

基于网络药理学和实验验证的黄芪六一汤药效组分促肾小管上皮细胞自噬抗糖尿病肾病的机制研究

王群¹, 唐甜甜¹, 韩伟^{1*}, 刘文², 李亚辉¹, 王庆学¹

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550000

摘要: **目的** 通过网络药理学分析及相关的动物实验探讨黄芪六一汤药效组分(HQD)调控肾小管上皮细胞自噬水平抗糖尿病肾病(DN)的机制。**方法** 采用DN大鼠模型考察HQD抗DN的作用。利用SwissTargetPrediction数据库获得HQD主要入血成分的相关靶点,并与GeneCard、DisGeNET和OMIM数据库中筛选的疾病靶点取交集;利用STRING数据库和Cytoscape构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络获得核心靶点;采用Metascape数据库对交集靶点进行基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。利用DN大鼠模型对预测结果进行验证。**结果** 与对照组比较, HQD能显著降低DN模型大鼠血糖(FBG)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、24 h尿白蛋白(24 h-U-Alb)值($P<0.05$),抑制肾组织细胞凋亡($P<0.05$)。网络药理学研究显示HQD主要通过STAT3、EGFR、VEGFA、JUN、TNF、AKT1、CASP3、mTOR、IL2等关键靶点,作用于癌症通路、癌症中的蛋白多糖、PI3K-Akt信号通路、MAPK等信号通路;动物验证实验显示HQD能下调PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白的表达,上调肾脏组织自噬相关蛋白Beclin-1、LC3II/I的表达($P<0.05$),增加肾小管上皮细胞自噬体及自噬溶酶体数量。**结论** HQD抗DN的分子机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路激活,促进肾小管上皮细胞自噬水平,抑制细胞凋亡,减轻肾小管上皮细胞损伤有关。

关键词: 网络药理学; 黄芪六一汤; 药效组分; PI3K/Akt/mTOR; 自噬; 糖尿病肾病

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)06-1187-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.003

Investigation on mechanism of active constituents of Huangqi Liuyi Decoction regulating autophagy renal tubular epithelial cells against diabetic nephropathy based on network pharmacology and experimental validation

WANG Qun¹, TANG Tiantian¹, HAN Wei¹, LIU Wen², LI Yahui¹, WANG Qingxue¹

1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which the pharmacological component of Huangqi Liuyi Decoction (HQD) modulates the level of autophagy in renal tubular epithelial cells against diabetic nephropathy (DN) through network pharmacological analysis and related animal experiments. **Methods** A rat model of DN was used to investigate the anti-diabetic nephropathy effect of HQD. The SwissTargetPrediction database was used to obtain the relevant targets of HQD's major blood-entry components and intersected with the disease targets screened in GeneCard, DisGeNET and OMIM databases; the STRING database and Cytoscape were used to construct a protein-protein interaction (PPI) network to obtain the core targets; Metascape database was used to analyze the GO and KEGG enrichment of the intersected targets. The predicted results were then validated using a diabetic nephropathy rat model. **Results** HQD significantly reduced blood glucose (FBG), blood creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN), total

收稿日期: 2024-01-04

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2023]一般416); 2023年度贵州中医药大学学术新苗项目(贵科合学术新苗[2023]-13号); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(黔卫健函[2024]24号); 贵州中医药大学药用高分子材料研究中心(贵中医ZX合字[2024]071号)

第一作者: 王群(1988—), 女, 博士, 讲师, 主要从事药效物质基础与药物代谢动力学研究。E-mail: gywq198856@163.com

*通信作者: 韩伟(1988—), 男, 博士, 讲师, 主要从事中药药理研究。E-mail: hanwei033@gzy.edu.cn

cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), low-density lipoprotein (LDL), and 24 h urinary albumin (24 h-U-Alb) values in rats with DN ($P < 0.05$), and inhibited apoptosis of renal tissue cells ($P < 0.05$). Network pharmacological studies showed that HQD mainly acted on the cancer pathway, proteoglycans in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, MAPK and other signaling pathways through key targets such as STAT3, EGFR, VEGFA, JUN, TNF, AKT1, CASP3, mTOR, IL2, etc. Animal validation experiments showed that HQD could down-regulate PI3K/Akt/mTOR signaling pathway-related proteins, up-regulate the expression of autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3II/I in renal tissues ($P < 0.05$), and increase the number of autophagosomes and autophagic lysosomes in renal tubular epithelial cells. **Conclusion** The molecular mechanism of HQD against DN may be related to the inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway activation, promotion of autophagy level in renal tubular epithelial cells, inhibition of apoptosis, and attenuation of renal tubular epithelial cell injury.

Key words: network pharmacological; Huangqi Liuyi Decoction; pharmacological components; PI3K/Akt/mTOR; autophagy; diabetic nephropathy

糖尿病肾病(DN)是糖尿病(DM)最常见且严重的微血管病变之一,常伴有肾小球硬化和肾小管间质纤维化,最终可发展为终末期肾脏病(ESRD),严重危及生命。西医治疗DN主要以降糖、降压、调脂、抗感染为主,但这些手段仍难以阻止炎症反应与肾纤维化的发生,且存在一定的局限性及不良反应,因此,探寻行之有效的DN防治策略,提高治疗水平迫在眉睫^[1-3]。中医药根据辨证分型对DN进行治疗已有上千年的历史,对其记载可追溯至《黄帝内经》之“消瘴”及“消渴病”继发的“虚劳、水肿、尿浊、关格、肾劳”等,可通过调节代谢、自噬、抗氧化、抗炎、抗纤维化等机制,对DN进行多靶点调控治疗。在改善DN客观指标、保护肾功能及远期疗效方面,中医药都显示出了独特的优势^[4-5]。

黄芪六一汤始载于《太平惠民和剂局方》,由黄芪60 g、甘草10 g组成,具有大补肺气、滋益肾水、调和脾胃的功效^[6]。课题组前期发现^[7-11],由黄芪六一汤提取、分离出来的黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草酸所组成的黄芪六一汤组分(简称“HQD”)具有防治DN、显著改善肾功能的作用。并鉴定出HQD中6个主要原型入血成分(黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、甘草酸)。然而,HQD作为中药复杂化学成分的混合物,其在体内发挥抗DN药效的分子作用机制尚不完全明确,制约了其深层次开发利用。

网络药理学能高效整合中药、成分和靶点之间关系,构建中药-成分-靶点网络,诠释药物与疾病之间的复杂关系,为中药及其复方作用机制研究提供了行之有效的新方法^[12-13]。故本实验首先采用网络药理学技术对HQD抗DN的机制进行探索,发现HQD发挥药理作用可能与细胞自噬缺陷有关。据报道^[14-15],自噬缺陷可导致肾小管上皮细胞的损伤,而激活自噬能够减轻这一损伤从而保护肾功能。

