

NGHIÊN CỨU *IN SILICO* CƠ CHẾ TÁC DỤNG CỦA *VERNONIA AMYGDALINA*
TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYP 2

Nguyễn Thụy Việt Phương^{1*}, Hồ Ngọc Khánh Phương¹

Tóm tắt

Mục tiêu: Khám phá cơ chế tác dụng của các chất trong cây lá đắng - *Vernonia Amygdalina* (VA) Asteraceae trên bệnh đái tháo đường typ 2 (ĐTĐ T2) ở cấp độ phân tử. **Phương pháp nghiên cứu:** Sử dụng kỹ thuật mô phỏng trên máy tính (*in silico*) gồm dược lý nổi mạng (network pharmacology) và gắn kết phân tử (molecular docking) để dự đoán cơ chế thông qua xác định các đích tác động cho các chất của VA trên ĐTĐ T2. Hệ thống gồm mạng hợp chất - đích tác động, tương tác giữa protein-protein, đích tác động quan trọng - con đường sinh hóa được xây dựng sử dụng Cytoscape 3.9.0. Gắn kết phân tử (sử dụng Autodock Vina 1.1.2) xác định được các đích tác động và các chất tiềm năng. **Kết quả:** Cơ chế tăng nhạy cảm với insulin được đề xuất là cơ chế chính của VA trên ĐTĐ T2. Các chất tiềm năng được xác định như P1 (luteolin), P5 (scutellarein), P15 (6,8-diprenylnaringenin), P16 (eriodictyol), P25 (ononin) và T20 (aglycon của vernoniamyosid D) tác động trên 5 mục tiêu tiềm năng (EP300, EGFR, MAPK8, SRC, TNF α). **Kết luận:** Thông qua dược lý nổi mạng và gắn kết phân tử, cơ chế tăng nhạy cảm với insulin được đề xuất là cơ chế tác dụng chính của VA trên ĐTĐ T2.

Từ khóa: *In silico*; *Vernonia amygdalina* Asteraceae; Đái tháo đường typ 2; Dược lý nổi mạng; Gắn kết phân tử; Cơ chế phân tử.

**IN SILICO STUDY ON THE MECHANISM OF ACTION
OF *VERNONIA AMYGDALINA* ASTERACEAE IN TREATING TYPE 2 DIABETES**

Abstract

Objectives: To explore the mechanism of action of *Vernonia Amygdalina* (VA) Asteraceae at an atomic level. **Methods:** *In silico* techniques, including network

¹Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Thụy Việt Phương (ntvphuong@ump.edu.vn)

Ngày nhận bài: 03/10/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 03/12/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i1.543>

pharmacology and molecular docking, were used to predict the molecular mechanism of VA by identifying potential therapeutic targets of VA in diabetes. The important network, consisting of the compound - target network, protein-protein interaction network, and hub target-pathway network, was developed using Cytoscape 3.9.0. Molecular docking using Autodock Vina 1.1.2 was conducted to identify the potential targets and compounds of VA related to the anti-diabetes bioactivity of VA. **Results:** Insulin resistance was explored as the main mechanism of anti-diabetes of VA. The potential compounds including P1 (luteolin), P5 (scutellarein), P15 (6.8-diprenylnaringenin), P16 (eriodictyol), P25 (ononin), T20 (aglycon của vernoniomyosid D) and five molecular targets (EP300, EGFR, MAPK8, SRC, TNF α) were identified. **Conclusion:** Through network pharmacology and molecular docking, insulin sensitivity was considered the main molecular mechanism of VA against type 2 diabetes.

Keywords: *In silico*; *Vernonia amygdalina* Asteraceae; Type 2 diabetes; Network pharmacology; Molecular docking; Molecular mechanism.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lá đắng *Vernonia amygdalina* Asteraceae đã được chứng minh là dược liệu tiềm năng trong điều trị bệnh ĐTD T2. Các nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh dịch chiết nước VA có khả năng giảm đường huyết lúc đói từ 520mg% còn 300mg% tương đương với tolbutamid [1]. Nghiên cứu khác cũng cho kết quả dịch chiết nước của VA giảm đáng kể đường huyết lúc đói từ 520,00 \pm 7,80 mg/dL còn 150,00 \pm 2,16 mg/dL, tương đương với glibenclamid [2]. Tại Việt Nam, thử nghiệm *in vitro* cho thấy cao ethanol của VA ức chế α -glucosidase (IC₅₀ = 480 μ g/mL) [3]. Trên bệnh nhân ĐTD T2, cao lỏng chiết nước từ lá VA giảm đường huyết sau ăn (AUC giảm 74,43 \pm 109,52) nhưng không gây hạ đường

huyết trầm trọng [4]. Tuy nhiên, cơ chế tác dụng trên bệnh ĐTD T2 của VA vẫn chưa được đánh giá toàn diện và hệ thống ở cấp độ phân tử.

