

基于网络药理学及转录组学探究连翘叶改善糖尿病小鼠肾损伤的作用机制

冯翼南¹, 吕盼盼¹, 冯旭丽², 牛润泽², 渠鹏霞², 贺美芳², 李元宾^{1,2,3*}

1. 山西中医药大学 第三临床学院, 山西 晋中 030619

2. 太原市中心医院 内分泌科, 山西 太原 030000

3. 深圳市南方科技大学医院 内分泌科, 广东 深圳 518100

摘要: **目的** 采用网络药理学、动物实验与转录组学相结合的方法, 探讨连翘叶改善糖尿病小鼠肾损伤的作用机制。方法通过网络药理学筛选连翘叶有效成分, 确认作用靶基因, 进行基因本体 (GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析预测连翘叶潜在作用通路及机制。动物实验以 *db/db* 小鼠建立糖尿病小鼠模型, 分为模型组、连翘叶组, 另设对照组, 灌胃干预 10 周后, 观察肾组织病理形态, 检测肾功能及炎症指标。转录组学对肾组织 RNA 测序, 分析差异基因及富集通路及分子对接验证。**结果** 网络药理学筛选出白蛋白 (ALB)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt1) 等核心靶点, 富集到磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 通路、晚期糖基化终末产物 (AGEs)-糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路等。动物实验中, 连翘叶组肾组织病理损伤较模型组减轻, 血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (SCr) 等肾功能指标明显改善, 及 AGEs、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症因子水平降低。转录组学发现连翘叶逆转 209 个差异基因, 雌激素受体 1 (ESR1) 和纤溶酶原 (PLG) 为网络药理学与转录组学交集关键基因, 分子对接表明连翘叶有效成分与关键基因结合稳定, 且肿瘤坏死因子 (TNF) 通路、白细胞介素-17 (IL-17) 通路等在两者中均富集, 这可能是连翘叶治疗糖尿病肾损伤的关键通路。**结论** 连翘叶可能通过作用于 ESR1、PLG 等关键靶点, 调控 AGEs-RAGE、PI3K-Akt、TNF、IL-17 等通路, 减少促炎因子和 AGEs 生成, 抑制肾脏炎症反应, 从而改善糖尿病小鼠肾损伤。

关键词: 连翘叶; 糖尿病肾病; 网络药理学; 转录组学; 分子对接

中图分类号: R285.5; R286.7 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)04-0955-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.04.010

Mechanism of *Forsythia suspensa* leaves in improving renal injury in diabetic mice based on network pharmacology and transcriptomics

FENG Yinan¹, LÜ Panpan¹, FENG Xuli², NIU Runze², QU Pengxia², HE Meifang², LI Yuanbin^{1,2,3}

1. The Third Clinical College, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Department of Endocrinology, Taiyuan Central Hospital, Taiyuan 030000, China

3. Department of Endocrinology, Southern University of Science and Technology Hospital, Shenzhen 518100, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Forsythia suspensa* leaves in improving renal injury in diabetic mice by combining network pharmacology, animal experiments and transcriptomics. **Methods** Network pharmacology was used to screen the effective components of *F. suspensa* leaves, identify the target genes, and conduct GO and KEGG enrichment analysis to predict the potential action pathways and mechanisms of *F. suspensa* leaves. A diabetic mouse model was established using *db/db* mice and divided into a model group, a *F. suspensa* leaves group, and a normal group. After 10 weeks of intragastric administration, the pathological morphology of the kidney tissue was observed, and the renal function and inflammatory indicators were detected. Transcriptomics was used to sequence the RNA of the kidney tissue, analyze the differentially expressed genes and enriched pathways, and verify through molecular docking. **Results** Network pharmacology identified core targets such as ALB and Akt1, and enriched pathways such as PI3K-Akt and AGE-RAGE. In the animal experiments, the pathological damage of the kidney tissue in the *F. suspensa* leaves group was less than that in the model group, and the renal function indicators such as serum BUN and Cr were significantly improved, as

收稿日期: 2026-01-03

基金项目: 山西省卫生健康委科研课题[晋卫办科教函(2022)4号 2022084]

作者简介: 冯翼南, 研究方向为中西医结合治疗内分泌系统疾病。E-mail: fengyinan2020@163.com

*通信作者: 李元宾 E-mail: liyuanbin1@163.com

well as the levels of inflammatory factors such as AGEs and TNF- α were decreased. Transcriptomics revealed that *F. suspensa* leaves reversed 209 differentially expressed genes, with ESR1 and PLG being the key genes at the intersection of network pharmacology and transcriptomics. Molecular docking indicated that the effective components of *F. suspensa* leaves had stable binding with the key genes, and the TNF and IL-17 pathways were enriched in both, which might be the key pathways for *F. suspensa* leaves in treating diabetic kidney injury. **Conclusion** *F. suspensa* leaves may improve renal injury in diabetic mice by acting on key targets such as ESR1 and PLG, regulating pathways such as AGE-RAGE, PI3K-Akt, TNF, and IL-17, reducing the production of pro-inflammatory factors and AGEs, and inhibiting renal inflammatory responses.

Key words: *Forsythia suspensa* leaves; diabetic kidney disease; network pharmacology; transcriptomics; molecular docking

