

基于网络药理学及细胞实验探讨当归补血汤抗糖尿病肾病作用机制

黄暄淇^{1,2}, 王雪松³, 王长州³, 周 茆³, 陈 娅³, 章晨峰^{1,2,3}, 殷洪梅^{1,2,3*}, 王振中^{1,2,3*}

1. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室 (江苏康缘药业股份有限公司/南京中医药大学), 江苏 南京 210000
2. 南京中医药大学 康缘中药学院, 江苏 南京 210023
3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接及细胞实验探究当归补血汤抗糖尿病肾病 (DN) 的作用机制。 **方法** 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 及中药综合数据库 (TCMID), 筛选当归补血汤中黄芪与当归的有效成分; 通过 UniProt 和 Swiss Target Prediction 数据库, 识别活性成分的相关靶点; 利用 GeneCards 与 OMIM 数据库预测 DN 的潜在靶点; 基于获取的数据, 利用 STRING 数据库以及 Cytoscape 软件构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络及“药物-活性成分-靶点”网络。利用 DAVID 数据库对上述靶点进行了基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。通过分子对接实验及细胞实验进行验证, 揭示当归补血汤治疗 DN 的作用机制。 **结果** 网络药理学分析, 得到当归补血汤 32 个活性成分, 与疾病交集靶点 255 个; KEGG 通路富集结果显示, 关键靶点主要参与晚期糖基化终末产物及其受体 (AGE/RAGE) 信号通路、脂质代谢异常导致的动脉粥样硬化通路等多个与免疫反应和炎症过程密切相关的信号通路。此外, 分子对接研究表明, 该方剂的主要化学成分对于 AGE/RAGE 信号通路上的主要靶点表现出良好的结合能力。细胞实验结果表明, 当归补血汤能够抵抗 HK-2 细胞经高糖诱导产生的炎症反应, 并且能够抑制 AGE/RAGE 信号通路上的核心蛋白表达。 **结论** 当归补血汤可能通过抑制 AGE/RAGE 信号通路, 减轻高糖所致的炎症反应, 从而达到治疗 DN 的目的, 可为当归补血汤深入研究提供方向。

关键词: 当归补血汤; 糖尿病肾病; 网络药理学; 分子对接; 细胞实验; AGE/RAGE 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)06-1470-15

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.009

Mechanism of Danggui Buxue Decoction against diabetic nephropathy based on network pharmacology and cell experiment

HUANG Xuanqi^{1,2}, WANG Xuesong³, WANG Changzhou³, ZHOU Mao³, CHEN Ya³, ZHANG Chenfeng^{1,2,3}, YIN Hongmei^{1,2,3}, WANG Zhenzhong^{1,2,3}

1. State Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China
2. Knion School of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Danggui Buxue Decoction (DBD) against diabetic nephropathy (DN) based on network pharmacology, molecular docking and cell experiments. **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and the Traditional Chinese Medicine Integrated Database (TCMID) were used to screen the active components of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* in DBD. Potential targets of these active compounds were identified using the UniProt and Swiss Target Prediction databases. Disease-related targets of DN were retrieved from GeneCards and OMIM. Protein-protein interaction (PPI) networks and a "drug-active component-target" network were constructed using the STRING

收稿日期: 2024-11-28

基金项目: 江苏省基础研究计划自然科学基金-前沿引领技术基础研究专项 (BK20232014)

作者简介: 黄暄淇, 硕士研究生。E-mail: 252696543@qq.com

*通信作者: 王振中, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研发及应用。E-mail: kyywzz@163.com

殷洪梅, 博士, 研究方向为中药制剂研发。E-mail: yinhongmei1010@126.com

database and visualized with Cytoscape. Functional enrichment analysis, including Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis, was performed using the DAVID database. The key findings were further validated through molecular docking and *in vitro* cell experiments. **Results** Network pharmacology analysis identified 32 active components in DBD and 255 overlapping targets associated with DN. KEGG pathway enrichment revealed that the core targets were primarily involved in the AGE/RAGE (advanced glycation end products/receptor for AGEs) signaling pathway, atherosclerosis pathways linked to lipid metabolism disorders, and other critical pathways related to immune response and inflammatory processes. Molecular docking studies demonstrated strong binding affinities between the major bioactive compounds of DBD and key targets in the AGE/RAGE pathway. *In vitro* experiments confirmed that DBD significantly attenuated high glucose-induced inflammatory responses in HK-2 cells and suppressed the expression of core proteins in the AGE/RAGE signaling pathway. **Conclusion** DBD may exert therapeutic effects against diabetic nephropathy by inhibiting the AGE/RAGE signaling pathway, thereby alleviating hyperglycemia-induced inflammation. These findings provide a scientific foundation for further research into the pharmacological mechanisms of DBD in DN treatment.

Key words: Danggui Buxue Decoction; diabetic nephropathy; network pharmacology; molecular docking; cell experiment; AGE/RAGE pathway

《健康中国行动（2019—2030 年）》^[1]中数据显示，我国糖尿病患病群体已达 1.3 亿，位居全球首位。糖尿病肾病（DN）是糖尿病常见的严重并发症之一，患病率约为 40%，该病症已成为导致终末期肾病的首要诱因。DN 的高发病率和严重后果，使得实现健康中国的目标面临严峻考验^[2-3]。相较于常规西医疗法，中医药干预在控制 DN 病情进展方面展现出独特优势，同时能有效改善多系统并发症。从中医辨证体系分析，DN 发展与“久病入络”理论密切相关，该病在中医典籍中对应“消渴”“水肿”“虚劳”等范畴，其核心病机以气阴两虚为主要病理基础，兼夹痰瘀互结、浊毒内蕴等标实之证，最终导致肾络受损^[4-5]。基于此病机特点，临床多采用益气扶正、化瘀通络、祛湿泄浊等治法进行综合治疗。

当归补血汤是由黄芪和当归 2 味中药以 5 : 1 配伍组成，见于金代李东垣内伤学说代表作品《内外伤辨惑论》中，该方主要作用是补气生血。黄芪有利水消肿、益气固表、养血补气等功效，当归具有补血活血的疗效^[6-7]，两者配伍，所发挥的补气生血活血的功效与 DN 病机契合。目前已有临床研究证实当归补血汤可治疗 DN，能够有效改善患者的肾功能^[8-9]，进一步的研究将有助于阐明其作用机制，为 DN 的临床治疗提供更多的依据。因此，本研究基于网络药理学结合分子对接验证、细胞实验验证，探究当归补血汤治疗 DN 的作用机制。

1 材料

1.1 数据库

中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP，<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3）、网络药理学在线数据库（TCMID，<http://www.megabionet.org/tcmid/>）、SwissTargetPrediction 数据库（<http://www.swisstargetprediction.ch/>）、Uniprot 数据库（<https://www.UniProt.org/>）、GeneCards 数据库（<https://www.genecards.org/>）、OMIM 数据库（<http://www.omim.org/>）、Venny 2.1.0（<http://www.liuxiaoyuyuan.cn/>）、STRING 数据库（<https://cn.string-db.org/>）、PubChem 数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）、Protein Data Bank（PDB）数据库（<https://www.rcsb.org/>）、DAVID 数据库（<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>）^[10-11]。

org/tcmid/）、SwissTargetPrediction 数据库（<http://www.swisstargetprediction.ch/>）、Uniprot 数据库（<https://www.UniProt.org/>）、GeneCards 数据库（<https://www.genecards.org/>）、OMIM 数据库（<http://www.omim.org/>）、Venny 2.1.0（<http://www.liuxiaoyuyuan.cn/>）、STRING 数据库（<https://cn.string-db.org/>）、PubChem 数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）、Protein Data Bank（PDB）数据库（<https://www.rcsb.org/>）、DAVID 数据库（<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>）^[10-11]。

1.2 细胞

HK-2 细胞（浙江美森细胞科技有限公司，批号 CTCC-002-0018）。

1.3 药品及试剂

K-SFM 完全培养基（浙江美森细胞科技有限公司，批号 CTCC-002-0018-CM）；D-葡萄糖（国药集团化学试剂有限公司，批号：20141008）；白细胞介素-6（IL-6）试剂盒（赛默飞世尔科技有限公司，88-7066-88）；晚期糖基化终末产物（AGEs）抗体、晚期糖基化终产物受体（RAGE）抗体（北京博奥森生物技术有限公司，批号：bs-1158R、bs-4999R）、核因子-κB（NF-κB）p65 抗体（美国 CST 公司，批号：8242）、β-actin 抗体（英国 Abcam 公司，批号：mAbcam8226）；MTT（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号：ST316）；达格列净（阿斯利康制药有限公司，批号：PT2754）；Steady Pure 通用型 RNA 提取试剂盒、Evo M-MLV 反转录预混试剂盒、SYBR Green ProTaq HS 预混型 qPCR 试剂盒（湖南艾科瑞生物工程有限公司，批号分别为 AG21017、AG11728、AG11701）；阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖

昔、黄芪甲昔（中国食品药品检定研究院，批号 110773-201915、111920-201907、110781-202219，质量分数 99.4%、96.8%、96.2%）；当归补血汤饮片来源信息见表 1，实验所用饮片均经南京中医药大学中药资源学谷巍教授鉴定为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis*（Oliv.）Diels 的干燥根。

表 1 饮片信息来源
Table 1 Origin of medicinal slices information

饮片	产地	批号
黄芪	内蒙古自治区包头市	YP230402
		YP230417
		YP230401
		YP240203
	甘肃省定西市陇西县	YP230416
		YP230406
		YP240201
	甘肃省陇西县首阳镇	YP240202
		YP240204
		YP240208
酒当归	甘肃省定西市岷县	YZ230410
		YZ230404
		YZ230801
		YZ230802
	甘肃省定西市漳县	YZ230804
	甘肃甘南藏族自治州卓尼县	YZ230806
		YZ230412
	青海省西宁市湟中区	YZ230403

1.4 仪器

全自动分体式多功能煎药壶（多用煲，潮州市潮安区金石镇中雄家用电器厂）；ToffLon 冷冻干燥机（上海东富龙科技股份有限公司）；3111 二氧化碳培养箱（美国 Thermo Scientific 公司）、MD 型多功能酶标仪（Molecular Devices 公司）；Universal Hood II 型凝胶成像发光系统（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 网络药理学分析^[13]

2.1.1 筛选药物有效成分及药物靶点 选取“黄芪”“当归”或其拉丁文为关键词，在 TCMSP 数据库、TCMID 数据库中检索并筛选有效成分。此外，将《中国药典》2020 年版中 2 味中药的质量控制成分纳入分析范围。在 TCMSP 数据库、TCMID 数据库、Swiss Target Prediction 数据库中收集活性成分

靶点，并将数据整合，通过 Uniprot 数据库对收集到的靶点蛋白名称进行标准化处理，去除重复项。

2.1.2 疾病靶点与复方交叉靶点的筛查 登录 GeneCards 基因数据库、OMIM 数据库，以“diabetic nephropathy”为检索词获取疾病靶点，去除重复基因，结合 UniProt 数据库将靶点名标准化，确定 DN 的潜在作用靶点。在 Venny2.1.0 平台中将当归补血汤的有效成分及 DN 的相关基因靶点取交集，绘制 Venn 图。

2.1.3 靶点蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）网络构建与分析 使用 Venn 图确定当归补血汤对 DN 作用的主要靶点，将交集靶点导入 STRING 数据库，物种限定为“智人”，选择 0.9 的高置信度以保证数据的可靠性，其余参数设置为默认值，得到当归补血汤治疗 DN 潜在靶点的 PPI 网络，保存结果，将结果文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件进一步构建 PPI 网络，删除无关联节点，对其网络进行分析，利用 CytoHubba 插件筛选排名前 10 的靶点作为核心靶点。

2.1.4 “复方-药物-成分-靶点-疾病”网络构建 将“药材-活性成分”“活性成分-靶点”的相互对应关系，导入 Cytoscape 3.9.1 软件中构建当归补血汤对 DN 的“复方-药物-成分-靶点-疾病”相互作用网络图，通过 Cytoscape 软件的 Network Analyzer 工具进行拓扑参数分析，筛选获得当归补血汤复方的核心活性成分。

2.1.5 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 将主要活性成分与疾病的 255 个交集靶点输入 DAVID 数据库，进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析。以 $P \leq 0.01$ ，错误发现率（FDR） ≤ 0.05 为标准，筛选生物过程（BP）、分子功能（MF）、细胞组成（CC）的前 8 条结果进行可视化，选取排名前 15 的信号通路绘制气泡图。

2.1.6 “关键活性成分-核心靶点-通路”网络构建 利用 Cytoscape 3.9.1 软件中的 Network Analyzer 插件对“2.1.4”项下筛选获得当归补血汤复方核心活性成分进行拓扑分析，构建“关键活性成分-核心靶点-通路”网络图。

2.1.7 主要活性成分与关键靶点的分子对接 运用分子对接模拟软件 AutoDock Vina 1.2.3 对“2.1.6”项下相关通路基因，以及“2.1.6”项下得到的排名前 10 的活性成分进行受体-配位对接模拟计算，同时将《中国药典》2020 年版规定的质量控制成分纳入分析。活性成分作为小分子配体，通过 PubChem

数据库查找其 CAS 号, 并从 Chem3D 导出后执行能量最小化计算, 最终保存为 mol2 格式文件。以核心靶点 RAGE 和 NF- κ B 作为受体, 从 Protein Data Bank (PDB) 下载相应的三维结构。使用 Pymol 软件去除水分子并对蛋白质模型加氢, 然后分别与各个活性成分进行分子对接实验。最后, 采用 GraphPad 软件以热图形式展示对接结果, 并利用 Pymol 软件绘制可视化图像。

2.2 当归补血汤基准样品制备

参考《古代经典名方关键信息表》, 将酒当归、黄芪饮片粉碎至粒度为 4 目, 取酒当归 8.26 g、黄芪 41.29 g, 加水 600 mL, 浸泡 30 min, 煎药壶武火加热至沸腾后, 转文火煎煮 60 min, 滤过后得到提取液, 经低温冷冻干燥机冻干, 即得冻干粉。将收集到的各批次饮片随机组合, 制备成 10 批当归补血汤物质基准样品, 组方信息见表 2。

表 2 10 批当归补血汤组方样品信息

Table 2 Information of 10 batches of Danggui Buxue Decoction formula

批次	酒当归批号	黄芪批号
S1	YZ230404	YP230402
S2	YZ230412	YP230406
S3	YZ230412	YP230416
S4	YZ230413	YP230417
S5	YZ230410	YP240201
S6	YZ230801	YP240202
S7	YZ230802	YP240203
S8	YZ230804	YP240204
S9	YZ230403	YP230401
S10	YZ230806	YP240208

2.3 当归补血汤基准样品多成分含量测定

2.3.1 供试品溶液制备 取基准样品冻干粉 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 的甲醇溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 回流 4 h, 放冷, 再次称定质量, 用 70% 的甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 离心, 取上清液即得。

2.3.2 阴性供试品溶液制备 按照处方和制备工艺, 分别制备缺当归和缺黄芪阴性样品, 按“2.3.1”项下方法制备阴性供试品溶液。

2.3.3 对照品溶液的制备 取阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制得每 1 mL 含阿魏酸 10 μ g、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 20 μ g 的混合对照品储备液。

2.3.4 色谱条件 色谱柱: Gemini C₁₈ 110A 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.2% 甲酸溶液 (15:85); 体积流量: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 260、316 nm; 进样量: 10 μ L。

2.3.5 专属性考察 取“2.3.1”项下供试品溶液、“2.3.2”项下阴性样品溶液、“2.3.3”项下对照品溶液适量, 按“2.3.4”项下色谱条件进样测定。

2.3.6 线性关系考察 精密移取各对照品母液适量, 逐级稀释, 分别制成质量浓度为 1.755、3.509、7.018、14.037、28.073、56.146、112.292 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的阿魏酸对照品溶液, 质量浓度为 2.561、5.123、10.245、20.490、40.980、81.961、163.921 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液, 按“2.3.4”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 建立回归方程。

2.3.7 精密度、稳定性、重复性试验 取 S1 批次样品, 按“2.3.1”项下供试品溶液制备方法, 制备供试品溶液, 按“2.3.4”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算 RSD; 取上述供试品溶液, 分别于 0、3、6、10、15、18、21、24 h 进样, 按“2.3.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算 RSD; 取 S1 批次样品, 按“2.3.1”项下供试品溶液方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.3.4”项下色谱条件进样, 测定含量, 计算 RSD。

2.3.8 加样回收率试验 取已知成分含量的样品 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 分别加入已知浓度的混合对照品适量, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.3”项下方法制备对照品溶液, 进样测定, 计算回收率。

2.3.9 样品含量测定 分别取 10 批当归补血汤基准样品, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 每批平行制备 2 个样品, 按“2.3.3”项下方法制备对照品溶液, 按“2.3.4”项下色谱条件进样测定, 计算含量。

2.4 当归补血汤基准样品黄芪甲苷含量测定

2.4.1 供试品溶液制备 取基准样品冻干粉 4 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入含 8% 浓氨试液的 80% 甲醇溶液 (取浓氨试液 8 mL, 加入 80% 的甲醇溶液至 100 mL, 摇匀) 100 mL, 密塞, 称定质量, 水浴回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用含 8% 浓氨试液的 80% 甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 离心, 精密量取上清液 50 mL, 蒸干, 残渣加 80% 的甲醇溶液溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加 80% 的

