、GSE25724、GSE29221 的数据芯片文件,获取差异基因作为疾病靶点。其中,GSE20966 芯片为 10 例 T2DM 和 10 例无糖尿病受试者的胰腺组织中胰岛 β 细胞基因表达谱,GSE25724 芯片为 7 例 T2DM 和 6 例无糖尿病者的胰腺基因表达谱,GSE29221 芯片为 3 例 T2DM 男性患者和 3 例非糖尿病男性患者骨骼肌活检样本的差异基因。借助 R 3.6.1 软件,用 R 包 GEOquery 获取基因芯片数据,用 limma 包计算出差异基因,将数据进行均一化处理,取差异基因中 logFC 绝对值 ≥ 1.5 且 $P < 0.05$ 者作为疾病靶点。整合上述靶点,利用 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库,设定属性为“人(Homo sapiens)”,将靶点转化为基因官方名称并剔除重复项。

1.2 T2DM 疾病模块划分

真实世界的复杂网络往往存在着社团结构,每个社团由节点组成,社团内部节点连接紧密,外部连接较为稀疏,社团发现对生物医学网络的拓扑分析和功能预测具有重要意义^[11]。首先从 STRING V11.0 (<https://string-db.org/>) 数据库中下载人类全基因 PPI 网络,过滤出高质量的蛋白-蛋白关联信息(边权重 ≥ 900),共 12 248 个节点及 319 613 条边。随后采用经典的社团发现算法——标签传播算法(LPA)将 PPI 网络进行划分,获得拓扑模块。该算法具有线性时间复杂度,能够快速收敛,适用

于大规模网络^[12-13]。通过将T2DM疾病基因映射到不同的模块中,计算基因在模块中的分布情况(超几何分布),将疾病基因显著富集的模块视为T2DM疾病模块(Fisher精确检验, $P < 0.05$)。以上步骤由 R 3.6.1 软件实现。

1.3 阴虚证证候靶点获取及病证结合模块的确立

以合作课题组制定的“糖尿病阴虚证辨证标准量表”^[14]、“阴虚证普适性辨证标准量表”为参考,制定T2DM阴虚证症状(含体征、舌脉)条目。糖尿病阴虚证辨证标准量表根据《中医临床常见症状术语规范》^[15]、《中医诊断学》^[16]构建,而阴虚证普适性辨证标准量表根据《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[17]构建。根据《中医基本名词术语中英对照国际标准》^[18]以及 SinoMed (<http://www.sinomed.ac.cn/index.jsp>) 数据库中“中文医学主题词表”的“症状”和“疾病”术语,获取 14 个阴虚证症状对应的英文检索词。将相关检索词分别输入 SymMap (<https://www.symmap.org/>)、HPO (<https://hpo.jax.org/app/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库,获取症状对应靶点,去重后取并集作为证候相关靶点。GeneCards 数据库筛选条件为相关性评分(Relevance score) > 10。通过将阴虚证症状相关靶点映射到潜在T2DM疾病模块中,并计算证候相关靶点和潜在疾病模块之间的超几何分布(Fisher精确检验),选取证候靶点富集程度高的疾病模块($P < 0.05$)作为T2DM阴虚证病证结合模块。

1.4 病证结合网络模块的可靠性验证

1.4.1 治疗T2DM西药对模块的验证 检索 DrugBank 数据库中收录的上市西药,包括小分子药物和生物技术药物,记录西药-靶点关系。由于西药主要针对疾病单一靶点,若西药对应靶点在病证结合模块中出现,则可说明该模块与T2DM发病关联密切,从而佐证该模块的可靠性。

1.4.2 基于网络的病证结合模块基因-方剂靶点的相关性评价 选取文献报道及指南中对T2DM具有治疗作用的四首滋阴方剂:1)胃热阴虚—玉女煎^[19](生石膏、熟地黄、麦冬、知母、牛膝);2)脾阴虚—滋补脾阴方药^[20](红参、山药、茯神、白芍、丹参、白扁豆、莲子、石菖蒲、远志、檀香、橘红、炙甘草);3)肝阴虚—一贯煎(北沙参、麦冬、当归、生地黄、枸杞子、川楝子)^[21];4)肾阴虚—六味地黄丸(熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、泽泻、牡丹皮)^[22]。利用 TCMSP (

tcmspw.com/tcmsp.php) 数据库检索各方剂中的药物, 获得复方的化学成分信息。同时, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 及药物相似性 (DL) ≥ 0.18 为过滤条件, 筛选出中药复方的活性成分及其对应靶点。对于 TCMSp 数据库未收录的药物, 在 TCMID (<http://119.3.41.228:8000/tcmid/>) 数据库收集其化学成分, 通过 SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) 平台进行药代动力学参数 (ADME) 筛选, 指标为胃肠道吸收 (GI absorption) 为 High 且类药性 (Druglikeness) 中至少有 2 项为 YES。将筛选得到的化合物分别输入 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库获得化合物的简化分子线性输入规范 (SMILES 表达式), 再将 SMILE 式输入到 Swiss Target Prediction 平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 限定物种为人 (Homo sapiens), 筛选出可能性 >0.8 的靶点, 整合上述预测出的靶点。