糖尿病肾病作为糖尿病常见且严重的微血管并发症,是慢性肾脏疾病和终末期肾脏疾病的主要原因,表现为肾小球体积增大、肾小球基底膜增厚、滤过率下降,后期发展为肾小管间质纤维化、最终导致肾小球滤过率降低^[1-2]。目前针对糖尿病肾病治疗策略,以提高患者生活质量延缓病程进展为治疗的主要目标。主要以血糖管理,利用各类降糖药物等降低血糖减少肾小球内压力,抑制高糖诱导的晚期糖基化终末产物(AGEs)生成及减轻肾脏细胞氧化应激^[3];同时以血压控制,利用血管紧张素转化酶抑制剂/血管紧张素 II 受体拮抗剂抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活,抑制肾脏炎症与纤维化,延缓肾损伤进展,改善糖尿病肾病的预后^[4]。中医认为,糖尿病归属于“消渴”范畴,糖尿病肾病则是消渴病久不愈,损伤肾气,湿、热、痰、瘀郁结于络脉,气血瘀滞,造成本虚标实之证,治疗以益气养阴,清热化痰为主;现代中药单体及提取物在治疗糖尿病肾病的开发中,以免疫调节、抗炎、改善组织纤维化作用为主^[5-6]。连翘叶是连翘的干燥叶片,药理学表明连翘叶在抗氧化、消炎、降糖、护肝和调降血脂等方面具有明显疗效^[7-8]。本课题组前期研究表明,连翘叶在干预肥胖、减轻炎症反应等发挥重要作用,抑制了过度糖异生和脂质沉积,降低高糖环境下的 AGEs 生成,这提示了连翘叶具有预防及改善糖尿病肾病肾损伤的可能^[9-10]。因此,本研究以 *db/db* 糖尿病小鼠为研究对象,以连翘叶为干预因素,检测小鼠肾功能及炎症指标,并结合网络药理学预测与转录组学筛选靶点和通路^[11],探究连翘叶缓解早期糖尿病肾损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 7 周龄雄性 *db/db* 小鼠 24 只和 8 只 C57BLKS/JGpt 同窝野生型小鼠均购于常州卡文斯实验动物有限公司,动物许可证号: SCXK

(苏) 2021-0013。小鼠饲养于山西中医药大学动物实验中心,饮食饮水自由,保持室温约 24 °C,相对湿度 40%~60%,通风良好。本实验已通过山西中医药大学动物实验伦理委员会伦理批准(批件号 AWE202209114),所有操作均遵守动物实验规范。

1.1.2 药品与试剂 连翘叶冻干粉(1 g 连翘叶冻干粉相当于 4 g 生药材)由山西大学合作课题组制备并提供^[12]。高脂饲料 D12492(北京小泰有泰生物科技有限公司);普通饲料(北京小泰有泰生物科技有限公司);苏木素染液套装(Biosharp 公司,批号 BL700B);尿素氮(BUN)测试盒、肌酐(SCr)测定试剂盒、尿酸(UA)测试盒、AGEs 试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,货号分别为 C013-2-1、C011-2-1、C012-2-1、H250-1-1);胰岛素(INS)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物公司,货号 E-EL-M1382);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司,货号分别为 EMC102a、EMC004、EMC001b)。

1.1.3 设备与仪器 酶标分析仪(Rayto,型号 RT-6100);病理切片机(上海徠卡仪器有限公司,型号 RM2016);冰冻切片机(Thermo,型号 CRYOSTARNX50);低温离心机(Thermo,型号 SL8);光学显微镜(OLYMPUS,型号 CX31);超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司,型号 DW-86L626)。

1.2 网络药理学分析

1.2.1 连翘叶活性成分及相关靶基因预测 合作课题组对连翘叶炮制品醇提物进行 HPLC 分析^[13],对连翘叶各成分的抑制胰脂肪酶的活性作用进行比较,发现连翘叶多种成分与胰脂肪酶的活性相关,具有减肥作用。本研究利用的连翘叶各炮制品中均包含有的绿原酸(chlorogenic acid)、咖啡酸(caffeic acid)、连翘酯苷 A(forsythiaside A)、芦丁(rutin)、橙皮苷(hesperidin)、山柰酚-3-O-芸香糖苷

(kaempferol-3-*O*-rutinoside)、连翘苷 (phillyrin) 和连翘脂素 (phillygenin) 8 种成分, 进一步分析连翘叶对糖尿病肾损伤的影响。然后, 利用 PubChem 下载连翘叶主要成分 sdf 结构, 上传结构至 Swiss Target Prediction 进行连翘叶潜在靶基因预测; 其次登录 Pharm Mapper 服务器, 上传连翘叶成分结构, 选择 Human Protein Target Only, 设置 Number of Reserved Matched Targets 为 300, species 为 Homo sapiens, 点击 submit 得到连翘叶的潜在靶基因, 最后结合两数据库预测靶基因得到最终潜在相关靶点。

1.2.2 糖尿病及糖尿病肾病相关靶点筛选 利用人类基因数据库 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNet 数据库 (<https://www.disgenet.org/home/>) 以及 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>) 分别以 “diabetes” “diabetic kidney disease” 和 “diabetic nephropathy” 为关键词搜索与糖尿病肾病相关的靶基因。GeneCards 数据库检索时, 设定 relevance score ≥ 5 为条件, 保留所筛选出的靶基因。各数据库检索结果进行整合, 删除重复值, 即为糖尿病及糖尿病肾病相关靶基因。

1.2.3 连翘叶治疗糖尿病肾病的靶基因搜集 将上述两步所检索到的与连翘叶相关的靶基因以及与糖尿病肾病相关的靶基因利用 Venny 2.1.0 平台 (<https://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 取得二者的交集, 即为连翘叶治疗糖尿病肾病的潜在靶基因。

1.2.4 连翘叶 - 糖尿病肾病靶点蛋白质 - 蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建和关键靶基因的筛选 将上述求得交集的靶基因导入至 STRING 平台 (<https://stringdb.org/>) 把物种设定为 “Homo sapiens”, 相互作用阈值设定高置信度 > 0.9 为条件, 隐藏网络中无联系的节点, 其余参数设置不变, 构建 PPI 网络。将 STRING 平台输出的 PPI 文件下载后导入 Cytoscape 3.10.2 软件中, 利用 Network analyzer 功能, 对网络的拓扑属性进行分析, 计算靶基因的度值、接近中心性和介数中心性, 以三者排位前 10 的靶点确定为连翘叶治疗糖尿病肾病的关键靶基因。

1.2.5 连翘叶 - 糖尿病肾病功能与通路的富集分析 将筛选出的潜在治疗靶基因利用 DAVID 平台 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 以 $P < 0.05$, 物种为 “Homo Sapiens”, 进行基因本体 (GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 最终按 P 值由小到大排列筛选主要信号转导通路。

1.3 动物实验验证

1.3.1 动物分组及干预 *db/db* 小鼠适应性饲养 1 周后, 尾静脉取血, 每周测 2 次随机血糖, 连续 3 次测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 即为糖尿病模型造模成功^[4]。将成模后的 24 只 *db/db* 小鼠随机分为模型组 ($n=12$) 和连翘叶组 ($n=12$)。对照组和模型组 ig 生理盐水, 连翘叶冻干粉以 0.025 g/mL 浓度溶于生理盐水, 每只小鼠每天 ig 0.5 g/kg^[5], 连续给药 10 周。

