

文章编号:1671-9352(2025)09-0031-10 DOI:10.6040/j.issn.1671-9352.0.2025.031

# 龙血竭促进糖尿病足创面愈合的作用机制

杨子钰,戴召媛,李根\*,冯心池

(天津中医药大学中药学院,天津 301617)

**摘要:**采用网络药理学、分子对接和实验验证研究龙血竭促进糖尿病足创面愈合的作用机制。利用 TCMSp 数据库,筛选龙血竭的化学成分及作用靶标;以“diabetic foot ulcer”“diabetic wound”等为关键词在 GeneCards 和 DisGeNET 数据库中检索疾病靶点;取龙血竭成分靶点与疾病靶点交集,构建“成分-疾病-靶标”网络图;生信分析预测龙血竭促进创面愈合的作用机制;采用分子对接考察龙血竭成分与关键靶点的结合情况;采用小鼠巨噬细胞,研究龙血竭及其主要成分对晚期糖基化终产物受体(the receptor of advanced glycation end products, RAGE)蛋白表达的影响。结果表明:网络药理学筛选得到 226 个化合物疾病共同靶标;KEGG 富集分析提示,龙血竭治疗糖尿病足创面的作用可能与 AGE-RAGE 信号通路密切相关。分子对接结果显示,龙血素 A、龙血素 B、龙血素 C、龙血素 D、白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮 6 个成分与 RAGE 之间均有较好的结合活性。龙血竭及其主要成分均能显著逆转晚期糖基化终末产物(AGEs)引起的小鼠巨噬细胞 RAGE 蛋白异常表达。综上,龙血竭促进糖尿病足创面愈合与其调控 AGE-RAGE 通路,抑制 AGEs 累积引起 RAGE 蛋白异常表达相关。

**关键词:**龙血竭;糖尿病足;网络药理学;分子对接;晚期糖基化终产物受体

**中图分类号:**R285 **文献标志码:**A

**引用格式:**杨子钰,戴召媛,李根,等. 龙血竭促进糖尿病足创面愈合的作用机制[J]. 山东大学学报(理学版),2025,60(9):31-40.

## Mechanism of Resina Draconis in promoting healing of diabetic foot wounds

YANG Ziyu, DAI Zhaoyuan, LI Gen\*, FENG Xinchu

(School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**Abstract:** Network pharmacology, molecular docking, and experimental verification were employed to investigate the mechanism by which Resina Draconis promotes the healing of diabetic foot wounds. The TCMSp database was utilized to screen the chemical constituents and targets of Resina Draconis. Disease targets were retrieved from the GeneCards and DisGeNET databases using keywords such as “diabetic foot ulcer” and “diabetic wound”. A “component-disease-target” network diagram was created using the intersections of component targets and disease targets. Bioinformatic analysis predicted the mechanism of Resina Draconis in facilitating wound healing. Molecular docking was used to investigate the combination of the components of Resina Draconis and key targets. Mouse macrophages were used to study the effects of Resina Draconis and its main components on the expression of the receptor of advanced glycation end products (RAGE) protein. The results showed that 226 common disease targets were obtained by network pharmacological screening. KEGG enrichment analysis suggested that the effect of Resina Draconis on diabetic ulcers may be associated with the AGE-RAGE pathway. The results of molecular docking demonstrated that loureirin A, loureirin B, loureirin C, loureirin D, resveratrol, and 7,4'-dihydroxyflavone exhibited good binding activity with the key target RAGE. Resina Draconis and its main components could significantly reverse the abnormal expression of RAGE protein in mouse macrophages induced by advanced glycation end products (AGEs). In conclusion, the mechanism of Resina Draconis in promoting healing of diabetic foot ulcers was associated with the regulation of the AGE-RAGE pathway and the inhibition of the abnormal expression of the RAGE protein caused by the accumulation of advanced glycation end products (AGEs).

**Key words:** Resina Draconis; diabetic foot; network pharmacology; molecular docking; RAGE

收稿日期:2024-01-22;网络出版时间:2025-04-02 17:31:40

基金项目:国家自然科学基金资助项目(82374140)

第一作者:杨子钰(2000—),女,硕士研究生,研究方向为中药化学. E-mail:18831586759@163.com

\*通信作者:李根(1984—),男,副教授,博士,研究方向为药物化学. E-mail:ligen0725@163.com

## 0 引言

全球范围内,糖尿病是引起人类死亡的第十大原因<sup>[1]</sup>。糖尿病会导致机体主要功能系统的损害,尤其是神经系统和血管系统,而由血管系统受损所引起的糖尿病足溃疡是糖尿病最常见的并发症之一<sup>[2]</sup>。2018年的一项统计结果显示,在我国,糖尿病创面愈合难度已超越外伤,成为慢性创面的主要组成部分<sup>[3]</sup>。糖尿病足溃疡(DFU)的终身患病率为19%~34%,溃疡复发率高达40%,同时DFU的治疗成本高昂,其直接成本和患者5年生存率均与癌症相当<sup>[4-5]</sup>。

创面愈合是一项复杂而有序的生物过程,该过程主要包括止血、炎症、增殖和组织重塑4个连续的阶段<sup>[6]</sup>,任何一个阶段出现问题都可能导致伤口愈合延迟。糖尿病患者本身伴有诸多并发症,机体长期处于高血糖微环境中,从而导致一系列的分子生物学变化,如生长因子分泌减少,成纤维细胞增殖减少等,进而导致糖尿病创面愈合延迟<sup>[7]</sup>。目前,针对糖尿病足创面的治疗方法主要有两大类,一是通过全身用药治疗,如使用降糖药物、抗神经病变药物、抗血管病变药物、抗感染药物等来恢复或改善患者的正常代谢过程,二是通过局部伤口护理,如清创、局部抗生素治疗控制炎症反应与感染、生长因子疗法、细胞疗法等<sup>[8]</sup>。这些治疗方法普遍存在价格昂贵、效果参差不齐等不足。寻求其他治疗药物已成为治疗糖尿病足创面亟待解决的课题。

龙血竭(*Resina Draconis*),是百合科植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S.C.Chen 的含脂木材经提取得到的树脂,其味甘、咸,归肺、脾、肾经,临床上主要用于治疗跌打损伤、外伤出血、疮疡不敛等。现阶段,龙血竭被广泛应用于治疗糖尿病溃疡、压疮、烫伤、术后创面等<sup>[9-11]</sup>。临床研究表明,龙血竭胶囊内容物局部外用,与普通抗生素治疗相比糖尿病创面缩小面积增加10%,能够显著提高创面愈合率,同时,肉芽组织生成比普通抗生素治疗提前约4天,显著缩短创面愈合时间<sup>[12]</sup>。然而,龙血竭促进糖尿病创面愈合的分子机制尚未被完全阐明。本研究采用网络药理学方法结合分子对接技术与实验验证,深入探讨龙血竭促进糖尿病足创面愈合的分子机制,为龙血竭的进一步开发与临床合理应用提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

