

基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎的作用机制

赵瑞生¹, 周霖^{2,3*}, 曹桂萌⁴

1. 新乡医学院第一附属医院 临床药学部, 河南 新乡 453100

2. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

3. 中南大学 资源加工与生物工程学院, 湖南 长沙 410083

4. 南阳医学高等专科学校 国际教育学院, 河南 南阳 473000

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎的作用机制。 **方法** 基于前期表征的肾康注射液的主要化学成分、文献中报道的定量成分、药典中含量测定的成分及 TCMSP 数据库筛选活性成分, 以 Swiss TargetPrediction 在线网站为主, 以 PharmMapper 在线网站为辅获得各活性成分的作用靶点, 并与通过文献挖掘及多种数据库查找的慢性肾小球肾炎相关靶点进行对比, 得到肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎的关键靶点, 借助 Metascape 在线网站对得到的关键靶点进行基因本体 (GO) 富集分析和京都基因和基因百科全书 (KEGG) 通路注释分析, 并进行分子对接和动物实验验证。 **结果** 共筛选到 17 个肾康注射液主要活性成分 (芦荟大黄素、羟基红花黄色素 A、大黄素甲醚、山柰酚等), 对应 568 个靶点, 活性成分靶点与疾病靶点取交集得到关键靶点 112 个。这些成分主要作用于蛋白激酶 B1 (Akt1)、雌激素受体 1 (ESR1)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、白细胞介素 (IL)-2 等核心靶点, 涉及胞内磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) /Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等主要信号通路; 分子对接结果显示, 肾康注射液的主要活性成分与核心靶点都有较好的结合活性。动物实验结果表明, 与模型组相比, 肾康注射液各剂量组均可以改善大鼠的毛发、体质量和肾功能 ($P < 0.05$); 显著降低大鼠尿液样本中的尿蛋白、ACR 值, 血液样本中的肌酐、尿素氮含量, 大鼠肾组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6、IL-1 β 含量以及 Akt1、ESR1、MMP-9、IL-2 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。 **结论** 肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎主要作用于 Akt1、ESR1、MMP-9、IL-2 等靶点, 参与 PI3K/Akt、MAPK、TNF 等信号通路的调节, 体现了中药多成分、多靶点、多通路的协同作用特点。

关键词: 肾康注射液; 慢性肾小球肾炎; 网络药理学; 芦荟大黄素; 羟基红花黄色素 A; 大黄素甲醚; 山柰酚

中图分类号: R287.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2025)10-2456-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.10.006

Mechanism of Shenkang Injection in treatment of chronic glomerulonephritis based on network pharmacology, molecular docking, and experimental verification

ZHAO Ruisheng¹, ZHOU Lin^{2,3}, CAO Guimeng⁴

1. Department of Clinical Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China

2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

3. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China

4. School of International Education, Nanyang Medical College, Nanyang 473000, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanisms of Shenkang Injection in treatment of chronic glomerulonephritis by using network pharmacology, molecular docking and experimental validation. **Methods** The main chemical constituents of Shenkang Injection were identified based on previously observed components, literature-reported quantitative components and pharmacopoeia-determined content levels, and TCMSP database. The action targets of each active ingredient were obtained mainly through the Swiss TargetPrediction online website and supplemented by the PharmMapper online website. They were compared with the targets related

收稿日期: 2025-08-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82104515); 河南省高等学校重点科研项目 (26A360023); 河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20210283)

作者简介: 赵瑞生, 主管药师, 研究方向为临床药学。E-mail: 15037153092@163.com

*通信作者: 周霖, 副主任药师, 研究方向为药理学。E-mail: 524734490@qq.com

to chronic glomerulonephritis found through literature mining and multiple databases to obtain the key targets of Shenkang Injection in treatment of chronic glomerulonephritis. The key targets obtained were subjected to GO enrichment analysis and KEGG pathway annotation analysis through the Metascape online website, and molecular docking and animal experiments were conducted for verification. **Results** A total of 17 main active ingredients (aloe emodin, hydroxysafflower yellow pigment A, emodin methyl ether, kaempferol, etc) of Shenkang Injection were screened out, corresponding to 568 targets. By taking the intersection of the active ingredient targets and the disease targets, 112 key targets were obtained. These components mainly act on core targets such as Akt1, ESR1, MMP-9, and IL-2, involving major signaling pathways such as PI3K/Akt and MAPK. The results of molecular docking showed that the main active ingredients of Shenkang Injection all had good binding activity with the core targets. The results of animal experiments showed that compared with the model group, each dose group of Shenkang Injection could improve the hair, body weight and renal function of rats ($P < 0.05$), significantly reduced the values of urine protein and ACR in rat urine samples, the contents of creatinine and urea nitrogen in blood samples, the contents of TNF- α , IL-6, IL-1 β in rat renal tissues, and the protein expression levels of Akt1, ESR1, MMP-9, and IL-2 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Shenkang Injection in treatment of chronic glomerulonephritis mainly acts on targets such as Akt1, ESR1, MMP-9, and IL-2, and participates in the regulation of signaling pathways such as PI3K/Akt, MAPK, and TNF, demonstrating the collaborative characteristics of multi-component, multi-target, and multi-pathway effects of traditional Chinese medicine.

Key words: Shenkang Injection; chronic glomerulonephritis; network pharmacology; aloe emodin; hydroxysafflower yellow pigment A; emodin methyl ether; kaempferol

慢性肾小球肾炎是一种以蛋白尿、血尿、高血压及进行性肾功能减退为主要临床表现的常见肾脏疾病，其病理机制复杂，涉及免疫炎症反应、氧化应激及纤维化等多重因素。据统计，慢性肾小球肾炎在我国慢性肾脏病患者中占比为 30%~40%，且近年来其发病率呈现出逐渐上升的趋势。目前临床上对于慢性肾小球肾炎的治疗主要以控制血压、减少蛋白尿、抑制免疫炎症反应等为主，对于慢性肾小球肾炎的病理损伤修复和肾功能保护作用相对有限，无法从根本上阻止疾病的进展^[1]。肾康注射液作为一种中药复方制剂，针对慢性肾小球肾炎的“湿浊血瘀”核心病机，由丹参、红花、黄芪、大黄等中药组成，具有活血化瘀、益气养阴、通腑泄浊等功效^[2]。肾康注射液在临床应用广泛，已有研究表明，肾康注射液中的多种成分能够通过抑制炎症反应、改善肾脏微循环、抑制肾纤维化、调节免疫功能等多种途径发挥肾脏保护作用^[3]。

网络药理学是从药物、成分、靶点与疾病间相互作用的整体性和系统性出发，从而更加全方位地阐明药物的作用机制，广泛用于医学领域。本研究旨在通过网络药理学和动物实验结合^[4]，系统评价肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎的药效及作用机制，为肾康注射液在慢性肾小球肾炎治疗中的临床应用提供更多科学的依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只，体质量 (200 ± 20) g，

购自河南省实验动物中心，动物生产许可证号 SCXK (豫) 2024-0001，合格证号 4110062311。动物实验方案经郑州大学第一附属医院伦理委员会批准 (审批号 2023-KY-0543)。