1.3.2 取材及处理 给药干预 10 周后, 全部小鼠禁食不禁水 12 h, 待麻醉完全后, 迅速取出肾脏, 分离肾皮质, 每组取 6 只小鼠左肾放置于 4% 的多聚甲醛中用于后续病理染色检测, 右肾先用液氮速冻, 然后放置于 -80 °C 储存, 待测; 另外 6 只小鼠肾脏液氮速冻、研磨, 用于后续转录组学检测。麻醉完全后的小鼠摘眼球取血, 3 000 r/min (离心半径 12 cm), 离心 15 min, 取上清分装, 冻存于 -80 °C 冰箱用于后续血清学检测。

1.3.3 形态学观察 末次灌胃结束后次日, 取小鼠肾脏组织, 利用 4% 多聚甲醛进行固定, 然后脱水、包埋、切片 (厚 3 μ m)、脱蜡、苏木精 - 伊红 (HE) 和 Masson 染色、中性树胶封片, 置于光学显微镜下观察肾小球损伤及胶原纤维沉积并拍照。

1.3.4 肾功能指标和炎症因子水平 取各组小鼠血清测定相关肾功能指标, 严格按照试剂盒说明书检测血清 BUN、SCr、UA、INS 水平; ELISA 法检测检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 AGEs 水平, 严格按照酶联免疫吸附测定试剂盒说明书操作。

1.4 RNA 提取和肾脏转录组分析

提取小鼠肾脏组织总 RNA, 用 mRNA 富集法对总 RNA 进行处理, 用带有 OligodT 的磁珠富集 mRNA, 并将其片段化, 进行反转录, 再合成 cDNA 二链形成双链 DNA。把合成的双链 DNA 末端补平并 5'端磷酸化, 3'端形成突出一个 “A” 的粘末端, 再连接一个 3'端有凸出 “T” 的鼓泡状的接头。连接产物通过特异的引物进行 PCR 扩增。PCR 产物热变性成单链, 再用一段桥式引物将单链 DNA 环化得到单链环状 DNA 文库。构建好的文库质检, 质检合格后, 使用 DNBSEQ 平台进行高通量测序。文库构建及测序工作由中科脂典生物技术有限责任公司负责。对测序数据进行过滤, 使用 HISAT2 软件对过滤后的测序数据与参考基因组比对。使用 Bowtie2 将 Clean reads 比对到参考基因序列上, 然后使用 RSEM 计算各个样品的基因表达水平。使用

DESeq2 方法筛选差异基因, $|\log_2FC| > 1$, $P < 0.05$ 。对筛选出的基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.5 分子对接

将关键靶点导入至 PDB 数据平台 (<https://www.rcsb.org/>) 中, 选择物种为 “Home sapiens”, 筛选条件为 “Refinement Resolution (A) $< 2.0 \times 10^{-10}$ ”, 下载受体蛋白的 pdb 文件。然后在 TCMSP 平台获取核心成分的小分子 mol2 结构文件以及受体蛋白的 pdb 文件, 在 Pymol 软件中对其进行去水、去配体操作, 在 Auto Dock Tools 1.5.6 中打开配体和受体, 确定配体和受体的结合位点的位置和大小, 提取对接分数, 最后使用 Pymol 软件调整透明度后显示结果位点并进行对接结果的可视化分析。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间肾功能指标采用单因素方差分析, 如果存在组间差异需两两比较, 采用 LSD 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 PPI 网络构建和核心靶点分析 将连翘叶治疗糖尿病肾病的 149 个潜在靶点导入至 STRING 平台构建 PPI 网络 (图 1), 结果显示 PPI 网络中共有作用节点 124 个, 节点之间代表蛋白互相作用关系

的连线共 243 条, 平均节点度值为 3.26, 平均局部聚类系数为 0.478。利用 Cytoscape 软件对网络中所有点的拓扑参数进行分析, 选取度值前 10 的靶点为核心靶点, 包括白蛋白 (ALB)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt1)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPARG)、半胱天冬酶-3 (CASP3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、雌激素受体 1 (ESR1)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (HSP90AA1) 和基质金属蛋白酶-2 (MMP2) 等, 核心交集靶点及拓扑参数见表 1。

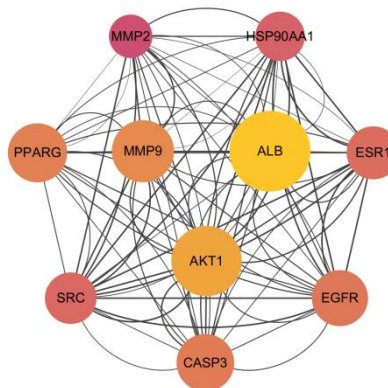


图 1 连翘叶治疗糖尿病肾病核心靶点的 PPI 网络
Fig. 1 PPI network of core targets for *Forsythia suspensa* leaves in the treatment of diabetic kidney disease

表 1 核心交集靶点及拓扑参数

Table 1 Core intersection targets and topological parameters

靶点	度值	接近中心性	介数中心性
ALB	216	0.787 234 042 553 191 5	0.143 545 356 938 249 070
AKT1	188	0.732 673 267 326 732 7	0.063 555 299 586 003 620
MMP9	166	0.685 185 185 185 185 2	0.049 143 401 849 791 820
PPARG	158	0.682 027 649 769 585 3	0.057 913 235 019 834 350
CASP3	154	0.669 683 257 918 552 1	0.024 186 561 178 017 300
EGFR	150	0.660 714 285 714 285 7	0.027 882 286 993 245 978
ESR1	142	0.651 982 378 854 625 5	0.029 533 697 147 862 780
SRC	138	0.635 193 133 047 210 3	0.031 778 468 087 309 940
HSP90AA1	132	0.643 478 260 869 565 3	0.031 277 283 320 821 600
MMP2	116	0.604 081 632 653 061 3	0.011 591 681 618 841 663

2.1.2 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析 将筛选出的 149 个相关靶点导入 David 数据库进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 见图 2。富集到的关键生物过程 (BP) 包括胰岛素受体信号通

路、胰岛素样生长因子受体信号通路和磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号转导的正向调节等; 关键细胞组分 (CC) 包括细胞外区域、细胞外空间和细胞外小囊体; 关键分子功能 (MF) 包括核