Hiểu rõ cơ chế, tác động hiệp đồng của hợp chất để sử dụng hiệu quả dược liệu và bài thuốc cổ truyền có tầm quan trọng lớn trong nghiên cứu thuốc mới [6]. Trong đó, hai kỹ thuật là phương pháp dược lý nối mạng và gắn kết phân tử đã trở thành giải pháp giúp đánh giá toàn diện mối liên quan của dược liệu với mục tiêu trên những bệnh đa cơ chế thông qua thiết lập một mạng lưới “hợp chất - protein/gen - bệnh” [5]. Ví dụ: Các nghiên cứu liên quan như hạt chùm ngây (*Moringa oleifera*) đã phát hiện glycosidic isothiocyanate và glycosidic benzylamine là những hợp chất chính giúp cải thiện kháng insulin

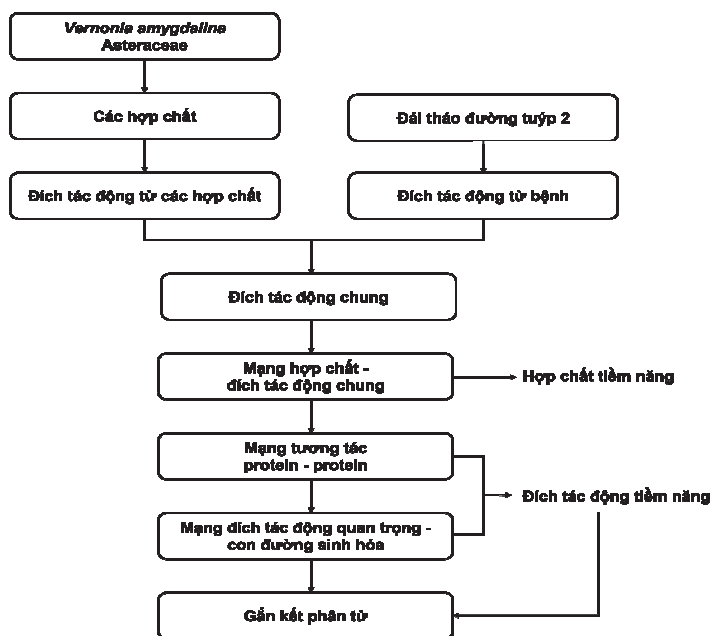
bằng cách tác động lên SRC, PTPN1 và CASP3 [6]. Bài thuốc LiuWei DiHuang với 6 dược liệu đã xác định 10 hợp chất có liên quan đến chống viêm, chống stress oxy hóa và giảm tổn thương tế bào β , thông qua con đường tín hiệu AGE - RAGE, con đường tín hiệu TNF và con đường tín hiệu NF - kappa B [7].

Do đó, nhằm áp dụng các kỹ thuật hiện đại này, mục tiêu của nghiên cứu

nhằm: *Khám phá cơ chế tác dụng của VA trên bệnh ĐTD T2 ở cấp độ phân tử thông qua mô phỏng máy tính. Các đích tác động của VA trên bệnh ĐTD T2 được dự đoán. Các mạng hợp chất - đích tác động điều trị ĐTD T2 của VA được xây dựng và thông qua gắn kết của hợp chất và đích tác động tiềm năng để xác định cơ chế chính cũng như các chất tiềm năng trong VA có tác dụng trên bệnh ĐTD T2.*

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thiết kế nghiên cứu



Hình 1. Các giai đoạn nghiên cứu.

* Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2. Cơ sở dữ liệu trực tuyến xây dựng đích tác động

Cơ sở dữ liệu trực tuyến cho dự đoán đích tác động của hợp chất là STITCH (<http://stitch.embl.de>), SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch>), PharmMapper (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper>). Dự đoán các đích tác động liên quan đến bệnh ĐTĐ T2 sử dụng cơ sở dữ liệu là GeneCard (<http://genecards.org>), Therapeutic Target Database (<http://db.idrblab.net/ttd>), OMIM (<http://omim.org>), và DrugBank (<http://go.drugbank.com>).

3. Dược lý nổi mạng

Dược lý nổi mạng bao gồm các giai đoạn chính: Dự đoán đích tác động; xây dựng mạng hợp chất - đích tác động để tìm chất và các đích tác động tiềm năng.

Dự đoán đích tác động của các hợp chất có trong VA trên ĐTĐ T2: Các chất chiết xuất trong lá VA được thu thập gồm 70 triterpenoid, 67 polyphenol, 14 sesquiterpen lacton, 7 hợp chất chứa mạch carbon dài và 1 diterpen. Đối với các chất có khung glycosid, các aglycon cũng được thêm vào cơ sở dữ liệu vì ở đường tiêu hóa, các glycosid bị thủy phân thành aglycon và hấp thu vào máu. Cấu trúc của các chất được tìm trên PubChem

(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), nếu không tìm thấy trên PubChem thì có thể vẽ bằng ChemDraw 19.0 (98 cấu trúc) và sau đó loại trùng lặp. Công cụ SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) được sử dụng để chọn các hợp chất có sinh khả dụng đường uống tốt.

Dự đoán đích tác động của VA trên bệnh ĐTĐ T2: Giản đồ Venn (<http://bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn>) là các đích tác động chung hoặc đích tác động của VA trên ĐTĐ T2 được nhận dạng.

Xây dựng mạng hợp chất - đích tác động:

- Mạng hợp chất - đích tác động: Sử dụng Cytoscape 3.9.0 và Network Analysis tích hợp sẵn trong Cytoscape giúp phân tích các thông số mạng.

- Mạng tương tác protein - protein: Sử dụng STRING (<http://string-db.org>).

- Mạng đích tác động quan trọng - con đường sinh hóa: Công cụ DAVID (<http://david.ncifcrf.gov>) được sử dụng để phân tích GO và KEGG (<http://kegg.jp/kegg/pathway.html>).

4. Gắn kết phân tử

Gắn kết phân tử được thực hiện bằng phần mềm Autodock Vina 1.1.2 [8]. Đích tác động tiềm năng ở dạng phức hợp được tìm kiếm sử dụng mã

Uniprot trên ngân hàng dữ liệu PDB (<http://www.rcsb.org>). Protein và ligand đồng kết tinh được tách riêng sử dụng Discovery Studio 2016 (file pdb): Protein được thêm hydro (file pdbqt) bằng AutoDock tool 1.5.6; ligand được tải từ PubChem hoặc vẽ và tối thiểu hóa năng lượng bằng phần mềm Chem3D 19.0 (file pdb). Dùng AutodockTools 1.5.6 để chuyển thành tập .pdbqt. Thông số gắn kết (file txt) bao gồm tọa độ khoang gắn kết (grid box) với khoảng cách không gian là 1Å, số cấu dạng tối đa là 8. Kết quả đánh giá dựa trên khả năng gắn, ái lực gắn (kcal.mol^{-1}) và tương tác với các acid amin quan trọng trong khoang. Đồng thời, giá trị độ lệch RMSD (root-mean-square-deviation) của phối tử trước và sau quá trình gắn được dùng để đánh giá tính tương thích và sự phù hợp của phần mềm sau quá trình tái gắn kết: Nếu $\text{RMSD} \leq 2\text{Å}$ thì phần mềm sử dụng là phù hợp.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Dự đoán đích tác động của các hợp chất trong VA trên ĐTĐ T2

Vì dạng thuốc đường uống tiện lợi, dễ sử dụng và an toàn; do đó, nghiên cứu đã thực hiện sàng lọc các chất sử dụng theo đường uống. Từ 159 hợp

chất có trong VA qua sàng lọc, kết quả thu được 91 hợp chất có sinh khả dụng đường uống tốt. Dựa vào tương đồng cấu trúc, 91 hợp chất được phân thành 4 nhóm chính là nhóm P, T, S và C: Nhóm P gồm 36 polyphenol, trong đó có 2 coumarin, 5 acid phenolic, 29 flavonoid (9 flavon, 5 flavonol, 7 isoflavon, 7 flavanon, 1 chalcon); nhóm T gồm 34 hợp chất là phần aglycon của các hợp chất nhóm cấu trúc saponin trong VA, trong đó có 33 steroid, 1 hợp chất triterpenoid; nhóm S gồm 15 hợp chất với 14 sesquiterpen lacton và 1 diterpen; nhóm C gồm 6 hợp chất với cấu trúc chứa các mạch carbon dài.

