

# 基于肠道菌群和系统药理学探讨藏药十五味乳鹏丸抗高尿酸血症肾病的作用机制

谢昊宸<sup>1</sup>, 张博恒<sup>2</sup>, 穆卡然·艾买江<sup>2</sup>, 李娜<sup>2</sup>, 何彭可<sup>2</sup>, 严亨秀<sup>2</sup>, 邵晓妮<sup>2\*</sup>

1. 西南民族大学 青藏高原研究院, 四川 成都 610041

2. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

**摘要:** 目的 基于肠道菌群、网络药理学和分子对接技术多维度挖掘藏药十五味乳鹏丸 (Shiwuwei Rupeng Pills, SRP) 抗高尿酸血症肾病 (hyperuricemic nephropathy, HN) 的作用机制。方法 腺嘌呤联合乙醇构建 HN 大鼠模型, 设置对照组、模型组、别嘌醇 (50 mg/kg) 组和 SRP 高、低剂量 (1.2、0.4 g/kg) 组。连续给药 14 d 后, 检测大鼠血清中尿酸 (uric acid, UA)、肌酐 (creatinine, CREA) 及尿素氮 (urea nitrogen, BUN) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肾组织病理变化。获取 SRP 和 HN 核心靶点, 构建“药物-活性成分-作用靶点”和蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并对潜在靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析; 采用分子对接技术模拟关键成分与核心靶点的结合活性。采用 qRT-PCR 法验证各组大鼠肾组织中关键靶点的 mRNA 表达; 收集大鼠粪便, 采用 16S rDNA 高通量测序法检测肠道菌群变化。结果 SRP 显著降低 HN 大鼠血清中 UA、CREA 及 BUN 水平 ( $P < 0.05$ ), 并改善肾组织病理损伤。SRP 可能通过作用于晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGE)-晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE)、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等信号通路发挥抗 HN 作用。白蛋白 (albumin, ALB)、TNF、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ )、信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 和骨髓细胞瘤病毒癌基因 (myelocytomatosis viral oncogene, MYC) 与木犀草素、槲皮素、山柰酚、表没食子酸儿茶素没食子酸酯和儿茶素有较好的对接活性。SRP 显著下调 HN 大鼠肾组织中 TNF、STAT3 和 ALB mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ ), 显著上调 PPAR $\gamma$  mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, SRP 组大鼠肠道菌群丰富度和多样性显著升高, 且在门水平上降低拟杆菌门和厚壁菌门的比例; 主要降低 *Acteroides*、*Akkermansia*、*Ralstonia* 及 *Prevotellaceae Ga6A1 group* 菌属, 增加 *Lactobacillus* 及 *Ruminococcaceae UCG-014* 的相对丰度。结论 SRP 可以通过调节肠道菌群结构, 调控 AGE-RAGE、IL-17、TNF 等信号通路及相关靶点的表达发挥抗 HN 作用, 具有多成分、多靶标及多通路的治疗特点。

**关键词:** 十五味乳鹏丸; 高尿酸血症肾病; 肠道菌群; 网络药理学; 分子对接; 肿瘤坏死因子; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ ; 白蛋白; 信号传导与转录激活因子 3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)19-6068-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.013

## Mechanism of Tibetan medicine Shiwuwei Rupeng Pills on hyperuricemia nephropathy based on intestinal flora and systematic pharmacology

XIE Hao-chen<sup>1</sup>, ZHANG Bo-heng<sup>2</sup>, Mukaram Amatjan<sup>2</sup>, LI Na<sup>2</sup>, HE Peng-ke<sup>2</sup>, YAN Heng-xiu<sup>2</sup>, SHAO Xiao-ni<sup>2</sup>

1. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of Tibetan medicine Shiwuwei Rupeng Pills (十五味乳鹏丸, SRP) on hyperuricemic nephropathy (HN) from multiple dimensions based on intestinal flora, network pharmacology and molecular docking technology.

收稿日期: 2022-06-15

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81801086); 四川省自然科学基金资助项目 (2022NSFSC1574); 四川省科技厅应用基础项目 (2021YJ0256)

作者简介: 谢昊宸, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 1024400780@qq.com

\*通信作者: 邵晓妮, 女, 博士, 研究方向为中药药理学。E-mail: xnshao@swun.edu.cn

**Methods** HN rats model was established by adenine combined with ethambutol, and rats were divided into control group, model group, allopurinol (50 mg/kg) group, SRP high-and low-dose (1.2, 0.4 g/kg) groups. After continuous administration for 14 d, levels of uric acid (UA), creatinine (CREA) and urea nitrogen (BUN) in serum of rats were detected; Pathological changes of kidney tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. SRP and HN core targets were obtained, “drug-active ingredient-targets” and protein-protein interaction (PPI) networks were constructed, gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on potential targets were performed; Molecular docking technology was used to simulate the binding activity of key components and core targets. qRT-PCR was used to verify the mRNA expression of key targets in kidney tissue of rats in each group; Rat feces were collected, and 16S rDNA high-throughput sequencing was used to detect changes in intestinal flora. **Results** SRP significantly decreased the levels of UA, CREA and BUN in serum of HN rats ( $P < 0.05$ ), ameliorated the pathological damage of renal tissue. SRP played an anti-HN role by acting on advanced glycation end products (AGE)-receptor for advanced glycation end products (RAGE), interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor (TNF) and other signaling pathways. Albumin (ALB), TNF, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and bone marrow Myelocytomatosis viral oncogene (MYC) had good docking activity with luteolin, quercetin, kaempferol, epigallocatechin gallate and catechin. SRP significantly down-regulated the mRNA expression levels of *TNF*, *STAT3* and *ALB* in kidney tissue of HN rats ( $P < 0.05$ ), and significantly up-regulated the expression level of *PPARG* mRNA ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, SRP significantly increased the richness and diversity of intestinal flora, and decreased the proportions of bacteroidetes and firmicutes at phylum level; mainly decreased *acteroides*, *akkermansia*, *ralstonia* and *prevotellaceae* Ga6A1 group, increased the relative abundance of *Lactobacillus* and Ruminococcaceae UCG-014. **Conclusion** SRP can exert anti-HN effect by regulating the structure of intestinal flora, regulating expression of AGE-RAGE, IL-17, TNF and other signaling pathways related targets, and has the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway treatment.