1.2 药品与试剂

肾康注射液 (西安世纪盛康药业有限公司，规格 20 mL/支，批号 202109111)，阿霉素 (凯立德生物医药，质量分数 98.2%，批号 2531640)；大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 试剂盒 (批号 23090735N)、白细胞介素 (IL)-6 试剂盒 (批号 23090737N)、IL-1 β 试剂盒 (批号 23090739N) 购自上海科兴生物技术有限公司；蛋白激酶 B (Akt1, 批号 YT891)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9) (批号 YT891)、雌激素受体 1 (ESR1, 批号 YT891)、IL-2 (批号 YT891) 抗体购自西安百萤生物科技有限公司。

1.3 仪器

FA10004B 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司)；KQ-250DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)；TL2010S 型高通量组织研磨仪 (北京鼎昊源科技有限公司)；ELX808TM 型酶标仪 (美国博腾公司)；04/BR186039 型电泳仪、电转槽 (美国 BIO-RAD 公司)；TE300 型荧光显微镜 (日本 Nikon 公司)、ECLPSE80i 型光学显微镜 (日本 Nikon 公司)；SOPTOPICX4I 型倒置显微镜 (上海普赫光电科技有限公司)；SW-CJ-2D 型超净工作台 (苏州净化科技有限公司)；HV8-85 型高压灭菌锅 (日本 HIRAYA 公司)；DK-98-II 型电热恒温水浴锅 (天津

市泰斯特仪器有限公司); SIM-FI40AY65-PC 型制冰机(日本 Panasonic 公司); Bio-Rad ChemiDoc XRS+化学发光成像系统(ChemiDoc XRS+)[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎的核心靶点预测 基于质谱技术表征的肾康注射液主要化学成分结合 TCMSP (<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)数据库筛选口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18%的成分,同时补充药典中的定量成分以及相关文献中报道的药效成分,作为肾康注射液的有效成分。以 SwissTargetPrediction 在线网站为主,以 PharmMapper 在线网站为辅获得各活性成分的作用靶点。

通过 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、DisGeNET (<https://disgenet.com/>)挖掘的慢性肾小球肾炎相关靶点进行对比,获得活性成分和疾病的交集靶点,得到肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎的靶点。

通过 String 数据库,设定物种为“homo sapiens”,构建交集靶点的蛋白质相互作用(PPI)网络,并导入 Cytoscape 3.9.1 软件中进行可视化处理,设置数使节点大小和颜色深浅反映度(degree)值的大小,边的粗细反映结合率评分的高低,构建 PPI 网络图,并进行拓扑分析。利用 CytoHubba 扩展程序计算节点得分,应用 MCODE 插件获得排名前 10 位的核心基因并可视化。筛选条件为 MCC 算法筛选,“Find Clusters”选择“In Whole Network”,“Network Scoring (Degree Cutoff)”设置为 2,“Cluster Finding”选择为“Haircut”,“Node Score Cutoff”设置为 0.2,“K-Core”设置为 2,“Max.Depth”设置为 100。

2.1.2 “有效成分-交集靶点-信号通路”的网络构建 先从活性成分靶点与慢性肾小球肾炎疾病靶点交集获得的潜在靶点入手,以“拓扑结构重要性”为首要标准,借助 Cytoscape 3.9.1 软件的“Network Analyzer”工具对靶点的 PPI 网络进行拓扑分析,其中 degree 值筛选阈值设为≥网络平均度值的 1.5 倍,中介中心性筛选阈值设为≥网络中位数的 1.2 倍,紧密中心性筛选阈值设为≥网络平均值的 1.1 倍,取 3 者交集得到具有核心拓扑地位的候选靶点;再以“通路功能关联性”为二次筛选标

准,采用 Metascape 在线工具对候选靶点进行基因本体(GO)、京都基因和基因百科全书(KEGG)通路富集分析(参数设定为 $P < 0.05$ 、 $FDR < 0.05$),筛选出肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎核心通路,最终剔除不涉及核心通路的靶点,得到关键靶点。

2.1.3 分子对接 通过 TCMSP 及 PubChem 数据库下载活性成分的 3D 结构,并通过 OpenBable-3.1.1 软件转化为 mol2 格式文件。基于 PDB 数据库,下载所需蛋白的 3D 结构。应用 AutoDockTools-1.5.7、vina 和 PyMOL 2.5.0 软件对关键靶点蛋白进行分子对接,将结合能最好的构象使用 PyMOL 2.5.0 软件进行可视化。

2.2 实验验证

2.2.1 模型建立、分组与给药 SD 大鼠在环境温度 22~25 °C、相对湿度 40%~50%的适宜条件下适应性喂养 7 d 后,随机分为对照组(10 只)、慢性肾小球肾炎模型组(30 只)。参考文献方法^[5],模型组采用单次尾 iv 阿霉素(6.5 mg/kg)建立慢性肾小球肾炎模型,对照组给予等体积生理盐水,注射后第 7 天收集 24 h 尿液检测尿蛋白含量,尿蛋白水平显著升高(>50 mg/d)提示造模成功。

将造模成功的 30 只 SD 大鼠随机分为模型组、肾康注射液(6、9 mL/kg)组,每组 10 只大鼠,肾康注射液组给药剂量参考文献方法^[6]。给药组每天 1 次尾 iv 等体积的对应药量,连续 14 d,对照组和模型组每天 1 次尾 iv 等体积生理盐水。

在实验进程中,全程观察大鼠毛发的变化情况,每 3 天记录 1 次大鼠的体质量,实验结束前一天晚上采集 1 次尿液。实验结束后,麻醉大鼠,取血液和肾组织样本,检测相关指标。

2.2.2 尿液指标检测 实验结束前一天晚上,将大鼠单独置于代谢笼中,禁食不禁水,收集 24 h 尿液,尿液在 4 °C 环境下,以 3 000 r/min 转速离心 5 min,然后取上清液,按照尿蛋白、尿肌酐定量试剂盒的使用说明,检测大鼠尿蛋白含量。尿白蛋白与肌酐的比值(ACR)=尿蛋白/尿肌酐。

2.2.3 血样指标检测 通过腹主动脉采血,大鼠采集血液约 5 mL,置于无抗凝剂的离心管中,室温静置 2 h 后,于 4 °C 环境下以 3 000 r/min 离心 15 min,分离上清液(血清),分装后置于-80 °C超低温冰箱保存,用于后续血肌酐、尿素氮等生化指标检测。

2.2.4 肾脏组织病理学检查 采血结束后,迅速解剖大鼠取出双侧肾脏,用预冷的生理盐水轻轻冲洗

肾脏表面残留血液，滤纸吸干水分。左侧肾脏沿冠状面切开，取部分肾皮质组织（约 0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm），立即置于 4%多聚甲醛溶液中固定，用于后续病理组织学检查（HE 染色、Masson 染色、PAS 染色）及 Western blotting 分析；剩余肾组织及右侧完整肾脏迅速放入冻存管，标记后置于液氮中速冻，随后转移至-80 ℃超低温冰箱保存，用于后续炎症因子检测分析。