龙血竭购自药材市场,经天津中医药大学中药学院中药资源教研室李先宽副教授鉴定为来源于百合科植物龙血树的中药龙血竭。龙血素A、龙血素B、龙血素C、龙血素D、白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮批号分别为B20767、B20768、B50551、B50474、B20044和B50550,购自上海源叶生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$ 。小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7, TCM-C677)购自苏州海星生物科技有限公司。其余试剂主要包括:RAW264.7细胞专用培养基(批号为CM-0190,普诺赛生命科技有限公司);AGEs-BSA(批号为CY30824,凯梅根生物科技有限公司);RIPA裂解液(批号为G2002,武汉servicebio生物科技有限公司);Cell-Count-Kit-8(批号为CA1210,大连meilunbio生物有限公司);晚期糖基化终产物(the receptor of advanced glycation end products, RAGE)抗体(批号为ZB15001,武汉servicebio生物科技有限公司);Tubulin抗体(批号为11224-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);彩虹180广谱蛋白(批号为PR1910,北京solarbio科技有限公司)。

### 1.2 实验仪器与数据库

DMI8型显微镜(Leica显微系统有限公司);Epoch型酶标仪(美国BioTek);EPS-600型电泳仪(上海泰坦科技股份有限公司)。数据库及网址信息:TCMSP(<http://tcmospw.com/tcmosp.php>)、PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、GeneCards(<http://www.genecards.org/>)、DisGeNET(<http://www.disgenet.org/>)、String(<https://cn.string-db.org/>)、David(<https://david.ncifcrf.gov/>)、微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)、Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)、PDB(<https://www.rcsb.org/>)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 龙血竭成分靶标的预测

在TCMSP数据库中,以龙血竭为关键词检索主要成分和靶点,并通过文献进行补充。将预测的靶标进

行去重和整理,通过 String 数据库对靶标进行规范化处理,得到龙血竭成分的潜在作用靶标。

### 1.3.2 糖尿病足疾病靶标的预测

以“diabetic foot ulcer”、“diabetic wound”、“diabetic foot”和“diabetic ulcer”为关键词,在 GeneCards 和 DisGeNET 数据库中检索,物种设置为“人”,预测疾病的潜在靶标。将预测的靶标进行去重和整理,最终得到与人类相关的糖尿病创面愈合作用靶点。

### 1.3.3 龙血竭成分与糖尿病足共同靶标的筛选

将整理得到的成分靶标和疾病靶标导入 Venny2.1 在线网站处理,得到化合物靶标和疾病靶标的交集。

### 1.3.4 蛋白-蛋白相互作用网络(protein-protein interaction, PPI)的构建

将共同靶标导入到 String 数据库,物种设为“人”,设置蛋白之间的最低相互作用分为 0.9,最终获得蛋白之间相互作用信息。将结果导入到 Cytoscape3.9.1 中进行可视化处理,构建蛋白-蛋白相互作用网络。通过 Cytoscape 中的“Analyze Network”功能分析 PPI 网络拓扑结构。

### 1.3.5 成分-疾病-靶标相互作用网络的构建

将成分、通路和靶点信息整理成网络文件和 type 文件,导入到 Cytoscape3.9.1 中进行可视化处理,构建成分-疾病-靶标相互作用网络。

### 1.3.6 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

将成分与疾病共同靶点导入 DAVID 数据库,进行基因本体论(gene ontology, GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,预测可能存在的的作用机制。最后,将预测结果导入微生信在线网站进行可视化分析。

### 1.3.7 分子对接

在 PubChem 数据库中检索并下载龙血竭成分的 2D 结构式(sdf 格式),并将其转换为 mol2 格式。在 Uniprot 数据库中检索靶点蛋白,下载其 Entry 号,输入到 PDB 数据库中,下载靶点蛋白 pdb 格式文件。通过 Autodocktools1.5.6,分别将靶点蛋白和小分子配体进行去水加氢,设置对接参数以及运算方法,进行分子对接。通过 OpenBabel2.4.1 查看分子对接结果并导入 Pymol 软件进行可视化分析。

### 1.3.8 RAW264.7 细胞培养

将 RAW264.7 细胞接种在含有完全培养基的 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,恒温培养箱温度为 37 °C,CO<sub>2</sub> 浓度为 5%,每日换液。待细胞融合度达到 90%左右,弃去原培养基,加入 2 mL 1×PBS 溶液洗涤两次,重新加入 2 mL 完全培养基,移液器轻轻吹打,使贴壁细胞重悬,800 r/min 离心 4 min,按照 1/3 比例传代。

### 1.3.9 药物溶液的配制

称取适量龙血竭药材粉末、龙血素 A、龙血素 B、龙血素 C、龙血素 D、白藜芦醇和 7,4'-二羟基黄酮标准品,加入适量细胞培养级 DMSO,使储备液浓度分别为 50、250、893.75、206.25、1 125、337.5 和 662.5 μg/mL。10 mg AGEs-BSA 粉末中加入 2 mL 1×PBS 溶液溶解,得到浓度为 5 mg/mL 的储备液。

### 1.3.10 AGEs-BSA 与龙血竭的细胞毒性评价

将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中,细胞密度为 2×10<sup>4</sup> 细胞/孔,贴壁 24 h 后给药。将 AGEs-BSA (500、200、100、50 和 25 μg/mL 浓度)或龙血竭(50、25、12.5、6.25、3.123、1.563 和 0.781 μg/mL 浓度),分别与细胞在 37 °C 恒温培养箱中共同孵育 24 h。24 h 后加入 10 μL CCK-8 工作液,培养箱中避光孵育 1 h,在 450 nm 波长下,测量 OD 值,计算细胞存活率。

### 1.3.11 蛋白免疫印迹(Western blotting)分析实验

向收取的细胞中加入完全裂解液提取蛋白,二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)测定蛋白浓度。蛋白变性后进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后采用 5%的脱脂奶封闭液处理 2 h,加入一抗,4 °C 孵育过夜,加入二抗,室温孵育 1 h。加入 ECL 发光液显影,使用 Image J 软件对蛋白条带进行处理,统计灰度值,计算各组目的蛋白的表达水平。