**Key words:** Shiwuwei Rupeng Pills; hyperuricemia nephropathy; intestinal flora; network pharmacology; molecular docking; tumor necrosis factor; peroxisome proliferator-activated receptor gamma; albumin; signal transducer and activator of transcription 3

高尿酸血症肾病 (hyperuricemic nephropathy, HN) 是由于体内尿酸堆积过多导致的肾脏损伤, 是高尿酸血症的常见并发症。目前临床上的疗法主要涉及尿酸的合成与排泄, 但这些疗法都有使用限制并会产生一定的不良反应<sup>[1]</sup>。且高尿酸血症是涉及多个器官的复杂生物过程, 越来越多的证据表明肠道菌群紊乱与 HN 的发展有关, 肠道微生物的代谢产物胆汁酸以及三甲胺等都会在肾脏发挥作用, 驱动着肾脏的炎症反应<sup>[2]</sup>。因此寻找新的治疗 HN 药物是临床亟待解决的问题。

藏药治疗高尿酸血症历史悠久, 具有多靶点、不良反应少的优势, 因此临床上运用藏药治疗 HN 独具特色。藏族药十五味乳鹏丸 (Shiwuwei Rupeng Pills, SRP) 由儿茶、毛诃子、余甘子等 15 味藏药材组成。现代药理学研究表明, SRP 中多种有效成分具有降尿酸、抗炎、镇痛、抗氧化等作用<sup>[3]</sup>, 临床上用于治疗急慢性痛风、高尿酸血症等相关疾病<sup>[4]</sup>。SRP 对高尿酸血症相关肾功能损伤具有明显的改善作用<sup>[5-7]</sup>, 但目前 SRP 用于治疗 HN 的具体作用机制尚未明确。本研究采用腺嘌呤联合乙胺丁醇诱导构建 HN 大鼠模型, 利用肠道菌群、网络药理学和分子对接技术探究 SRP 抗 HN 的作用机制, 为其临

床应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只, 7 周龄, 体质量 (200±20) g, 购自成都达硕实验动物研究中心, 动物许可证号 SCXK (川) 2020-030。动物饲养于西南民族大学药学院 SPF 级动物实验室, 自由进食饮水, 温度 (23±1) °C, 相对湿度 (55±5) %, 每 12 小时昼夜间断性照明, 适应性培养 1 周。动物实验方案均经过西南民族大学动物伦理委员会审核批准 (批准号 No.2021-16)。

### 1.2 药品与试剂

十五味乳鹏丸 (批号 190808) 购自甘南佛阁藏药有限公司; 别嘌醇片 (批号 20201004) 购自合肥久联制药有限公司; 腺嘌呤 (批号 A108804) 购自上海阿拉丁生化科技有限公司; 盐酸乙胺丁醇片 (批号 201202) 购自成都锦华药业有限公司; 血清尿酸 (uric acid, UA) 试剂盒 (批号 Cobas57121601)、血清肌酐 (creatinine, CREA) 试剂盒 (批号 Cobas58321702) 和血清尿素氮 (urea nitrogen, BUN) 试剂盒 (批号 Cobas58266201) 购自德国 Roche 公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂 (批号 G1003) 购

自武汉赛维尔生物科技有限公司; PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (批号 AI21034A) 购自日本 Takara 公司; iTaq™ Universal SYBR Green Super mix (批号 L001752A) 购自美国 Bio-Rad 公司; 粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (批号 116560-200) 购自 MP Biomedical 公司。

### 1.3 仪器

H1850R 型高速冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司); cobas c311 型全自动血生化仪 (德国 Roche 公司); Veriti™ 96 孔梯度 PCR 仪、QuantStudio™ 3 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); RM2016 型病理切片机 (上海徠卡仪器有限公司); JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); Illumina Miseq 高通量测序仪 (美国 Illumina 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物实验

**2.1.1 分组、造模和给药** Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、别嘌醇 (50 mg/kg, 相当于临床等效剂量) 组和 SRP 高、低剂量 (1.2、0.4 g/kg, 分别相当于临床剂量的 3、1 倍) 组, 每组 6 只。腺嘌呤和盐酸乙胺丁醇溶于生理盐水配制成 1%腺嘌呤和 2.5%盐酸乙胺丁醇混悬液, 对照组 ig 等体积生理盐水, 其余各组 ig 混悬液, 1 次/d, 连续 21 d。SRP 临用前碾碎成粉末, 用生理盐水配制成 0.24、0.08 g/mL 的溶液。别嘌醇研磨成粉末, 溶于生理盐水配制成 0.5%混悬液。在造模第 8 天时开始给药, 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 14 d。

**2.1.2 血清中 UA、CREA 和 BUN 水平的测定** 末次给药后, 大鼠禁食 12 h, ip 0.3%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置 30 min, 3000 r/min 离心 15 min, 取血清, 按照试剂盒说明书操作, 使用全自动生化仪检测各组大鼠血清中 UA、CREA 和 BUN 水平。

**2.1.3 HE 染色法检测肾脏组织病理变化** 取各组大鼠肾脏组织, 于 4%多聚甲醛中固定, 包埋切片后, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察肾脏组织的病理变化。

### 2.2 网络药理学与分子对接

**2.2.1 SRP 活性成分收集及靶点的获取** 从 TCMSP 数据库 (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 中获得 SRP 中 15 种中药的活性成分, 筛选条件为口

服生物利用度 (oral bioavailability,  $OB \geq 30\%$ ) 且药物相似性 (drug likeness,  $DL \geq 0.18$ )。对于 TCMSP 数据库中检索不到的中药, 选择搜索 CNKI 及 PubMed 数据库其所含化学成分, 最终确定 SRP 的活性成分集合。将得到的活性成分集合在 TCMSP 数据库中获得其靶点名, 再通过蛋白质数据库 UniPort (<https://www.uniprot.org/>) 检索各靶点的靶基因 ID, 物种选择为 homo sapiens。对于 TCMSP 数据库中检索不到的化学成分, 可以在 PubChem 数据库中获得化学成分的 SMILES, 再利用 SWISS 数据库进行靶点预测, 最终获得所有成分的预测靶点集合。