甲醇溶液至刻度, 摇匀, 离心, 取上清液, 即得。

2.4.2 阴性供试品溶液制备 取缺黄芪阴性样品, 按“2.4.1”项下方法制备阴性供试品溶液。

2.4.3 对照品溶液的制备 取黄芪甲苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制得每毫升分别含 0.1、0.5 mg 的对照品溶液。

2.4.4 色谱条件 色谱柱: Micro Pulite GOLD C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (32:68); 体积流量: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 蒸发光散射检测器; 蒸发光温度: 108 °C; 气体体积流量: 2.8 L·min⁻¹; 检测进样量: 10 μL。

2.4.5 专属性考察 取“2.4.1”项下供试品溶液、“2.4.2”项下阴性样品溶液、“2.4.3”项下对照品溶液适量, 按“2.4.4”项下色谱条件进样测定。

2.4.6 线性关系考察 精密移取黄芪甲苷对照品母液适量, 逐级稀释, 制成质量浓度为 36.030、72.060、144.120、288.239、576.479、1 152.957、2 305.914 μg·mL⁻¹ 的黄芪甲苷对照品溶液, 按“2.4.4”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以进样量对数值为横坐标 (*X*), 峰面积对数值为纵坐标 (*Y*), 建立回归方程。

2.4.7 精密度、稳定性、重复性试验 取 S1 批次样品, 按“2.4.1”项下供试品溶液制备方法, 制备供试品溶液, 按“2.4.4”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积对数值, 计算 RSD; 取上述供试品溶液, 分别于 0、3、6、10、15、18、21、24 h 进样, 按“2.4.4”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积对数值, 计算 RSD; 取 S1 批次样品, 按“2.4.1”项下供试品溶液制备方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.4.4”项下色谱条件进样, 测定含量, 计算 RSD。

2.4.8 加样回收率试验 取已知成分含量的样品 6 份, 每份 2 g, 精密称定, 分别加入一定浓度的黄芪甲苷对照品溶液适量, 按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4.3”项下方法制备对照品溶液, 进样测定含量, 计算回收率。

2.4.9 样品含量测定 分别取 10 批当归补血汤物质基准样品, 按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液, 每批平行制备 2 个样品, 按“2.4.3”项下方法制备对照品溶液, 按“2.4.4”项下色谱条件进样测定, 计算含量。

2.5 细胞实验

2.5.1 HK-2 细胞培养和处理 在 37 °C 水浴锅中复苏 HK-2 细胞, 接种于含 10% FBS 的 K-SFM 完

全培养基中, 在含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养, 2~3 d 换液, 待细胞融至 70%~80% 时, 用胰蛋白酶消化, 收集细胞, 按 1:3 进行传代培养, 取对数生长期细胞进行实验。

2.5.2 葡萄糖造模浓度及当归补血汤毒性浓度筛选 将处于对数生长期的 HK-2 细胞, 以每孔 2×10⁴ 个细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 实验用基准样品为 S9 批次, 分别加入含不同质量浓度药物的培养基 (葡萄糖质量浓度 5、10、20、40、80、160、320 mmol·L⁻¹; 当归补血汤质量浓度 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0、800.0 μg·mL⁻¹) 干预细胞 48 h, 加入 20 μL MTT 溶液, 孵育 4 h, 吸去孔内原有液体, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO) 溶液, 利用酶标仪摇晃均匀后, 于 490 nm 下测定吸光度 (*A*) 值, 均设立对照组, 每组 3 个复孔, 计算细胞存活率。

2.5.3 细胞造模与分组 取对数生长期下的 HK-2 细胞, 分为对照组、模型组、当归补血汤低、中、高质量浓度 (50、100、200 μg·mL⁻¹) 组、达格列净组, 细胞以每孔 2×10⁴ 个, 接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 除对照组外, 各组分别给予 40 mmol·L⁻¹ 葡萄糖干预 48 h, 建立高糖诱导的细胞炎症模型, 当归补血汤低、中、高质量浓度组分别给予 50、100、200 μg·mL⁻¹ 当归补血汤, 同步干预 48 h, 达格列净组给予 50 μmol·mL⁻¹ 达格列净, 同步干预 48 h。

2.5.4 MTT 法检测细胞存活率 取对数生长期下的 HK-2 细胞, 以每孔 2×10⁴ 个, 接种于 96 孔板中按“2.5.3”项下方法分组、处理, 加入 20 μL MTT 溶液, 孵育 4 h, 吸去孔内原有液体, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 利用酶标仪摇晃均匀后, 于 490 nm 下测定 *A* 值, 每组 3 个复孔, 计算细胞存活率。

2.5.5 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法测定细胞上清液中 IL-6 水平 取对数生长期 HK-2 细胞, 以每孔 2×10⁴ 个, 接种于 96 孔板中, 按“2.5.3”项下方法分组、处理, 收集细胞上清液至 EP 管中, 按照试剂盒说明书检测 IL-6 水平。

2.5.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测细胞中 IL-6、RAGE、核因子 κB (NF-κB) mRNA 水平 取对数生长期 HK-2 细胞, 以每孔 1×10⁶ 个, 接种于 6 孔板中, 按“2.5.3”项下方法分为对照组、模型组及当归补血汤低、中、高质量浓度组。药物干预结束后, 使用胰酶消化收集细胞沉淀, 采用 Trizol 提取总 RNA。通过逆转录试剂盒合成 cDNA, 用

cDNA、引物、SYBR 荧光染料、无菌无酶水配制反应体系，反应程序：95 ℃ 30 s 预变性；95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s，共进行 40 个循环。检测 *IL-6*、*RAGE*、*NF-κB* 的 mRNA 表达水平，引物序列见表 3。

表 3 引物序列
Table 3 Primer sequence

基因	引物序列 5'→3'
<i>IL-6</i>	F-GTAGCCGCCACACAGA
	R-CATGTCCTTTCTCAGGGCTG
<i>RAGE</i>	F-CACCTTCTCCTGTAGCTTCAGC
	R-AGGAGCTACTGCTCCACCTTCT
<i>NF-κB</i>	F-GCAGCACTACTTCTTGACCACC
	R-TCTGCTCCTGAGCATTGACGTC
<i>GADPH</i>	F-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
	R-ACCACCTGTTGCTGTAGCCAA

2.5.7 Western blotting 法检测细胞 AGE/RAGE 信号通路相关蛋白及 NF-κB 蛋白表达 取对数生长期 HK-2 细胞，以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中，按“2.5.3”项下方法分组、处理，收集对照组、模型组和当归补血汤低、中、高质量浓度组细胞，使用 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白，取上清用 BCA 法测定蛋白浓度，加入适量上样缓冲液，沸水浴 10 min，得到蛋白样品，经

SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移到 PVDF 膜上，根据目的蛋白分子量剪膜，5%脱脂牛奶室温封闭 1 h，分别加入抗体 AGEs、RAGE、NF-κB 及 β-actin，4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，加入对应二抗，室温孵育 2 h，在化学发光成像仪上扫描条带，进行后续分析，通过 Image J 软件计算蛋白相对表达量。

2.5.8 统计学分析 通过 SPSS 27.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用最小显著法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学结果

3.1.1 活性成分及潜在靶点的收集 将 TCMSP、TCMID 数据库检索出的活性成分，以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 筛选^[12]，并查阅《中国药典》(2020 年版) 和相关文献^[14]，将质控成分纳入研究，共计 32 个活性成分 (当归 8 个、黄芪 24 个)，见表 4。通过检索多个数据库，收集整理交集靶点，得到 539 个活性成分靶点，2 714 个 DN 相关靶点。通过 Venn 图分析，得到 255 个药物-疾病共同靶点作为当归补血汤治疗 DN 的潜在靶点。见图 1。

表 4 当归补血汤活性成分

Table 4 Active ingredient of Danggui Buxue Decoction

药物	分子编码	化合物名称	OB/%	DL
当归	MOL000358	β-谷甾醇 (β-sitosterol)	36.91	0.75
当归	MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76
当归	MOL001942	异欧前胡素 (isoimperatorin)	45.46	0.23
当归	MOL001956	8-氧甲基异欧前胡内酯 (cnidilin)	32.69	0.28
当归	MOL003957	1-甲基-2-十五烷基-4(1H)-喹诺酮 (1-methyl-2-pentadecyl-4(1H)-quinolone)	44.52	0.46
当归	MOL000360	阿魏酸 (ferulic acid)	31.79	0.74
当归	MOL011782	藁本内酯 (ligustilide)	23.50	0.07
当归	MOL003590	当归素 (angelicin)	36.91	0.75
黄芪	MOL000211	白桦脂酸 (mairin)	55.38	0.78
黄芪	MOL000239	华良姜素 (jaranol)	50.83	0.29
黄芪	MOL000296	常春藤皂苷元 (hederagenin)	36.91	0.75
黄芪	MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-异丙基辛烷-2-基]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊[a]菲-3-醇[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol]	36.23	0.78
黄芪	MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)	49.60	0.31
黄芪	MOL000371	3,9-二-O-甲基尼索林 (3,9-di-O-methylnisolin)	53.74	0.48
黄芪	MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.30
黄芪	MOL000379	黄芪异黄烷苷 (9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside)	36.74	0.92
黄芪	MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷[(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofuran[3,2-c]chromen-3-ol]	64.26	0.42
黄芪	MOL000387	联苯双酯 (bifendate)	31.10	0.67