2.2.5 肾脏组织中炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 的含量测定 取各组大鼠肾组织，匀浆、离心并吸取上清液，采用 ELISA 法检测大鼠肾组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量。

2.2.6 Western blotting 法检测肾组织蛋白表达水平 取各组大鼠肾组织样本加入 10 倍体积裂解液置于组织研磨机中充分匀浆，提取总蛋白，采用 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白溶液按照 4：1 的比例加入 5 倍还原型蛋白上样缓冲液，金属浴 95 ℃变性 10 min。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，于含 5%脱脂牛奶的 TBST 溶液中室温封闭 30 min，加入配置好的一抗，4 ℃孵育摇床过夜（摇床慢摇），TBST 快速涮洗膜 3 次，然后加入 TBST，放置脱色摇床上快速洗脱，每次 5 min，洗 3 次，加入二抗，室温摇床孵育 30 min，TBST 快速涮洗膜 3 次，然后加入 TBST，

放置脱色摇床上快速洗脱，每次 5 min，洗 3 次，将 ECL A 和 B 液按照 1：1 比例混合好后备用，将洗脱完的 PVDF 膜取出放在吸水纸上，稍微吸干膜上面的液体，将膜放入混合好的 ECL 发光液中，让液体完全浸没膜，待反应后，将膜取出放入化学发光仪托盘上，按照预设程序开始化学发光，曝光完成之后，保存原始图为 TIFF 格式。将保存好的 TIFF 格式的原始图用 AIWBwell™ 分析软件进行分析。

2.3 统计分析

采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据采用单因素方差分析后，进行多组间方差分析。

3 结果

3.1 肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎网络药理学分析

3.1.1 肾康注射液主要活性成分和靶点预测 基于文献报道的质谱技术表征的肾康注射液主要化学成分^[7-9]，结合 TCMSP 数据库筛选 OB≥30%和 DL≥0.18%的成分，同时补充药典中的定量成分作为肾康注射液的有效成分。共得到没食子酸等 17 个主要活性成分，见表 1。通过 SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 在线网站预测得到 1 081 个作用靶点，删除重复项后得到 568 个肾康注射液主要活性成分潜在靶点。

表 1 主要活性成分的相关参数

Table 1 Relevant parameters of the main active ingredients

中文名称	英文名称	分子式	相对分子质量	Lipinski 规则	OB/%	DL
没食子酸	gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	170.12	Yes	61.84	0.25
丹参素	danshensu	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.17	Yes	35.34	0.28
迷迭香酸	rosmarinic acid	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360.30	Yes	31.38	0.35
丹酚酸 A	salvianolic acid A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	494.40	Yes	32.95	0.70
芦荟大黄素	aloe emodin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	Yes	83.37	0.24
大黄酸	rhein	C ₁₅ H ₈ O ₆	284.22	Yes	47.06	0.27
大黄素	emodin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	Yes	34.39	0.23
大黄酚	chrysophanol	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.24	Yes	38.63	0.20
大黄素甲醚	phycion	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.26	Yes	32.28	0.26
山柰酚	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	Yes	31.24	0.26
羟基红花黄色素 A	hydroxysafflor yellow A	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	612.50	No	32.54	0.35
丹酚酸 B	salvianolic acid B	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.60	No	43.01	0.40
黄芪甲苷	astragaloside A	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	785.00	No	37.53	0.34
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	calycosin 7-O-glucoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446.40	Yes	36.54	0.37
丹参酮IIA	tanshinone II _A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294.30	Yes	49.88	0.39
隐丹参酮	cryptotanshinone	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	296.40	Yes	52.34	0.39
丹参酮I	tanshinone I	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	276.30	Yes	39.26	0.36

3.1.2 肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎的作用靶点预测 通过 GeneCards、OMIM、DisGeNET 查找得到 1 296 个慢性肾小球肾炎相关靶点。将筛选得到的主要活性成分靶点和疾病靶点输入 Venn 在线网站 (<http://www.ehbio.com/test/venn/#/>) 取交集 (图 1), 得到 112 个肾康注射液作用于慢性肾小球肾炎的预测靶点。

将得到的 112 个交集靶点导入 String 数据库中, 设置物种为 “homo sapiens”, 删除没有蛋白互作的靶点, 导出数据至 Cytoscape 3.9.1 软件中进行可视化分析, 见图 2。PPI 网络中共有 112 个节点, 1 800 条边, 颜色越深圆圈越大代表相关性越强, degree 值排名前 5 位的靶点分别是 Akt1、ESR1、

MMP9、IL-2、Src 酪氨酸蛋白激酶 (SRC)。MCODE 插件得到的排名前 10 位的核心靶点见表 2。

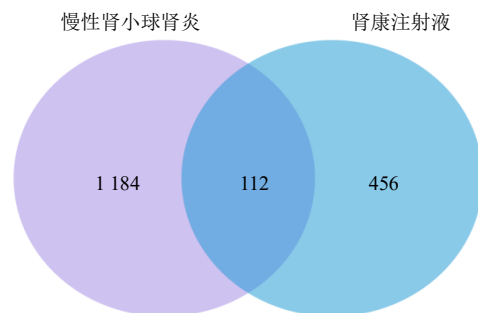


图 1 肾康注射液活性成分和慢性肾小球肾炎的交集靶点
Fig. 1 Intersection targets of active ingredients in Shenkang Injection and chronic glomerulonephritis

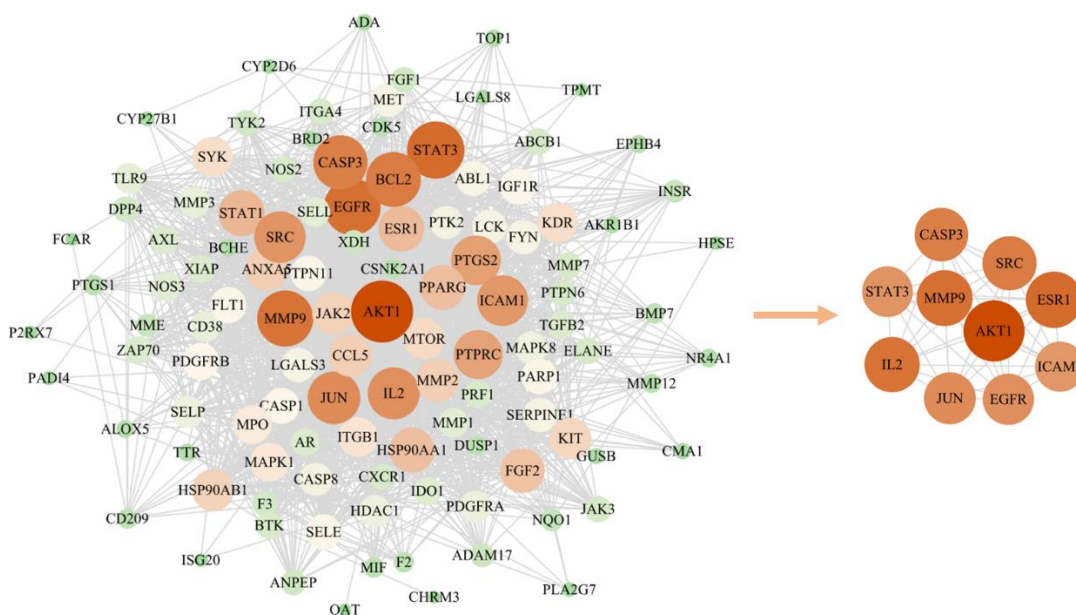


图 2 肾康注射液活性成分和慢性肾小球肾炎的交集靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of intersection targets between active ingredients of Shenkang Injection and chronic glomerulonephritis