**2.2.2 HN 靶点的获取** 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 获取 HN 相关靶点, 导出 Excel 的形式后标准化建立疾病靶点集合; 然后利用微生信平台将 SRP 的活性成分靶点与疾病靶点进行 Venn 图的绘制, 并得到潜在作用靶点。

**2.2.3 SRP 活性成分-HN 疾病靶点网络的构建** 根据各中药的活性成分与 HN 潜在作用靶点的相互作用关系构建属性文件和网络文件, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件构建 SRP 活性成分-HN 的调控网络。

**2.2.4 关键靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建与分析** 将获得的潜在作用靶点输入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 中, 物种选择为 homo sapiens, 获得蛋白互作分析, 最低互作阈值设置为高可信, 导出 TSV 格式后再利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 SRP 治疗 HN 作用靶点的 PPI 网络。

**2.2.5 关键靶点京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路和基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析** 利用 Metascape 数据库 (<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 对潜在作用靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 以  $P < 0.05$  为筛选标准, 代表具有统计学意义。利用微生信平台绘制气泡图和柱状图。

**2.2.6 关键靶点分子对接验证** 根据筛选的活性成分和核心靶点, 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载活性成分的 2D 结构并保存为 SDF 格式, 利用 Open Babel 软件将 SDF 格式转换为 MOL2 格式, 作为小分子配体。利用 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 将核心靶点的 3D 结构保存为 PDB 格式, 再运用 PyMol 软件对靶

蛋白进行预处理，产生活性口袋，采用 AutoDockTools 1.2.6 将活性成分与靶蛋白的活性口袋进行对接，验证其相互作用活性。

### 2.3 qRT-PCR 法检测关键靶点 mRNA 表达

取“2.1.1”项下各组大鼠肾脏组织至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末，按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。通过 Primer Premier 5 设计 PCR 扩增引物序列，白蛋白 (albumin, *ALB*)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , *TNF- $\alpha$* )、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *PPARG*)、信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, *STAT3*) 和 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>ALB</i>	F: CCAAGTGCTGTAGTGGGTCC R: GCCTGGGCTTGTGTTTCAC
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F: GGCGTGTCATCCGTTCTCT R: CCCAGAGCCACAATTCCCTT
<i>PPARG</i>	F: GTGCCTTCGCTGATGCACT R: GCAGGCTCTACTTTGATCGC
<i>STAT3</i>	F: GACCCGCGTCGGCTAGGA R: ATCCTGCCGCAATCAGGGG
<i>GAPDH</i>	F: GAAGGTCGGTGTGAACGGAT R: CCCATTTGATGTTAGCGGGAT

### 2.4 16S rDNA 测序法检测肠道菌群的变化

末次给药后，收集“2.1.1”项下各组大鼠粪便，采用 Zymo Research BIOMICS DNA 微量制备试剂盒提取 DNA，并使用 0.8% 琼脂糖电泳检测 gDNA 完整性，随后测定 DNA 浓度。用 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对样本的 16S rDNA V3~4 区域进行扩增，采用 Zymoclean 凝胶 DNA 回收试剂盒对 PCR 回收产物进行纯化，并使用 Qubit@2.0 Fluorometer 定量，用 NEBNext Ultra II DNA 文库制备试剂盒构建 DNA 文库，最后采用 Illumina HiSeq 快速 SBS 试剂盒 v2 进行测序。下机后对数据进行处理，使用 FLASH 拼接双端序列，基于 Barcode 从 raw reads 中拆分出各样品序列，截去 Barcode 序列，并使用 QIIME2 进行质控。基于

Deblur 算法对序列进行序列降噪和嵌合体去除，生成 ASV 特征表和特征序列。使用基于朴素贝叶斯算法的分类器对 SILVA 数据库进行物种分类数据集的构建，并使用该数据集对 ASV 特征序列进行物种注释。使用 QIIME2 对特征序列进行多重比对，并使用其内置的 FastTree 插件构建进化树。最后进行群落组成分析、 $\alpha$  多样性分析、 $\beta$  多样性分析、差异物种分析以及群落功能预测分析。

### 2.5 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 8 和 SPSS 20.0 软件进行统计分析，数据结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间差异采取单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行比较。肠道菌群测序数据的群落组成、 $\alpha$  多样性、 $\beta$  多样性以及差异物种分析使用 R 语言 4.0.5 数据分析软件进行分析；使用 QIIME2 2020.2 进行数据质控、操作分类单元 (operational taxonomic unit, OUT) 聚类、物种注释和进化树构建。

## 3 结果

### 3.1 SRP 对 HN 大鼠肾组织病理变化以及血清中 UA、CREA 和 BUN 水平的影响

如图 1-A 所示，与对照组比较，模型组大鼠肾小球细胞核数增多，肾小管间质损伤，肾小管扩张以及肾小管上皮细胞变形坏死。与模型组比较，各给药组均可改善肾间质损伤、肾小管扩张以及减少肾小管上皮细胞变性坏死的情况。如图 1-B 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清中 UA、CREA 和 BUN 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ )，表明 HN 模型构建成功；与模型组比较，各给药组大鼠血清中 UA、CREA、BUN 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )；SRP 对 HN 大鼠血清中 CREA 和 BUN 水平的下调作用优于别嘌醇，表明 SRP 对由 UA 升高导致的肾功能损伤具有明显的改善作用，且疗效优于单一靶点的别嘌醇。

### 3.2 网络药理学研究

**3.2.1 SRP 活性成分的筛选** 通过 TCMSP 数据库以及文献检索，搜索 SRP 中各药材成分，经过筛选最终得到 121 个有效成分，其中余甘子 12 个、安息香 3 个、决明子 11 个、诃子 7 个、乳香 2 个、木香 4 个、儿茶 11 个、黄葵子 3 个、巴夏嘎 8 个、藏菖蒲 7 个、宽筋藤 16 个、毛诃子 22 个、麝香 4 个、铁棒锤 8 个、渣驯膏 3 个。其中主要活性成分为山柰酚、儿茶素、槲皮素、木犀草素以及表没食子儿茶素没食子酸酯。