## 1.4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件分析数据,计量资料以均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析。 $p<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 龙血竭化学成分靶标的预测

综合考虑 TCMSP 数据库中的龙血竭成分及文献调研结果,选择龙血竭的 25 个化学成分进行网络药理学研究,具体为:龙血素 A、龙血素 B、龙血素 C、龙血素 D、白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、3,7,4'-三羟基-5-甲氧基高异黄酮二羟基黄酮、紫檀芪、金合欢素、3,7,4'-三羟基-5-甲氧基高异黄酮、5,7-二甲氧基黄酮、3',7-二羟基-4'-甲氧基黄酮、2,4,4'-三羟基二氢查尔酮、3,2',3',4'-四羟基-4-甲氧基查尔酮、7,4'-二羟基二氢黄酮、7,4'-二羟基-3'-甲氧基黄酮、2,4,4'-三羟基-3'-甲氧基-3-甲基二氢查尔酮、芹菜素、7-羟基黄酮、5,7,4'-三羟基-8-甲基黄酮、4,4'-二羟基-2,6-二甲氧基二氢查尔酮、5,7-二羟基-2',4'-二甲氧基二氢异黄酮、3-甲基白藜芦醇、7-甲氧基二氢黄酮、5,7-二甲氧基黄酮和异甘草素。将上述 25 个化学通过TCMSP和 Pubchem 数据库进行检索,经整理去重后共得到 478 个化合物靶点。将靶点导入 String 数据库,物种选择“人”对结果进行去重和标准化,最终获得了 252 个龙血竭化学成分靶标信息。

### 2.2 糖尿病足疾病靶标预测

以“diabetic foot ulcer”、“diabetic wound”、“diabetic foot”、“diabetic ulcer”为关键词在 Genecards 和 DisGeNet 数据库检索,删除重复项,共得到 1 573 个疾病相关靶标。将靶标导入到 String 数据库,物种选择“人”,对结果进行去重和标准化,最终获得了 1 347 个与糖尿病创面愈合相关的疾病靶标信息。

### 2.3 蛋白-蛋白相互作用网络 (PPI) 的构建

将 2.1 小节获得的化学成分靶标和 2.2 小节获得的疾病靶标导入 Venny2.1 在线网站分析,得到 226 个化合物疾病共同靶标,结果见图 1。将结果导入 String 数据库,并经 Cytoscape3.9.1 进行可视化处理,结果见图 2。在 PPI 网络中,节点越大,颜色越深表明该节点 Degree 值越高,越重要。结果表明:STAT3、MAPK1、SRC、AKT1、MAPK3、FOS、PIK3CA、TP53、RELA、CTNNB1、JUN、TNF、VEGFR、ESR1 和 IL6 处于该网络的中心位置,发挥关键作用。

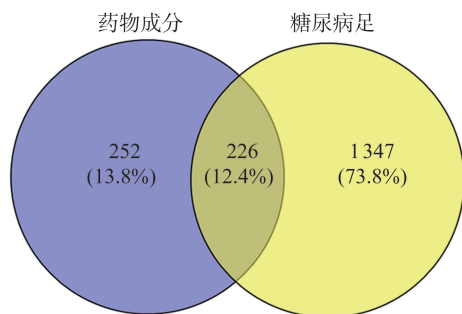


图 1 龙血竭化学成分靶点-糖尿病足创面靶点韦恩图  
Fig.1 Venn diagram of the targets of Resina Draconis and diabetic foot

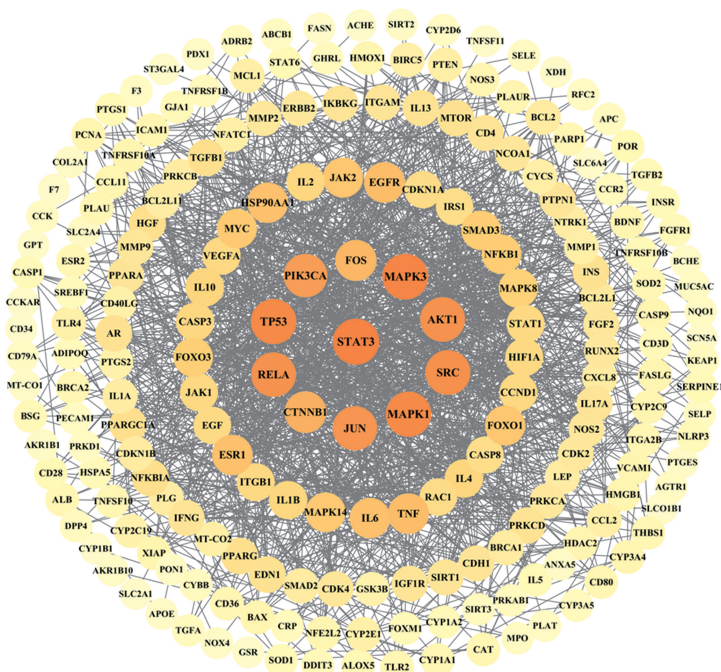


图 2 蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络  
Fig.2 PPI network

### 2.4 成分-疾病-靶标相互作用网络的构建

将成分疾病和靶标信息整理成网络文件和 type 文件,导入 Cytoscape3.9.1 构建相互作用图,并通过 Analyze Network 功能进行网络拓扑结构分析,比较各节点 Degree 值,值越大表明该节点连接度越大,则该节点为关键节点。结果如图 3 所示,其中 Degree 表示节点连接度,Average Shortest Path Length(ASPL)表示该节点到其它节点的最短路的平均长度,Betweenness Centrality(BC)为介数中心性,Closeness Centrality(CC)为接近中心性,Neighborhood Connectivity(NC)为节点邻居的平均连接度。结果表明:龙血竭中促进糖尿病创面愈合的最主要的化学成分可能为:龙血素 A、龙血素 B、龙血素 C、龙血素 D、白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、芹菜素、异甘草素、金合欢素、甘草素和 7-羟基黄酮。重要作用靶点为:AKT1、MAPK1、MAPK3、MAPK8、PIK3CA、CASP3、TP53、IL6、NFKB1、BCL2、VEGFA、STAT3、CDKN1A、CCND1、RELA、CASP9、TNF、PTGS2、MTOR、JUN、FOS、MAPK14、SMAD3、EGFR、BCL2L1。