参照文献 [23]: 首先利用 R 3.6.1 执行重启随机游走算法 (RWR), 计算方剂靶标与病证结合模块中的基因这两组种子节点对上述 STRING 背景网络中所有节点影响力的得分向量; 随后计算得分向量间的皮尔逊相关系数, 记为 Cor; 最后计算 Z-score 值, 以此评价相关性的显著性, 其公式 [23] 如下:

$$Z\text{-score} = \frac{Cor - E(Cor)}{\delta(Cor)}$$

其中 $E(Cor)$ 和 $\delta(Cor)$ 表示方剂靶点影响得分向量与 100 次随机对照基因影响得分向量之间相关系数的平均值和标准差, 每次随机选择的基因数量与病证结合模块节点数量相等。

1.5 病证结合模块基因的功能分析和通路分析

利用 R 3.6.1 软件运行网页排名 (PageRank) 算法, 通过 PageRank 值对分子网络中的基因进行重要性评价。通过 Metascape (<https://metascape.org/>) 软件对基因集进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析 ($P < 0.01$), 并将结果可视化, 进而分析 T2DM 阴虚证的生物学基础。

2 结果

2.1 T2DM 疾病相关基因预测结果

通过 DisGeNET、DrugBank、TTD、MalaCards、OMIM、CTD、GEO 数据库分别获得 T2DM 相关疾病基因 18、127、68、496、512、522、449 个, 汇总去重后, 经 UniProt 数据库矫正后共得到 1514 个

基因。

2.2 T2DM 疾病模块划分结果

将疾病相关靶点映射至 STRING 数据库的 PPI 网络后, 有 1318 个疾病靶点落在节点数为 12 248 的 PPI 网络中。社团发现算法共划分出 373 个模块, 其中包含 T2DM 相关疾病靶点的模块共 137 个, 包含蛋白 11 214 个。故疾病相关基因在潜在的 137 个疾病模块中出现的平均比例为 11.75% (1318/11 214)。借助 Xu 等 [24] 在疾病社团划分中引入的相对危险度 (RR) 的概念, 即暴露组累积发病率/对照组累积发病率 >1.5 则说明暴露因素与疾病有中等或中等以上关联, 取疾病基因数/所在模块基因数 $>$ 平均比例 1.5 倍 ($>17.63\%$) 且疾病靶点显著富集 ($P < 0.05$) 的模块。最终获取 T2DM 相关的疾病模块 19 个, 编号为 Mem 3、5、7、9、14、18、23、39、56、104、107、116、139、146、151、214、261、281、317。

2.3 T2DM 阴虚证模块划分结果

在 SymMap、HPO、GeneCards 数据库中检索到与 14 个症状 (包括体征、舌脉) 相对应的 1547 个基因 (见表 1)。其中, 有 1275 个基因被映射到上述 137 个包含疾病基因的模块中。通过计算症状相关基因在 19 个 T2DM 疾病模块中的富集情况, 筛选得到 7 个疾病模块 (Mem 3、5、7、39、139、146、317), 该模块中阴虚证症状潜在基因显著富集 ($P < 0.05$), 故将其定义为 T2DM 阴虚证病证结合模块。

2.4 病证结合模块的初证结果

2.4.1 T2DM 西药-靶点关系 通过 DrugBank 数据库, 共获得生物技术药物 19 个, 小分子药物 38 个, 对应治疗靶点 61 个。将其映射至病证结合模块中, 有 4 个模块出现西药治疗靶点。Mem3 包含靶点 CYP11B1, 对应西药为左酮康唑; Mem5 包含靶点 IGFBP7、IGFBP3 对应药物分别为胰岛素、美卡舍明; Mem7 包含靶点 CYP51A1, 对应药物为左酮康唑; Mem39 涵盖靶点 GCGR、AGTR1, 对应药物为胰高血糖素、坎地沙坦酯、依普罗沙坦、厄贝沙坦、替米沙坦、氯沙坦。其余模块未见西药靶点。由于西药靶点明确且较单一, 模块中若包含治疗 T2DM 的靶点可从现代药理学角度证明相关模块与 T2DM 阴虚证有一定的关联性。

2.4.2 基于网络的病证结合模块基因-方剂靶点的相关性评价 在数据库中收集并预测出四首治疗 T2DM 阴虚证不同方剂的潜在作用靶点, 靶点数目分别为: 玉女煎 285 个、滋补脾阴方药 267 个、一