表 4 (续)

药物	分子编码	化合物名称	OB/%	DL
黄芪	MOL000392	刺芒柄花素 (formononetin)	69.67	0.21
黄芪	MOL000417	毛蕊异黄酮 (calycosin)	47.75	0.24
黄芪	MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	41.88	0.24
黄芪	MOL000433	叶酸 (folic acid)	68.96	0.71
黄芪	MOL000438	7,2-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷[(3 <i>R</i>)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol]	67.67	0.26
黄芪	MOL000442	异微凸剑叶莎醇-7,2'-二- <i>O</i> -葡萄糖苷 (isomucronulatol-7,2'-di- <i>O</i> -glucosiole)	49.28	0.62
黄芪	MOL000440	1,7-二羟基-3,9 二甲氧基紫檀烯(1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene)	39.05	0.48
黄芪	MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28
黄芪	MOL002565	美迪紫檀素 (medicarpin)	49.22	0.34
黄芪	MOL009290	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin-7-glucoside)	5.49	0.81
黄芪	MOL000407	黄芪甲苷 (astragaloside IV)	22.50	0.15
黄芪	MOL000405	黄芪皂苷 III (astragaloside III)	31.83	0.10
黄芪	MOL000403	黄芪皂苷 II (astragaloside II)	46.06	0.13
黄芪	MOL000401	黄芪皂苷 I (astragaloside I)	46.79	0.11

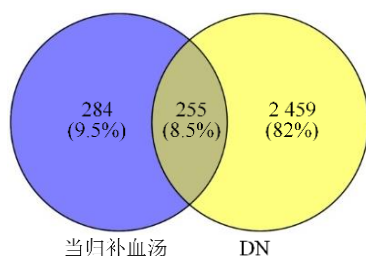


图 1 当归补血汤-DN 靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of Danggui Buxue Decoction-DN target

3.1.2 PPI 网络分析与核心基因筛选 将“3.1.1”项获得的共有靶点导入 STRING 数据库分析,并通过 Cytoscape 3.9.1 软件可视化 PPI 网络,利用 cytoHubba 插件分析筛选排名前 10 的靶点。见表 5。

表 5 PPI 网络前 10 靶点

Table 5 Top 10 targets of PPI network

排名	靶点	得分
1	SRC	27
2	STAT3	23
3	AKT1	22
4	PIK3CA	20
4	ESR1	20
4	PIK3R1	20
7	JUN	19
7	CTNNB1	19
9	EGFR	18
9	PIK3CB	18

3.1.3 “复方-药物-成分-靶点-疾病”网络构建 利用 Cytoscape 3.9.1 软件处理得到“药材-活性成分-靶点”网络,见图 2。运用 Network Analyzer 计算该化合物-靶点网络分析,该网络共 183 个节点,691 条边。其中黄色中药为复方,蓝色菱形为中药,紫色椭圆为成分,红色箭头为疾病,绿色长方形为靶点,结果表明当归补血汤对 DN 的作用是基于多成分、多靶点的复杂协同调控。

3.1.4 GO 及 KEGG 通路富集分析 GO 功能富集分析结果显示,经 $P<0.01$ 筛选后,得到 790 条 GO 结果,其中 BP 677 条、MF 139 条、CC 74 条,分别选取前 8 条进行可视化处理,见图 3。

KEGG 通路分析结果,经 $P<0.01$ 筛选后,共得到 148 条通路结果,前 15 名见图 4。包括癌症通路、AGE/RAGE 信号通路、脂质动脉粥样硬化、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染等。

3.1.5 “关键活性成分-核心靶点-通路”网络构建 利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“关键活性成分-靶点-通路”网络图,并将结果可视化,网络中共有 198 个节点,1 025 条边,黄色为复方,红色为疾病,紫色为活性成分,蓝绿色为通路,绿色为核心靶点。网络结果显示存在 1 个分子与多个核心靶点蛋白的相互作用,也存在不同分子作用于同 1 个靶点蛋白的现象,同时也显示了 1 个核心靶点可对应多条信号通路,表明当归补血汤可能通过多成分、多靶点、多通路缓解 DN,初步阐释了当归补血汤对 DN 的

主要药效物质基础和作用机制, 见图 5。其中, 抗 DN 最相关的通路为 AGE/RAGE 信号通路, 且多数核心靶点主要富集于此条通路上, 因此以其作为后续细胞实验验证通路。经度值对当归补血汤活性成分进行排序, 排名前 10 的活性成分见表 6。

3.1.6 分子对接验证 利用 Pymol 软件对 AGE/RAGE 通路的核心靶点蛋白 (RAGE、NF- κ B) 进行去水、加氢处理, 分别与核心活性成分做分子对接。核心活性成分包括“3.1.5”项下排名前 10 的

关键活性成分及《中国药典》规定 2 味药的质控成分, 共 12 个成分, 即黄芪中的 3,9-di-O-methylnissolin、熊竹素、异鼠李素、山柰酚、槲皮素、美迪紫檀素、黄芪紫檀烷、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷和当归中的 8-氧甲基异欧前胡内酯、阿魏酸, 与 AGE/RAGE 通路的核心靶点蛋白 RAGE、NF- κ B 进行分子对接并绘制图形, 结果显示 12 个活性成分与 RAGE、NF- κ B 的分子结合能均 $< -20.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,

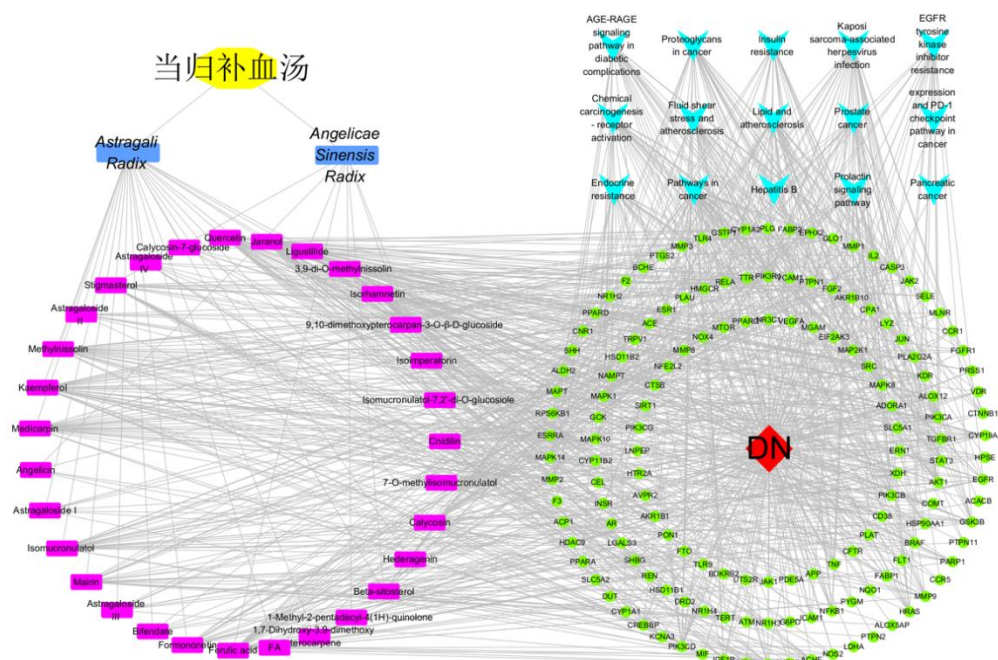


图 2 当归补血汤“复方-药物-成分-靶点-疾病”网络

Fig. 2 Danggui Buxue Decoction "compound-drug-component-target-disease" network

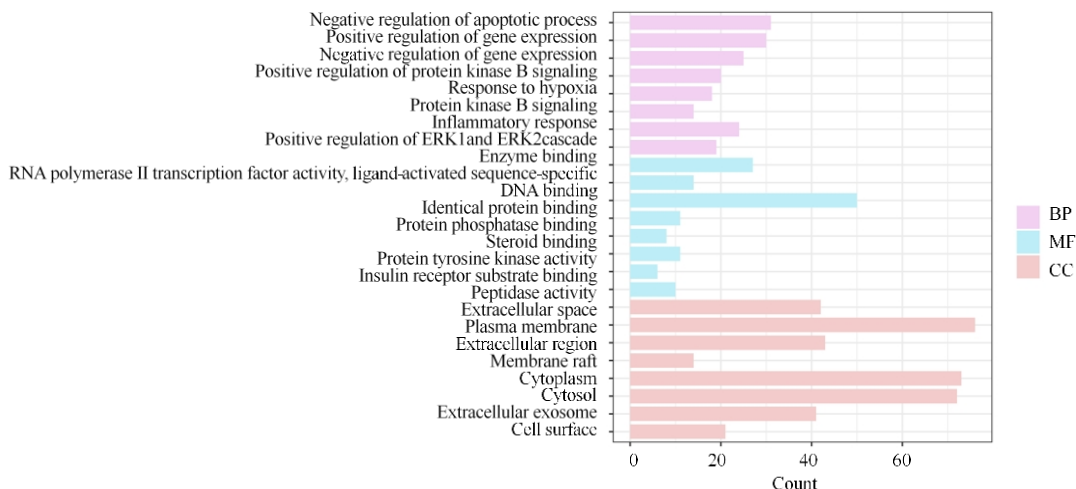


图 3 当归补血汤防治 DN 的 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of Danggui Buxue Decoction in prevention and treatment of DN