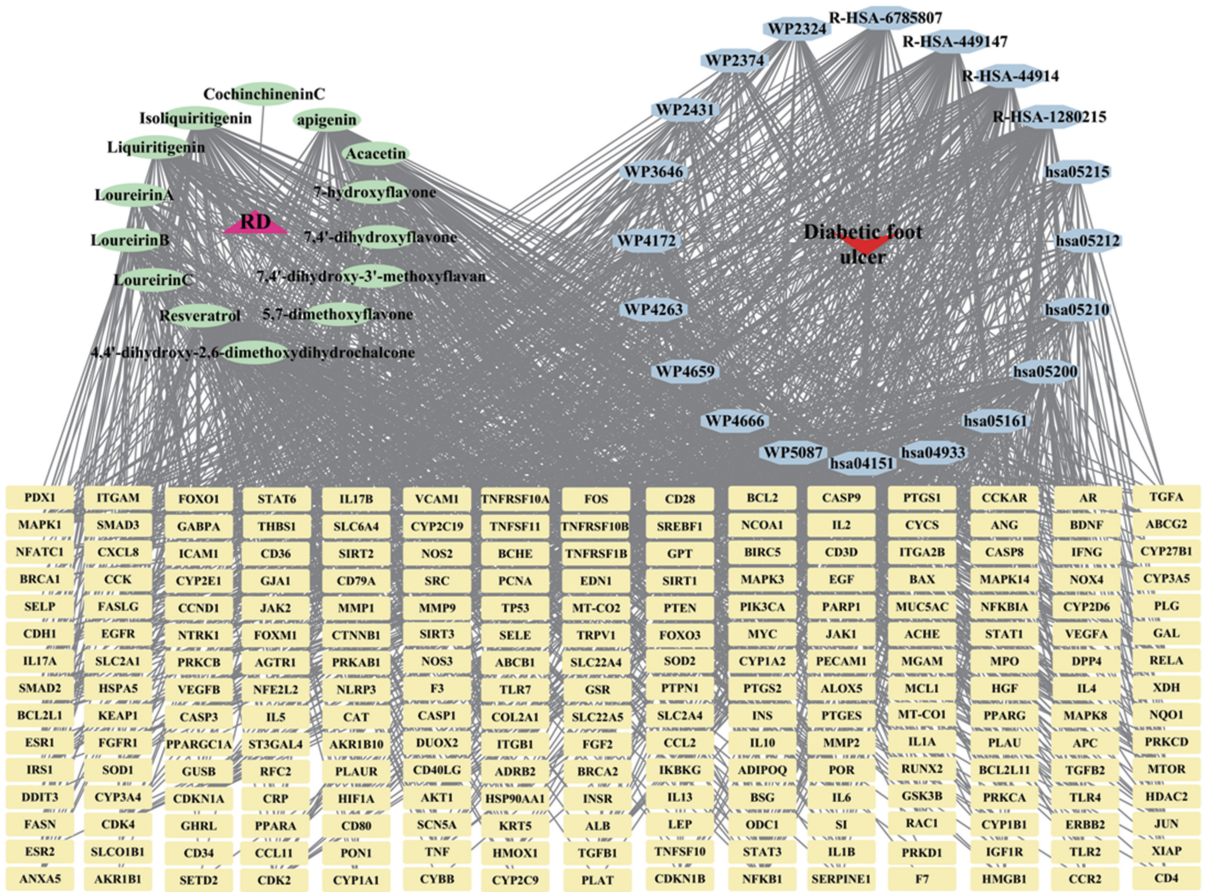


图 3 成分-疾病-靶标图  
Fig.3 Diagram of compounds–disease–targets network

### 2.5 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析

将龙血竭化学成分与糖尿病足创面愈合的共同靶标导入 DAVID 数据库进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 功能注释共获得 802 个 GO 条目,其中包括 640 个生物学过程(biological process, BP)条目,61 个细胞组分(cellular component, CC)条目,101 个分子功能(molecular function, MF)条目。各条目按照 p 值(-log10)从大到小进行排序,将各条目中排名前 10 的条目进行可视化(图 4)。结果表明,龙血竭化学成分对糖尿病足创面愈合主要涉及:药物反应和基因表达的正向调控等生物过程;细胞外间隙和胞外区等细胞成分以及蛋白结合和酶结合等分子功能。KEGG 通路富集分析共富集到 897 条通路,按照各通路 Q 值从大到小进行排序,将排名前 20 的信号通路进行可视化分析(图 5)。结果表明,与糖尿病并发症密切相关的 AGE-RAGE 信号通路被富集。该信号通路由 AGEs 与其受体 RAGE 结合引发,进而激活多条信号通路,如:NF-κB、MAPK 和 PI3K-AKT-mTOR 等,在糖尿病并发症的发生和发展中发挥重要作用。在糖尿病足的疾病进程中,AGE-RAGE 信号通路可通过损伤神经组织,诱导氧化应激与外周血管病变等多方面,加速疾病