表 1 2 型糖尿病阴虚证中医症状及对应检索词

症状	SymMap 数据库检索词	英文数据库检索词	基因数量
五心烦热	五心烦热	Vexing heat in chest, palms and soles/ Dysphoria & smothery sensation	204
盗汗	盗汗	Night Sweat	61
口干咽燥	口干	Thirst/ Xerostomia	105
两目干涩	目涩	Xerophthalmia/ Dry eyes	278
形体消瘦或渐瘦	形体消瘦	Emaciation/ Weight loss	718
渴喜冷饮	口渴	Thirst/ Xerostomia	94
大便偏干	大便干	Dry stool/ Constipation	346
怕热	畏热	Aversion to heat/ Heat intolerance	54
皮肤干痒	皮肤干燥/皮肤瘙痒	Pruritus/ Sjogren syndrome	395
心烦	心烦	Dysphoria/ Anxiety	341
午后潮热	午后潮热	Afternoon tidal fever/Hot flashes	11
少寐	不寐	Insomnia	43
舌红少苔/少津	舌红/舌干/舌质红少苔	Red tongue/ Tongue without fur	146
脉细数	脉细数	Thready pulse/ Rapid pulse	14

贯煎 255 个、六味地黄丸 273 个，四首方剂的靶点共计 382 个。疾病基因、证候相关基因及药物靶点在模块中分布情况见表 2。可见，Mem3、5、7、39、139、146 中均分布滋阴方剂靶点，从方证相应角度初步证明模块与 T2DM 阴虚证密切相关。研究表明，在人类基因背景网络中，疾病基因之间往往处于临近位置或聚集为疾病模块^[25]。故药物作用靶点也位于分子网络中疾病模块内或模块周围。因此，通过计算 PPI 网络中病证结合模块基因与方剂靶点的相关性，可判断二者在网络中的相对位置，继而从方证相应的角度验证模块的可信度。以同时涵盖西药、方剂靶点的 Mem3、5、7、39 为研究对象进行分析，结果如表 3 所示，除 Mem7 外，其余 T2DM 阴虚证模块基因相关基因与 4 首滋阴方剂靶点呈正相关，且大部分相关性显著（以 $Z\text{-score}>3$ 为显著相关^[23]），表明通过以方测证，从分子网络水平上证明模块与阴虚证关系密切。

2. 5 病证结合模块基因的功能分析和通路分析结果

2. 5. 1 病证结合模块核心模块关键靶点 将与滋

表 3 2 型糖尿病阴虚证模块基因与中药方剂相关性的 Z-score 值

模块编号	六味地黄丸	滋补脾阴方药	一贯煎	玉女煎
Mem3	14. 98	15. 85	14. 2	15. 65
Mem 5	3. 03	0. 89	3. 44	2. 16
Mem 7	-0. 55	-1. 02	-1. 18	0. 49
Mem 39	4. 45	7. 39	6. 68	4. 54

注：Z-score>3 表示显著相关。

阴方剂显著相关，同时包含西药靶点的模块进行重点分析，即 Mem3、5、39，将其定义为 T2DM 阴虚证核心模块。Mem3 由 79 个节点，421 条边构成；Mem5 由 306 个节点，6164 条边构成；Mem39 由 132 个节点，6551 条边构成。PageRank 算法是评价复杂网络中节点重要性的经典算法^[26]，将模块中基因按照 PageRank 值从大到小排列，详见表 4。

2. 5. 2 病证结合模块核心模块功能分析和通路分析结果 对 Mem3、5、39 中靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析，继而探讨 T2DM 阴虚证潜在的生物学基础。将 GO 富集分析分为生物过程、细胞组分、分

表 2 2 型糖尿病疾病基因、证候基因、西药靶点、滋阴方剂靶点分布情况

模块编号	规模	疾病基因分布			证候基因分布		药物靶点数目	
		数量	P 值	比例（疾病基因/ 社团规模）/%	数量	P 值	西药	滋阴方剂
Mem3	79	26	9. 61×10 ⁻⁸	32. 91	15	0. 0270	1	22
Mem5	306	75	3. 61×10 ⁻¹²	24. 51	48	0. 0089	2	12
Mem7	40	12	7. 25×10 ⁻⁴	30. 00	10	0. 0110	1	2
Mem39	132	27	7. 35×10 ⁻⁴	20. 45	34	1. 96×10 ⁻⁶	2	16
Mem 139	16	6	0. 0047	37. 50	5	0. 026	0	4
Mem 146	3	3	0. 0012	100	2	0. 034	0	3
Mem 317	3	3	0. 0012	100	3	0. 0014	0	0

表 4 2 型糖尿病阴虚证核心模块基因重要性评价

模块 编号	基因 数量	PageRank 平均值	基因名称 (PageRank 值排名前 30 基因)
Mem3	79	0.012658228	CYP3A4、CYP1A1、AKR1C3、HSD3B1、HSD3B2、CYP3A5、CYP2E1、HSD17B12、CYP17A1、CYP2A6、CYP1A2、AKR1D1、CYP19A1、AKR1C1、EPHX1、CYP2D6、HSD17B8、HSD17B2、HSD17B6、CYP11B1、CYP11B2、SRD5A3、SRD5A1、HSD17B1、CYP3A7、CYP21A2、SRD5A2、CYP2A13、SULT2B1、STS
Mem5	306	0.003267974	IL6、APOB、GPC3、VCAN、APOA1、APOE、SDC4、APOA2、GPC1、SDC3、ALB、SDC1、HSP90B1、PROC、MBTPS1、SERPINC1、IGFBP3、PDIA6、BMP4、AGRN、C4A、P4HB、FGA、GAS6、FGG、F5、HSPG2、APOA5、SERPIND1、IGFBP5
Mem39	132	0.007575758	GNAQ、EDN3、NTS、NPFF、F2RL2、UTS2R、BRS3、LPAR6、EDN1、GCG、GNA11、GNA15、GNA14、TBXA2R、F2R、AVP、ADRBK1、GRK5、P2RY10、PROKR2、OXT、MLNR、GNRHR、KISS1R、GHSR、GNRH2、FFAR1、F2RL3、CHRM3、GRP