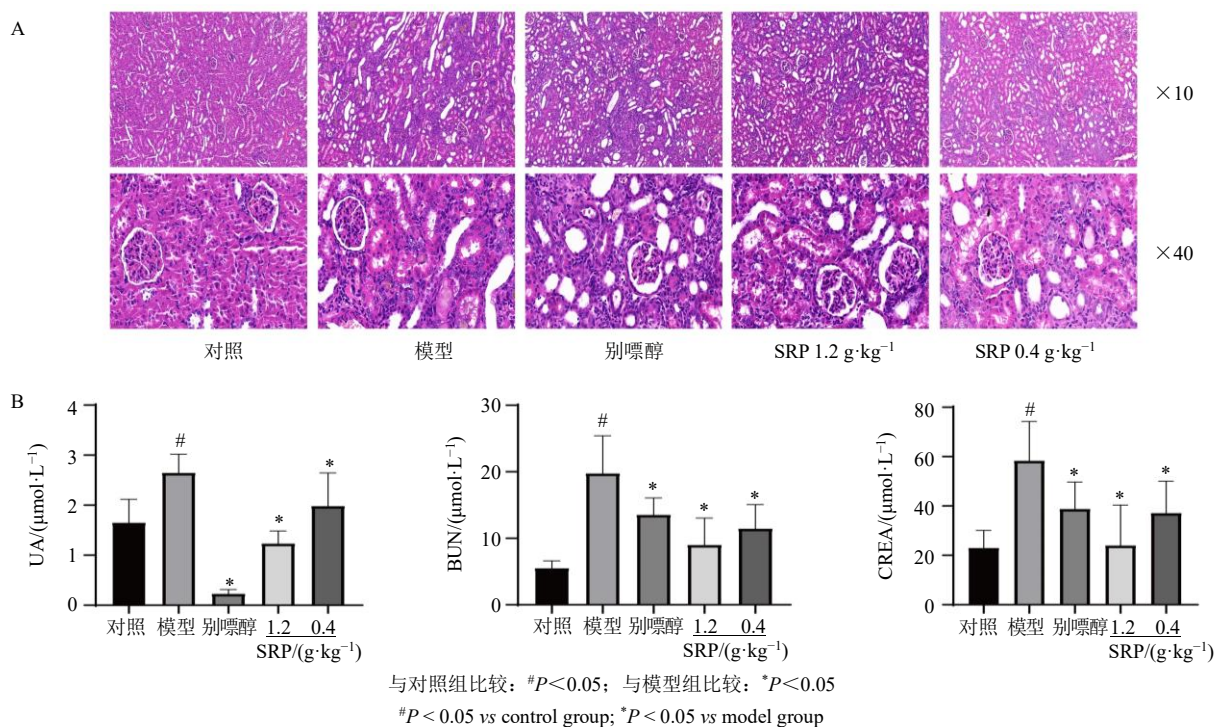


图1 SRP对HN大鼠肾组织病理变化(A)及血清中UA、CREA和BUN水平(B)的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of SRP on pathological changes of kidney tissue (A) and UA, CREA and BUN levels in serum (B) of HN rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**3.2.2 HN及SRP活性成分对应靶点收集** 将得到的活性成分 Canonical SMILES 导入 Swiss Target Prediction 数据库以及 PharmMapper 数据库, 最终得到SRP的作用靶点780个, 在 GeneCards 数据库检索到HN的626个靶点。将疾病靶点与药物靶点取交集共得到147个交集靶点, 见图2。

**3.2.3 潜在靶点的网络构建** 将SRP与HN的靶点交集后的文件导入 Cytoscape 3.7.2, 得到活性成分-靶点网络(图3), 网络共有279个节点; 度值较高成分为表没食子儿茶素没食子酸酯(MOL006821)、槲皮素(MOL000098)、木犀草素(MOL000006)、儿茶素(MOL000492)、山柰酚(MOL000422), 这些活性成分可能是治疗HN的关键成分。

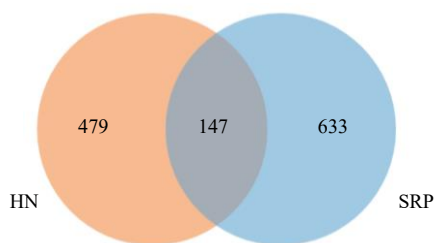


图2 SRP活性成分与HN靶点交集的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of intersection of SRP active ingredient and HN targets

**3.2.4 HN与SRP潜在靶点PPI网络的构建** 将共同靶点导入 STRING 数据库, 获得PPI网络图(图4-A)。其中节点表示靶点, 节点间的连线表示靶点之间的关系。筛选度值靠前的靶点(图4-B), 网络图含有77个靶点以及1582条相互关系, 节点颜色越深, 节点越大, 代表度值越大, 表明在整个图中生物学重要性越高; 节点间连线的粗细代表节点间的联系, 连线越粗代表结合分数越高, 联系越密切。度值排名靠前的靶点分别为ALB、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cystein-aspartate protease 3, CASP3)、转录因子JUN、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、TNF、血管内表皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、STAT3、IL-1 $\beta$ 、肿瘤蛋白p53(tumor protein p53, TP53)和PPARG, 这10个节点均高于平均自由度且度值较高, 表明靶点在SRP治疗HN过程中起重要作用。

**3.2.5 SRP治疗HN靶点的GO功能富集分析** 将SRP治疗HN的潜在靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析, GO功能富集分析包括生物过程(biological processes, BP)、细胞成分(cellular components, CC)和分子功能(molecular functions, MF)3个方面。如图5所示, BP主要包括细胞对