根据药效学及网络药理学实验结果,推测HQD发挥抗糖尿病肾病的作用机制可能和肾小管上皮细胞自噬水平失调有关,为验证推测结果,本研究从细胞自噬角度出发,采用DN大鼠模型对筛选出的核心通路进行验证,以期对黄芪六一汤及中药复方的分子作用机制研究及深层次开发提供创新思路与借鉴。

1 材料

1.1 仪器

EnVision酶标仪(PerkinElmer);H1-16KR台式高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司);Rayto全自动生化分析仪(Chemray 800);Tissuelyser-24L多样品组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司);三诺血糖仪(长沙三诺生物传感技术有限公司);Multiskan FC酶标仪(Thermo Scientific);免染蛋白印迹系统(ChemiDoo™)、蛋白快速转印仪(Trans-Blot Turbo)、胶凝成像系统(GBOXChemiXL1.4)均购自美国Bio-rad公司;电泳仪(PowerPacBasic)、核酸蛋白紫外检测仪(Biomate 3S)、垂直电泳槽,均购自美国Thermo公司;纯水超纯水机(四川优普超纯科技有限公司);透射电子显微镜(日本电子JEOL)生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);台式高速微量离心机(大龙兴创实验仪器北京股份);超薄切片机(LEICA);组织脱水机(LEICA)。

1.2 试药

黄芪(批号220604、211104、220901,四川盛世锦荣药业有限公司)、甘草(批号201024、200306、220805,四川盛世锦荣药业有限公司),黄芪、甘草经贵州中医药大学谢军丽讲师鉴定分别为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根和根茎。细胞凋亡检测试剂盒(货号

E-CK-A322, Elabscience), DAPI(货号C1002, 上海碧云天生物技术有限公司), 抗荧光淬灭封片剂(货号0100-01, southernbiotech), 苏木素(货号H9627, Sigma); 二甲苯(货号10023418)、包埋石蜡(货号69019361)、伊红Y(水溶性, 货号71014544)、中性树胶(货号10004160)均购于中国医药集团有限公司; 肌酐(Scr, 货号C074-d)、尿素氮(BUN, 货号C010-a)、总胆固醇(TC, 货号C048-a)、三酰甘油(TG, 货号C019-a)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C, 货号C047-a)检测试剂盒均购于长春汇力生物科技有限公司; 尿蛋白测试试剂盒(货号C035-2, 南京建成生物工程研究所), RIPA裂解液、PMSF、蛋白酶抑制剂、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA蛋白定量试剂盒、1xTBST缓冲液、5x蛋白上样缓冲液、 β -actin兔多克隆抗体(货号AC230205001)均购于武汉塞维尔生物科技有限公司; mTOR(货号66888-1-1g)、Beclin 1(货号66665-1-1g)、p-mTOR(货号66882-1-1g)、HRP标记的羊抗鼠IgG(货号SA00001-2)、HRP标记的羊抗兔IgG(货号20000373)鼠单克隆抗体均购于武汉Proteintech有限公司; LC3 α/β (货号R10241506)、PI3K(货号N09263380)、Akt(货号M04201652)兔多克隆抗体购于沈阳万类生物科技有限公司, 链脲佐菌素(STZ, 索莱宝生物有限公司, 批号2230520002)。

根据本课题组前期确定的HQD制备工艺^[10], 按照原处方黄芪与甘草6:1比例, 取符合药典标准的黄芪饮片12 kg和甘草饮片2 kg, 制备得质量分数为72.04%的黄芪总皂苷干浸膏76.02 g(含黄芪甲苷2.69%); 质量分数为70.03%的黄芪总黄酮干浸膏31.64 g(含毛蕊异黄酮葡萄糖苷1.72%、毛蕊异黄酮1.52%、芒柄花苷0.94%、芒柄花素0.31%); 质量分数为67.12%的黄芪总多糖干浸膏185.04 g, 质量分数为80.05%的甘草酸精制品22.01 g。将上述制备所得黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖干浸膏与甘草酸精制品全部混合均匀, 即得本实验所需HQD样品。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠35只, 体质量(300.00 \pm 10.82)g, 购自长沙市天勤生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号SCXK(湘)2022-0011, 饲养于通风良好, 室温18~25℃, 相对湿度50%~70%, 按常规定期消毒的动物房。按每笼4只分装, 由专人饲养管理, 自由饮水及饲料, 实验操作和处理严格遵循国际准则。

2 方法

2.1 HQD抗DN的药效实验

2.1.1 DN模型大鼠的制备 大鼠适应性喂养1周后, 选取8只作为对照组, 对照组大鼠喂食普通饲料。其余大鼠高糖高脂饲料喂养2周, 尾iv STZ(溶于pH 4.5, 0.01 mol·L⁻¹无菌柠檬酸钠缓冲液) 33 mg·kg⁻¹, 注射4周后测定空腹血糖(FBG)及24 h尿蛋白(24 h U-Alb)含量, 以FBG \geq 11.1 mmol·L⁻¹^[16-17], 肾组织出现病变为造模成功。其中, 24只大鼠造模成功, 3只血糖低于11.1 mmol·L⁻¹, 无死亡大鼠。

2.1.2 分组及给药 将造模成功大鼠随机分为模型组, HQD高、低剂量给药组, 每组8只。以黄芪六一汤临床生药用量(黄芪60 g、甘草10 g)的4倍、1倍剂量, 换算本实验的HQD高剂量(0.66 g·kg⁻¹)与低剂量(0.17 g·kg⁻¹)。按照给药剂量, 每日固定时间ig 1次, 对照组与模型组ig等量的0.9%氯化钠溶液, 连续给药8周。

2.1.3 各组大鼠相关生化指标检测 实验期间观察各组大鼠活动情况、精神状态、毛色、进食、饮水量及排泄量状况等。末次给药后, 代谢笼收集24 h尿液并记录尿量(禁食不禁水), 1 400 r·min⁻¹离心5 min, 收集上清。尾静脉采血测FBG, 于腹主动脉取血, 4℃下3 000 r·min⁻¹离心15 min, 收集上清。取血后断颈处死各组大鼠, 取肾脏, 除去被膜, 部分肾组织用于病理学、细胞凋亡等检测, 其余组织于-20℃保存备用。采用全自动生化分析仪, 检测血清Scr、BUN、TG、TC、LDL-C水平。按照尿蛋白定量测试盒说明书操作测定尿总蛋白。

2.1.4 肾脏组织病理学观察 取上述部分肾脏置于4%多聚甲醛中固定, 蒸馏水冲洗, 将组织包裹在石蜡块中, 组织脱水, 浸蜡、包埋、切片、烤片、切片脱蜡, HE染色、Masson染色, 封片, 光镜下观察肾脏组织病理学改变。

2.1.5 TUNEL检测细胞凋亡情况 取肾脏组织石蜡切片进行脱蜡、水化, 以蛋白酶K工作液在25℃下消化组织15 min, PBS漂洗, 按照说明书对切片进行TUNEL染色, 荧光显微镜下观察采集图像, 计算细胞凋亡率。

2.1.6 数据统计分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用SPSS 27单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2 网络药理学研究