子功能三类,并根据 $\text{Log}_{10}P$ 值排列。Mem3 内靶点主要分布于内质网膜、线粒体膜等细胞器膜,通过发挥调控氧化还原酶、单加氧酶、类固醇羟化酶活性等功能,共同影响机体细胞激素代谢、类固醇代谢、烯炔化合物代谢、脂质生物合成等多重生物过程。Mem5 中靶点的细胞组分主要涉及内质网腔、细胞外基质、外部封装结构、脂蛋白颗粒等,分子功能主要涉及磺基转移酶等转移酶活性、化合物以及离子结合等,生物过程主要涉及翻译后蛋白质修饰、多糖的生物合成及代谢、脂蛋白调节等。Mem39 富集到的细胞组分包括树突、突触后膜、轴突末端、神经元投射末端等神经结构组成,分子功能包括 G 蛋白偶联受体及神经肽受体等受体活性、激素活性、磷脂酰肌醇磷脂酶 C 活性等,生物过程包括磷脂酶 C 激活 G 蛋白偶联受体通路、细胞钙离子等离子浓度的调节与稳态、血液循环、血压调节等。

KEGG 通路分析结果按照 $\text{Log}_{10}P$ 值排序后,Mem3 富集到 16 条通路,Mem5 富集到 43 条通路,Mem39 富集到 51 条通路,共计 96 条,可见 3 个模块既参与特定的生物学机制,又存在共同调节的代谢通路,而 3 者共同富集的通路为醛固酮合成与分泌。Mem3 通路富集以激素合成、物质代谢等途径为主,具体涉及类固醇激素生物合成、细胞色素 P450 对外源性化合物的代谢、化学致癌作用、药物代谢-细胞色素 P450、视黄醇代谢、卵巢类固醇生成、花生四烯酸代谢、脂肪酸延长等通路。Mem5 主要为物质合成和代谢、免疫系统、胰岛素相关信号通路以及内分泌系统等,具体包括糖胺聚糖生物合成、补体和凝血级联反应、细胞外基质受体相互作用、内质网蛋白加工、PI3K-Akt 信号通路、甲状腺激素合成、脂肪消化与吸收、维生素消

化与吸收等。Mem39 富集结果多为神经信号转导、感觉系统、内分泌系统、免疫系统相关通路,例如神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、磷脂酶 D 信号通路、TRP 通道的炎症介质调节、胰岛素分泌、肾素分泌、cGMP-PKG 信号通路、血小板活化等通路。

3 动物实验验证

本研究通过构建动物模型,对分子网络划分的病证结合核心模块 Mem5 及 Mem39 的核心靶点进行验证。IL6 为 Mem5 的核心靶标 (PageRank 值最高),Mem39 中预测到大量 G 蛋白偶联受体介导的信号通路相关基因,实验部分选择该模块 PageRank 值最高的鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 q 多肽 (GNAQ) 介导通路下游效应器 PLCB1、PLCB3 基因编码的蛋白即异源三聚体嘌呤核苷酸结合蛋白 (Gq)、磷脂酶 C β 1 (PLC β 1)、磷脂酶 C β 3 (PLC β 3) 蛋白进行验证,进一步证实预测结果的可靠性。

3.1 动物及分组

SPF 级 6 周龄自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠 26 只 (体质量 32 ~ 45g) 及同窝野生对照小鼠 21 只 (体质量 18 ~ 20 g),实验动物生产许可证号:SYXK (苏) 2016-0010,购自常州卡文斯实验动物有限公司,饲养于南京中医药大学 SPF 级实验动物中心。适应性喂养 3 天后,测量动物体质量,借助 Excel 2019 软件生成随机数字,将小鼠随机分为正常对照组 9 只、阴虚证组 12 只、2 型糖尿病组 12 只、2 型糖尿病阴虚证组 14 只。动物实验经南京中医药大学动物伦理委员会批准 (批号:201910A033)。

3.2 动物模型构建

采用“热盛伤阴”法^[27]进行阴虚证造模,将炮附片、肉桂、吴茱萸按 1 : 1 : 1 比例配制,煎煮前将药物浸泡 30 min,炮附片先煎 30 min,随后加