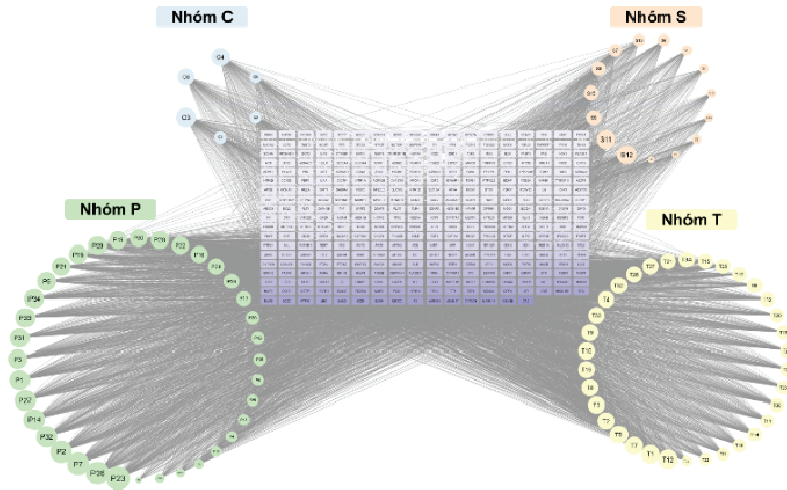
Dự đoán đích tác động của VA: Từ 91 hợp chất dự đoán được 1.207 đích tác động.

Tìm kiếm đích tác động điều trị ĐTĐ T2: Đích tác động điều trị ĐTĐ T2 được tìm kiếm trên 4 cơ sở dữ liệu, sau khi loại trùng lặp, thu được 1.095 đích tác động.

Đích tác động của VA trên bệnh ĐTĐ T2: Bảng giản đồ Venn, 339 đích tác động chung được xác định ở phần giao nhau của hai tập dữ liệu là đích tác động của các hợp chất trong VA trên ĐTĐ T2.

2. Mạng dược lý hợp chất - đích tác động

Mạng hợp chất - đích tác động của VA trên ĐTĐ T2 được xây dựng với 91 hợp chất và 339 đích tác động chung (Hình 2).

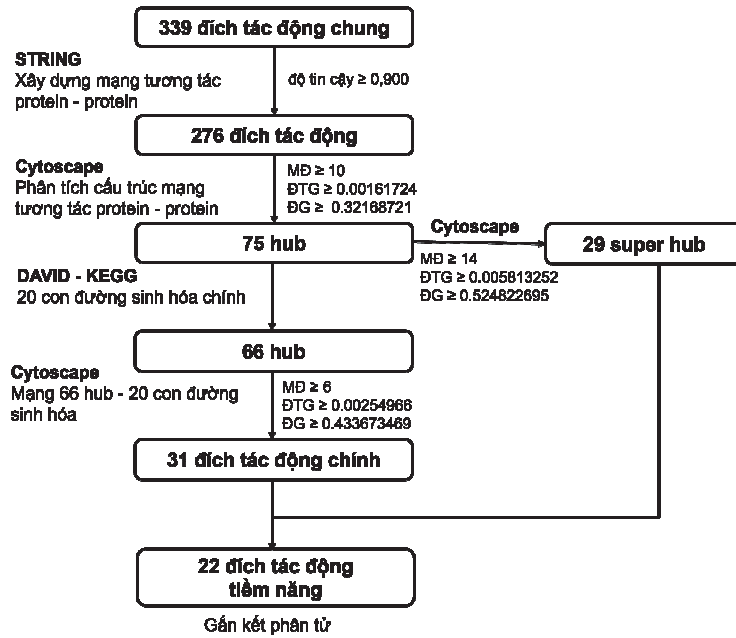


Hình 2. Mạng hợp chất - đích tác động của VA trên ĐTĐ T2.