2.2.1 活性成分靶点预测 以HQD中6个主要原

型入血成分(黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、甘草酸)为研究对象。采用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载活性成分的 SDF 格式,将其导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>) 进行活性成分的靶点预测。剔除重复靶点,获取与6个活性成分相关的靶点。通过 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将得到的活性成分靶点蛋白名称进行标准化。

2.2.2 DN 的靶点预测 通过 GeneCard (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 和 OMIM (<https://omim.org/>) 数据库以“Diabetic nephropathy”为关键词进行检索,剔除重复得到疾病靶点,并用 Venny 工具将6个活性成分的作用靶点与 DN 靶点进行交集比对,得到其共同作用的靶点作为6个活性成分治疗 DN 的潜在靶点。

2.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 为了进一步明确 HQD 治疗 DN 预测靶点之间的直接或间接调控关系,将潜在靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 中构建 PPI 网络,限定物种为“Homo sapiens”,为了具有高置信度,设置 minimum required interaction score ≥ 0.9 ,并隐藏游离蛋白,以 TSV 格式保存结果,将其导入可视化的 Cytoscape 3.6.0 软件进行拓扑分析,筛选得到核心靶点。

2.2.4 基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将交集靶点导入 Metascape (<http://metascape.org/gp/index.html>),进行 GO 功能富集分析;将交集靶点导入 KOBAS 3.0 数据库 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/genelist/>),进行 KEGG 通路富集分析。下载分析结果,将其分别按 *P* 值和“Count”(每条通路中含有的潜在基因靶点的数量)值的大小进行排序。

2.3 实验验证网络药理学预测结果

2.3.1 透射电镜观察肾小管上皮细胞中自噬体及自噬溶酶体的形成 取“2.1.3 项”下对照组、模型组、HQD 高剂量给药组大鼠部分肾组织约 1 cm³,经 3% 戊二醛预固定 24 h 左右,1% 四氧化锇再固定 2 h;依次加入 30%、50%、70%、80%、95%、100% 的丙酮溶液进行逐级脱水,每次 20 min;脱水后,采用丙酮和 Epon812 包埋剂对其进行渗透和包埋;采用超薄切片机制备 60~90 nm 的超薄切片;并以醋酸铀避光染色 10~15 min,再用柠檬酸铅避二氧化碳

染色 1~10 min,超纯水清洗 3 次,滤纸吸干、室温干燥过夜后,采用 JEM-1400FLASH 透射电镜对各组肾组织中的肾小管上皮细胞外形及其中的自噬体及自噬溶酶体进行观察。

2.3.2 Western blotting 检测肾脏组织中自噬相关蛋白及磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路关键蛋白的表达 随机从对照组、模型组、HQD 高剂量给药组选取 3 只大鼠的肾组织,加入含蛋白酶和磷酸化酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上匀浆,裂解 1 h 后,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液;BCA 法测定总蛋白浓度。每孔以 20 μ g 蛋白上样,100 V 电泳,100 V 湿转;5% 的脱脂牛奶封闭 2 h,加入 Beclin-1、LC3II/I 一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入二抗(1:10 000)室温孵育 1 h,显色曝光。扫描胶片,分析胶片灰度值。考察 HQD 对肾组织中 Beclin-1、LC3II/I、PI3K、Akt、mTOR 及 p-mTOR 蛋白表达的影响。