入肉桂、吴茱萸。武火煎沸后，转文火再煎煮 1 h。煎煮两次后将药液混合。借助旋转蒸发仪（瑞士步琪公司，型号 R-300），将药液浓缩至 1 g/ml。上述中药均购自南通三越中药饮片有限公司。阴虚证组和 2 型糖尿病阴虚证组小鼠每日予 0.1 ml/10 g 体积的伤阴药液灌胃，正常对照组及 2 型糖尿病组小鼠予以 0.1 ml/10 g 超纯水灌胃。造模时间持续 8 周，期间自由饮食、饮水。

3.3 观察指标及方法

3.3.1 血清白细胞介素 6 (IL-6) 浓度 8 周后各组小鼠采用异氟烷（瑞沃德生命科技有限公司，批号 YFW012）吸入麻醉（诱导麻醉浓度 2%，维持麻醉浓度 1.5%）后摘取眼球取血，离心后取血清按照 Elisa 试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号 20200713）说明书步骤进行浓度检测，采用微量分光光度计（美国 Thermo 公司，型号 NanoDrop One）测定 OD 值，根据标准曲线计算样本浓度。

3.3.2 下丘脑 Gq、PLCβ1、PLCβ3 蛋白表达 分离下丘脑组织，充分裂解后提取蛋白，微量分光光度计测定浓度。10%SDS-PAGE 蛋白电泳后，湿转至 PVDF 膜。牛奶封闭后，孵育 Gq 抗体（美国 Santa Cruz 公司，批号 sc-365906，1：750）、PLCβ1（美国 Santa Cruz 公司，批号 sc-5291，1：500）、PLCβ3（美国 Santa Cruz 公司，批号 sc-133231，1：500）、β-actin（美国 CST 公司，批号 3700，1：1000）。4℃过夜后室温孵育二抗（美国博士德生物公司，批号 BST16D19B16E50，1：2000）90 min。凝胶扫描成像系统（美国 GE 公司，型号 Amersham Imager 600）中进行显影，测定灰度值。以目的蛋白灰度值/内参 β-actin 灰度值作为相对表达量。

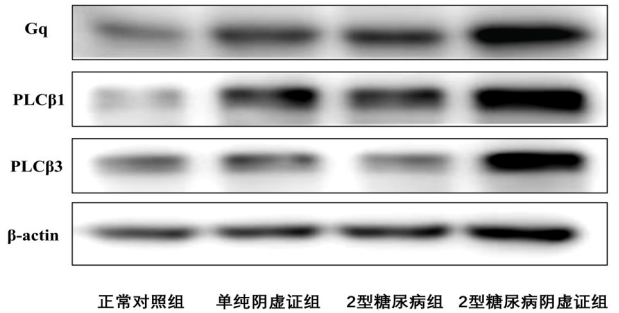
3.4 统计学方法

采用 GraphPad prism 8.0 软件统计分析，计量资料符合正态分布以均值±标准误 ($\bar{x}\pm S. E. M$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较

采用 Fisher's LSD 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3.5 各组小鼠血清 IL-6 水平及下丘脑 Gq、PLCβ1、PLCβ3 蛋白表达比较

表 5 示，正常对照组、阴虚证组和 2 型糖尿病组小鼠血清 IL-6 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)，而 2 型糖尿病阴虚证组小鼠血清 IL-6 水平显著高于正常对照组和 2 型糖尿病组 ($P<0.05$)。与正常对照组比较，其余 3 组下丘脑 Gq、PLCβ1 蛋白显著升高，2 型糖尿病阴虚证组 PLCβ3 蛋白亦升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与 2 型糖尿病组比较，2 型糖尿病阴虚证组 Gq、PLCβ1 蛋白显著升高 ($P<0.01$)。各组大鼠下丘脑 Gq、PLCβ1、PLCβ3 蛋白电泳图见图 1。



注：Gq，异源三聚体嘌呤核苷酸结合蛋白；PLCβ1，磷脂酶 Cβ1；PLCβ3，磷脂酶 Cβ3。

图 1 各组大鼠下丘脑 Gq、PLCβ1、PLCβ3 蛋白电泳图

4 讨论

本研究运用复杂网络的模块分析法构建 T2DM 阴虚证病证结合分子网络，筛选出核心模块，且利用机器学习的方法以方测证，验证了 Mem3、5、39 的可靠性，提示 T2DM 阴虚证生物学基础与 Mem3、5、39 基因功能的改变密切相关。根据富集分析结果可知，T2DM 阴虚证模块基因涉及不同的生物功能，且各有侧重。

在胰岛素抵抗状态下，胰岛素无法抑制肝脏葡萄糖生成，而脂质合成增多，导致高血糖和高甘油

表 5 各组小鼠血清 IL-6 水平及下丘脑 Gq、PLCβ1、PLCβ3 蛋白表达比较

组别	鼠数	IL-6/ng·L ⁻¹	Gq/β-actin	PLCβ1/β-actin	PLCβ3/β-actin
正常对照组	4	157.948±12.978	0.991±0.002	1.001±0.055	1.015±0.010
阴虚证组	4	152.057±9.987	1.840±0.073 ^{a)}	2.102±0.092 ^{a)}	1.690±0.239
2 型糖尿病组	4	151.547±7.455	1.817±0.075 ^{a)}	2.058±0.089 ^{a)}	2.289±0.479
2 型糖尿病阴虚证组	4	187.922±5.951 ^{b) c)}	2.812±0.157 ^{a) d)}	2.710±0.227 ^{a) d)}	3.199±1.036 ^{b)}