的进程<sup>[13]</sup>。因此,本研究选择 AGE-RAGE 信号通路进行后续验证。

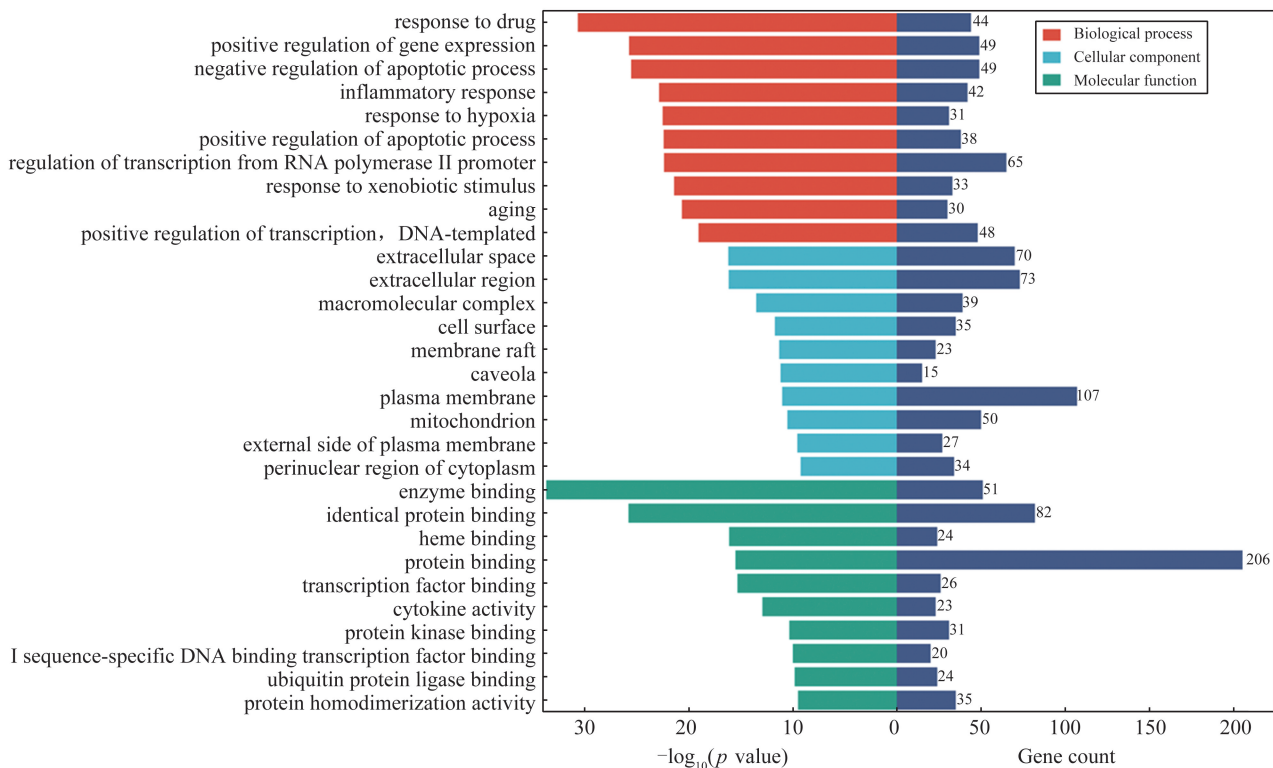


图 4 GO 功能注释图

Fig.4 Chart of GO function annotations

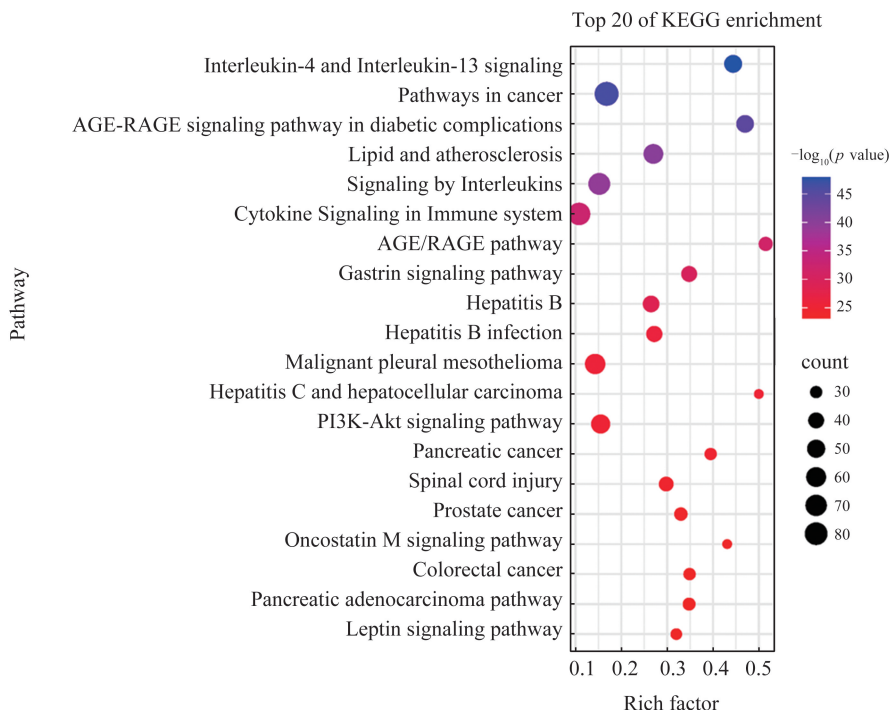


图 5 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig.5 Bubble diagram of the KEGG enrichment pathway

## 2.6 分子对接

以 AGE-RAGE 信号通路上的关键靶点 RAGE 为大分子受体,龙血竭中 6 个主要成分,即龙血素 A、龙血素 B、龙血素 C、龙血素 D、白藜芦醇和 7,4'-二羟基黄酮为小分子配体,进行分子对接。上述 6 个成分与关键靶点 RAGE 之间均具有较好的结合活性,结合能分别为 $-26.13$ 、 $-26.17$ 、 $-25.87$ 、 $-25.08$ 、 $-29.01$  和 $-29.18 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

选择与 RAGE 蛋白结合能力最强的白藜芦醇和 7,4'-二羟基黄酮的分子对接结果通过 Pymol 进行可视化(图 6)。图中黄色棒状分子表示化合物;粉色棒状表示形成氢键的氨基酸残基。结果表明,白藜芦醇会通过 ARG-77 和 VAL-78 在 RAGE 的活性口袋形成两个氢键结合,7,4'-二羟基黄酮会通过 SER-65 和 ARG-77 在 RAGE 的活性口袋形成两个氢键结合。

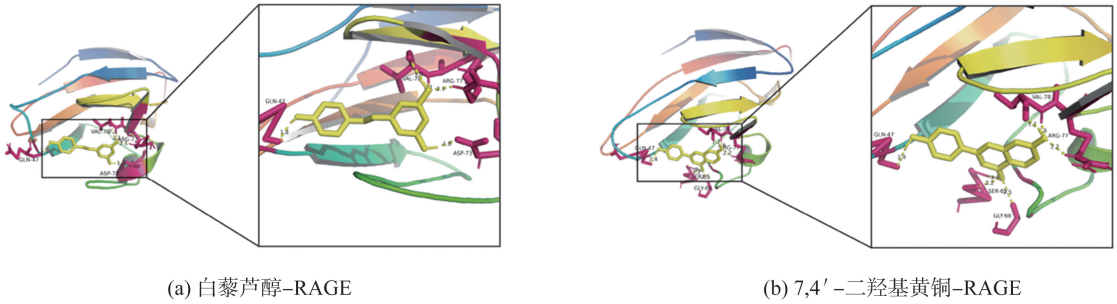
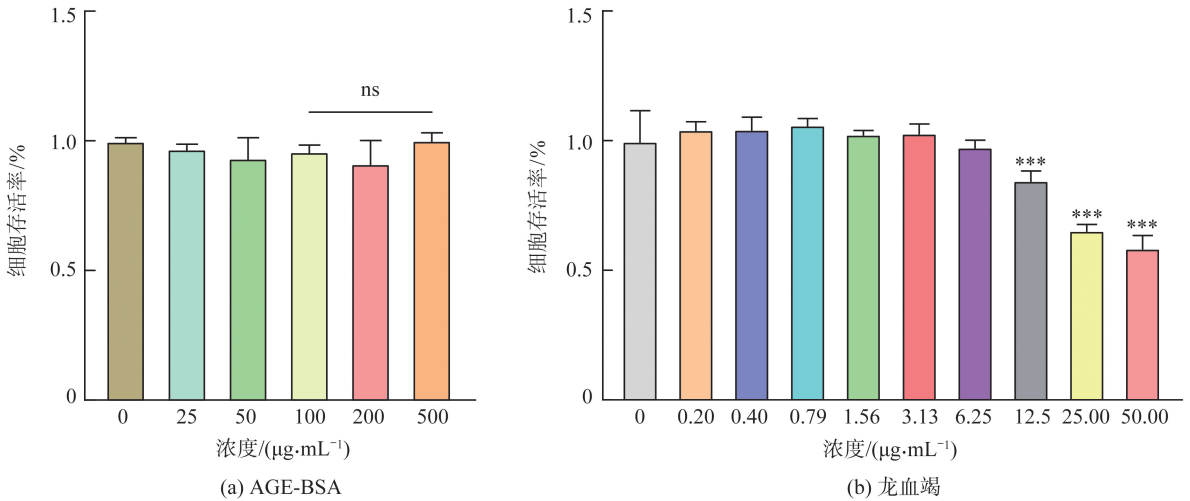