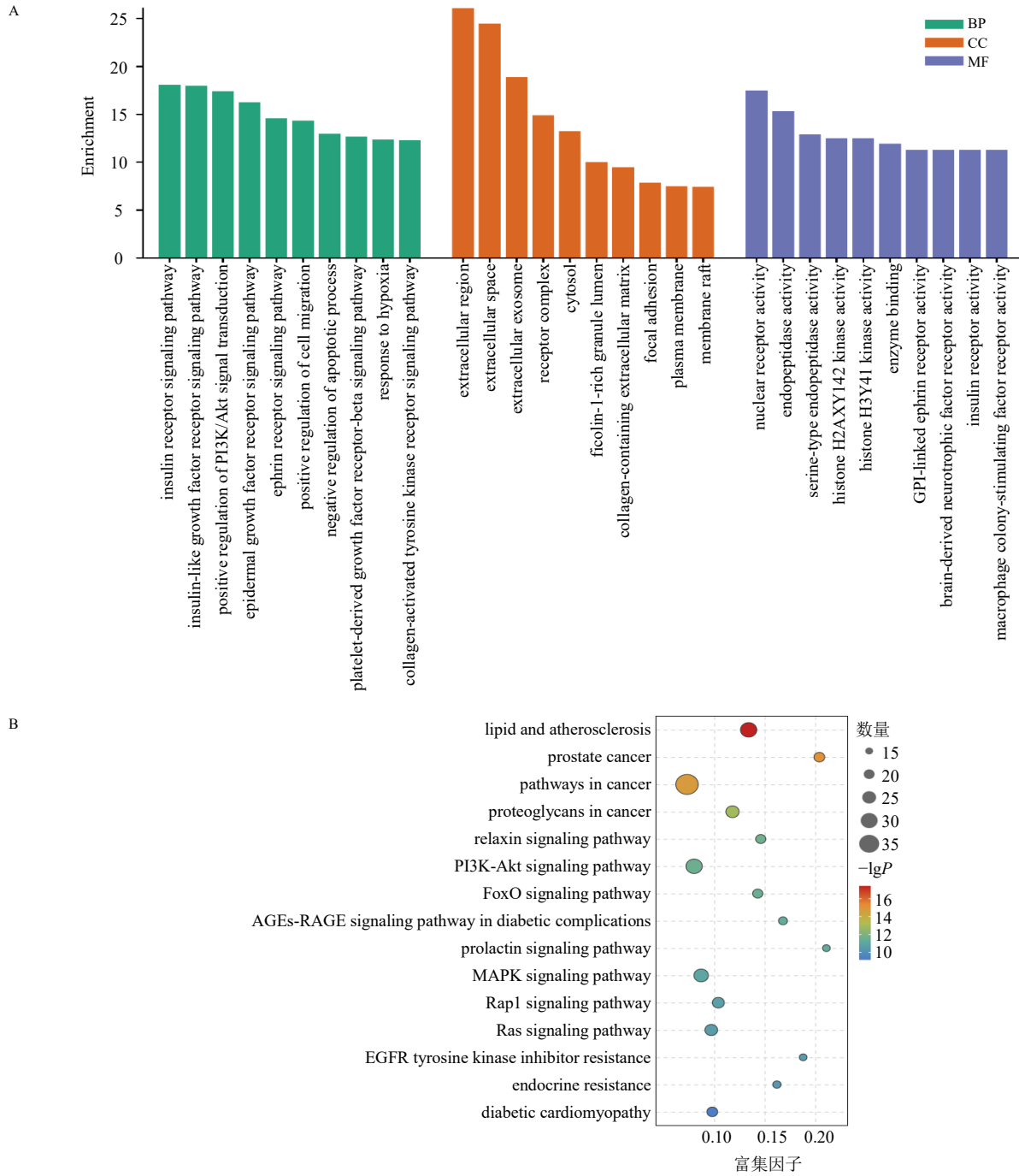


图 2 连翘叶治疗糖尿病肾病的 GO 功能富集分析 (A) 和 KEGG 通路分析 (B)

Fig. 2 GO functional enrichment analysis (A) and KEGG pathway analysis (B) of *F. suspensa* leaves in treatment of diabetic kidney disease

受体活性、肽链内切酶活性和丝氨酸型内肽酶活性。KEGG 通路分析中连翘叶治疗糖尿病肾损伤的相关通路包括脂质与动脉粥样硬化、癌症的通路、PI3K-Akt 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、MAPK 信号通路、TNF 信号通路和 IL-17 信号通路等。

2.2 连翘叶改善糖尿病小鼠肾损伤的实验验证

2.2.1 小鼠肾脏组织病理形态 如图 3、4 所示, HE

和 Masson 染色显示对照组小鼠肾脏组织肾小球分布均匀, 肾小球中细胞数量以及基质均匀, 肾小管上皮细胞圆润、饱满; 间质未见明显异常; 未见明显的炎性细胞浸润肾间质可见少量胶原纤维。模型组小鼠肾脏组织肾小球系膜基质增厚, 肾小管上皮细胞空泡变性, 胞质可见大小不等的圆形空泡; 肾小管上皮细胞水样变性, 细胞肿胀, 胞质空泡化, 肾小球、肾间质可见大量胶原纤维沉积。连翘叶组

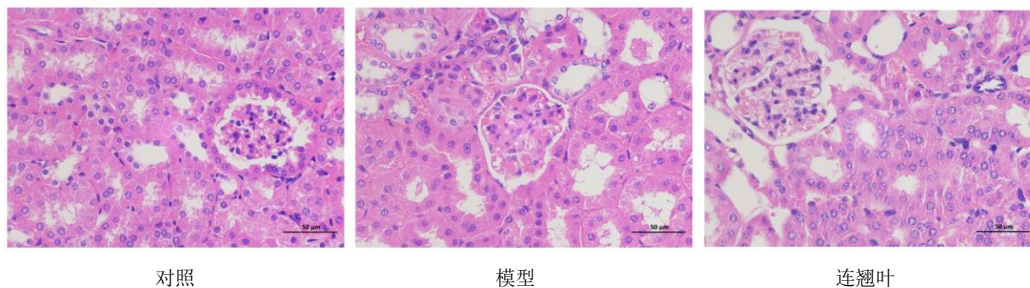


图 3 各组小鼠肾脏组织病理形态 (HE 染色, ×400)
Fig. 3 Renal histopathological morphology of mice in each group (HE staining, ×400)