注：IL-6，白细胞介素 6；Gq，异源三聚体嘌呤核苷酸结合蛋白；PLCβ1，磷脂酶 Cβ1；PLCβ3，磷脂酶 Cβ3。
a) 与正常对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与 2 型糖尿病组比较， $P<0.05$ ；d) 与 2 型糖尿病组比较， $P<0.01$ 。

三酯血症^[28]。本研究富集到了多条糖代谢相关功能和通路,如Mem5中的PI3K-Akt信号通路、胰岛素抵抗、胰岛素分泌等,Mem39中的胰岛素分泌、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路等,说明T2DM阴虚证机体血糖稳态失衡程度可能更高。胰岛素样生长因子1(IGF1)结构与胰岛素相似,通常与胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBPs)结合,从而与其受体形成二聚体,可改善胰岛素敏感性,提高游离脂肪酸利用率,抑制糖尿病、肥胖进程^[29]。Mem5包括多种IGFBPs,如IGFBP1、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP5、IGFBP7,且IGFBP3和IGFBP5的PageRank值位于模块前列。其中IGFBP3和IGFBP7同时为治疗T2DM的西药靶点,故预测IGFBPs与IGF1的变化可能参与T2DM阴虚证机糖代谢紊乱的病理过程。另外,临床研究发现,T2DM阴虚热盛证胱抑素C(CST3)水平较低,CST3可用于早期糖尿病肾病的筛查^[30],在本研究中CST3被划分于Mem5中。较其他证型而言,T2DM阴虚证脂代谢紊乱严重,载脂蛋白A1(APOA1)、载脂蛋白B(APOB)显著增高^[31]。本研究中APOA1、APOB位于Mem5中的核心位置。同样,在预测到的核心模块中涉及脂质代谢过程,如Mem3的花生四烯酸代谢、脂肪酸延长、初级胆汁酸生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成、亚油酸代谢;Mem5中的脂肪消化与吸收、亚麻酸代谢等。

免疫功能、炎症反应是目前T2DM阴虚证生物学基础的研究重点,有研究^[32]发现,T2DM患者血清炎症反应标志物C反应蛋白(CRP)水平高于糖耐量异常患者,且阴虚热盛证患者CRP水平最低。白细胞介素(IL)和肿瘤坏死因子(TNF)等炎症细胞因子会刺激肝细胞合成CRP,加重炎症过程和胰岛素抵抗^[33]。本研究中IL-6、CRP均位于Mem5中,且IL-6为该模块网络的核心。Mem39富集分析也预测到NOD样受体、趋化因子等免疫、炎症相关信号通路。此外,糖尿病肾病阴虚证小鼠肾脏纤维连接蛋白(FN1)表达增高,提示阴虚证加重了肾脏纤维化进程^[34],而FN1在Mem5的PageRank值中排名相对靠前(PageRank值中排名第38)。

本研究结果还显示,T2DM阴虚证病理变化与内分泌系统紊乱、环核苷酸异常相关。3个病证结合核心模块分析结果均涉及大量激素代谢、内分泌系统生物学变化,如甲状腺激素合成、醛固酮合成与分泌、卵巢类固醇生成、雌激素信号通路。其中

Mem3包含众多细胞色素P450酶(CYP)家族成员,参与催化类固醇激素生物合成,如雌激素、性激素等^[35],提示可以从下丘脑-垂体-内分泌轴入手探究T2DM阴虚证内分泌系统。综上,结合既往报道文献,从糖脂代谢、免疫功能、炎症反应、内分泌紊乱等角度,证明了T2DM阴虚证核心模块划分的可靠性。部分模块未富集到相关生物学过程或通路,可能是由于网络规模较小或本身属于单一疾病模块的一部分。

在T2DM疾病模块划分基础上,根据阴虚证的典型症状,建立了T2DM阴虚证-症状-基因关系,筛选7个病证结合模块。本研究运用西药靶点、滋阴方剂靶点作为种子基因,验证其与病证结合模块的关系,进而确定3个T2DM阴虚证核心模块,对核心模块进行分析后,挖掘出T2DM阴虚证的部分生物学基础。此外,Mem39中富集到的瞬时感受器电位(TRP)通道的炎症介质调节通路值得关注,在哺乳动物中鉴定了大量的热传感器集合,几乎所有的热感受器都属于TRP通道家族^[36]。当TRP通道在生理或病理条件下激活后,位于背根神经节和三叉神经节的热敏初级感觉神经元将皮肤和内脏的温度信息输入传递到大脑,然后触发热感觉行为^[37]。因此,探究T2DM阴虚证机体中感知温度变化的TRP通道是否存在异常,可能有助于揭示阴虚证自觉发热等“内热”症状的物质基础。