表 2 排名前 10 位的核心靶点信息

Table 2 Information of top 10 core targets

靶点	中介中心性	紧密中心性	degree
Akt1	0.041 6	0.816 2	86
ESR1	0.030 9	0.770 8	78
MMP-9	0.038 8	0.765 5	77
IL-2	0.044 6	0.755 1	76
SRC	0.024 9	0.750 0	74
CASP3	0.027 6	0.745 0	73
JUN	0.021 3	0.730 3	70
EGFR	0.041 7	0.720 8	69
STAT3	0.027 4	0.716 1	68
ICAM1	0.021 7	0.711 5	67

3.1.3 GO 功能富集分析 通过 Metascape 工具将筛选得到的 112 个肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎的靶点进行 GO 生物学过程富集分析, 即分别从细胞组分 (CC)、分子功能 (MF)、生物过程 (BP) 3 个层面对基因功能进行注释。共得到 280 个 BP, 74 个 CC, 124 个 MF。对 BP、CC、MF 结果按 $P < 0.05$ 分别排列并筛选出前 10 个结果, 利用微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制富集分析图, 见图 3。

3.1.4 KEGG 通路富集分析 利用 Metascape 工具将筛选得到的 112 个肾康注射液治疗慢性肾小球肾

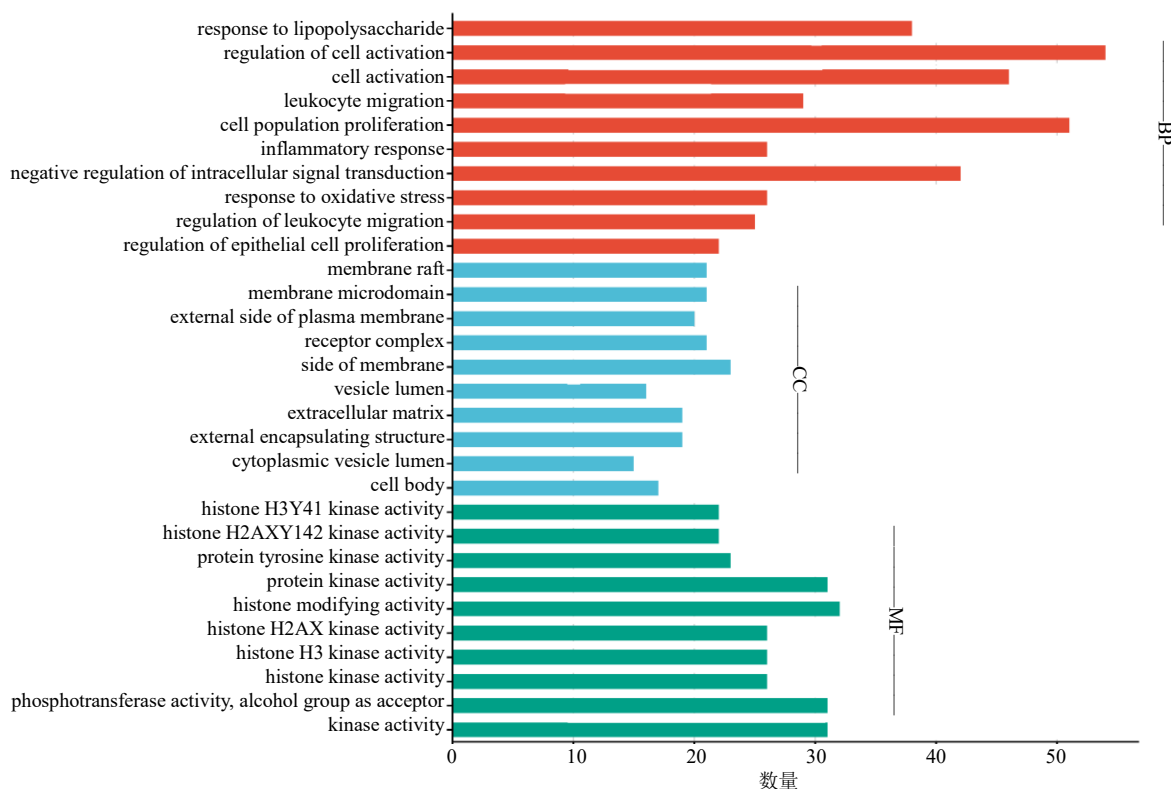


图 3 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis

炎的靶点行 KEGG 通路富集分析, 得到 139 条相关通路, 对所得信号通路进行富集分析, 按 $P < 0.05$ 排列并筛选出 20 个结果。通过微生信平台对筛选出的结果根据 P 值、基因数目及富集系数绘制气泡图, 见图 4。通路所涉及基因数目越多, 气泡越大; 统计显著性越大, 填充颜色从绿到红颜色渐深。

筛选的通路可分为 4 类: 一是免疫炎症调控核心通路, [TNF、IL-17、核因子- κ B (NF- κ B)、Toll 样受体 (TLR)、NLR], 它们通过激活免疫细胞、释放促炎因子直接介导肾间质炎症浸润与肾小球免疫损伤, 肾康注射液可通过降低相关炎症因子含量、抑制通路关键分子活性阻断炎症级联; 二是肾纤维化与细胞损伤调控通路[胞内磷脂酰肌醇激酶 (PI3K)/Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、RAS 蛋白 (RAS)、低氧诱导因子-1 (HIF-1)], 其异常激活会导致肾小球系膜增生、细胞外基质沉积及肾组织缺氧纤维化, 肾康注射液能下调 Akt1 等核心靶点表达、抑制通路过度活化, 从而保护肾组织结构; 三是血管调节与代谢异常相关通路[脂质和动脉粥样硬化 (Lipid and atherosclerosis)、高级糖基化终末产物-受体 (AGE-RAGE)], 慢性肾小球肾炎患

者常伴血脂紊乱或晚期糖基化终产物积累, 这些通路通过脂质沉积、氧化应激间接加重肾损伤, 肾康注射液可调节脂质代谢、改善肾脏微循环以间接调控此类通路; 四是其他关联通路[非受体型酪氨酸蛋白激酶 (JAK)/信号转导及转录激活因子 (STAT)、Ras 相关蛋白 1 (Rap1)、雌激素], JAK/STAT 调控免疫与细胞增殖, Rap1 参与血管功能维持, 雌激素通路通过 ESR1 发挥肾脏保护作用, 与慢性肾小球肾炎病理进程相关, 肾康注射液多成分协同作用于这些通路, 实现对慢性肾小球肾炎的治疗效应。