图 6 分子对接模式图  
Fig.6 Molecular docking pattern diagram

### 2.7 AGEs-BSA 与龙血竭的细胞毒性研究

通过 CCK-8 实验,考察不同浓度的 AGEs-BSA 对 RAW264.7 细胞增殖情况的影响,评价其细胞毒性(图 7(a))。结果表明,AGEs-BSA 的浓度在 25 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内时没有明显细胞毒性。最终选择 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的 AGEs-BSA 进行后续实验。

通过 CCK-8 实验,考察不同浓度的龙血竭对 RAW264.7 细胞增殖情况的影响(图 7(b))。结果表明,50、25、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的龙血竭能够显著抑制细胞增殖( $p < 0.001$ ),而 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及以下的给药浓度对细胞增殖无明显抑制作用。因此选择 6.25、3.13 和 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3 个给药浓度用于后续实验。



注:与正常组(药物浓度为 0)比较, ns 表示无统计学差异,\*\*\* $p < 0.001$ 。

图 7 AGEs-BSA 与龙血竭对 RAW264.7 细胞活力的影响( $n = 3$ )

Fig.7 Effects of AGEs-BSA and Resina Draconic on cell viability ( $n = 3$ )

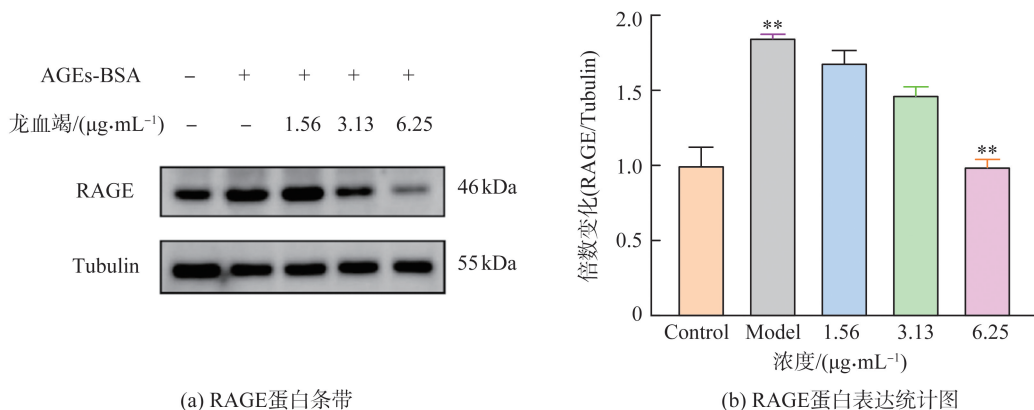
### 2.8 龙血竭给药逆转 AGEs-BSA 诱导的 RAGE 高表达

将细胞接种于 6 孔板中,分为对照组、模型组以及龙血竭给药低、中、高剂量组,除对照组外均加入 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 AGEs-BSA,诱导 RAGE 表达,龙血竭低、中、高剂量组分别加入 1.56、3.13 和 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的龙血竭药物溶液共同孵育 24 h,提取细胞蛋白后进行 Western blotting 实验,结果见图 8。结果表明,200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AGEs-BSA 处理细胞可以显著提高 RAGE 的蛋白表达,而龙血竭给药后能逆转 RAGE 的高表达,且在 1.56 ~ 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内呈剂量依赖性。

### 2.9 龙血竭主要成分逆转 AGEs-BSA 诱导的 RAGE 高表达

2.8 小节结果表明,6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的龙血竭能够显著逆转 AGEs-BSA 诱导的 RAGE 高表达( $p < 0.01$ ),为了进一步明确其可能存在的物质基础,通过 Western blotting 实验检测了龙血竭中主要成分对