Trong đó, các hợp chất (hình tròn) có kích thước lớn dần theo mức độ tăng dần, liên quan đến càng nhiều đích tác động. Đích tác động (hình chữ nhật) có màu đậm dần theo mức độ tăng dần, liên quan đến càng nhiều hợp chất.

Từ 339 đích tác động trên, qua quá trình phân tích cấu trúc mạng tương tác protein - protein đã tìm ra được những mục tiêu tiềm năng của VA trên ĐTĐ T2 (Hình 3) dựa trên các tiêu chí đánh giá. Kết quả đã xác định được 32 hợp chất, 22 đích tác động tiềm năng, 5 con

đường sinh hóa giải thích cơ chế tác dụng của VA trên ĐTĐ T2. Trong đó, 22 đích tác động tiềm năng được xác định, gồm PIK3R1, AKT1, PIK3CA, MAPK1, RELA, NFKB1, STAT3, MTOR, IL6, MAPK8, EGFR, NFKBIA, TP53, RPS6KB1, SRC, STAT1, VEGFA, TNF α , FOXO1, EP300, IGF1, RHOA. Đồng thời, 5 con đường sinh hóa liên quan đến ĐTĐ T2 là đề kháng insulin, béo phì - xơ vữa, con đường tín hiệu PIK3 - AKT, con đường tín hiệu AGE-RAGE trong biến chứng ĐTĐ, con đường tín hiệu HIF-1.



Hình 3. Kết quả tìm kiếm mục tiêu tiềm năng từ 339 đích tác động của VA trên ĐTD T2.

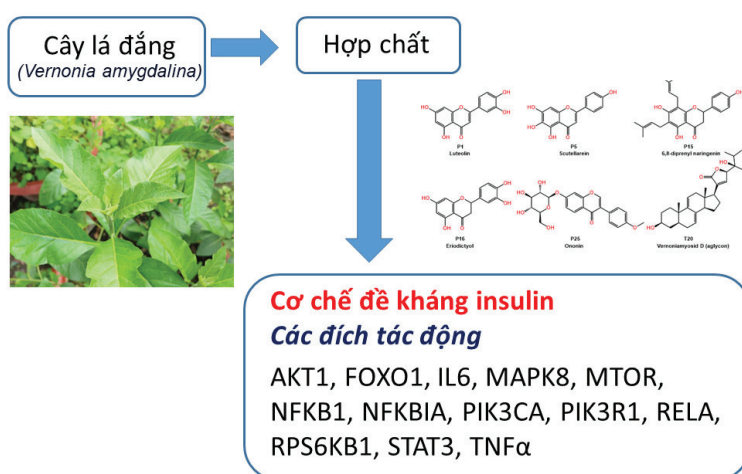
Mức độ (MĐ), độ trung gian (ĐTĐG), độ gần (ĐG).

Dựa trên phân tích KEGG, đề kháng insulin có thể là cơ chế tác dụng chính của VA trên ĐTD T2 vì có giá trị p thấp nhất ($5,97.10^{-28}$). Trong đó, AKT1, FOXO1, IL6, MAPK8, MTOR, NFKB1, NFKBIA, PIK3CA, PIK3R1, RELA, RPS6KB1, STAT3, TNF α là những đích tác động liên quan đến con đường tăng nhạy cảm với insulin (Hình 4). Đối chiếu với các nghiên cứu trước đó cho thấy VA làm giảm sản xuất glucose thông qua ức chế hai enzym PIK3 và FOXO1 [9]. PIK3 giúp hoạt hóa AKT có thể tăng tổng hợp glycogen thông qua điều chỉnh glycogen synthase kinase 3