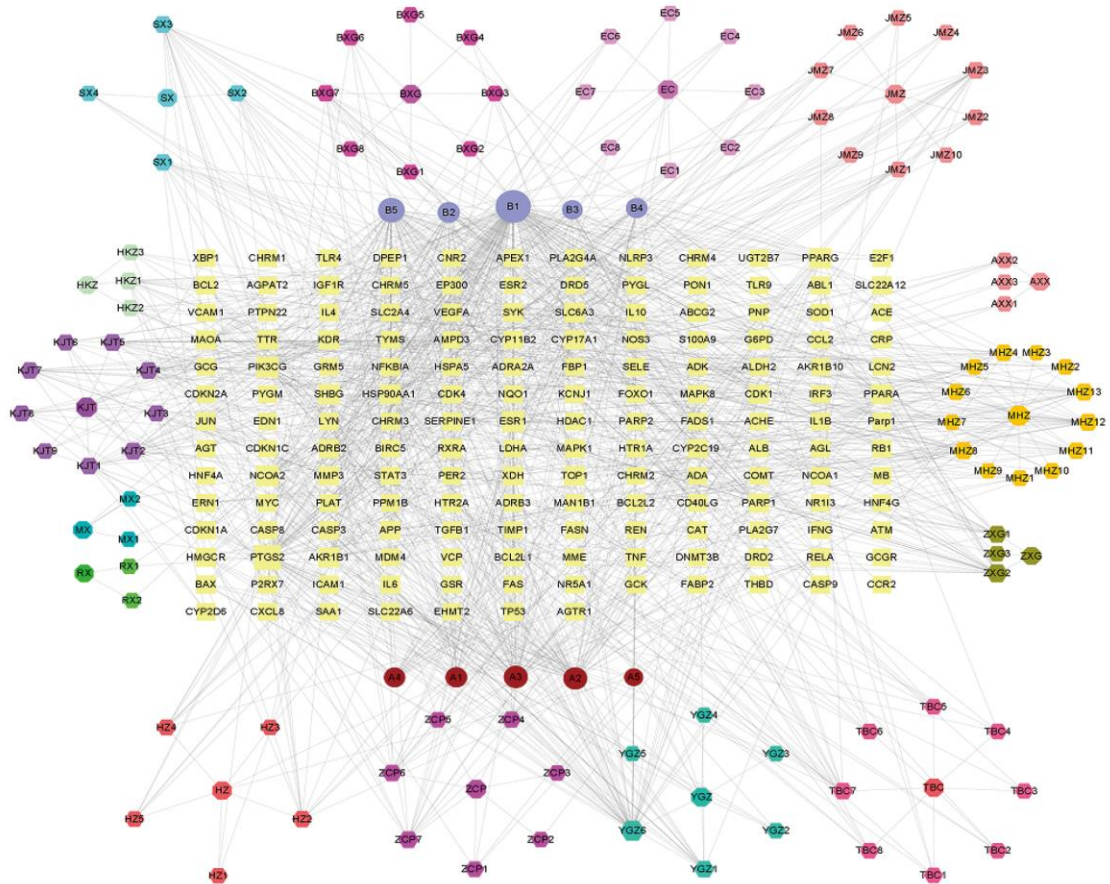
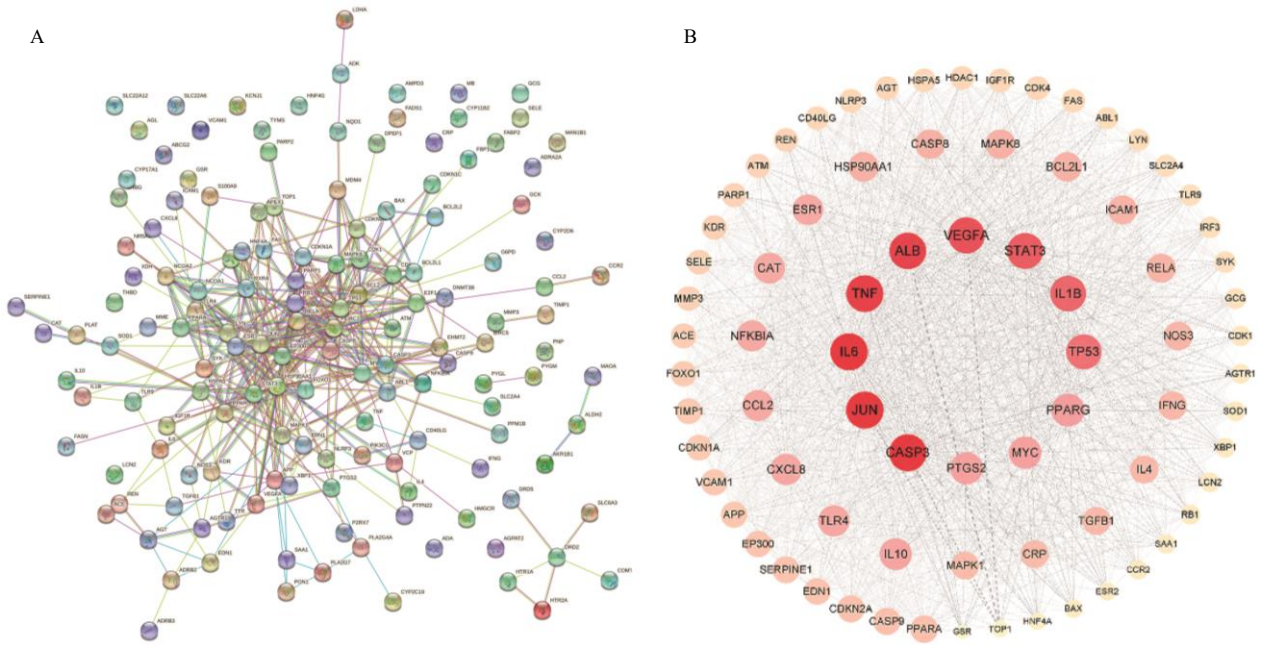


图3 SRP 活性成分-靶点网络  
Fig.3 SRP active ingredient-target network



A-SRP 治疗 HN 靶点的 PPI 网络 B-度值靠前的靶点 PPI 网络  
A-PPI network of SRP-treated HN targets B-PPI network of targets with the highest degree value