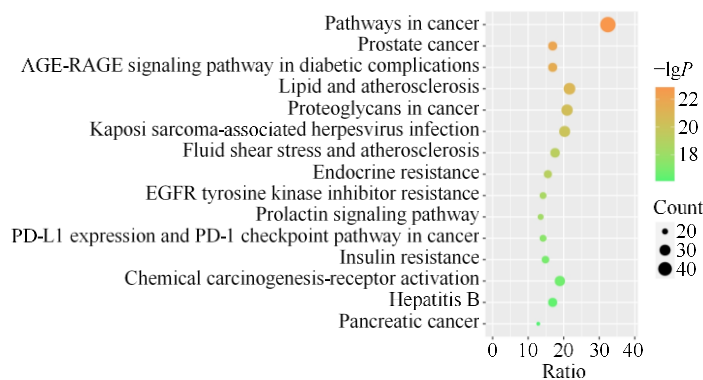


图 4 当归补血汤防治 DN 的 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of Danggui Buxue Decoction in preventing and treating DN

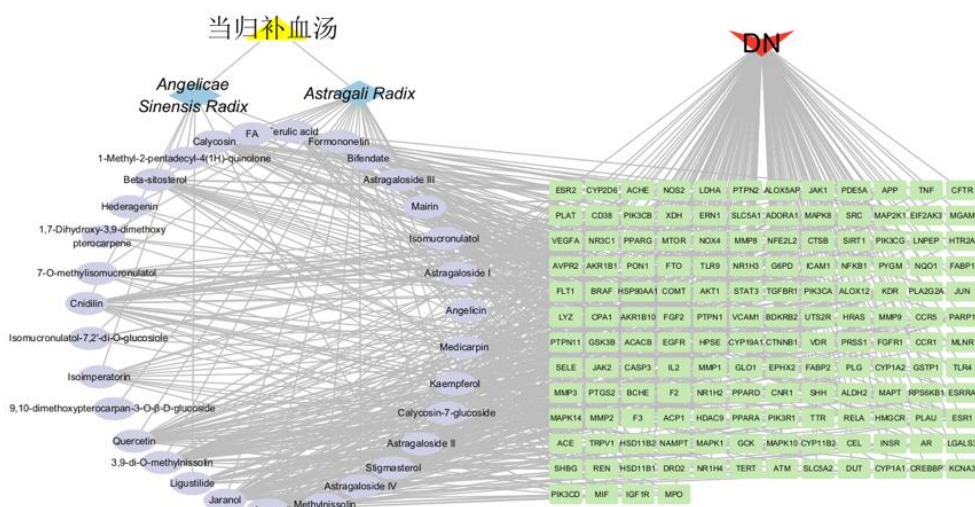


图 5 当归补血汤“关键活性成分-核心靶点-通路”网络

Fig. 5 Danggui Buxue Decoction "key active ingredients-core targets-pathways" network

表 6 当归补血汤前 10 活性成分

Table 6 Danggui Buxue Decoction top 10 active ingredients

成分	度值
3,9-二-O-甲基尼索林 (3,9-di-O-methylnissolin)	37
华良姜素 (jaranol)	36
异鼠李素 (isorhamnetin)	34
山柰酚 (kaempferol)	33
槲皮素 (quercetin)	30
阿魏酸 (ferulic acid)	29
美迪紫檀素 (medicarpin)	28
黄芪紫檀烷 (methylnissolin)	26
7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷 (isomucronulatol)	26
8-氧甲基异欧前胡内酯 (cnidilin)	26

表明 12 个活性成分与 RAGE、NF- κ B 能够较好地结合, 结合后具有稳定的结构。如图 6 所示, 12 种关键活性成分与 AGE-RAGE 信号通路中的 2 个核

心靶点蛋白均可自发结合。选取 2 个核心蛋白与各自对应打分前 3 的成分可视化, 其结合模式见图 7。

3.2 方法学验证结果

3.2.1 专属性考察 多成分含量测定方法专属性考察结果见图 8、黄芪甲苷含量测定方法专属性考察结果见图 9, 各成分色谱峰分离度良好, 阴性样品溶液未见干扰峰, 表明该方法专属性良好。

3.2.2 线性关系考察 阿魏酸的线性方程为 $Y = 54\,616.438\,40X - 4\,254.781\,12$ ($R^2 = 0.999\,9$), 表明阿魏酸在 $1.755 \sim 112.292\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的线性方程为 $Y = 33\,065.803\,07X - 9\,413.011\,49$ ($R^2 = 0.999\,9$), 表明毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 $2.561 \sim 163.921\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好; 黄芪甲苷的线性方程为 $Y = 1.527\,01X - 2.308\,52$ ($R^2 = 0.997\,6$), 表明黄芪甲苷在 $0.360 \sim 23.060\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

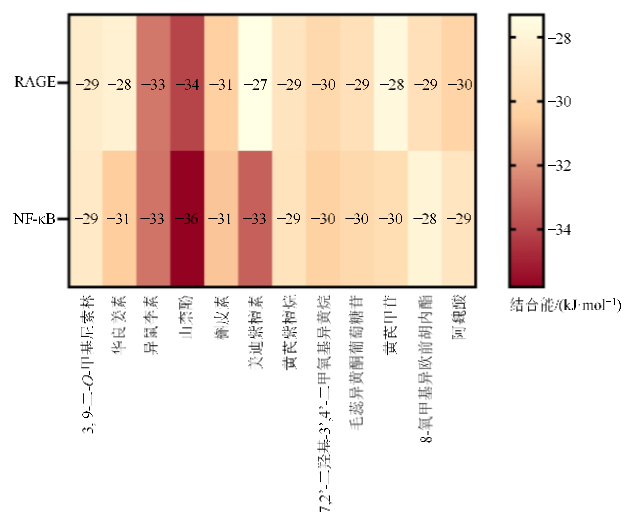


图 6 分子对接结合能热图分析

Fig. 6 Heatmap analysis of molecular docking binding energy

的进样量范围内线性关系良好。

3.2.3 精密度、稳定性、重复性试验 精密度试验中供试品溶液中阿魏酸含量的 RSD 为 0.32%，毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的 RSD 为 0.28%，黄芪甲苷含量的 RSD 为 0.79%，表明仪器测定精密度良好；稳定性试验中阿魏酸含量的 RSD 为 0.38%，毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的 RSD 为 0.67%，黄芪甲苷含量的 RSD 为 1.43%，表明供试品溶液在 24 h 内均稳定性良好；重复性试验中阿魏酸含量的 RSD 为 0.34%，毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的 RSD 为 0.37%，黄芪甲苷含量的 RSD 为 0.08%，表明重复性良好。

3.2.4 加样回收率试验 阿魏酸平均加样回收率为 93.80%，RSD 为 2.21%；毛蕊异黄酮葡萄糖苷平均加样回收率为 97.02%，RSD 为 2.60%；黄芪甲苷平均加样回收率为 98.09%，RSD 为 1.45%，表明 2 个

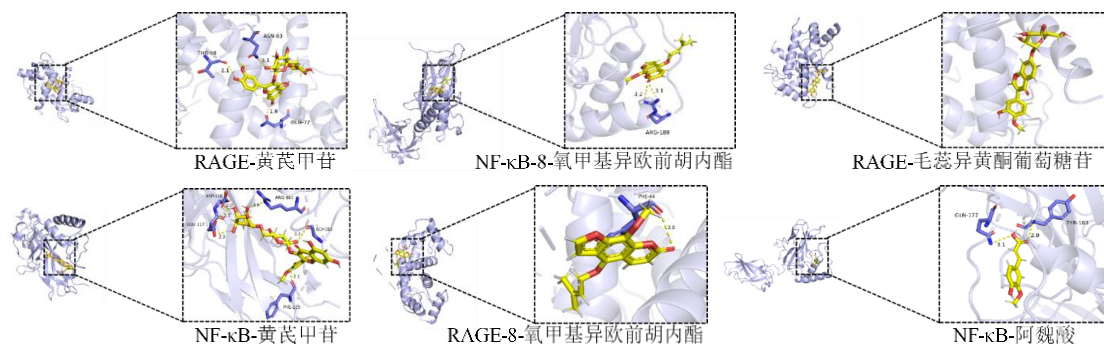
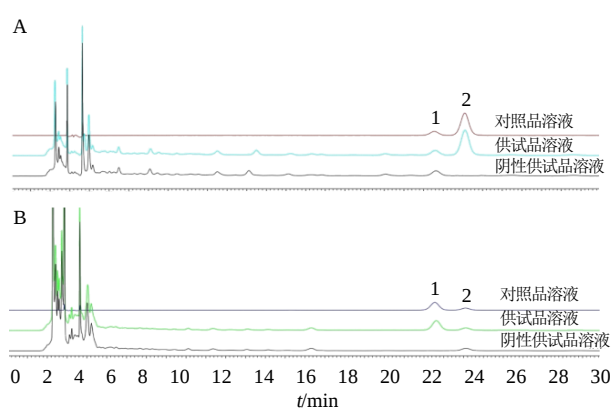


图 7 部分活性成分与核心靶点分子对接图

Fig. 7 Molecular docking diagram of some active ingredients with core target



1-毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 2-阿魏酸。
1- calycosin-7-glucoside; 2- ferulic acid.