动物实验结果显示,IL-6表达在T2DM阴虚证小鼠血清中显著上升,证明提示机体炎症状态的加重可能是2型糖尿病在阴虚证阶段的一种特征性病理变化。对Gq、PLCβ1、PLCβ3蛋白进行验证,进一步证实了预测结果的可靠性。实验结果提示,糖尿病阴虚证小鼠下丘脑中G蛋白-磷脂酶Cβ通路异常激活。

综上,本研究构建了基于网络生物学方法的2型糖尿病阴虚证病证结合潜在分子网络的研究模式,为探究T2DM阴虚证的生物学基础提供研究思路。由于本研究涉及靶点、通路较多,可能会出现假阳性结果,后续可开展阴虚证相关动物或临床组学,结合数据库挖掘出的结果对证候相关的靶点进行筛选,对本模型进行优化。

参考文献

- [1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J].

- Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109119. doi: 10.1016/j.diabres. 2021. 109119.
- [2] 赵能江, 张智海, 陈薇, 等. 《中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)》亮点解读及糖尿病中医指南分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(6): 652-655.
- [3] WANG JK, MA QT, LI YQ, et al. Research progress on traditional Chinese medicine syndromes of diabetes mellitus[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109565. doi: 10.1016/j.biopha. 2019. 109565.
- [4] 杨宇峰, 田晓君, 石岩. 2 型糖尿病中医病因病机理论框架结构研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1173-1174.
- [5] 龚燕冰, 罗增刚, 高思华, 等. 运用因子分析方法探索 2 型糖尿病证候要素及其靶位特征[J]. 中医杂志, 2011, 52(13): 1100-1102.
- [6] BARABÁSI AL, OLTVAI ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(2): 101-113.
- [7] HOPKINS AL. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [8] HOPKINS AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4 (11): 682-690.
- [9] LI S, ZHANG ZQ, WU LJ, et al. Understanding ZHENG in traditional Chinese medicine in the context of neuro-endocrine-immune network [J]. IET Syst Biol, 2007, 1 (1): 51-60.
- [10] 李梢. 中医证候生物分子网络标志的构想与研究[J]. 中医杂志, 2009, 50(9): 773-776.
- [11] 李辉, 陈福才, 张建朋, 等. 复杂网络中的社团发现算法综述[J]. 计算机应用研究, 2021, 38(6): 1611-1618.
- [12] RAGHAVAN UN, ALBERT R, KUMARA S. Near linear time algorithm to detect Mem structures in large-scale networks [J]. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 76 (3 Pt 2): 036106. doi: 10.1103/PhysRevE. 76. 036106.
- [13] SUBELJ L, BAJEC M. Unfolding communities in large complex networks: combining defensive and offensive label propagation for core extraction [J]. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2011, 83 (3 Pt 2): 036103. doi: 10.1103/PhysRevE. 83. 036103.
- [14] 陈小愚, 王世东, 陈宇, 等. 基于层次分析法评估 2 型糖尿病阴虚证辨证依据权重的研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2022, 46(1): 78-81, 85.
- [15] 黎敬波, 马力. 中医临床常见症状术语规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [16] 李灿东. 中医诊断学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [17] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- [18] 李振吉. 中医基本名词术语中英对照国际标准[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [19] 庞国明, 倪青, 张芳. 2 型糖尿病病证结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2021, 62(4): 361-368.
- [20] 梁丽娜, 战丽彬, 郑路平, 等. 滋补脾阴方药对脾阴虚糖尿病小鼠下丘脑胰岛素信号的调控作用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(1): 82-86.
- [21] 梁悦, 王长虹, 程雪梅, 等. 一贯煎的处方考证和临床应用研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (22): 15-22.
- [22] ZHENG WJ, WANG GF, ZHANG Z, et al. Research progress on classical traditional Chinese medicine formula Liuwei Dihuang Pills in the treatment of type 2 diabetes [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109564. doi: 10.1016/j.biopha. 2019. 109564.
- [23] YANG J, TIAN SS, ZHAO J, et al. Exploring the mechanism of TCM formulae in the treatment of different types of coronary heart disease by network pharmacology and machining learning [J]. Pharmacol Res, 2020, 159: 105034. doi: 10.1016/j.phrs. 2020. 105034.
- [24] XU WM, YANG K, JIANG LJ, et al. Integrated modules analysis to explore the molecular mechanisms of phlegm-stasis cementation syndrome with ischemic heart disease [J]. Front Physiol, 2018, 9: 7. doi: 10.3389/fphys. 2018. 00007.
- [25] MENCHE J, SHARMA A, KITSACK M, et al. Disease networks. Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome [J]. Science, 2015, 347(6224): 1257601.
- [26] 王安, 顾益军. 基于社区划分的节点重要性评估方法 [J]. 计算机工程与应用, 2020, 56(8): 42-48.
- [27] 杨翠平, 薛春苗. 温热药造小鼠阴虚模型的建立及其对小鼠抗氧化作用的影响[J]. 四川中医, 2004(10): 14-15.
- [28] TITCHENELL PM, LAZAR MA, BIRNBAUM MJ. Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin [J]. Trends Endocrinol Metab, 2017, 28(7): 497-505.
- [29] 李博文, 冯丽丽, 田振军. 胰岛素样生长因子-1 与代谢性疾病及运动干预的研究进展[J]. 生理学报, 2021, 73(2): 342-352.
- [30] 陈婷. 2 型糖尿病中医辨证分型与胰抑素 C 及慢性并发症的相关性研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [31] 柯娜娜. 血脂血压对 2 型糖尿病证型分布的影响研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2019.
- [32] 孙玉娇, 陈璇. 糖尿病阴虚热盛型患者 C 反应蛋白的