图4 PPI 网络  
Fig.4 PPI network

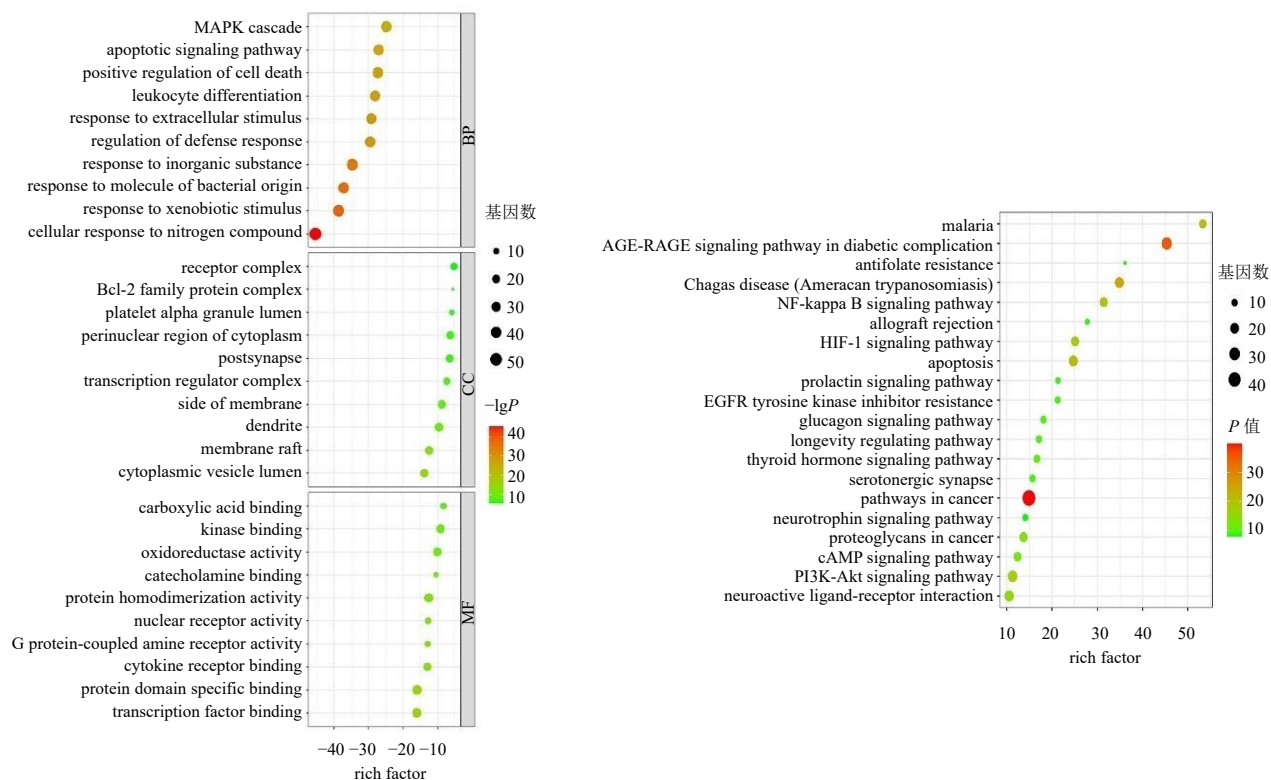


图5 GO功能及KEGG通路富集分析

Fig. 5 GO function and KEGG pathway enrichment analysis

外来刺激的反应及对细菌来源分子的反应等;CC主要包括胞质囊泡、膜筏及树突等;MF主要包括转录因子结合、蛋白质结构域特异性结合及细胞因子受体结合。KEGG通路富集选取程度最高的前20条信号通路,主要作用于晚期糖基化终末化产物(advanced glycation end products, AGE)-晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)信号通路、细胞凋亡及核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通路等。

### 3.3 分子对接研究

筛选网络中度值较高的成分与靶点,导入AutoDockTools 1.5.6得到分子对接结果。其中成分选取度值较高的表没食子儿茶素没食子酸酯、槲皮素、儿茶素、山柰酚以及木犀草素,靶点选取PPI网络中排名前10的靶点。其中ALB、TNF、PPARG、STAT3以及MYC与成分对接情况较好,对接结果以热图形式展示(图6)。部分对接结果可视化模式见图7。

### 3.4 SRP对HN大鼠肾组织中关键靶点mRNA表达的影响

HN常伴有炎症发生,其中TNF- $\alpha$ 、ALB、STAT3以及PPARG均与肾损伤密切相关。如图8所示,与

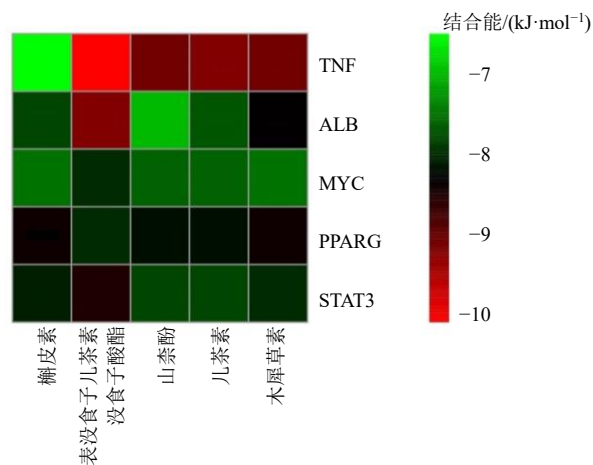


图6 分子对接聚类分析

Fig. 6 Cluster heatmap of molecular docking

对照组比较,模型组大鼠肾组织中ALB、STAT3及TNF- $\alpha$  mRNA表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ),PPARG mRNA表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,各给药组大鼠肾组织中ALB、STAT3及TNF- $\alpha$  mRNA表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ),PPARG mRNA表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。表明SRP能够通过抑制炎症因子表达,从而改善HN大鼠的肾损伤。