(GSK3), glucose transporter 4 (GLUT4) để chuyển hóa glucose, trong khi FOXO1 là yếu tố phiên mã ở tế bào β tụy, liên quan đến tăng biểu hiện enzyme tổng hợp glucose [9]. Viêm là một trong những nguyên nhân dẫn đến đề kháng insulin thông qua tăng phosphoryl hóa serin. Nuclear factor kappa B (NFKB) là yếu tố chính liên quan đến các con đường truyền tín hiệu viêm, cũng như đóng vai trò quan trọng trong việc kích hoạt và điều chỉnh các yếu tố gây viêm. Như vậy, tác động của các mục tiêu trên có thể góp phần giải thích cho việc đề xuất VA có thể làm tăng nhạy

cảm với insulin. Một số con đường sinh hóa khác cũng liên quan đến đề kháng insulin như con đường PIK3 - AKT liên quan đến điều hòa đường huyết của insulin, béo phì và xơ vữa liên quan đến tích tụ lipid làm tăng mức diacylglycerol trong mô, dẫn đến

kích hoạt các thành viên của protein kinase C trong gan, dẫn đến ức chế quá trình truyền tín hiệu insulin, gây ra đề kháng insulin; hoạt hóa EP300 dẫn đến khả năng acetyl hóa IRS, giảm liên kết của thụ thể insulin với tiểu đơn vị β làm gián đoạn tín hiệu insulin.



Hình 4. Mô tả cơ chế tác dụng của cây lá đắng VA theo các đích tác dụng trong cơ chế đề kháng insulin.

3. Gắn kết phân tử

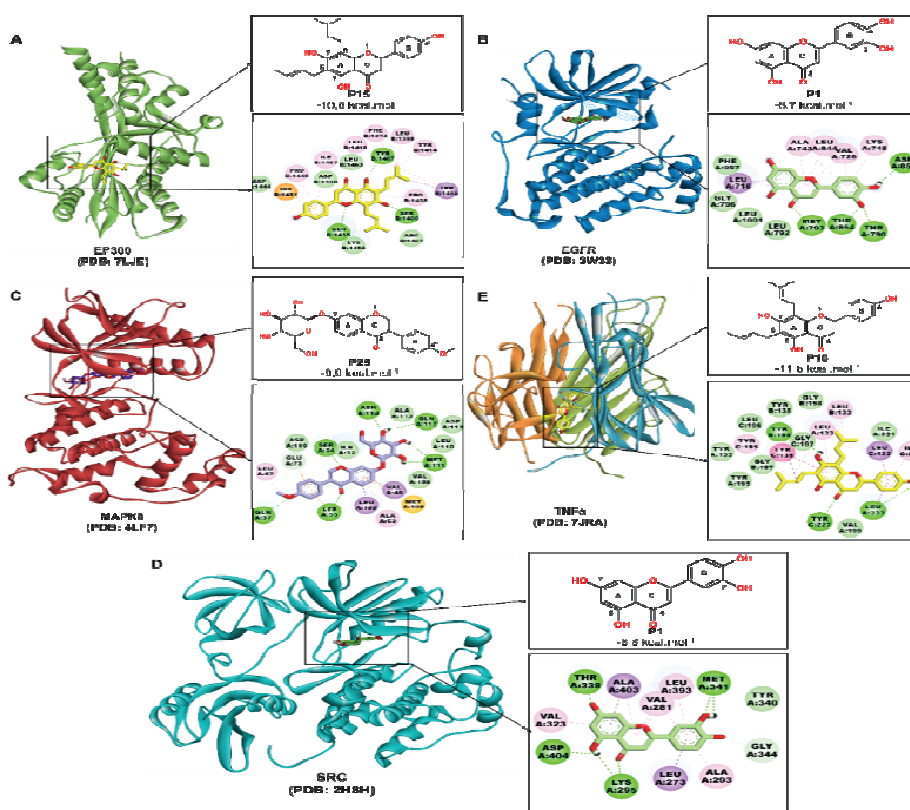
Nghiên cứu đã thực hiện gắn kết phân tử cho 91 hợp chất và 14 đích tác động bao gồm AKT1 (PDB: 4GV1), EGFR (PDB: 3W33), EP300 (PDB: 7LJE), IL6 (PDB: 1ALU), MAPK1 (PDB: 6SLG), MAPK8 (PDB: 4LF7), MTOR (PDB: 4JSX), PIK3CA (PDB: 4JPS), RHOA (PDB: 5JHH), RPS6KB1 (PDB: 4L46), SRC (PDB: 2H8H), STAT3 (PDB: 6NUQ), TNF α

(PDB: 7JRA), TP53 (PDB: 5AB9). Quá trình tái gắn kết cho thấy tính tương thích và sự phù hợp của phần mềm sau quá trình gắn với cấu trúc các đích tác động (các ligand đồng kết tinh có ái lực gắn từ khá đến rất tốt (-6,6 kcal.mol⁻¹ đến -13,9 kcal.mol⁻¹) với giá trị RMSD $\leq 2\text{\AA}$).