- 表达水平研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(9): 1909-1911.
- [33] AGIL A, REITER RJ, JIMÉNEZ-ARANDA A, et al. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats [J]. J Pineal Res, 2013, 54(4): 381-388.
- [34] 韩佳瑞, 邢玉凤, 彭紫凝, 等. 基于病证结合探讨糖尿病肾病阴虚证小鼠肾损害与自噬的关系[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(3): 938-947.
- [35] 黄玉松, 李力. 细胞色素 P450 酶参与动物体内代谢的研究与展望[J]. 药物生物技术, 2021, 28(1): 94-98.
- [36] VENKATACHALAM K, MONTELL C. TRP channels [J]. Annu Rev Biochem, 2007, 76: 387-417. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- [37] XIAO R, XU XZS. Temperature sensation: from molecular thermosensors to neural circuits and coding principles [J]. Annu Rev Physiol, 2021, 83: 205-230. doi: 10.1146/annurev-physiol-031220-095215.

Model Construction and Preliminary Validation of Disease-syndrome Combined Molecular Networks for Type 2 Diabetes Mellitus with Yin Deficiency Syndrome

GUO Hang¹, ZHAN Libin², SUN Xiaoxia¹, CHEN Ning¹, WENG Zebin¹

1. School of Traditional Chinese Medicine/School of Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023; 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To construct the disease-syndrome combined molecular network for type 2 diabetes mellitus (T2DM) using network biology approaches, and to explore its biological basis and validate it through experimental data. **Methods** The DisGeNET, DrugBank, TTD, MalaCards, OMIM, CTD, and GEO databases were integrated to obtain T2DM-related genes. The PPI network in the STRING database was divided into topological modules using the algorithm for community discovery, and the disease-related genes were mapped into the modules to obtain the disease module of T2DM. The genes corresponding to the symptoms of *yin* deficiency syndrome obtained from SymMap, HPO, and GeneCards databases were mapped into the disease module, so as to get the disease-syndrome combined module for T2DM with *yin* deficiency syndrome. Furthermore, the results were verified through the corresponding relationship between the T2DM western medicine targets and the module targets, and the correlation analysis between nourishing *yin* formula targets and the disease-syndrome combined module. GO and KEGG enrichment analysis was performed for the molecular networks based on the Metascape platform. Finally, the warm-heat damaging *yin* method was used to construct the disease-syndrome combined mice model, which was divided into normal control group, *yin* deficiency syndrome group, T2DM group, and T2DM with *yin* deficiency syndrome group, and the serum and hypothalamic tissues were taken to validate the predicted key targets. **Results** Totally, 1514 T2DM-related genes and 1547 T2DM with *yin* deficiency syndrome-related genes were obtained, and 19 disease modules closely related to T2DM were identified, of which 7 modules related to *yin* deficiency syndrome were defined as the disease-syndrome combined modules for T2DM with *yin* deficiency syndrome. Through validation by western medicine targets and nourishing *yin* formulas, Mem3, 5, and 39 as the core disease-syndrome combined modules for T2DM with *yin* deficiency syndrome were finally established. The enrichment analysis revealed that the biological basis may be involved with glucose and lipid metabolism disorders, immune inflammation and endocrine disorders, and other pathological processes. The validation analysis of the interleukin-6 (IL-6), the core targets of Mem5 and Mem39, as well as the proteins related to Guanine nucleotide-binding protein q polypeptide (GNAQ)-mediated pathway, namely heterotrimeric purine nucleotide-binding protein (Gq), phospholipase C β 1 (PLC β 1), and phospholipase C β 3 (PLC β 3) showed that the IL-6 level in serum and the protein expression of Gq and PLC β 1 in the hypothalamus in the T2DM with *yin* deficiency syndrome group were significantly higher than those in the normal control group and T2DM group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The core biological processes of T2DM with *yin* deficiency syndrome are involved with G protein linked signal transduction system, glucose and lipid metabolism, immune function, inflammatory response, and endocrine disorders.

Keywords type 2 diabetes mellitus; *yin* deficiency syndrome; network biology; disease-syndrome combined module

(收稿日期: 2021-12-06; 修回日期: 2022-05-09)

[编辑: 邓媛]