3.1.5 “有效成分-交集靶点-信号通路”的网络构建 利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“有效成分-交集靶点-信号通路病”网络图, 网络中共有 107 个节点, 987 条边。交集靶点中有 Akt1、IL-2、ESR1、MMP9 等多个炎症相关靶点。根据 degree 值判断相关性强的活性成分、作用靶点和通路, 肾康注射液可能是通过芦荟大黄素、羟基红花黄色素 A、大黄素甲醚和山柰酚调控 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路发挥治疗慢性肾小球肾炎的作用, 此网络体现了肾康注射液通过多成分、多靶点、多通路的方式治疗慢性肾小球肾炎的特点, 见图 5。

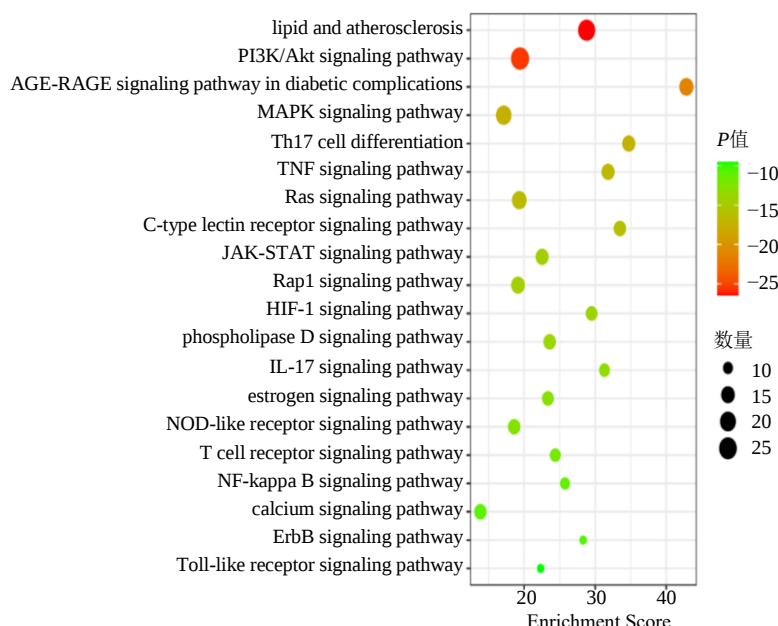


图 4 KEGG 通路分析
Fig. 4 KEGG meridian analysis

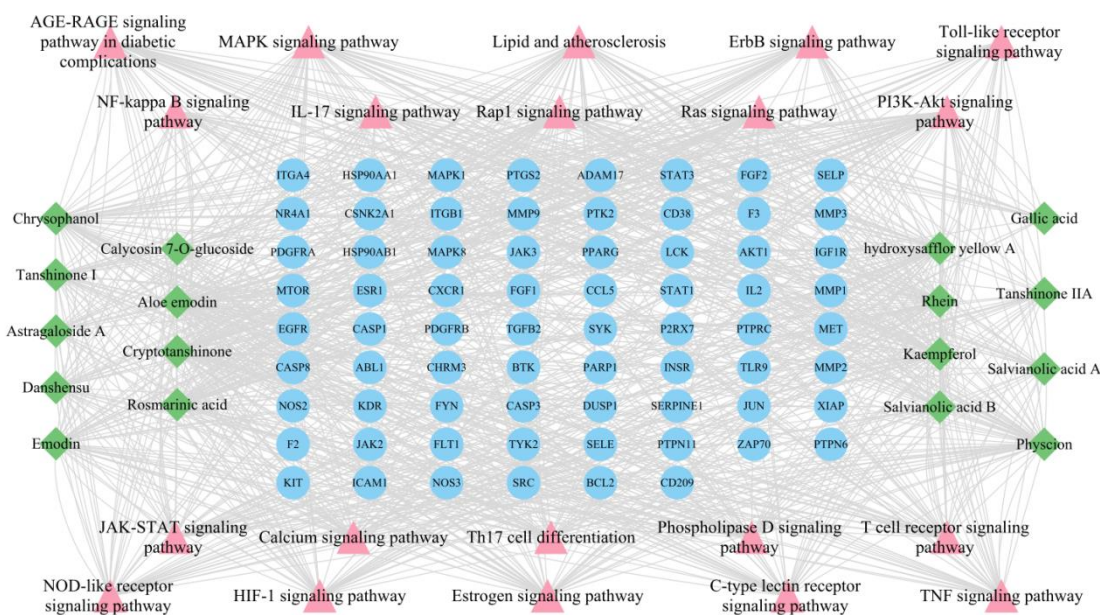


图 5 “有效成分 - 交集靶点 - 信号通路”图
Fig. 5 “Effective ingredient - intersection target - signal pathway” diagram

3.1.6 肾康注射液活性成分和关键靶点的分子对接 选取选取 PPI 网络中排名前 4 位的靶点(Akt1、ESR1、MMP9、IL-2)和“有效成分 - 交集靶点 - 信号通路”网络中排名前 4 位的活性成分(芦荟大黄素、羟基红花黄色素 A、大黄素甲醚、山柰酚)进行分子对接验证。使用 PDB 数据库下载靶点蛋白,各靶点与成分的结合能均小于-5 kcal/mol(1 cal=4.2

J),见表 3,说明各靶点与成分结合较好,数值越小,二者的亲和力越好。与 Akt1 结合最好的成分是芦荟大黄素,与 ESR1 结合最好的成分是大黄素甲醚,与 MMP9 结合最好的成分是大黄素甲醚,与 IL-2 结合最好的成分山柰酚。利用 PyMOL 软件对活性成分与蛋白结合能低的进行可视化处理,最优构想如图 6 所示。

表 3 靶点与活性成分分子对接结合能
Table 3 Docking binding energies of target and active ingredient molecules

靶点	结合能/(kcal·mol ⁻¹)			
	芦荟大黄素	羟基红花黄色素 A	大黄素甲醚	山柰酚
Akt1	-6.8	-6.5	-6.6	-6.1
ESR1	-6.9	-6.4	-7.4	-6.7
MMP9	-5.9	-5.4	-6.0	-5.2
IL-2	-8.1	-8.4	-7.9	-8.5