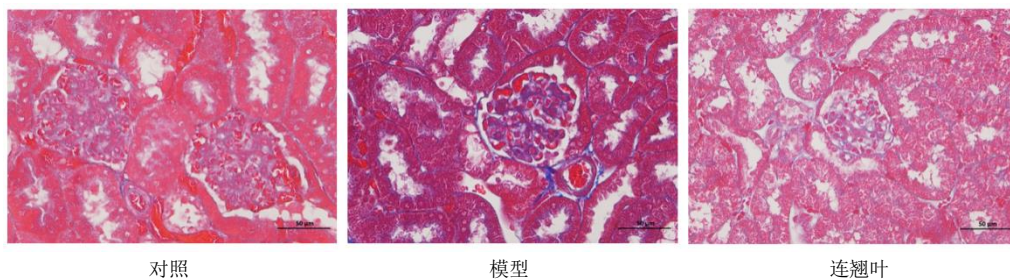


图 4 各组小鼠肾脏组织胶原纤维沉积情况 (Masson 染色, ×400)
Fig. 4 Collagen fiber deposition in renal tissue of mice in each group (Masson staining, ×400)

小鼠肾脏组织肾小球分布均匀, 偶见肾小球毛细血管扩张, 偶见肾小管上皮细胞空泡变性, 胞质可见圆形小空泡; 间质未见明显异常; 未见明显的炎症细胞浸润, 胶原纤维沉积较模型组减少。

2.2.2 肾功能指标 模型组小鼠血清 BUN、SCr、UA、INS 水平均明显高于对照组 ($P < 0.05, 0.01$); 连翘叶组小鼠血清 BUN、Cr、INS 水平均明显低于

模型组 ($P < 0.05$), UA 水平较模型组也有所降低, 见表 2。

2.2.3 小鼠肾脏组织 AGEs、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平 模型组 AGEs、IL-6、TNF- α 水平均明显高于对照组 ($P < 0.01$); 连翘叶组 AGEs、TNF- α 、IL-6 水平均明显低于模型组 ($P < 0.05$), IL-1 β 水平较模型组也有所降低, 见表 3。

表 2 各组小鼠肾功能指标比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison on renal function indicators of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BUN/(ng·mL ⁻¹)	SCr/(pg·mL ⁻¹)	UA/(pg·mL ⁻¹)	INS/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	8.08 ± 1.02	37.67 ± 6.95	125.12 ± 15.72	49.72 ± 8.80
模型	—	11.04 ± 1.66**	50.38 ± 10.13*	161.45 ± 17.31*	71.87 ± 10.04**
连翘叶	0.5	9.25 ± 1.45 [#]	39.29 ± 4.81 [#]	140.92 ± 30.61	58.81 ± 6.25 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group.

表 3 各组小鼠 AGEs、IL-6 和 TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 AGEs, IL-6, and TNF- α levels of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	AGEs/(ng·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	37.72 ± 5.55	49.64 ± 8.84	39.16 ± 7.95	113.05 ± 19.10
模型	—	58.77 ± 11.02**	68.44 ± 11.77**	55.52 ± 9.83**	178.17 ± 40.50**
连翘叶	0.5	45.20 ± 9.49 [#]	60.49 ± 9.74	45.18 ± 3.63 [#]	146.23 ± 34.41 [#]

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group.

2.3 连翘叶对糖尿病小鼠肾脏转录组的影响

根据对照组、模型组、连翘叶组肾脏组织样品的 RNA 测序分析,对基因的表达量进行 PCA 分析,发现对照组与模型组样品转录聚类轮廓有明显的分离趋势,说明两组之间差异有统计学意义。连翘叶组与模型组轮廓区分明显,且连翘叶组比模型组更接近对照组。过滤掉原始数据包含的低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的序列后,筛选差异基因。与对照组比较,模型组筛选出 1 903 个差异基因,其中 1 201 个基因上调,702 个基因下调;与

模型组比较,连翘叶组筛选出 300 个差异基因,其中 109 个上调,191 个下调。通过两组差异基因的韦恩图显示,对照组 vs 模型组和模型组 vs 连翘叶组之间存在 209 个共性差异基因,这些基因在模型组中呈现显著异常表达,而经连翘叶干预后表达水平平均发生明显回调。同时,网络药理学与转录组分析中回调的交集基因共 2 个,分别为 ESR1 和纤溶酶原 (PLG),它们在对照组和连翘叶干预后的表达比模型组更低。这些差异基因可能是连翘叶调控糖尿病肾脏损伤的关键差异基因,见图 5。

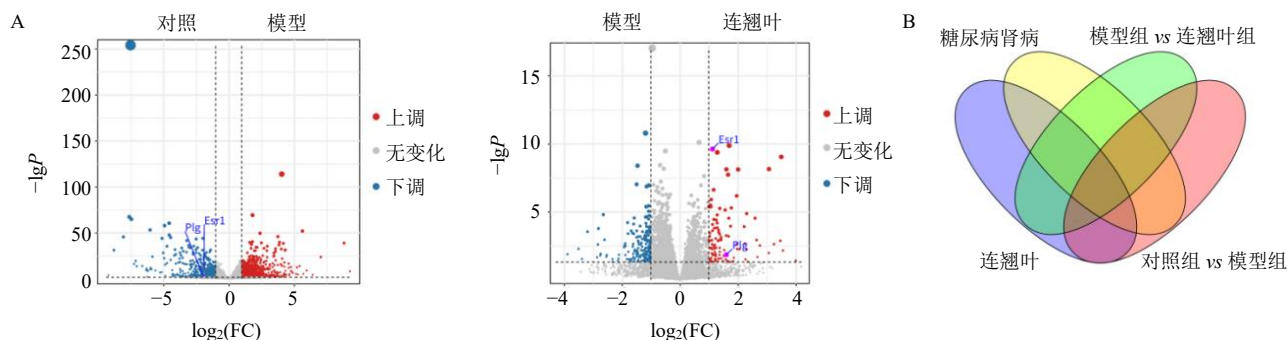


图 5 差异基因火山图 (A)、网络药理学与转录组学交集基因 (B)