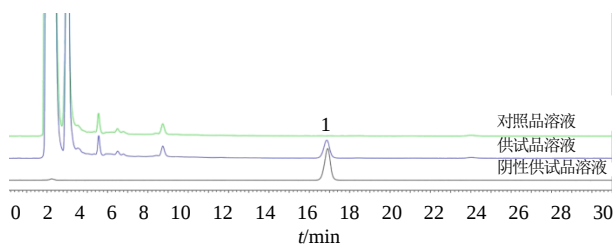
图 8 阿魏酸 (A) 与毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (B) 含测方法
专属性考察色谱图Fig. 8 Chromatograms for specificity investigation of assay
method for ferulic acid (A) and calycosin-7-glucoside (B)

图 9 黄芪甲苷含测方法专属性考察色谱图

Fig. 9 Chromatograms for specificity investigation of
assay method for astragaloside IV

含量测定方法准确度良好。

3.2.5 多批次基准样品含量测定 结果表明，阿魏酸质量浓度为 0.213~0.322 mg·g⁻¹，毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度为 0.294~0.805 mg·g⁻¹，黄芪甲苷质量浓度为 0.937~1.740 mg·g⁻¹，均在均值的±30%内，表明多批次基准样品质量均一稳定，结果见表 7。在

表 7 基准样品质量分数测定结果

批号	质量浓度/(mg·g ⁻¹)		
	阿魏酸	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	黄芪甲苷
S1	0.322	0.443	1.318
S2	0.213	0.805	1.398
S3	0.254	0.294	0.937
S4	0.251	0.879	1.273
S5	0.282	0.430	1.416
S6	0.274	0.442	1.348
S7	0.238	0.444	1.502
S8	0.242	0.425	1.219
S9	0.304	0.753	1.740
S10	0.281	0.456	1.590

后续细胞实验中选择 S9 批次的基准样品进行实验。

3.3 细胞实验结果

3.3.1 葡萄糖及当归补血汤对 HK-2 细胞存活率的影响 如图 10-A 所示, 12.5~200.0 μg·mL⁻¹ 当归补血汤对 HK-2 细胞活力没有显著影响 ($P>0.05$), 表明该质量浓度范围内当归补血汤对细胞没有毒性; 如图 10-B 所示, HK-2 细胞给予葡萄糖干预时, 当葡萄糖浓度为 40 mmol·L⁻¹ 时, 细胞存活率降低 ($P<0.05$), 并且随着浓度不断增加, 影响更加明显 ($P<0.01$)。

3.3.2 当归补血汤对高糖诱导 HK-2 细胞炎症损伤的影响 如图 11 所示, 与对照组细胞比较, 模型组 HK-2 细胞存活率明显降低 ($P<0.01$), 说明高糖诱

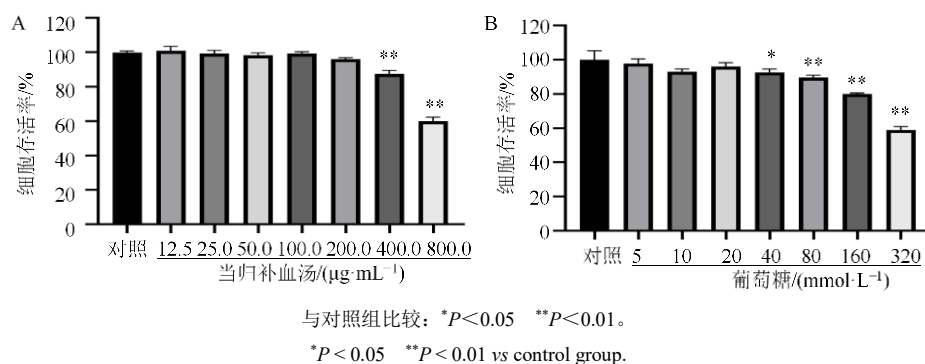


图 10 当归补血汤 (A) 和葡萄糖 (B) 对 HK-2 细胞存活率的影响 ($\bar{X} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Effects of DBD (A) and glucose (B) on survival of HK-2 cells ($\bar{X} \pm s$, $n=3$)

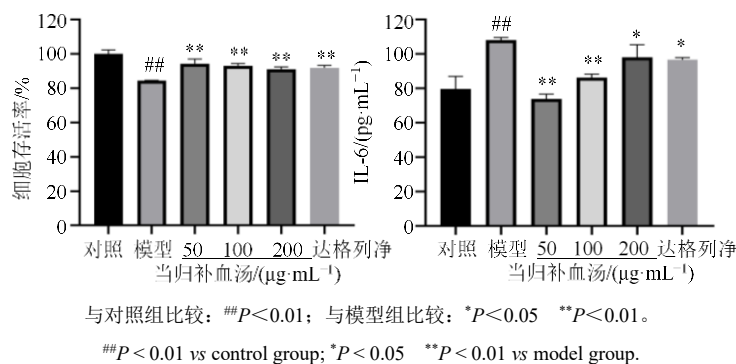


图 11 当归补血汤对高糖干预 HK-2 细胞存活率和 IL-6 水平的影响 ($\bar{X} \pm s$, $n=3$)

Fig. 11 Effect of DBD on survival of HK-2 cells treated with high glucose ($\bar{X} \pm s$, $n=3$)

导 HK-2 细胞炎症损伤模型造模成功; 与模型组比较, 当归补血汤低、中、高质量浓度组存活率均升高 ($P<0.01$), 说明当归补血汤对于高糖诱导 HK-2 细胞炎症损伤具有保护作用。

3.3.3 ELISA 法测定细胞上清液中 IL-6 水平 与对照组比较, 模型组细胞 IL-6 水平升高 ($P<0.01$), 说明在高糖干预下, 细胞产生了炎症反应, 释放炎

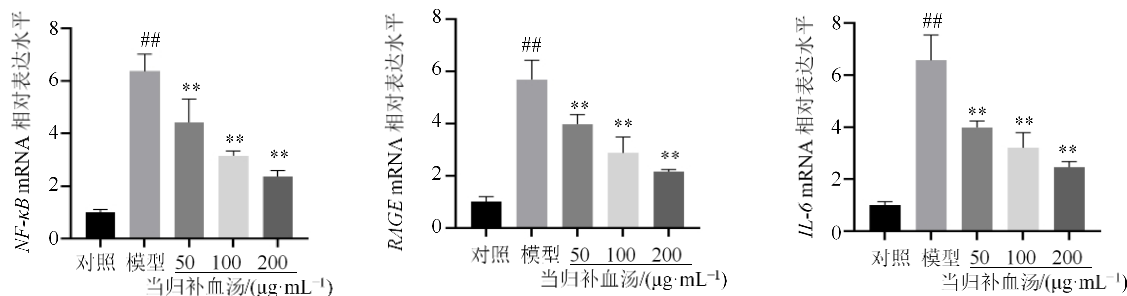
症因子; 与模型组比较, 当归补血汤低、中、高质量浓度组细胞 IL-6 水平降低 ($P<0.05$ 、 0.001), 说明当归补血汤具有一定的抗炎作用。

3.3.4 qRT-PCR 法检测细胞中 IL-6、RAGE、NF- κ B mRNA 水平 如图 12 所示, 与对照组比较, 经高糖干预后, 模型组 HK-2 细胞 NF- κ B、RAGE、IL-6 mRNA 表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 当归

补血汤低、中、高质量浓度组 *IL-6*、*RAGE*、*NF-κB* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)。