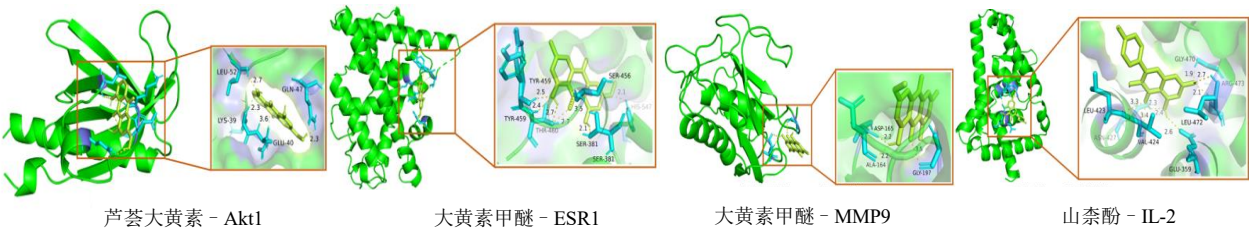


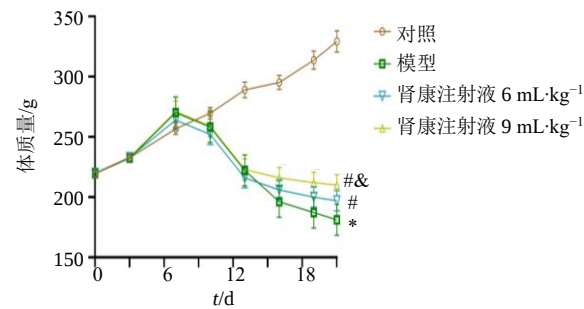
图 6 活性成分与关键靶点的最佳构像
Fig. 6 Optimal conformation of active ingredients and key targets

3.2 动物实验结果

3.2.1 大鼠皮毛与体质量变化 实验期间，对照组大鼠皮毛整体洁白、光泽无瑕；模型组大鼠皮毛逐渐出现发黄、枯槁无泽的现象；与模型组比较，各药组均能不同程度改善这一状况，尤其是肾康注射液 9 mL/kg 组改善效果更为明显。

造模后，与对照组比较，模型组大鼠体质量开始显著下降 ($P<0.05$)。肾康注射液各剂量组大鼠体质量显著升高 ($P<0.05$)，且肾康注射液 9 mL/kg 组更为明显，见图 7。

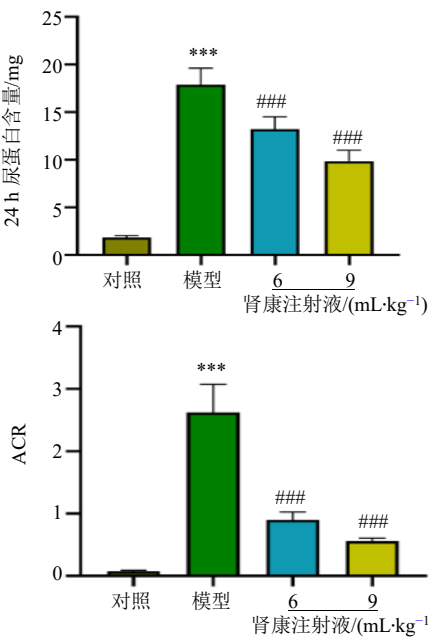
3.2.2 大鼠生化指标变化 与模型组比较，肾康注



与对照组比较：* $P<0.05$ ；与模型组比较：# $P<0.05$ ；与肾康注射液 6 mL·kg⁻¹ 组比较：& $P<0.05$ 。
* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; & $P<0.05$ vs Shenkang Injection 6 mL·kg⁻¹ group.

图 7 各组大鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Fig. 7 Body weight changes of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

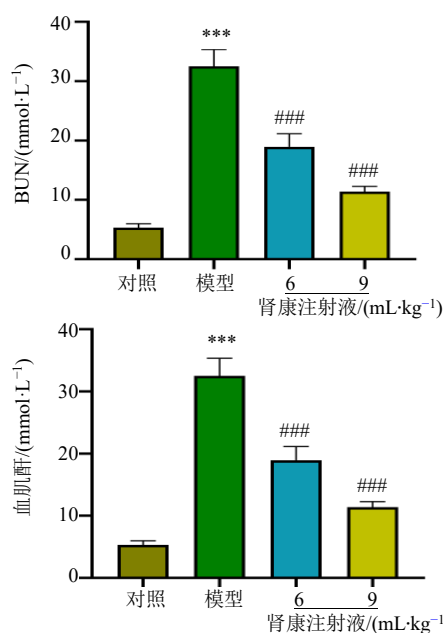
射液各剂量组大鼠尿液样本中的尿蛋白、ACR 值以及血液样本中的肌酐、尿素氮的含量均显著降低 ($P<0.001$)，见图 8、9。



与对照组比较：*** $P<0.001$ ；与模型组比较：### $P<0.001$ 。
*** $P<0.001$ vs control group; ### $P<0.001$ vs model group.

图 8 各组大鼠 24 h 尿蛋白含量和 ACR 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 8 24 h Urinary protein content and ACR values in each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$.
 *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 9 各组大鼠血尿素氮和血肌酐水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 9 Blood urea nitrogen and creatinine levels in each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.2.3 大鼠肾脏组织病理学变化 肾组织病理学检查发现对照组大鼠肾小球大小、形态正常、构造完好无损, 基底膜薄厚正常, 毛细血管发育良好,

肾曲管结构清楚。模型组大鼠大量肾小管萎缩消失, 间质大量结缔组织增生, 伴有炎症细胞浸润, 肾小球基底膜较正常组变厚, 肾小球毛细血管结构不清, 系膜增生, 肾小球囊壁层纤维组织增生, 并有明显的蛋白管样改变。肾康注射液各剂量组大鼠的间质大量结缔组织增生、肾小球基底膜厚度、系膜增生、肾小球囊壁层纤维组织增生及炎症细胞总量较模型组有明显改善, 见图 10。

3.2.4 大鼠肾脏组织中炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 的含量测定 与模型组比较, 肾康注射液各剂量组大鼠肾组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 的含量均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 见图 11。

3.2.5 大鼠肾脏组织蛋白表达水平变化 与模型组比较, 肾康注射液各剂量组大鼠肾组织中 Akt1、ESR1、MMP-9、IL-2 蛋白相对表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), 见图 12。

4 讨论

根据慢性肾小球肾炎的发病特点及症状体征, 在中医药理论体系中将其归于“肾风”“水肿”“虚劳”“尿浊”“尿血”“腰痛”等病症范畴, 以湿热、瘀血等为主要临床表现, 肾康注射液具有降逆泄浊、活血化瘀、益气养阴、通腑利湿的功效, 适用于慢性肾小球肾炎的“湿热瘀血”症^[10]。与西药的单一成分、单一靶点相比, 中药及其复方有多成分、