Fig. 5 Volcano plot of DEGs (A) and intersection genes between network pharmacology and transcriptomics (B)

GO 功能富集分析显示,在模型组 vs 连翘叶组的差异基因中,主要参与了有机阴离子迁移、组织再生等生物过程;显著富集到了非钠依赖性有机阴离子跨膜转运蛋白活性、DNA 结合转录因子活性, RNA 聚合酶 II 特异性等分子功能;CC 集中于细胞外空间、质膜、转录因子 AP-1 复合物等。KEGG 通路分析发现,差异基因富集于 TNF 信号通路、胰岛素分泌、IL-17 信号通路、钙信号通路等,其中于网络药理学重叠的富集通路包括 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、环磷酸腺苷 (cAMP) 信号通路等,见图 6。

2.4 分子对接

将网络药理学与转录组分析中回调的 2 个关键差异基因 (ESR1 和 PLG),与连翘叶有效成分进行分子对接,以验证有效成分与基因结合的稳定性。对接得分越低,表示化合物与蛋白结合得越牢固,一般来说,对接结合能在 -5.0 kcal/mol ($1 \text{ cal}=4.2 \text{ J}$) 以下表示对接较稳固。对接结果显示,连翘叶各有效成分与 ESR1、PLG 的对接具有较好的稳定性。其中,ESR1 与芦丁、连翘苷,PLG 与连翘酯苷 A、橙皮苷的结合能最好,具有强烈的结合活性,见图 7 和表 4。

3 讨论

连翘始载于《神农本草经》,具有清热解毒、消肿散结的功效。连翘叶为连翘的干燥叶片,其有效成分包括连翘酯苷 A、芦丁、橙皮苷、连翘苷和连翘脂素等,部分活性成分如连翘苷的含量高于连翘果实,具有较高的药用价值。研究表明,连翘叶具有降脂、降糖、抗炎等作用^[16]。本研究利用网络药理学与转录组学、分子对接相结合的方法,揭示了连翘叶改善糖尿病小鼠早期肾损伤的作用机制。本研究结果表明,连翘叶可改善肾功能,Scr、BUN、UA 等各项指标均下降,抑制了肾组织中的炎症反应和 AGEs 的合成。

网络药理学显示,ALB、Akt1、MMP9、PPARG 等核心靶点与连翘叶治疗糖尿病肾病相关,这些靶点富集到了多条与炎症、糖代谢相关通路。其中,PI3K-Akt 信号通路在网络药理学中富集,它是重要的胰岛素信号通路,同时作用于细胞增殖,分化和凋亡的调节^[17]。本课题组前期验证了连翘叶通过调控 PI3K-Akt 抑制过度糖异生和脂质沉积,改善胰岛素抵抗的机制^[9],说明连翘叶能改善糖尿病病情发展。AGEs-RAGE 通路在网络药理学中同样被显著富集,AGEs-RAGE 通路的激活是糖尿病肾病的发

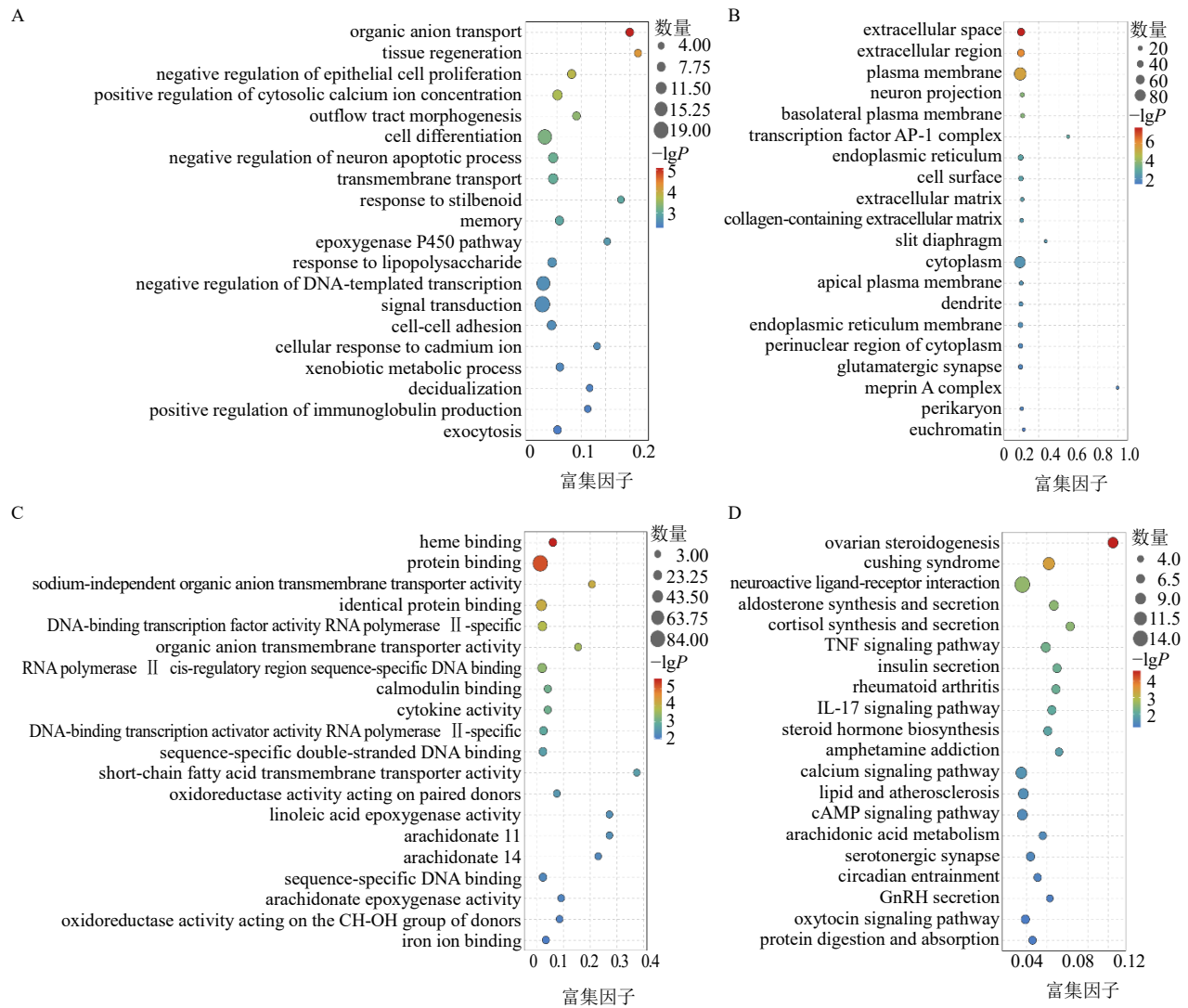


图 6 模型组和连翘叶组差异基因 GO 的 BP (A)、CC (B)、MF (C) 和 KEGG 分析 (D)