Kết quả gắn kết phân tử cho thấy 91 hợp chất có trong VA đều gắn được vào khoang gắn kết của 14 đích tác

động với ái lực gắn từ $-11,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ đến $-2,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Quá trình gắn kết đã giúp xác minh và cải thiện sự chính xác của dược lý nổi mạng thông qua loại bỏ những hợp chất có giá trị mức độ cao nhưng không có khả năng gắn kết với đích tác động tiềm năng trong mạng hợp chất - đích tác động.

Một số phức hợp ligand - protein tiềm năng tạo được những liên kết hydro, liên kết kỵ nước quan trọng để quyết định hoạt tính, như P15 - EP300 ($-10,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$), P1 - EGFR ($-8,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$), P25 - MAPK8 ($-9,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$), P1 - SRC ($-8,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$), P15 - TNF α ($-11,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$) (Hình 5).



Hình 5. Những phức hợp protein - ligand có ái lực gắn tốt: (A) EP300 - P15, (B) EGFR - P1, (C) MAPK8 - P25, (D) SRC - P1, (E) TNF α - P15.

(Nét xanh lá: Liên kết hydro, nét tím: Liên kết π - σ , nét hồng đậm: Liên kết π - π , nét hồng nhạt: Liên kết alkyl, π -alkyl, nét cam đậm: Liên kết π -cation, nét cam nhạt: Liên kết π -sulfur).

Trong đó, P1, P5, P15, P16, P25, T20 là những chất ái lực cao trên nhiều đích tác động nhất (10/14 đích tác động). Các chất trong nhóm P đều có khung flavonoid (với cấu trúc C6-C3-C6) dài hơn so với cấu trúc C6-C3 trong coumarin và acid phenolic nên flavonoid có thể tiếp cận được các acid amin quan trọng để hình thành liên kết hydro và liên kết kỵ nước, từ đó gắn tốt hơn các coumarin và acid phenolic. Trong các đích tác động tiềm năng, EP300 là đích tác động nổi bật vì cho khả năng gắn kết với đa số hợp chất (73/91 hợp chất, chiếm 80% chất gắn tổ với ái lực $\leq -8,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$).

BÀN LUẬN

Việc xác định cơ chế phân tử để tìm hiểu và nghiên cứu tìm kiếm các chất tiềm năng từ hiệu quả của cây lá đắng VA trong điều trị ĐTĐ T2 là rất cần thiết, mở ra các nghiên cứu sâu hơn về các hợp chất có trong VA nhằm tăng hoạt tính sinh học, giảm độc tính, tăng các tính chất dược động học của các thuốc có sử dụng thành phần dược liệu này. Phương pháp dược lý nổi mạng là một kỹ thuật máy tính hiện đại, trong đó, các yếu tố liên quan đến bệnh ĐTĐ T2 và các hợp chất trong VA được quan tâm. Kết quả xác định được từ 339 đích tác động và 91 chất, thu được

32 hợp chất, 22 đích tác động tiềm năng và 5 con đường sinh hóa liên quan giữa VA và ĐTĐ T2. Trong đó, tăng nhạy cảm với insulin có thể là cơ chế tác dụng chính của VA trên ĐTĐ T2, bên cạnh các cơ chế khác như con đường tín hiệu PIK3 - AKT, HIF-1, béo phì - xơ vữa, AGE-RAGE trong biến chứng ĐTĐ.

Nghiên cứu cũng đã sử dụng kỹ thuật mô phỏng việc gắn kết và tương tác là phương pháp được sử dụng phổ biến hiện nay để xác định các cấu trúc được cho là có hoạt tính sinh học cao. Kết quả đã giúp nhận dạng P1, P5, P15, P16, P25, T20 là những chất có khả năng gắn kết cao với 10/14 đích tác động. Kết hợp dược lý nổi mạng và gắn kết phân tử đã xác nhận các hợp chất này, đặc biệt là các flavonoid là những hợp chất chính của VA cho tác dụng cải thiện ĐTĐ T2. Điều này gợi ý flavonoid là các chất tiềm năng lớn cho tác dụng trên bệnh ĐTĐ. Đối chiếu với các nghiên cứu đã công bố cho thấy trên mô hình *in vivo*, các dịch chiết giàu flavonoid có khả năng giảm đường huyết tốt, hiệu quả tương đương hay có thể tốt hơn so với insulin [10]. Như vậy, nghiên cứu đã xác định P1 (luteolin), P5 (scutellarein), P15 (6,8-diprenyl naringenin), P16 (eriodictyol),