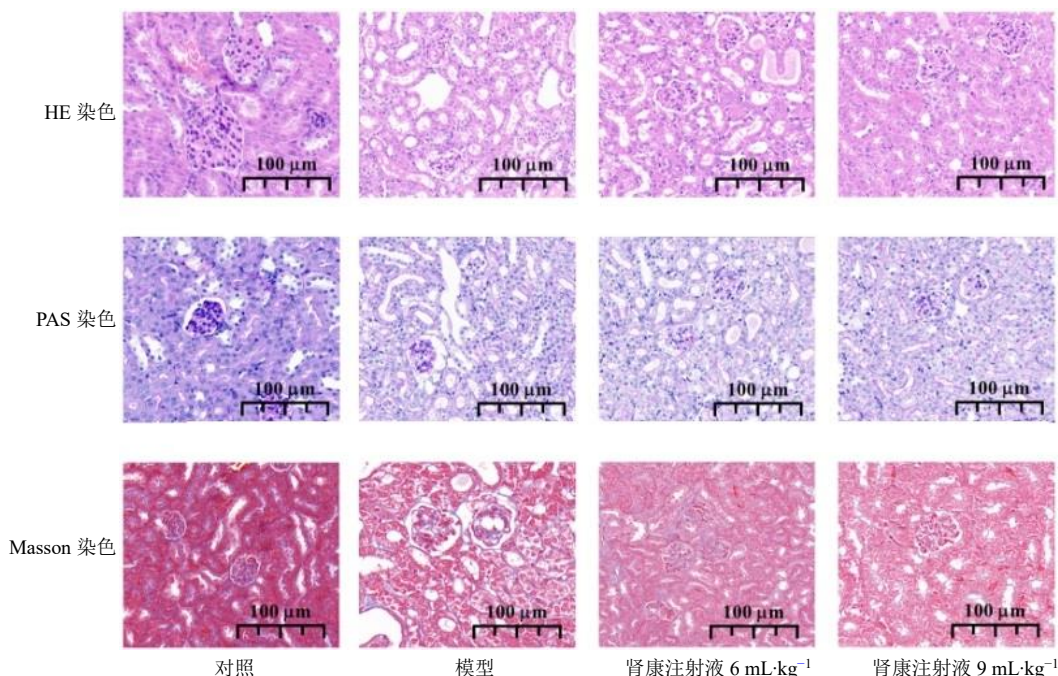
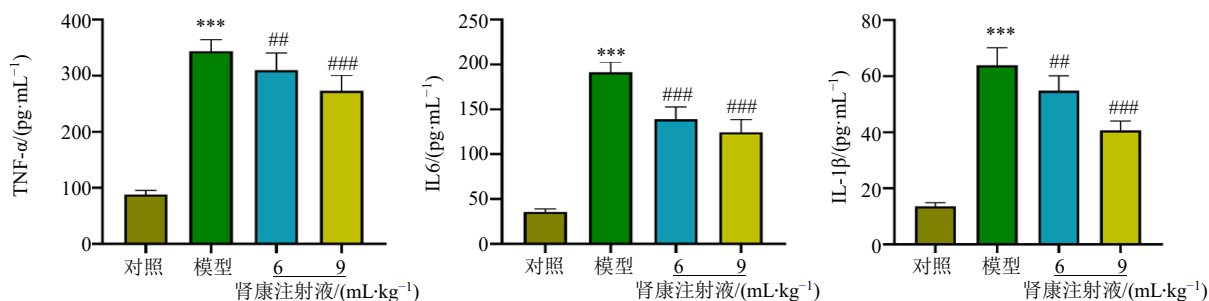


图 10 各组大鼠肾脏组织病理染色结果 ($\times 200$)

Fig. 10 Pathological staining results of kidney tissues in each group of rats ($\times 200$)

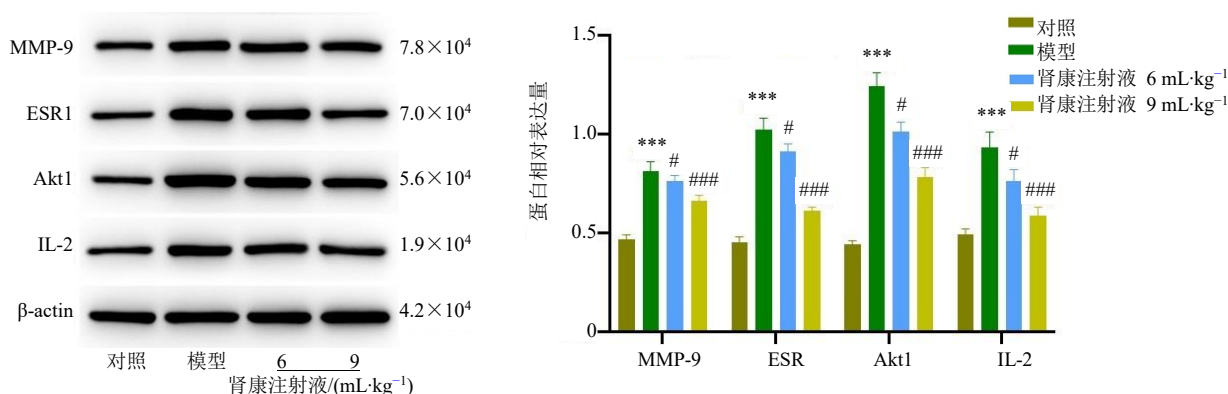


与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 11 各组大鼠肾脏组织中的炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 11 Inflammatory cytokine levels in renal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 12 大鼠肾脏组织蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 12 Protein expression levels in rat kidney tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

多靶点、多通路的相互作用特点。中药的有效成分及其复杂,以多成分、多靶点、多通路相互调控来发挥药理作用,从而达到治疗疾病的目的^[11]。肾康注射液作为一种中药复方制剂,因其低毒性、多靶点和广谱特性,近年来备受关注。本研究结合网络药理学和体内实验验证,系统的探讨了肾康注射液治疗慢性肾小球肾炎的潜在作用机制。

网络药理学结果显示,在“有效成分-交集靶点-信号通路”网络图中,活性成分包括芦荟大黄素、羟基红花黄色素 A、大黄素甲醚和山柰酚。芦荟大黄素是一种具有多种生物活性功能的蒽醌类化合物,主要通过抗炎、抗氧化及抗纤维化发挥治疗作用^[12];羟基红花黄色素 A 是红花的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化和改善微循环等多种生物活性^[13];大黄素甲醚作为蒽醌类衍生物,具有抗纤维化及细胞保护作用^[14];山柰酚是黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及调节免疫的作用^[15]。研

究表明,慢性肾小球肾炎与免疫反应介导的炎症、氧化应激和纤维化密切相关。本研究发现的活性成分多具有免疫调节、抗炎症反应、抗纤维化的作用,可以作为潜在治疗药物进一步开发与探索。

PPI 网络分析结果表明,核心的靶点包括 Akt1、ESR1、MMP-9、IL-2 等,KEGG 富集分析发现,核心的通路包括 PI3K/Akt、MAPK 等信号通路。Akt1 作为 PI3K/Akt 信号通路的关键分子,在细胞增殖、存活和代谢调控中起着核心作用,肾康注射液对 Akt1 的调节,可能通过恢复 PI3K/Akt 信号通路的正常功能,抑制系膜细胞的过度增殖,减少细胞外基质的合成,从而减轻肾小球的纤维化和炎症损伤。研究表明,黄芪作为肾康注射液的主要成分之一,可通过调控 Akt1/mTOR 自噬通路减少糖尿病肾病蛋白尿,这与本研究中 Akt1 的调节机制具有一致性。此外,网络药理学结果显示,肾康注射液的活性成分如芦荟大黄素、羟基红花黄色素 A、大