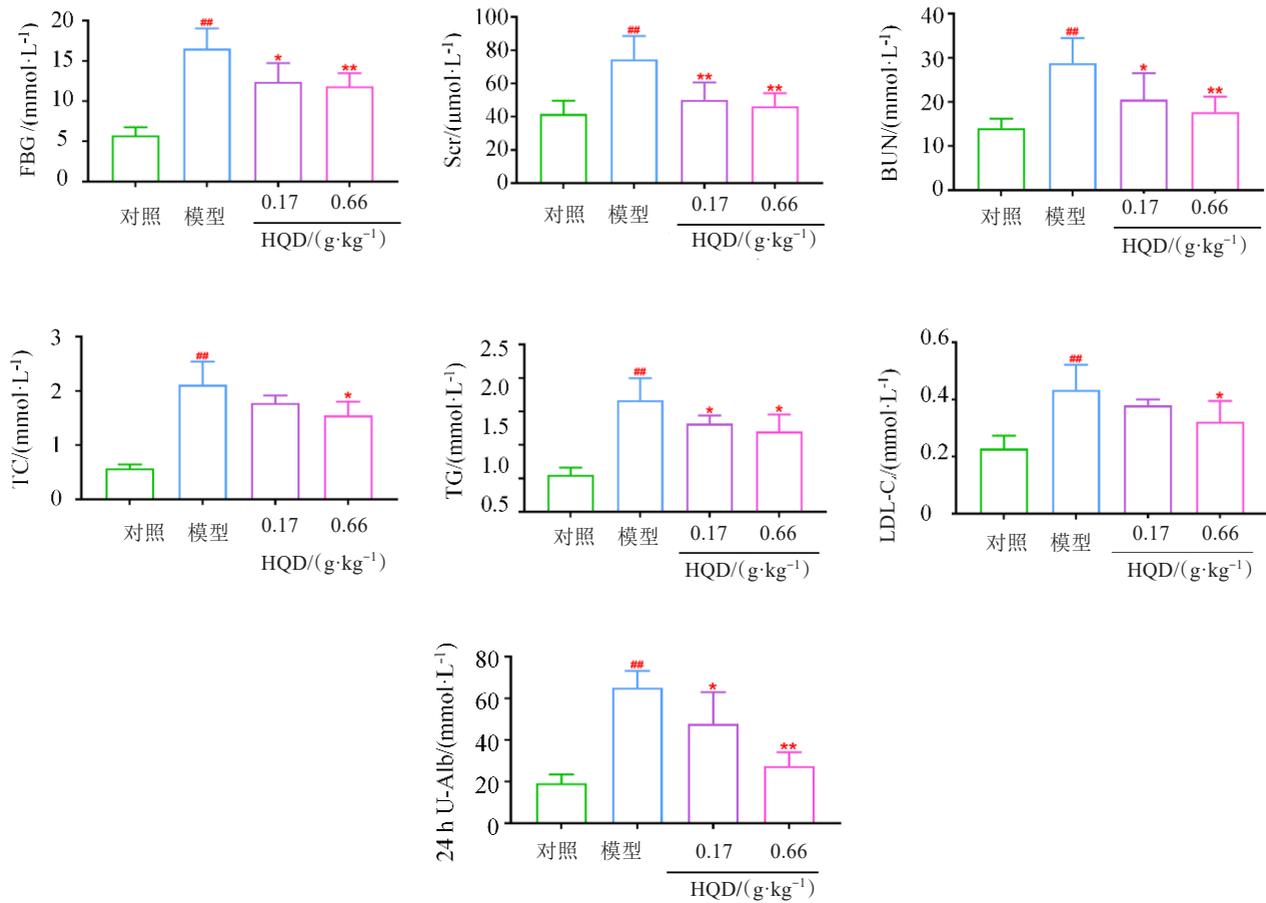
3 结果

3.1 HQD 抗 DN 的药效实验

3.1.1 各组大鼠相关生化指标检测 结果见图 1。对照组大鼠精神状态良好,饮食、饮水与大小便正常,皮毛有光泽,体质量逐渐增加。模型组大鼠明显的多饮、多尿、多食、体质量下降等糖尿病“三多一少”症状,后期出现不同程度的体毛暗淡、稀疏、精神萎靡,反应迟钝症状。与对照组比较,模型组大鼠 FBG、Scr、BUN、TG、TC、LDL-C、24 h U-Alb 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,HQD 高剂量组均能显著降低上述药效指标($P < 0.05, 0.01$);低剂量组 FBG、Scr、BUN、TG、24 h U-Alb 显著降低($P < 0.05, 0.01$)。

3.1.2 肾脏组织病理学观察 HE 染色结果显示,细胞核呈蓝色,细胞浆、肌纤维、胶原纤维和红细胞呈不同程度的红色。对照组肾小球结构清晰,肾小球系膜区未见明显改变。模型组大鼠肾小球系膜基质增宽、增多,基底膜弥漫增厚,肾小囊腔狭窄,肾小球体积增大。HQD 给药组大鼠肾小球系膜轻度增生,肾组织损伤情况较模型组明显减轻,见图 2。

Masson 染色结果显示,胶原纤维、黏液、软骨呈蓝色,肌肉、胞浆、纤维素、红细胞呈红色,胞核呈蓝黑色。主要用于区分肌纤维和胶原纤维。与模型组相比,HQD 给药组大鼠的肾纤维化程度较轻,见图 3。



与对照组比较: ^{*}P<0.05 ^{##}P<0.01; 与模型组比较: ^{*}P<0.05 ^{*}P<0.01。
^{*}P<0.05 ^{##}P<0.01 vs control group; ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs model group.

图1 各组大鼠相关生化指标的检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Detection results of relevant biochemical indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

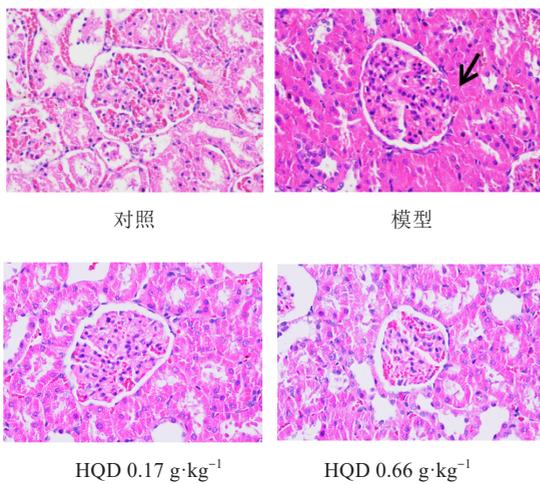


图2 各组大鼠肾组织病理改变 (HE, ×400)

Fig. 2 Pathological changes of rat kidney tissue in each group (HE, ×400)

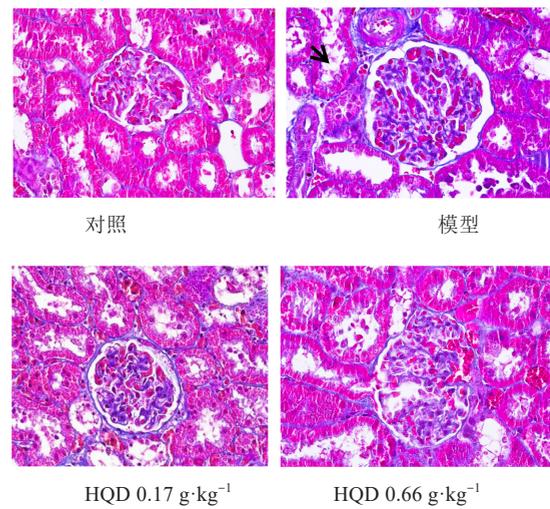


图3 各组大鼠肾组织超微结构 (Masson, ×400)

Fig. 3 Ultrastructure of rat kidney tissue in each group (Masson, ×400)

3.1.3 TUNEL 检测细胞凋亡情况 荧光显微镜下组织切片上凋亡的细胞呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光。每个样品选取3个高倍视野(400倍),每个高倍视野计数各视野总细胞数,同时计数各视野的凋亡阳性细胞。结果见图4。与对照组比较,模型组细胞凋亡率明显上升($P < 0.01$);而HQD高、低剂量组细胞凋亡率显著下降($P < 0.05$)。

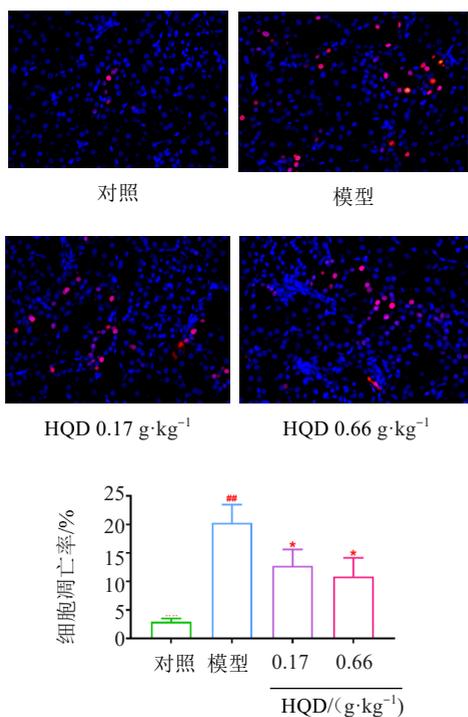


图4 各组大鼠肾组织TUNEL染色图(×400)
Fig. 4 TUNEL staining of rat kidney tissues in various groups (×400)

3.2 网络药理学研究

3.2.1 潜在靶点 通过检索SwissTargetPrediction得到各个活性成分所对应的靶点基因共600个,去掉重复的244个,剩余356个靶点。通过GeneCard、DisGeNET和OMIM数据库共获得1480个与DN相关的靶点,通过制作韦恩图分析,得到114个药物-疾病共同靶点作为活性成分治疗DN的潜在靶点,见图5。

3.2.2 潜在靶点的PPI网络分析 为了获得有关潜在靶点交互作用的信息,将114个潜在靶点上传到STRING平台,进行PPI网络分析,结果见图6。并将结果的TSV文件导入Cytoscape 3.6.0进行可视化和拓扑分析,PPI网络包括102个节点和451条边,选择“度”(degree)、“介数中心性”(betweenness