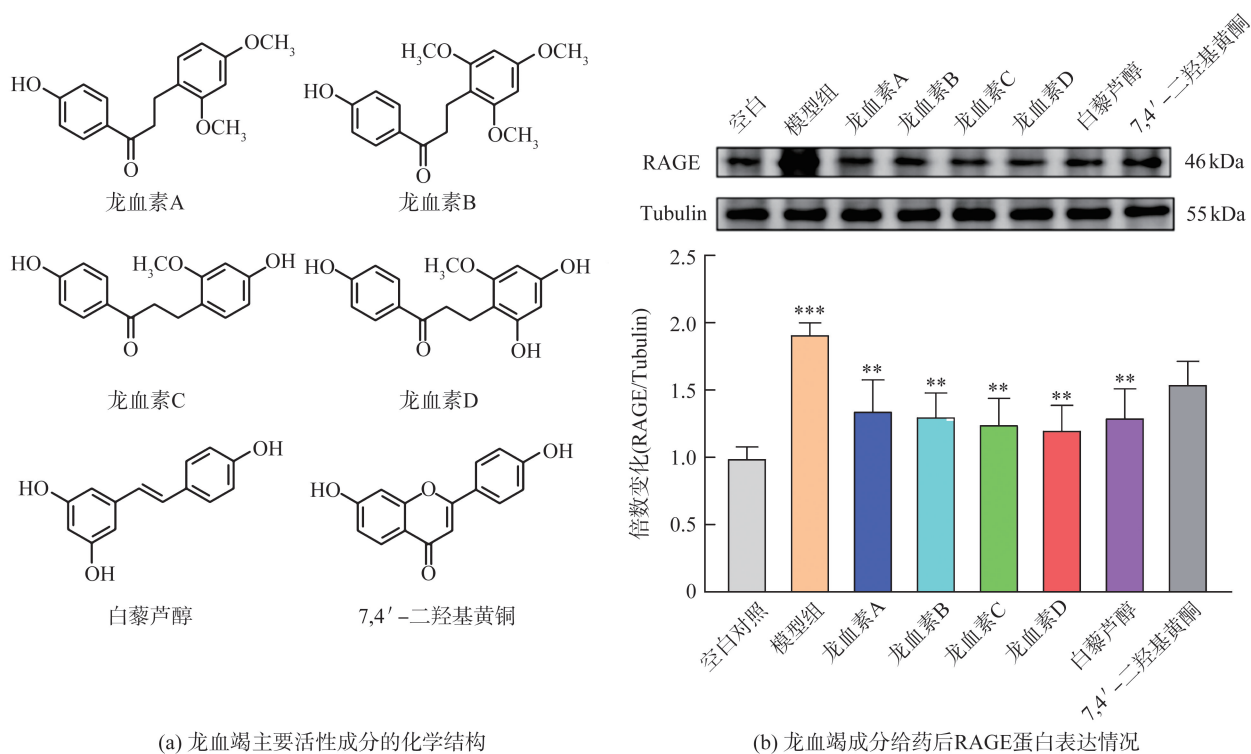
RAGE 表达的影响。综合考虑网络药理学结果中获得的龙血竭潜在活性成分与这些成分在龙血竭药材中含量,选择龙血素 A、龙血素 B、龙血素 C、龙血素 D、白藜芦醇和 7,4'-二羟基黄酮 6 个成分作为研究对象。课题组前期针对龙血竭中龙血素 A、龙血素 B、龙血素 C、龙血素 D、白藜芦醇和 7,4'-二羟基黄酮的含量测定结果表明,上述 6 个成分在龙血竭中的含量分别为 0.4%、1.43%、0.33%、1.8%、1.06% 和 0.54%,因此,确定给药剂量分别为 87.31、282.52、75.74、390.23、290.26、132.75 nmol/L。Western blotting 结果如图 9 所示,龙血素 A、龙血素 B、龙血素 C、龙血素 D 和白藜芦醇均能显著抑制 RAGE 的高表达,而 7,4'-二羟基黄酮的抑制作用不明显。



(a) RAGE蛋白条带

(b) RAGE蛋白表达统计图

与对照组比较, \*\* $p < 0.01$ ; 与模型组比较, \*\* $p < 0.01$ 。

图 8 龙血竭对 RAGE 蛋白( $n=3$ )表达的影响Fig.8 Effect of different concentrations of Resina Draconis on the expression of RAGE protein ( $n=3$ )

(a) 龙血竭主要活性成分的化学结构

(b) 龙血竭成分给药后RAGE蛋白表达情况

与对照组比较, \*\*\* $p < 0.001$ ; 与模型组比较, \*\* $p < 0.01$ 。

图 9 龙血竭中主要活性成分对 RAGE 蛋白( $n=3$ )表达的影响Fig.9 Effect of components in Resina Draconis on the expression of RAGE protein ( $n=3$ )

### 3 讨论与结论

中药具有多成分多靶点的特点,这为明确其药效物质基础与作用机制带来了挑战。网络药理学是一种

基于系统生物学、基因组学、蛋白质组学等学科领域,通过整合大量信息以发现药物靶点和分子作用机制的方法<sup>[14]</sup>。中药网络药理学已逐步成为中药作用机制预测的关键工具<sup>[15]</sup>。本研究通过网络药理学预测,获得了252个龙血竭成分靶标信息、1347个与糖尿病足创面愈合相关的疾病靶标信息,并通过Venn图分析得到226个化合物疾病共同靶标。通过KEGG通路富集分析,富集到897条信号通路。进一步的结果分析发现,龙血竭促进糖尿病创面愈合可能与其调控AGE-RAGE信号通路密切相关。

糖尿病患者生化代谢异常,尤其是其体内血糖含量水平长期较高,导致蛋白质上的游离氨基与糖上的碳基发生反应导致其AGEs的形成和累积,从而触发促炎信号,进一步引起细胞中TNF- $\alpha$ 等炎症因子的表达升高并释放出大量活性氧,这可能会抑制伤口愈合的增殖阶段,从而影响创面愈合进程<sup>[16]</sup>。AGEs主要通过受体途径发挥作用,其中RAGE是研究最广泛的一类AGEs受体,在巨噬细胞、平滑肌细胞、内皮细胞、单核细胞、小胶质细胞和成纤维细胞中均有表达<sup>[17]</sup>。我们都知道,创面的愈合时间与炎症的发生发展密切相关,而巨噬细胞是糖尿病创面炎症调控的关键细胞。有研究表明,AGEs可以在单核细胞或巨噬细胞中与RAGE结合,通过激活NF $\kappa$ B进一步促进TNF- $\alpha$ 等促炎细胞因子的产生,从而使细胞和组织长期处于炎症状态,影响伤口愈合<sup>[18]</sup>。阻断AGEs-RAGE信号通路可以增加血管生成、减轻细胞内炎症反性,并促进创面再上皮化,有助于促进糖尿病创面愈合<sup>[19]</sup>。

在本研究中,我们将龙血竭中的6个主要化学成分与AGE-RAGE信号通路上的关键靶点RAGE进行分子对接,结果表明,各成分与RAGE之间均具有较好的结合活性。进一步的,我们采用AGEs-BSA模拟糖尿病患者体内累积的AGEs,考察AGEs-BSA对小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)的影响。AGEs-BSA是牛血清白蛋白与葡萄糖孵育,然后透析得到的交联产物,在AGEs参与的多种病理过程机制研究中被广泛应用<sup>[20-21]</sup>。结果表明,AGEs-BSA可显著增加RAGE蛋白表达。龙血竭及其活性成分龙血素A、龙血素B、龙血素C、龙血素D和白藜芦醇,均能够显著改善AGEs-BSA引起的RAGE蛋白表达异常升高的情况。有趣的是,7,4'-二羟基黄酮也可以一定程度降低AGEs-BSA引起的RAW264.7细胞中RAGE蛋白的表达,但是这种降低并未体现出统计学意义,这可能与7,4'-二羟基黄酮在龙血竭中的相对含量较低有关。