Fig. 6 BP (A), CC (B), MF (C) of GO and KEGG analysis (D) of DEGs between model group and *F. suspensa* leaves group

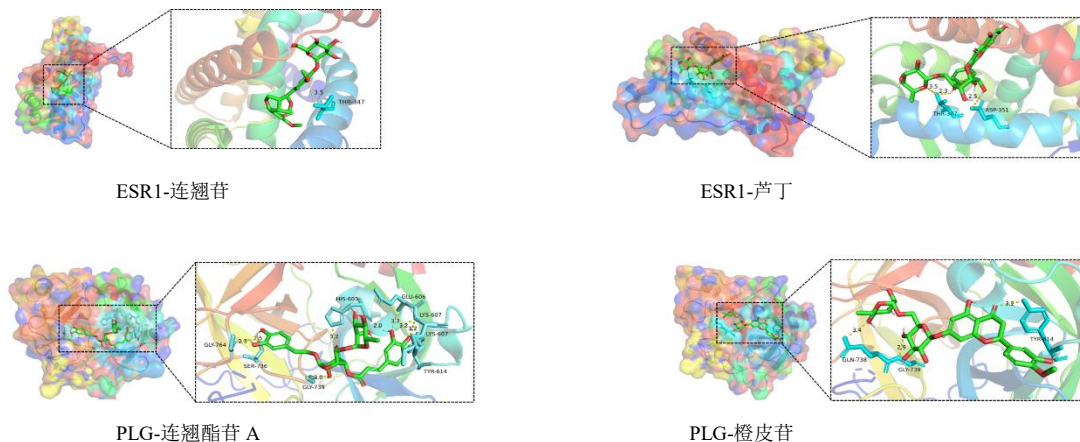


图 7 分子对接结果可视化

Fig. 7 Visualization of molecular docking results

表 4 关键靶点分子对接结合能

Table 4 Molecular docking binding energy of key targets		
靶点名称	成分名称	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
ESR1	caffeic acid	-6.3
	chlorogenic acid	-6.8
	forsythiaside A	-7.1
	hesperidin	-7.1
	kaempferol-3-O-rutinoside	-6.9
	phillygenin	-7.1
	phillyrin	-7.9
	rutin	-7.3
	PLG	caffeic acid
chlorogenic acid		-7.6
forsythiaside A		-9.5
hesperidin		-9.4
kaempferol-3-O-rutinoside		-8.9
phillygenin		-8.0
phillyrin		-7.8
rutin		-8.4

展的主要途径之一。高血糖刺激加速了 AGEs 的产生，而过量的 AGEs 直接增加了活性氧的产生，产生的活性氧反馈并刺激 AGEs 产生^[18]。AGEs-RAGE 信号通路可激活核因子- κ B，促使其进入细胞核，在核内与其靶基因特异性结合后，可引起 IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子的表达和释放，加剧氧化应激并导致肾组织损伤^[19]。连翘叶具有降糖、抗炎等作用，本研究发现，连翘叶能够降低糖尿病小鼠 AGEs 水平，且炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平均降低，这说明连翘叶可能抑制 AGEs-RAGE 通路的激活，同时也抑制了下游炎症通路和炎症因子的产生。

转录组学显示，连翘叶作用下，逆转了 209 个差异基因，其中 ESR1 和 PLG 为网络药理学和转录组学的交集基因。ESR1 与胰岛素作用和血糖调节有关，ESR1 可与 PI3K 相互作用，增加 Akt 活性，多项研究表明 ESR1 是糖尿病肾病的关键靶点^[20]。PLG 通过组织型或尿激酶型 Plg 激活剂切割肽键而转化为纤溶酶，PLG-PLA 系统与炎症反应、组织损伤与修复有关^[21]。研究表明，PLG 可能通过氧化应激途径介导肾损伤，影响肾小球完整性，促进慢性肾脏疾病进展^[22]。同时，有研究发现 PLG 是一种关键的调节分子，具有明显的促炎作用，促进 IL-6 水平增强和信号转导和转录激活因子 3 的激活，可增

强伤口愈合过程中的早期炎症反应^[23]。在连翘叶作用下，*db/db* 小鼠肾脏的 ESR1 和 PLG 的表达较模型组降低，且多种连翘叶成分与二者分子对接结合紧密，说明连翘叶可能通过降低二者表达，减轻肾脏炎症反应。

KEGG 通路分析显示，醛固酮的合成与分泌、胰岛素分泌等途径在转录组中富集，其中 TNF 信号通路和 IL-17 信号通路同时在转录组学和网络药理学中显著富集。TNF 通路和 PI3K-Akt 通路关系密切，与全身炎症相关，可能介导糖尿病肾病炎症的进展^[24]。研究表明，TNF- α 水平升高会导致糖尿病肾病加重，并促进肾脏脂质积聚和肾小管损伤^[25]。连翘叶干预后，小鼠肾脏的 TNF- α 显著降低，说明连翘叶可能通过降低 TNF- α 表达抑制 TNF 信号通路的激活，进而抑制了肾脏的炎症反应。IL-17 信号通路通过调节多种炎症基因的表达来控制炎症，包括促炎细胞因子 (IL-6、IL-1、TNF)、趋化因子 (CXCL1、CXCL2、CXCL5、CCL2、CCL7、CCL20、IL-8)、抗菌肽 (AMPs)、基质金属蛋白酶 (MMPs) 等^[26]，已有研究表明，抑制 IL-17 信号通路可以抑制氧化应激和炎症，改善糖尿病肾病^[27-28]。在本研究中，连翘叶调控了 IL-6、IL-1 等 IL-17 信号通路相关指标，抑制了 IL-17 信号通路，*db/db* 小鼠肾脏中的炎症反应得到改善。