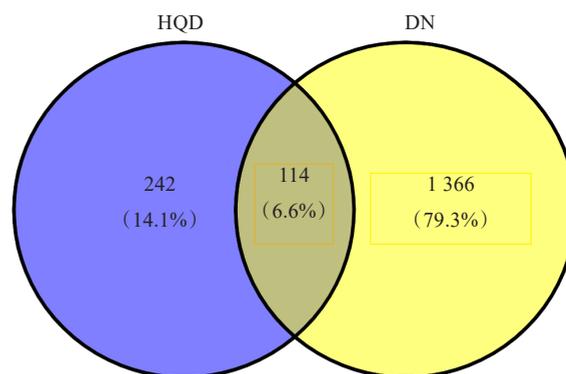


图5 活性成分与DN交集靶点韦恩图
Fig. 5 Ven plots of active ingredients of HQD and DN intersection targets

centrality)和“接近中心性”(closeness centrality)高于中位数的靶点作为关键目标,首次筛选值为 $degree > 6$, $betweenness\ centrality > 0.003\ 836\ 8$, $closeness\ centrality > 0.413\ 800\ 8$,筛选后,获得了一个包含41个节点和258条边的新网络;随后筛选值为 $degree > 10$, $betweenness\ centrality > 0.007\ 837\ 44$, $closeness\ centrality > 0.571\ 428\ 57$,获得包含19个节点和107条边的中心网络;为了在PPI网络中找到最关键的目标,最后一次筛选值为 $degree > 11$, $betweenness\ centrality > 0.014\ 000\ 41$, $closeness\ centrality > 0.72$,筛选获得STAT3、EGFR、VEGFA、JUN、TNF、AKT1、CASP3、mTOR及IL2作为PPI网络中的核心靶点,见图7。其中,mTOR是调节自噬的关键激酶,抑制mTOR可促进自噬。

3.2.3 GO分析和KEGG分析 将114个交集靶点导入Metascape平台进行GO富集分析,共获得1581条结果,包含1388条生物过程(BP)结果,122条分子功能(MF)结果,71条细胞组成(CC)结果,分别选取显著丰富的前15个结果进行可视化处理,见图8。BP主要对激素的反应、MAPK级联调节、细胞对氮化合物的反应、细胞对有机氮化合物的反应和蛋白质磷酸化的正调控等;CC主要涉及膜筏(membrane raft)、膜微区(membrane microdomain)、细胞外基质(extracellular matrix)、膜面(side of membrane)和囊泡腔(vesicle lumen)等;MF主要涉及激酶结合(kinase binding)、蛋白激酶结合(protein kinase binding)、激酶活性(kinase activity)、内肽酶活性(endopeptidase activity)和蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性(protein serine/threonine kinase activity)等。表明HQD治疗DN的机制涉及多种生物学过程,体现多重治疗作用。

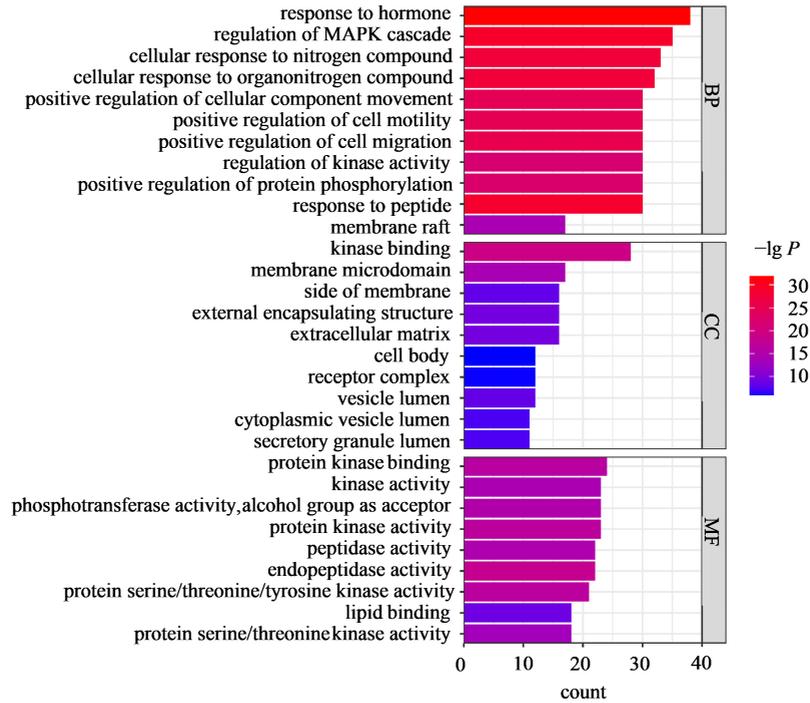


图 8 GO 富集分析

Fig. 8 GO enrichment analysis

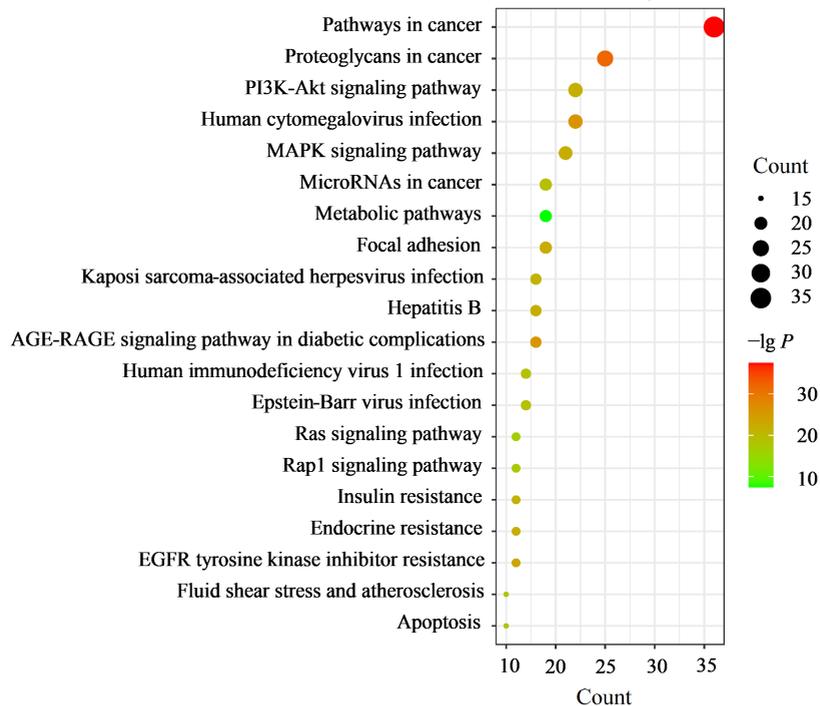


图 9 KEGG 通路富集分析

Fig. 9 KEGG pathway enrichment analysis

胞浆中自噬溶酶体数量较对照组明显降低。HQD 高剂量组肾小管上皮细胞形态结构轻度异常。细胞核呈类椭圆形或类圆形,核仁明显;部分线粒体轻度肿胀,嵴溶解断裂,基质颗粒减少;胞浆中自噬溶酶体及自噬小体数量较模型组有所增加,溶酶体