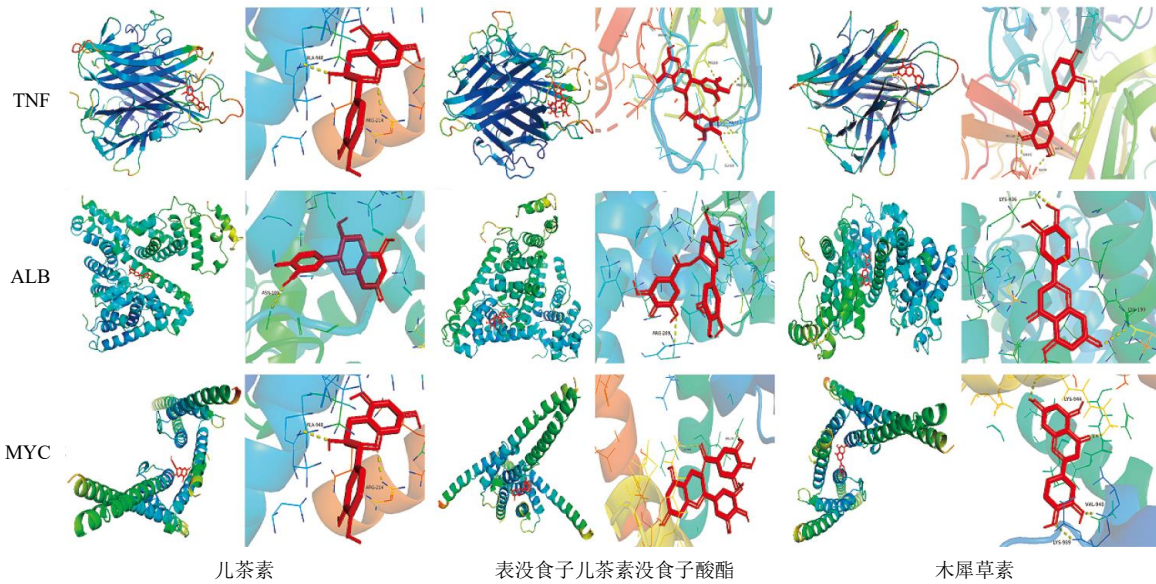


图7 SRP主要活性成分与关键靶点的分子对接

Fig. 7 Molecular docking of main active ingredients of SRP with key targets

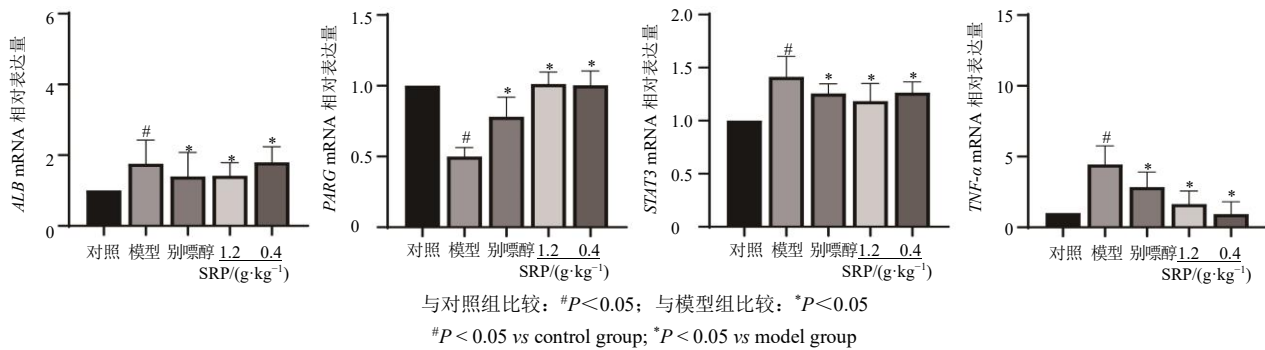


图8 SRP对HN大鼠肾组织中ALB、TNF-α、PPARG及STAT3 mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 8 Effect of SRP on ALB, TNF-α, PPARG and STAT3 mRNA expressions in kidney tissue of HN rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.5 SRP对HN大鼠肠道菌群的影响

**3.5.1 SRP对肠道菌群多样性的影响** 采用α多样性分析法对各组大鼠肠道菌群物种多样性进行评价,其中包括Chao1、Shannon、PD和Simpson指数。Chao1指数用于估算物种总数,Shannon和Simpson指数说明物种多样性,PD指数是对进化树所有枝长求和,说明物种有无,进化差异度与数值呈正相关,数值越大,多样性越高。如图9所示,与对照组比较,模型组Chao1、PD、Simpson及Shannon指数均下降,说明HN大鼠肠道菌群的丰富度和多样性都有所下降;与模型组比较,给药组Chao1、PD、Shannon及Simpson指数总体上升,说明SRP可提高大鼠肠道菌群的丰富度和多样性。

为了探索样本物种丰富度随着测序深度的变化趋势,做稀释曲线(图10-A),当OTU数目<1300时,各样本稀释曲线趋向平坦,表明测序数据足够

大,能够反映样本中绝大多数微生物的多样性信息。为了研究各样本中物种个体丰度与物种个体类型的变化关系,进行Rank-Abundance曲线分析(图10-B),Rank-Abundance曲线用来解释多样性的2个方面,即物种丰度和物种均匀度。

β多样性分析是指对不同样本的微生物群落结构进行比较分析,本研究通过主成分分析(principal component analysis, PCA)和主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)来研究群落组成的相似性或差异性。如图10-C、D所示,不同的颜色或点代表不同处理的样本,两样本点相距越近代表两样本组成越相似。对照组和模型组的样本明显分离,说明建立的HN大鼠模型的肠道菌群有明显的变化,且在SRP干预后,大鼠的肠道菌群分布情况有向对照组迁移的趋势,说明SRP对大鼠的肠道菌群的群落结构组成有一定的调节作用。