综上,本研究通过网络药理学、分子对接与细胞实验研究,发现龙血竭促进糖尿病足创面愈合的作用机制可能为调节AGE-RAGE信号通路,抑制RAGE蛋白的异常表达。本研究为龙血竭的进一步开发与临床合理应用提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] ZHOU M G, WANG H D, ZENG X Y, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990—2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *The Lancet*, 2019, 394(10204):1145-1158.
- [2] ARMSTRONG D G, TAN T W, BOULTON A J M, et al. Diabetic foot ulcers: a review[J]. *JAMA*, 2023, 330(1):62-75.
- [3] FU X B. Wound healing center establishment and new technology application in improving the wound healing quality in China [J]. *Burns & Trauma*, 2020, 8:38.
- [4] HICKS C W, SELVARAJAH S, MATHIOUDAKIS N, et al. Burden of infected diabetic foot ulcers on hospital admissions and costs[J]. *Annals of Vascular Surgery*, 2016, 33:149-158.
- [5] ARMSTRONG D G, BOULTON A J M, BUS S A. Diabetic foot ulcers and their recurrence[J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 376(24):2367-2375.
- [6] SORG H, TILKORN D J, HAGER S, et al. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts[J]. *European Surgical Research Europäische Chirurgische Forschung Recherches Chirurgicales Europeennes*, 2017, 58(1/2):81-94.
- [7] BURGESS J L, WYANT W A, ABDO ABUJAMRA B, et al. Diabetic wound-healing science[J]. *Medicina*, 2021, 57(10):1072.
- [8] CHANG M, NGUYEN T T. Strategy for treatment of infected diabetic foot ulcers[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(5):1080-1093.
- [9] 杨敏,杨瑞,覃彬华,等. 民族药龙血竭研究进展[J]. *海峡药学*, 2019, 31(11):49-52.  
YANG Min, YANG Rui, QIN Binhua, et al. Research progress of dragon's blood, a national medicine[J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2019, 31(11):49-52.
- [10] 孙晶,庞道然,郑姣,等. 龙血竭的药理、临床及质量控制研究进展[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2017, 17(11):1445-1447.

- SUN Jing, PANG Daoran, ZHENG Jiao, et al. Research progress in pharmacology, clinic and quality control of Resina Draconis[J]. Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China, 2017, 17(11):1445-1447.
- [11] FAN J Y, YI T, SZE-TO C M, et al. A systematic review of the botanical, phytochemical and pharmacological profile of *Dracaena cochinchinensis*, a plant source of the ethnomedicine "dragon's blood"[J]. *Molecules*, 2014, 19(7):10650-10669.
- [12] 牟蕾,李秀萍. 龙血竭胶囊治疗糖尿病足溃疡病人的临床研究[J]. 双足与保健, 2019, 28(13):3-4.
- MU Lei, LI Xiuping. Clinical study of dragon blood dragon capsule in the treatment of diabetic foot ulcer patients[J]. *Biped and Health*, 2019, 28(13):3-4.
- [13] 孟庆元,林炜栋,陈向芳. AGE-RAGE系统与糖尿病足综合症的发病机制及治疗进展[J]. 药学服务与研究, 2009, 9(2):118-121.
- MENG Qingyuan, LIN Weidong, CHEN Xiangfang. The relationship between AGE-RAGE system and pathogenesis of diabetic foot syndrome, and advance on treatment[J]. *Pharmaceutical Care and Research*, 2009, 9(2):118-121.
- [14] BOEZIO B, AUDOUZE K, DUCROT P, et al. Network-based approaches in pharmacology[J]. *Molecular Informatics*, 2017, 36(10):28692140.
- [15] 廖韵诺,赵凯丽,郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战[J]. 中草药, 2024, 55(12):4204-4213.
- LIAO Yunuo, ZHAO Kaili, GUO Hongwei. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2024, 55(12):4204-4213.
- [16] 林炜栋,陆树良,青春. 糖尿病难愈创面与晚期糖基化终末产物的关系[J]. 中国临床康复, 2003, 7(17):2491-2493.
- LIN Weidong, LU Shuliang, QING Chun. The relation between impaired wound healing and advanced glycation end products[J]. *Modern Rehabilitation*, 2003, 7(17):2491-2493.
- [17] LITWINOFF E, HURTADO DEL POZO C, RAMASAMY R, et al. Emerging targets for therapeutic development in diabetes and its complications: the RAGE signaling pathway[J]. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2015, 98(2):135-144.
- [18] TAKAHASHI H K, MORI S J, WAKE H, et al. Advanced glycation end products subspecies-selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2009, 330(1):89-98.
- [19] WANG Q, ZHU G Y, CAO X Z, et al. Blocking AGE-RAGE signaling improved functional disorders of macrophages in diabetic wound[J]. *Journal of Diabetes Research*, 2017, 2017:1428537.
- [20] TWARDA-CLAPA A, OLCZAK A, BIAŁKOWSKA A M, et al. Advanced glycation end-products (AGEs): formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs[J]. *Cells*, 2022, 11(8):1312.
- [21] WU J T, TU M C, ZHUNG P. Advanced glycation end product (AGE): characterization of the products from the reaction between D-glucose and serum albumin[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1996, 10(1):21-34.

(编辑:胡春燕)

(上接第30页)

- [16] DE BOER T, BRUINVELS J. Assay and properties of 4-aminobutyric-2-oxoglutaric acid transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase in rat brain tissue[J]. *Journal of Neurochemistry*, 1977, 28(3):471-478.
- [17] 李碧,方雄,龚晏,等.  $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶抑制剂筛选方法的建立及其在天麻成分筛选中的应用[J]. 中草药, 2016, 47(3):454-458.
- LI Bi, FANG Xiong, GONG Yan, et al. Establishment of screening method for  $\gamma$ -aminobutyric acid transaminase inhibitor and its application in screening constituents in *Gastrodiae Rhizoma*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016, 47(3):454-458.
- [18] 阿布都艾则孜·艾尔肯,阿丽亚·依拉木,艾尔菲丁·阿尼娃尔,等. 没食子温敏原位凝胶质量标准研究[J]. 医药导报, 2022, 41(8):1187-1192.
- ARKIN Abdulaziz, ELHAM Aliya, ANWAR Arfidin, et al. Study on the quality standard of thermosensitive in situ gel of *quercus infectoria* galls[J]. *Herald of Medicine*, 2022, 41(8):1187-1192.
- [19] KOURDOUGLI N, PELLEGRINO C, RENKO J M, et al. Depolarizing  $\gamma$ -aminobutyric acid contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy[J]. *Annals of Neurology*, 2017, 81(2):251-265.
- [20] LIU M Q, WANG T, WANG Q L, et al. Structure-guided discovery of food-derived GABA-T inhibitors as hunters for anti-anxiety compounds[J]. *Food & Function*, 2022, 13(24):12674-12685.

(编辑:胡春燕)