黄素甲醚、山柰酚等均可能通过 PI3K/Akt 信号通路发挥作用,进一步支持了 Akt1 在其治疗机制中的核心地位。

雌激素可能通过 ESR1 介导的信号通路对肾脏起保护作用,如调节肾小球滤过率、抑制炎症和纤维化等^[16-17],肾康注射液调节 ESR1 靶点,可能通过模拟或增强雌激素的肾脏保护效应,改善肾小球的功能,减轻炎症反应,表明 ESR1 可能是肾康注射液发挥疗效的重要靶点之一,此外,ESR1 是芦荟大黄素、羟基红花黄色素 A、大黄素甲醚等活性成分的作用靶点。

MMP-9 主要参与细胞外基质的降解,MMP-9 的异常表达可能导致肾小球基底膜的降解和结构破坏,进而影响肾小球的滤过功能。同时,MMP-9 还与炎症细胞的浸润和炎症因子的释放密切相关。肾康注射液通过芦荟大黄素、羟基红花黄色素 A、大黄素甲醚、山柰酚等活性成分调节 MMP-9,通过抑制其活性或表达,减少细胞外基质的过度降解,维持肾小球基底膜的完整性,同时抑制炎症细胞的迁移和炎症反应的放大,从而发挥治疗作用,此外,TNF- α 通过 PI3K/Akt 通路诱导 MMP-9 表达的机制,进一步解释了肾康注射液通过调节 Akt1 和 MMP-9 协同发挥作用的可能性。

IL-2 是一种重要的细胞因子,在调节免疫反应和炎症过程中具有关键作用,慢性肾小球肾炎的发生发展与免疫功能紊乱和炎症反应密切相关,IL-2 的异常分泌可能导致 T 细胞功能失衡,促进炎症细胞的活化和浸润,肾康注射液可能通过芦荟大黄素、羟基红花黄色素 A 等活性成分调节 IL-2 靶点,通过调节 T 细胞的分化和功能,抑制异常的免疫反应,减轻肾脏的炎症损伤。因此,肾康注射液可能通过其核心活性成分,包括芦荟大黄素、羟基红花黄色素 A、大黄素甲醚、山柰酚的协同作用,靶向调控 Akt1、ESR1、MMP-9、IL-2 等关键分子,从而干预慢性肾小球肾炎的炎症反应与纤维化两大核心病理进程,最终实现治疗效应。

动物实验证实,肾康注射液对慢性肾小球肾炎模型大鼠具有显著治疗作用。①表观改善:缓解毛发枯黄、无光泽等外观症状;②病理修复:减轻肾间质结缔组织增生、肾小球基底膜增厚、系膜细胞增生及肾小球囊纤维化,并减少炎症细胞浸润;③生化指标:降低尿蛋白、ACR 值、血清肌酐和尿素氮水平;④分子机制:抑制肾组织中 Akt1、ESR1、

MMP-9、IL-2 等关键蛋白的异常表达。

综上所述,肾康注射液慢性肾小球肾炎的治疗具有多成分、多靶点、多途径的特点,其可能通过 Akt1、ESR1、MMP-9、IL-2 等炎症靶点,调控 PI3K/Akt、MAPK 等信号通路,抑制系膜细胞的过度增殖,平衡细胞外基质合成与降解,通过 ESR1 模拟内源性肾脏保护作用,维持肾小球基底膜的完整性,调控免疫稳态,减轻炎症浸润,从而减轻肾小球的纤维化和炎症损伤,延缓肾损伤,起到保护肾功能作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 常舒雅,陆晨,曹阳,等.基于网络药理学和分子对接技术研究肾炎四味片治疗慢性肾炎的作用机制[J].现代药物与临床,2025,40(8):1909-1921.
- [2] 李鹏,周霖,王肖辉,等.肾康注射液对慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化、内质网应激状态和线粒体氧化损伤的影响[J].现代药物与临床,2024,39(5):1107-1114.
- [3] 包晓悦,李鹏,周霖.肾康注射液联合雷公藤多苷片治疗小鼠慢性肾炎的疗效及作用机制[J].成都医学院学报,2024,19(6):923-927.
- [4] 宋辉,黄晓俏,孙向明,等.基于网络药理学、分子对接和动物实验探讨菟丝子醇提物抗乳腺癌作用机制[J].中草药,2024,55(14):4747-4758.
- [5] 王艳娥,付晓幸,丰莉娟.金匱肾气丸对肾小球肾炎大鼠的保护作用及机制研究[J].中药材,2019,42(5):1173-1176.
- [6] Zhou L, Wang X H, Zhang Y, et al. Renal metabolomics study and critical pathway validation of Shenkang Injection in the treatment of chronic renal failure [J]. *Biol Pharm Bull*, 2024, 47(2): 499-508.
- [7] Yang J, Sun Z, Li D L, et al. A novel liquid chromatography orbitrap mass spectrometry method with full scan for simultaneous determination of multiple bioactive constituents of Shenkang injection in rat tissues: Application to tissue distribution and pharmacokinetic studies [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(10): e4306.
- [8] Jiang X F, Zhou L, Zuo L H, et al. Pharmacokinetics and metabolism research of Shenkang Injection in rats based on UHPLC-MS/MS and UHPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 1837-1850.
- [9] 杨彦涛,李卓伦,周霖,等.基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的肾康注射液在大鼠体内代谢产物的鉴定及代谢途径分析[J].中草药,2024,55(3):730-745.
- [10] 包晓悦,房哲,李鹏,等.肾康注射液通过抑制内质网应激和氧化应激治疗慢性肾衰竭[J].中医学报,2025,

- 40(1): 201-209.
- [11] 李宗霖, 谭晓华, 王格瑩, 等. 基于“药物-成分-靶点”探讨中药复方辨证论治阴道炎的科学内涵 [J]. 中草药, 2023, 54(21): 7232-7247.
- [12] Ouyang F, Li Y L, Wang H M, *et al.* Aloe emodin alleviates radiation-induced heart disease via blocking P₄HB lactylation and mitigating kynurenine metabolic disruption [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(47): e2406026.
- [13] Zhao F, Wang P, Jiao Y Y, *et al.* Hydroxysafflor yellow A: A systematical review on botanical resources, physicochemical properties, drug delivery system, pharmacokinetics, and pharmacological effects [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 579332.
- [14] 梁瑞峰, 宋献美, 葛文静, 等. 大黄素甲醚通过调控 Keap1/Nrf2 信号通路抗大鼠肝纤维化的作用 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(10): 46-51.
- [15] Li Y P, Cui H D, Li S P, *et al.* Kaempferol modulates IFN- γ induced JAK-STAT signaling pathway and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 114: 109585.
- [16] 谭钊芳. 基于数据挖掘探讨付滨教授运用和法治疗慢性肾炎的用药规律及核心处方的网络药理学分析 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
- [17] Hou W Y, Yang H Y, Chen P, *et al.* Long-term evaluation of the timing of corticosteroid therapy in an IgA nephropathy cohort [J]. *Clin Kidney J*, 2025, 18(5): sfaf076.

[责任编辑 高源]