3.3.5 Western blotting 法检测细胞 AGE/RAGE 信号通路相关蛋白及 NF-κB 蛋白表达 如图 13 所示, 与对照

组比较, 经高糖干预后, 模型组 HK-2 细胞 AGEs/RAGE 通路相关蛋白及 NF-κB 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 当归补血汤高、中、低质量浓度组 AGEs、RAGE、NF-κB 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。

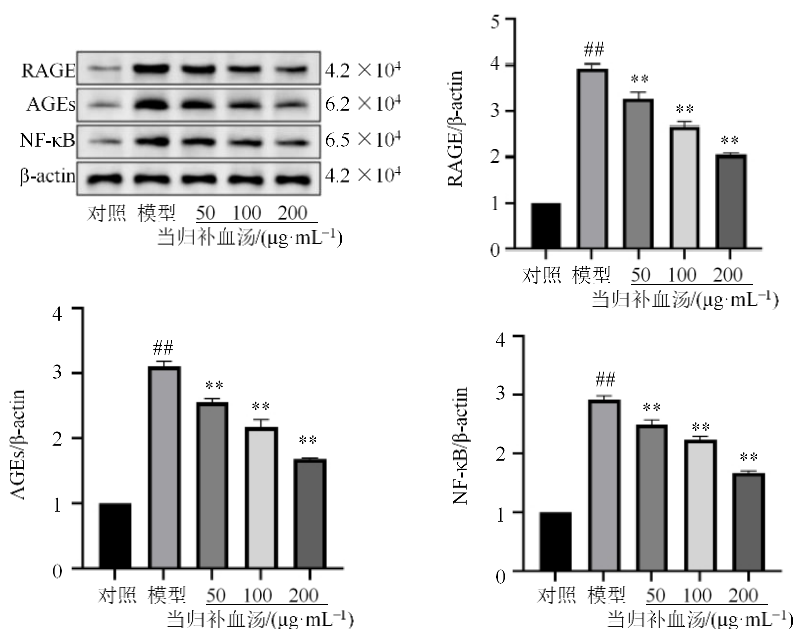


与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ 。

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

图 12 当归补血汤对 HK-2 细胞 *NF-κB*、*RAGE*、*IL-6* mRNA 表达的影响 ($\bar{X} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Effect of DBD on mRNA expression of *NF-κB*, *RAGE*, and *IL-6* in HK-2 cells ($\bar{X} \pm s$, $n = 3$)



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

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

图 13 当归补血汤对 HK-2 细胞 AGEs/RAGE 信号通路以及 NF-κB 蛋白表达的影响 ($\bar{X} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 13 Effect of DBD on AGEs/RAGE signaling pathway and NF-κB protein expression in HK-2 cells ($\bar{X} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

大量体外流行病学研究的实验和病理检查表明, 炎症是 DN 的主要发病机制^[15], 而肾小管上皮细胞损伤会促进多种炎症分子分泌, 导致间质炎症^[16-18]。当归补血汤作为国家公布的第一批经典名方之一, 已被广泛用于临床治疗各种疾病, 尤其在改善肾功能

方面显示出显著的疗效^[19]。

本研究基于网络药理学, 对当归补血汤防治 DN 的活性成分及作用靶点进行了筛选, 共获取当归补血汤与 DN 的交集靶点 255 个, 构建“复方-药物-成分-靶点-疾病”网络, 并进行了 GO 功能和 KEGG 富集分析, 筛选出 AGE/RAGE 信号通路可

能为当归补血汤治疗 DN 的机制通路; 构建“关键活性成分-核心靶点-通路”网络, 按照度值排名从大到小的顺序筛选能够与 AGE/RAGE 通路作用的排名前 10 活性成分, 包括黄芪中的 3,9-di-O-methylisolin、熊竹素、异鼠李素、山柰酚、槲皮素、美迪紫檀素、黄芪紫檀烷、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷以及当归中的 8-氧甲基异欧前胡内酯和阿魏酸, 这些成分多数来源于君药黄芪, 少数来源于臣药当归, 这一结果也与中医学中的君臣佐使理论相切合。活性成分按度值大小排名, 前 10 中的黄芪成分为黄酮类和黄芪皂苷类, 文献研究表明黄芪中黄酮类及黄芪皂苷类成分具有抗炎、抗氧化、免疫调节等作用^[20]; 排名前 10 中的当归成分为有机酸类和香豆素类成分, 研究表明当归中的香豆素类及有机酸类成分具有抑制炎症因子分泌、改善微循环, 促进血液循环, 减轻肾脏的病理损伤等作用^[21-22], 结合文献研究侧面说明了网络药理学结果的可靠性。

为了进一步验证结果的可靠性, 将“关键活性成分-核心靶点-通路”网络中度值排名前 10 的活性成分, 补充《中国药典》2020 年版规定黄芪的质控成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷, 共 12 个成分, 与 AGE/RAGE 通路相关核心蛋白进行分子对接验证, 分子对接结果表明当归补血汤中的活性成分均可与信号通路相关的核心蛋白进行自发结合。

为保证整体实验的科学性和严谨性, 本研究通过建立基准样品指标性成分含量测定方法, 以确保细胞实验中使用的基准样品质量稳定。通过比较基准样品水提工艺对于不同成分溶出检测限度的影响, 同时结合前一部分网络药理学研究对于活性成分的预测结果, 最终选择阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷作为指标性成分进行检测控制。方法学验证结果表明阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷的含测方法均具备良好的科学性和可行性。多批次样品含量测定结果表明, 不同批次基准样品中指标性成分含量均在质控范围内, 表明基准样品质量均一稳定, 最终选择 S9 批次的基准样品进行后续的细胞实验验证。

本研究采用 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖干预 HK-2 细胞 48 h, 建立 DN 高糖炎症模型, 并将细胞进行分组培养, 分为对照组、模型组、当归补血汤低、中、高质量浓度组 (50 、 100 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、达格列净组 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$); MTT 实验中, 与对照组细胞比

较, 模型组经高糖干预后细胞存活率明显下降, 但给予不同剂量当归补血汤干预高糖作用下的细胞后, 不同剂量药物组细胞存活率较模型组均明显升高, 结果表明, 当归补血汤可以改善高糖诱导的 HK-2 细胞凋亡; ELISA 实验结果表明, 模型组细胞上清液中 IL-6 水平较对照组明显升高, 不同剂量药物组细胞上清液中 IL-6 水平较模型组显著降低, 表明当归补血汤可以显著抑制高糖所诱导 HK-2 细胞的炎症因子分泌。

研究发现, DN 患者体内的糖基化终末期产物 AGEs 水平较普通人明显升高, AGEs 可使细胞外基质中的蛋白交联变硬, 从而影响肾脏器官功能^[23]; AGEs 可通过与细胞上的 RAGE 受体结合, 激活多种信号传导途径, 诱导炎症因子和趋化因子的表达^[24-27], 例如 IL-6、TNF- α 等, 从而诱导氧化应激和炎症反应, 在 DN 发病过程中起到重要作用。作为 AGE/RAGE 信号通路下游的关键转录因子, NF- κ B 通过调控多种炎症相关基因的表达参与 DN 的发病过程^[28-30], NF- κ B 的持续活化可上调 RAGE 表达, 促进 RAGE 与 AGEs 结合, 由此形成的正反馈调节机制导致炎症介质和组织损伤因子的持续释放, 从而加速 DN 的病理进展^[31-32]。本研究 Western blotting 实验结果表明, 模型组 AGEs、RAGE、NF- κ B 蛋白表达水平升高, 说明高糖诱导后, HK-2 细胞 AGE/RAGE 通路上的核心蛋白及下游 NF- κ B 蛋白的表达水平升高, 引发炎症反应, 造成细胞损伤; 而当归补血汤低、中、高剂量组的 AGEs、RAGE、NF- κ B 蛋白表达水平明显降低; qRT-PCR 实验结果表明, 高糖诱导后, 可使细胞中 IL-6、RAGE、NF- κ B 水平升高, 给予不同剂量当归补血汤后, 各组中 IL-6、RAGE、NF- κ B 水平均降低, 以上结果说明当归补血汤可能通过抑制 AGE/RAGE 信号通路, 降低 NF- κ B 等炎症因子的表达, 减轻炎症反应, 进而延缓 DN 的进展。

综上所述, 本研究通过网络药理学及分子对接技术结合细胞实验初步阐释了当归补血汤防治 DN 可能的作用机制, 为临床应用当归补血汤防治 DN 提供了一定的理论依据, 为当归补血汤复方制剂的开发以及抗 DN 药物的研发奠定一定的基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 健康中国行动推进委员会. 健康中国行动(2019—2030 年): 总体要求、重大行动及主要指标 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(9): 846-858.