P25 (ononin), T20 (aglycon của vernoniamyosid D) là những hợp chất chính của VA cho tác dụng cải thiện ĐTĐ T2 thông qua tác động lên 5 mục tiêu tiềm năng (EP300, EGFR, MAPK8, SRC, TNF α). Nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo như tiền lâm sàng và lâm sàng bệnh ĐTĐ T2.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật *in silico* là dược lý nổi mạng và gắn kết phân tử để dự đoán được 32 hợp chất, 22 đích tác động tiềm năng và 5 con đường sinh hóa của VA liên quan đến tác dụng điều trị ĐTĐ T2. Trong đó, các hợp chất chính của VA được xác định cho tác dụng cải thiện ĐTĐ T2 thông qua cơ chế đề xuất là tăng nhạy cảm với insulin bao gồm P1 (luteolin), P5 (scutellarein), P15 (6,8-diprenyl naringenin), P16 (eriodictyol), P25 (ononin), T20 (aglycon của vernoniamyosid D) tác động lên 5 mục tiêu tiềm năng (EP300, EGFR, MAPK8, SRC, TNF α).

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ của Bộ môn Công nghệ thông tin Dược, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Chúng tôi xin cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akah P, Okafor C. Blood sugar lowering effect of Vernonia amygdalina Del, in an experimental rabbit model. *Phytotherapy research*. 1992; 6(3):171-173. DOI:10.1002/ptr.2650060318
2. Aba PE, Udechukwu IR. Comparative hypoglycemic potentials and phytochemical profiles of 12 common leafy culinary vegetables consumed in Nsukka, Southeastern Nigeria. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2018; 29(4):313-320. DOI:10.1515/jbcpp-2017-0134
3. Nguyễn Thị Chi, Phạm Việt Trang, Lê Xuân Tiến, Nguyễn Văn Thanh. Nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa và ức chế enzym α -glucosidase của cao chiết từ lá cây lá đắng (Vernonia amygdalina Del.), họ Cúc (Asteraceae). *Tạp chí Dược học*. 2018; 507:25-29.
4. Nguyễn Văn Đoàn, Nguyễn Thị Nguyên Sinh, Bùi Chí Bảo, Trịnh Thị Diệu Thường. Bước đầu đánh giá hiệu quả giảm đường huyết sau ăn trên người bệnh đái tháo đường tít 2 của bài thuốc nam sưu tầm trên địa bàn tỉnh Sóc Trăng. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2018; 22(3):417.
5. Zhang R, Zhu X, Bai H, Ning K. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: Review and assessment. *Frontiers in Pharmacology*. 2019; 10:123. DOI:10.3389/fphar.201

6. Huang Q, Liu R, Liu J, et al. Integrated network pharmacology analysis and experimental validation to reveal the mechanism of anti-insulin resistance effects of *Moringa oleifera* seeds. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020; 14:4069. DOI:10.2147/DDDT.S265198
7. He D, Huang J-H, Zhang Z-Y, et al. A network pharmacology-based strategy for predicting active ingredients and potential targets of LiuWei DiHuang pill in treating type 2 diabetes mellitus. *Drug Design, Development and Therapy*. 2019; 13:3989. DOI:10.2147/DDDT.S216644
8. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010; 31(2):455-461. DOI:10.1002/jcc.21334
9. Wu X-m, Ren T, Liu J-F, et al. *Vernonia amygdalina* Delile extract inhibits the hepatic gluconeogenesis through the activation of adenosine-5' monophosph kinase. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018;103:1384-1391. DOI:10.1016/j.biopha.2018.04.135
10. Ugoanyanwu FO, Mgbeje BI, Igile GO, Ebong PE. The flavonoid-rich fraction of *Vernonia amygdalina* leaf extract reversed diabetes-induced hyperglycemia and pancreatic beta cell damage in albino wistar rats. *World J Pharm Pharm Sci* [Internet]. 2015; 4(10):1788-802.