与自噬小体融合较好。

3.3.2 Western blotting 检测肾脏组织中自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3II/I 及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路关键蛋白的表达 结果见图 11。与对照组比,模型组 PI3K、Akt、mTOR、p-mTOR 蛋白表达水平显著升

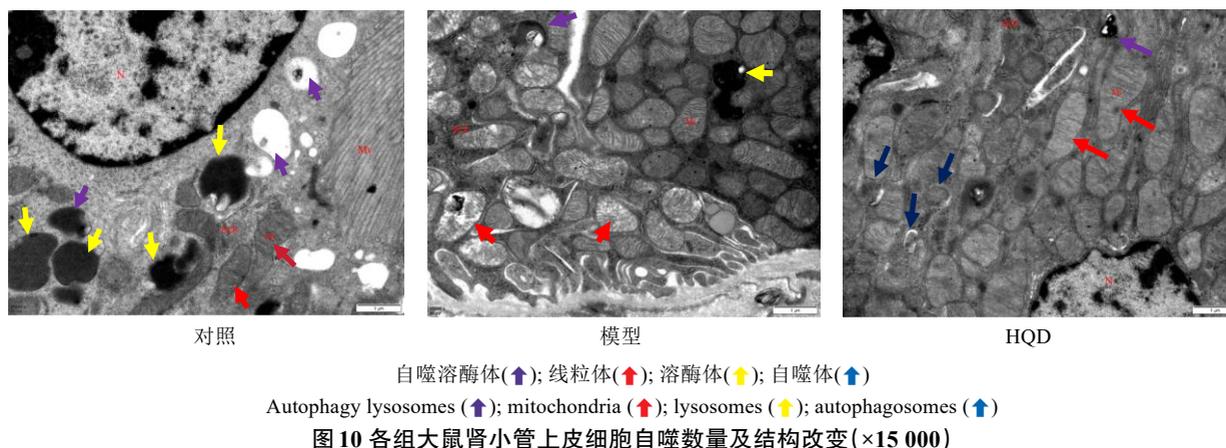


Fig. 10 Plot of autophagy number and structural changes in renal tubular epithelial cells of rats in each group (×15 000)

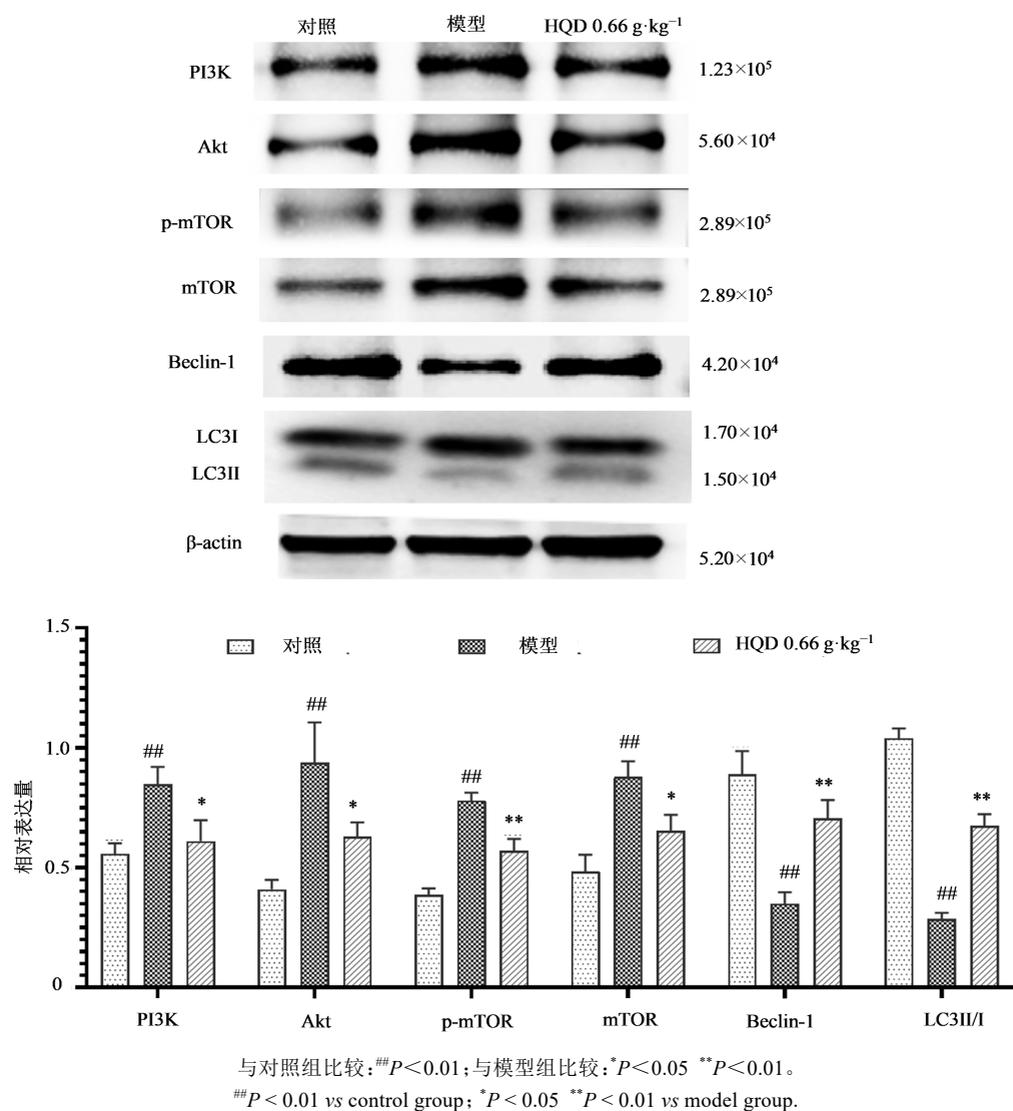


图 11 肾脏组织中自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3II/I 及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路关键蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 11 Expression of autophagy-related proteins Beclin-1, LC3II/I and key proteins of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in renal tissues($\bar{x} \pm s, n=8$)

高; Beclin-1、LC3 II/I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比, HQD 高剂量给药组 PI3K、Akt、mTOR、p-mTOR 蛋白表达水平显著降低; Beclin-1、LC3 II/I 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

自噬是真核细胞的一种自我保护机制,也是细胞内蛋白质降解的主要途径之一。自噬活性正常时,细胞能够及时降解自噬小体内包裹的受损细胞器、侵入的病原体及衰老的蛋白质等,以维持细胞稳态、能量生成及细胞器的更新^[19-20]。研究表明^[21-23], DN 发生时,肾脏存在显著的自噬失调。自噬缺陷可导致肾小管上皮细胞的损伤,激活自噬能够减轻这一损伤从而保护肾功能。恢复自噬活性可能成为保护肾脏免受高糖损伤的一种新的治疗选择,有望成为防治 DN 的新靶点。