综上所述，结合网络药理学和转录组测序富集分析，ESR1 和 PLG 可能是连翘叶改善糖尿病早期肾损伤的关键靶点，二者与芦丁、连翘苷、连翘酯苷 A、橙皮苷等多种连翘叶成分对接结合密切；通过实验验证，连翘叶可调节 AGEs、IL-6、TNF- α 的表达水平，与多条通路相关，抑制肾脏的炎症反应。本研究证实，连翘叶可通过多途径、多靶点调控糖尿病小鼠的炎症反应进程，在改善糖尿病肾损伤中发挥明确的抗炎效应，揭示上述靶点和成分在糖尿病肾损伤治疗中的价值，为后续验证连翘叶的活性成分与作用靶点、解析其在各信号通路中的调控机制等深入研究奠定了坚实基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang Z, Chen Q Y, Wu W T, *et al.* FBXW7 protects against diabetic nephropathy by targeting metadherin for ubiquitin degradation [J]. *Kidney Dis*, 2025, 11(1): 631-646.
- [2] Wu X Y, Guo B Y, Chang X Y, *et al.* Identification and

- validation of glycolysis-related diagnostic signatures in diabetic nephropathy: A study based on integrative machine learning and single-cell sequence [J]. *Front Immunol*, 2025, 15: 1427626.
- [3] Ghasemzadeh Rahbardar M, Ferns G A, Ghayour Mobarhan M. Exploring the significance of phase angle in diabetes management: A narrative review [J]. *Diabetol Int*, 2025, 16(2): 223-236.
- [4] Natale P, Palmer S C, Navaneethan S D, et al. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers for preventing the progression of diabetic kidney disease [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2024, 4(4): CD006257.
- [5] 陆世龙, 王龙龙, 黄国东. 中医药治疗早期糖尿病肾病的研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(5): 1101-1103.
- [6] 靳丁霞, 王志刚. 中医药治疗糖尿病肾病的作用机制研究进展 [J]. *实用中医内科杂志*, 2024, 38(11): 130-133.
- [7] 李敬, 尤颖, 赵庆生, 等. 连翘叶成分及生物活性研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(18): 344-352.
- [8] 杨建雄, 刘静. 连翘叶茶保肝作用的实验研究 [J]. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 2005, 33(3): 82-85.
- [9] 王紫玉, 冯翼男, 吕盼盼, 等. 连翘叶调控 PI3K/Akt/FoxO1 通路对肥胖大鼠脂代谢影响的研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2025, 34(7): 904-908.
- [10] 田真, 王紫玉, 渠鹏霞, 等. 连翘叶改善肥胖大鼠炎症因子水平及肠道菌群结构的作用 [J]. *海南医学院学报*, 2024, 30(13): 970-981.
- [11] 芦殿香, 张虹波, 梁焯森, 等. 基于转录组学和网络药理学探讨肉豆蔻挥发油干预低氧性肺动脉高压的作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(10): 3375-3387.
- [12] 张磊, 纪思慧, 赵建斌, 等. 连翘叶减肥颗粒剂辅料筛选及质量标准研究 [J]. *山西大学学报: 自然科学版*, 2022, 45(4): 1060-1068.
- [13] 周菲, 胡荣, 刘晨杰, 等. 不同连翘叶炮制品抑制胰脂肪酶活性比较 [J]. *山西大学学报: 自然科学版*, 2018, 41(2): 406-412.
- [14] Sharma K, McCue P, Dunn S R. Diabetic kidney disease in the *db/db* mouse [J]. *Am J Physiol Ren Physiol*, 2003, 284(6): F1138-F1144.
- [15] 周菲. 连翘叶减肥保健品开发可行性研究 [D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [16] 侯改霞. 连翘叶提取物的降血脂和抗疲劳作用研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2004.
- [17] Fruman D A, Chiu H, Hopkins B D, et al. The PI3K pathway in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605-635.
- [18] Ma X J, Ma J R, Leng T, et al. Advances in oxidative stress in pathogenesis of diabetic kidney disease and efficacy of TCM intervention [J]. *Ren Fail*, 2023, 45(1): 2146512.
- [19] Rungratanawanich W, Qu Y, Wang X, et al. Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(2): 168-188.
- [20] Gregorio K C R, Laurindo C P, Machado U F. Estrogen and glycemic homeostasis: The fundamental role of nuclear estrogen receptors ESR1/ESR2 in glucose transporter GLUT4 regulation [J]. *Cells*, 2021, 10(1): 99.
- [21] Perucci L O, Vago J P, Miles L A, et al. Crosstalk between the plasminogen/plasmin system and inflammation resolution [J]. *J Thromb Haemost*, 2023, 21(10): 2666-2678.
- [22] Egerman M A, Wong J S, Tian R X, et al. Plasminogenuria is associated with podocyte injury, edema, and kidney dysfunction in incident glomerular disease [J]. *FASEB J*, 2020, 34(12): 16191-16204.
- [23] Shen Y, Guo Y Z, Mikus P, et al. Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds [J]. *Blood*, 2012, 119(24): 5879-5887.
- [24] Yang S, Wang M M, Li Z M, et al. *Tripterygium wilfordii* Hook. f induced kidney injury through mediating inflammation via PI3K-Akt/HIF-1/TNF signaling pathway: A study of network toxicology and molecular docking [J]. *Medicine*, 2024, 103(6): e36968.
- [25] Yan Y H, Shi H H, Li Y, et al. Mechanism of *Rhizoma Chuanxiong* for the treatment of diabetic kidney disease based on network pharmacology [J]. *Ren Fail*, 2025, 47(1): 2524528.
- [26] Amatya N, Garg A V, Gaffen S L. IL-17 signaling: The *Yin* and the *Yang* [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(5): 310-322.
- [27] Wang H Y, Pan F Z, Liu J, et al. Huayuwendan decoction ameliorates inflammation via IL-17/NF- κ B signaling pathway in diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319: 117328.
- [28] Yang Y, Wang Y Y, Zhou Y, et al. Tirzepatide alleviates oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy via IL-17 signaling pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2025, 480(2): 1241-1254.