- Healthy China Action Promotion Committee. Healthy China action (2019-2030): General requirements, major actions and main indicators [J]. Chin Circ J, 2019, 34(9): 846-858.
- [2] Mohan T, Narasimhan K K S, Ravi D B, et al. Role of Nrf2 dysfunction in the pathogenesis of diabetic nephropathy: Therapeutic prospect of epigallocatechin-3-gallate [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 160: 227-238.
- [3] Sun H J, Wu Z Y, Cao L, et al. Hydrogen sulfide: Recent progression and perspectives for the treatment of diabetic nephropathy [J]. Molecules, 2019, 24(15): 2857.
- [4] 马锋锋, 范增慧. 糖尿病肾病中医病因病机研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(8): 1373-1377.
- Ma F F, Fan Z H. Research progress on TCM etiology and pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. J Basic Chin Med, 2022, 28(8): 1373-1377.
- [5] 任威铭, 战丽彬. 从《黄帝内经》“移热”理论探讨消渴病病机演变规律 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(2): 181-184.
- Ren W M, Zhan L B. Discussion of the evolution law of Xiaoke disease pathogenesis from the theory of “heat transfer” in inner canon of Huangdi [J]. J Basic Chin Med, 2024, 30(2): 181-184.
- [6] 王文萍, 曹琦琛, 王华伟, 等. 当归补血汤不同配伍的药动学研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(6): 659-663.
- Wang W P, Cao Q C, Wang H W, et al. Pharmacokinetic study on different compatibilities of Dangguibuxue Tang [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2009, 14(6): 659-663.
- [7] 马艳春, 胡建辉, 段莹, 等. 当归补血汤研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(2): 10-13.
- Ma Y C, Hu J H, Duan Y, et al. Research progress of Danggui Buxue Decoction (当归补血汤) [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2023, 25(2): 10-13.
- [8] 吴星霖. 当归补血汤治疗糖尿病肾病临床观察 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2023, 21(11): 107-109.
- Wu X L. Danggui Buxue Decoction in the treatment of diabetic nephropathy [J]. Chin Med Mod Distance Educ China, 2023, 21(11): 107-109.
- [9] 王越, 王旭, 马艳春, 等. 基于益气活血法的当归补血汤治疗糖尿病肾病的炎症机制研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50(9): 110-113.
- Wang Y, Wang X, Ma Y, et al. Research progress on the anti-inflammatory mechanism of Danggui Buxue Decoction in treating diabetic nephropathy based on Qi-replenishing and blood-activating principles [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2022, 50(9): 110-113.
- [10] 樊俐慧, 王志刚, 杨霞. 基于网络药理学与细胞实验探讨葛连调糖丸对 2 型糖尿病的预防作用 [J/OL]. 中成药, 1-10 [2025-04-13].
- Fan L, Wang Z, Yang X. Preventive effect of Gelian Tiaotang Pill on type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology and cellular experiments [J/OL]. Chin Tradit Patent Med, 1-10 [2025-04-13].
- [11] Liu Y, Li X, Chen C, Ding N, Ma S, Yang M. Exploration of compatibility rules and discovery of active ingredients in TCM formulas by network pharmacology [J]. Chin Herb Med. 2024;16(4):572-588.
- [12] 宋思瑶, 陆彭, 伍鼎骁, 等. 基于网络药理学与分子对接探讨芍药苷治疗糖尿病的作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(15): 2261-2264.
- Song S Y, Lu P, Wu D X, et al. Network pharmacology and molecular docking study on the mechanism of paeoniflorin in treating diabetes mellitus [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2024, 40(15): 2261-2264.
- [13] 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 Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(12):4204-4213.
- [14] 朱景天, 王文恺, 葛凡, 等. 当归补血汤及其活性成分通过抑制 NLRP3 炎症小体活化改善糖尿病肾病的实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(1): 31-35.
- Zhu J T, Wang W K, Ge F, et al. Experimental study on Danggui Buxue Decoction and its active components improving diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(1): 31-35.
- [15] Ruyu M, Yinghao H, Qing F, et al. Ferulic acid ameliorates renal injury via improving autophagy to inhibit inflammation in diabetic nephropathy mice [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153:113424.
- [16] 王永胜, 杨丽霞, 程涛, 等. 糖尿病肾病的炎症致病机制与中药防治 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 200-207.
- Wang Y S, Yang L X, Cheng T, et al. Pathogenic mechanism of inflammation and TCM intervention of diabetic nephropathy [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(2): 200-207.
- [17] 高利超, 徐兵, 刘永安, 等. 三七皂苷 R₁ 抑制 TGF- β 1/Smad3 信号传导对糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化和炎症细胞因子的调节作用研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(10): 1188-1193.
- Gao L C, Xu B, Liu Y A, et al. Regulatory effect of notoginsenoside R₁ on renal fibrosis and inflammatory

- cyto-kines in diabetic nephropathy rats via inhibiting of TGF- β 1/Smad3 signal transduction [J]. Chin J Immunol, 2020, 36(10): 1188-1193.
- [18] 李申, 刘志红. 糖尿病肾病肾小管损伤机制 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2018, 27(3): 265-268, 219.
Li S, Liu Z H. Tubulointerstitial lesions in diabetic nephropathy [J]. Chin J Nephrol Dial Transplant, 2018, 27(3): 265-268, 219.
- [19] Salti T, Khazim K, Haddad R, et al. Glucose induces IL-1 α -dependent inflammation and extracellular matrix proteins expression and deposition in renal tubular epithelial cells in diabetic kidney disease [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1270.
- [20] 钟丹, 罗启明, 黄宇清, 等. 当归补血汤对糖尿病肾病气虚血瘀证疗效及肾脏纤维化的影响 [J]. 河南中医, 2022, 42(11): 1720-1723.
Zhong D, Luo Q M, Huang Y Q, et al. Effects of Danggui Buxue Decoction on clinical efficacy and renal fibrosis in diabetic nephropathy patients with *qi* deficiency and blood stasis syndrome [J]. Henan Tradit Chin Med, 2022, 42(11): 1720-1723.
- [21] 田晓玲, 华川, 张艳, 等. 补益药黄芪防治糖尿病肾病的应用和研究进展 [J]. 中药材, 2021, 44(6): 1531-1535.
Tian X L, Hua C, Zhang Y, et al. Application and research progress of tonic drug *Astragalus membranaceus* in preventing and treating diabetic nephropathy [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(6): 1531-1535.
- [22] 董熠, 刘丽佳, 韩璐雯, 等. 香豆素类化学成分的药理作用及毒性机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(16): 5462-5472.
Dong Y, Liu L J, Han L W, et al. Research progress on pharmacological action and toxicity mechanism of coumarins [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(16): 5462-5472.
- [23] 马艳春, 吴文轩, 胡建辉, 等. 当归的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 111-114.
Ma Y C, Wu W X, Hu J H, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Angelica sinensis* [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2022, 50(1): 111-114.
- [24] Asgharpour Dil F, Ranjkesh Z, Goodarzi M T. A systematic review of antiglycation medicinal plants [J]. Diabetes Metab Syndr, 2019, 13(2): 1225-1229.
- [25] Yan S F, Ramasamy R, Schmidt A M. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response [J]. J Mol Med (Berl), 2009, 87(3): 235-247.
- [26] Xie J L, Méndez J D, Méndez-Valenzuela V, et al. Cellular signaling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) [J]. Cell Signal, 2013, 25(11): 2185-2197.
- [27] Garay-Sevilla M E, Gomez-Ojeda A, González I, et al. Contribution of RAGE axis activation to the association between metabolic syndrome and cancer [J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(3): 1555-1573.
- [28] Li W X, Guo Y, Xu Z Y, et al. Notoginsenoside R₁ (NGR1) regulates the AGE-RAGE signaling pathway by inhibiting RUNX2 expression to accelerate ferroptosis in breast cancer cells [J]. Aging (Albany NY), 2024, 16(12): 10446-10461.
- [29] Hollenbach M, Thonig A, Pohl S, et al. Inflammation und Hypoxie führen über das Glyoxalase-Enzymsystem zur Regulation von RAGE, NF- κ B und pERK in sinusoidalen Endothelzellen: Ein möglicher Mechanismus Bei der Entstehung der Leberzirrhose [J]. Z Gastroenterol, 2015, 53(8).
- [30] Navarro-González J F, Mora-Fernández C, de Fuentes M M, et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 7(6): 327-340.
- [31] Ma Y F, Ma Z M, Zhang Y Y, et al. Apigenin and baicalein ameliorate thoracic aortic structural deterioration and cognitive deficit via inhibiting AGEs/RAGE/NF- κ B pathway in *D*-galactose-induced aging rats [J]. Eur J Pharmacol, 2024, 976: 176660.
- [32] 李钰佳, 李定祥, 张熙, 等. 基于 AGEs/RAGE/NF- κ B 通路探讨左归降糖通脉方对大鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(7): 1057-1063.
Li Y J, Li D X, Zhang X, et al. Effect of Zuogui Jiangtang Tongmai Formula on brain microvascular endothelial cells injury in rats based on AGEs/RAGE/NF- κ B signaling pathway [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2022, 42(7): 1057-1063.

[责任编辑 齐静雯]