课题组前期已鉴定出 HQD 中 6 个主要原型入血成分(黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、甘草酸)。文献报道^[24-28], 黄芪甲苷可通过激活 AMPK/eNOS 信号通路,改善大鼠糖尿病肾损伤;毛蕊异黄酮葡萄糖苷具有保护血管内皮细胞的作用,能延缓 DN 患者的血管病变;毛蕊异黄酮能通过调节 NF- κ B/p65/NLRP3/TXNIP 炎症小体信号通路延缓 DN 的发展;芒柄花素可通过调节 Sirt1/PGC-1 α 通路减轻 DN 大鼠的肾小管及线粒体损伤;芒柄花苷能通过降低氧化应激和炎症标志物减轻链脲佐菌素诱导的 DN 大鼠模型的肾损伤;甘草酸能通过调节 SNARK/AMPK 信号通路保护高糖诱导的肾小球足细胞损伤。然而, HQD 在体内发挥抗 DN 药效作用的分子机制尚不完全明确,限制了其深层次研究。网络药理学能基于中药多靶点效应,从生物信息学上整体分析在 HQD 治疗 DN 上所涉及的靶点及信号通路。故本实验以 HQD 中 6 个主要原型入血成分为研究对象,采用网络药理学方法对 HQD 作用靶点及信号通路进行预测,并将 114 个潜在靶点进行了 PPI 分析,发现 HQD 可能主要作用于 STAT3、EGFR、VEGFA、JUN、TNF、AKT1、CASP3、mTOR 及 IL2 等核心靶点。其中, mTOR 是调控自噬的重要因子。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白酶,是磷脂酰肌醇 3 激酶的相关激酶(PIKK), mTOR 复合体是调节细胞自噬的关键分子之一,可作为多条信号通路的中间环节参与细胞自噬调节过程,并影响自噬标志性蛋白 LC3 的表达。mTOR 可与其他调控蛋白相互作用至少形成两个不同的复合物,分别是 mTOR 复合物 1(mTORC

1)和复合物 2(mTORC2)。虽然这两个复合物含有相同的催化亚基——TOR,但均可磷酸化不同的下游靶点,从而显示出不同的细胞功能。抑制 mTOR 可促进自噬,响胰岛素抵抗和炎症反应^[29-30]。因此,调控 mTOR 不同的上游信号通路可能是治疗 DN 的一个新思路。

KEGG 通路功能富集分析显示, HQD 可能通过作用于癌症通路、癌症中的蛋白多糖、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 等信号通路发挥药理作用。其中 PI3K/Akt/mTOR 通路为自噬调控的经典通路,通路活化后可激活 mTORC1 抑制细胞自噬过程^[31]。据报道^[32], Beclin-1、LC3 蛋白参与自噬小体的形成与自噬溶酶体降解过程,是经典的自噬标志物。自噬小体的减少会导致 Beclin-1 和 LC3 II/I 的表达水平降低,而激活 Beclin-1 和 LC3 II/I 表达可诱导细胞发生自噬。故本项目选择对经典自噬调控通路 PI3K/Akt/mTOR 进行验证,并进一步考察 HQD 对自噬标志蛋白 Beclin-1 和 LC3 II/I 的调节作用。Western blotting 结果表明, HQD 可以上调肾组织自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II/I 表达,抑制 PI3K/Akt 通路活化,抑制 mTOR 的激活;透射电镜观察显示, HQD 可以增加肾小管上皮细胞自噬体及自噬溶酶体数量。研究结果初步证实 HQD 能够抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路活化,促进肾小管上皮细胞自噬,改善糖尿病肾损伤情况,与预测的结果相吻合。

5 结论

本研究应用网络药理学的方法探讨了 HQD 调控肾小管上皮细胞自噬抗 DN 的主要靶点及信号通路,并利用 DN 大鼠模型对预测结果进行了初步验证。HQD 抗 DN 的分子机制可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路活化,提高肾小管上皮细胞自噬水平,抑制细胞凋亡,减轻肾小管上皮细胞损伤有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hou X Y, Du K R, Yang X J, et al. Progress in the study of chronic inflammatory mechanism of diabetic nephropathy [J]. *Adv Clin Med*, 2022, 12(7): 6019-6025.
- [2] Yang M, Wang X, Han Y C, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in diabetic nephropathy [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(42): 8810-8824.
- [3] Bag A, Byahut A, Khandelwal B. Medicinal plants with kidney-protecting effect in diabetic nephropathy [J]. *Curr Sci*, 2022, 123(4): 542.
- [4] 闫淼, 陈锐. 糖尿病肾病中医病因病机的研究概述 [J].

- 吉林中医药, 2021, 41(6): 837-840.
- Yan M, Chen R. A summary of the research on the etiology and pathogenesis of diabetic nephropathy in traditional Chinese medicine [J]. Jilin J Chin Med, 2021, 41(6): 837-840.
- [5] 陈聪聪, 秦雪梅, 杜冠华, 等. 中药有效组分"配伍艺术"的研究基础: 组分配比研究策略 [J]. 药学学报, 2019, 54(5): 808-817.
- Chen C C, Qin X M, Du G H, et al. The "compatible art" of effective components from traditional Chinese medicine: Research on the compatibility and proportion of effective components [J]. Acta Pharm Sin, 2019, 54(5): 808-817.
- [6] 温丽敏, 许燕玲, 李振, 等. 黄芪六一汤对2型糖尿病大鼠降糖作用的机制研究 [J]. 中药材, 2018, 41(3): 699-702.
- Wen L M, Xu Y L, Li Z, et al. Study on the effects and mechanism of *Astragalus liuyi* decoction on type 2 diabetes mellitus rats [J]. J Chin Med Mater, 2018, 41(3): 699-702.
- [7] Wang Q, Shi Y, GONG Z P, et al. A Comparative study of the pharmacokinetics of astragaloside IV in normal and diabetic nephropathic rats [J]. Latin American J Pharm, 2019, 38(8).
- [8] Wang Q, Wang Y L, Liu W, et al. Mechanisms underlying the differences in the pharmacokinetics of six active constituents of Huangqi liuyi decoction between normal and diabetic nephropathy mouse models [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 2481654.
- [9] Wang Q, Tang T T, Wu Z G, et al. Study on the liver Drug's dominant metabolic enzymes for six effective components of the Huang qi Liuyi Decoction [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1175896.
- [10] Wang Q, Shi Y, Wu Z G, et al. Effects of Huangqi liuyi decoction in the treatment of diabetic nephropathy and tissue distribution difference of its six active constituents between normal and diabetic nephropathy mouse models [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 934720.
- [11] Wang Q, Shi Y, Liu X D, et al. Pharmacokinetic difference of six active constituents of Huangqi liuyi decoction between control and diabetic nephropathy mouse models [J]. Int J Anal Chem, 2022, 2022: 7602992.
- [12] 田崇梅, 傅利萍, 夏道宗. 基于网络药理学和细胞生物学研究黄芪治疗糖尿病肾病的作用机制 [J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(1): 52-61.
- Tian C M, Fu L P, Xia D Z. Exploration into the mechanism of effective components and potential targets of astragali Radix in treatment of diabetic nephropathy based on network pharmacology and cell biology verification [J]. Chin Pharm J, 2022, 57(1): 52-61.
- [13] 陈勃麟, 曾琨鹏, 王宇辰, 等. 槲皮素治疗帕金森病机制的网络药理学分析及验证 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2023, 25(2): 752-762.
- Chen B L, Zeng K P, Wang Y C, et al. Network pharmacological analysis and verification of the mechanism of quercetin in the treatment of Parkinson's disease [J]. Modern Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Techn, 2023, 25(2): 752-762.
- [14] 周梦琪, 郑慧娟, 田蕾, 等. 糖尿病肾病肾间质纤维化"肾络癥瘕聚散消长"病机内涵 [J]. 中医学报, 2022, 8(2): 293-298.
- Zhou M Q, Zheng H J, Tian L, et al. Pathogenesis of "ebb and flow of renal collateral gatherings" in renal interstitial fibrosis of diabetic nephropathy from perspective of abnormalities autophagy and ubiquitin-proteasome system [J]. Acta Chin Med, 2022, 8(2): 293-298.
- [15] 李建省, 王英明, 闫燕顺, 等. 自噬在肾间质纤维化中的作用及中药干预研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(19): 274-282.
- Li J S, Wang Y M, Yan Y S, et al. Role of autophagy in renal interstitial fibrosis and intervention of Chinese medicine: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(19): 274-282.
- [16] 孙凤平, 殷丽平, 谢春光, 等. 参芪复方对GK大鼠肾NF- κ BmRNA表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6): 1434-1436.
- Sun F P, Yin L P, Xie C G, et al. Effects of Shenqi compound recipe on NF - κ BmRNA in kidney tissue of GK rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2012, 23(6): 1434-1436.
- [17] 金童, 邵赛聪, 周丽红, 等. 复方鱼腥草合剂对糖尿病大鼠肾小球足细胞的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 858-860.
- Jin T, Shao S C, Zhou L H, et al. Effect of compound houttuynia cordata mixture on glomerular podocytes in diabetic rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(4): 858-860.
- [18] 许燕玲, 郑媛嘉, 李振, 等. 黄芪六一汤对2型糖尿病模型大鼠肾小管上皮葡萄糖重吸收的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 114-121.
- Xu Y L, Zheng Y J, Li Z, et al. Effect of Huangqi liuyi Tang on glucose re-absorption via renal tubular epithelial cells in type 2 diabetes model rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2017, 23(11): 114-121.
- [19] 邹琴, 李清璇, 屈玲玲, 等. E2F1调节肾小管上皮细胞自噬对小鼠糖尿病肾病肾纤维化的作用研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(6): 1046-1055.

- Zou Q, Li Q X, Qu L L, et al. E2F1 promotes renal fibrosis in mouse diabetic nephropathy by regulation of autophagy of renal tubular epithelial cells [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(6): 1046-1055.
- [20] 童楠, 童安荣. 中医药调控自噬减轻肾纤维化 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2021, 22(4): 361-363.
- Tong N, Tong A R. Chinese medicine regulates autophagy and reduces renal fibrosis [J]. *Chin J Integr Tradit West Nephrol*, 2021, 22(4): 361-363.
- [21] 王宇阳, 张浩军, 路晓光, 等. 自噬在糖尿病肾病中的作用 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2019, 28(4): 364-368.
- Wang Y Y, Zhang H J, Lu X G, et al. Role of autophagy in progression of diabetic nephropathy [J]. *Chin J Nephrol Dial Transplant*, 2019, 28(4): 364-368.
- [22] Liu Y Y, Li X J, Zhao M L, et al. Macrophage-derived exosomes promote activation of NLRP3 inflammasome and autophagy deficiency of mesangial cells in diabetic nephropathy [J]. *Life Sci*, 2023, 330: 121991.
- [23] Fang Y K, Xing C H, Wang X Y, et al. Activation of the ROS/HO-1/NQO1 signaling pathway contributes to the copper-induced oxidative stress and autophagy in duck renal tubular epithelial cells [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 757: 143753.
- [24] Dong L N, Yu L, Liu A Q, et al. Ononin mitigates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via alleviating oxidative stress and inflammatory markers [J]. *J King Saud Univ Sci*, 2022, 34(6): 102029.
- [25] Yosri H, El-Kashef D H, El-Sherbiny M, et al. Calycosin modulates NLRP3 and TXNIP-mediated pyroptotic signaling and attenuates diabetic nephropathy progression in diabetic rats; An insight [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113758.
- [26] Xu Y H, Feng L, Wang S S, et al. Phytoestrogen calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside ameliorates advanced glycation end products-induced HUVEC damage [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(10): 2953-2965.
- [27] Zhao T Q, Li Y, Zhang M, et al. Glycyrrhizic acid protects glomerular podocytes induced by high glucose by modulating SNARK/AMPK signaling pathway [J]. *Curr Med Sci*, 2023, 43(4): 696-707.
- [28] 李国玲, 匡彬, 张舒, 等. 基于AMPK/eNOS信号通路探讨黄芪甲苷改善糖尿病肾病大鼠肾损伤的作用及机制研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(3): 701-707.
- Li G L, Kuang B, Zhang S, et al. Study on the effect and mechanism of astragaloside IV on rats with diabetic kidney disease based on AMPK/eNOS signaling pathway [J]. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med*, 2023, 40(3): 701-707.
- [29] 钱子冰, 刘静, 曾佩芸, 等. mTOR调控自噬参与糖尿病并发症的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(8): 1200-1204.
- Qian Z B, Liu J, Zeng P Y, et al. Research progress of autophagy regulated by mTOR in diabetic complications [J]. *Basic Clin Med*, 2021, 41(8): 1200-1204.
- [30] Bi C F, Liu J, Hao S W, et al. Xuebijing injection protects against sepsis-induced myocardial injury by regulating apoptosis and autophagy via mediation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rats [J]. *Aging*, 2023, 15(10): 4374-4390.
- [31] Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas J M, Hernández-Damián J, et al. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12): 2694-2701.
- [32] Sun W J, Dong S J, Lu H Q, et al. Beclin-1 overexpression regulates NLRP3 activation by promoting TNFAIP3 in microvascular injury following myocardial reperfusion [J]. *Cell Signal*, 2021, 84: 110008.

[责任编辑 袁永兵]