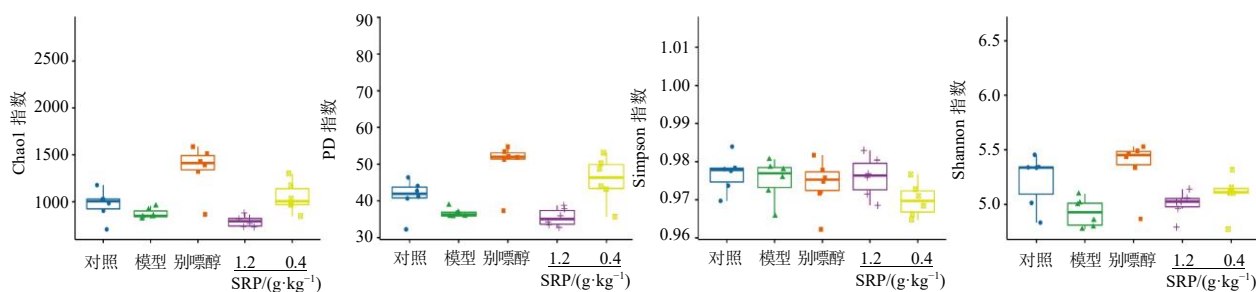


图9 各组大鼠肠道菌群  $\alpha$  多样性分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 9  $\alpha$ -Diversity of intestinal flora of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

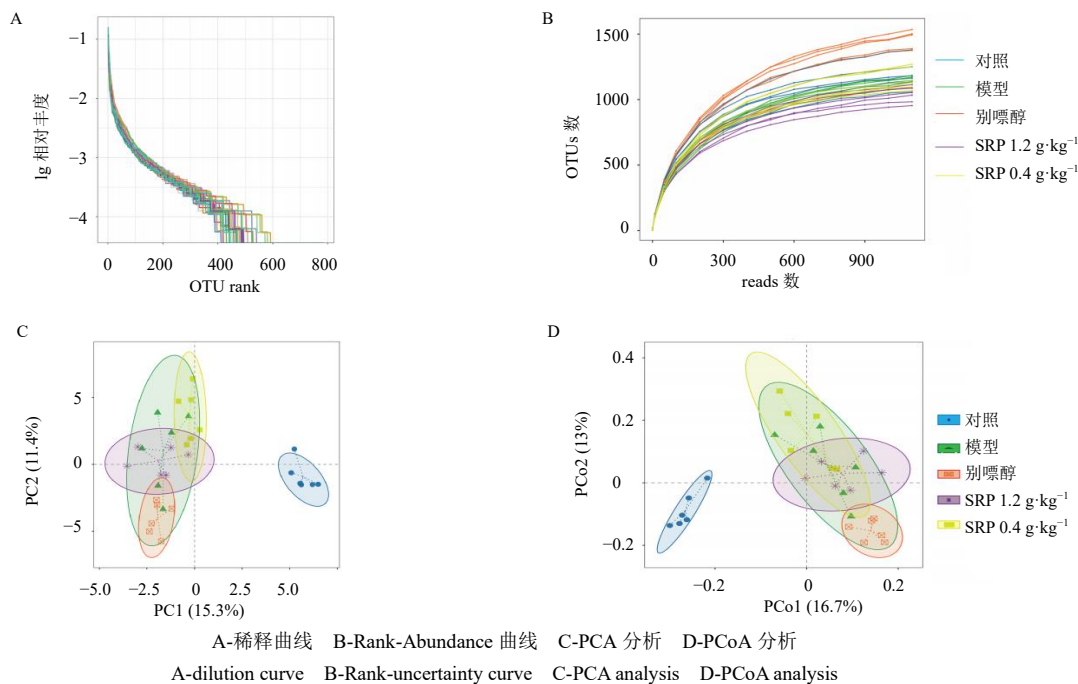


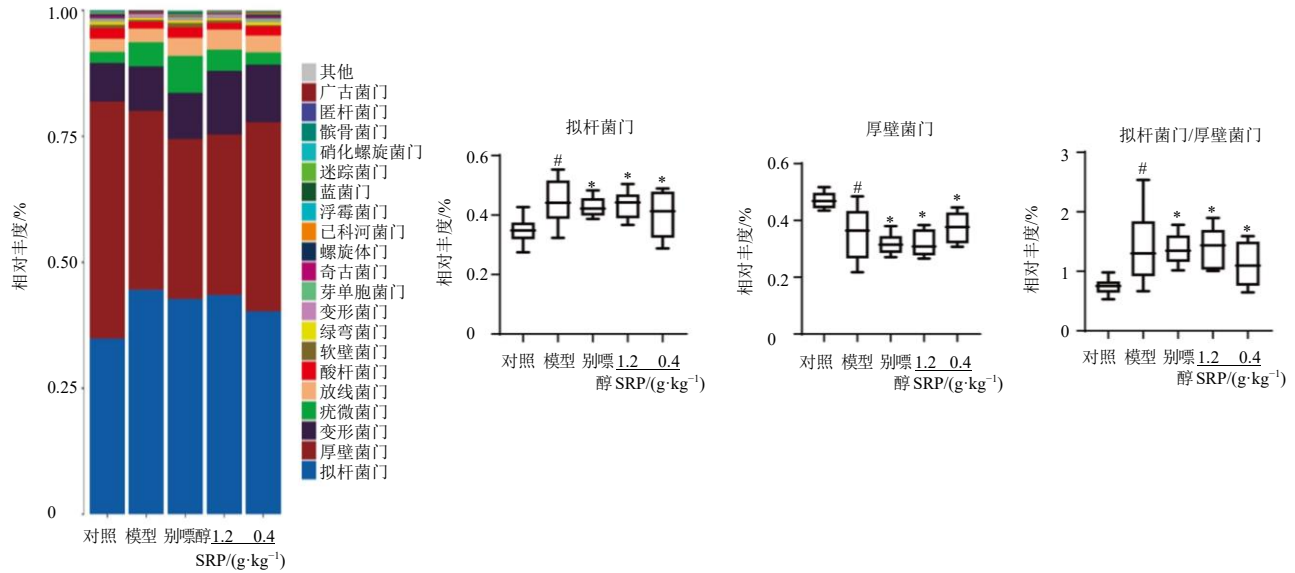
图10 各组大鼠肠道菌群稀释曲线及  $\beta$  多样性分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 10 Dilution curve and  $\beta$ -diversity of intestinal flora of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**3.5.2 SRP 对 HN 大鼠肠道菌群门水平的影响** 如图 11 所示,大鼠肠道菌群门水平上主要以拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 为主, 其中还有少量的变形菌门 (Proteobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、放线菌门 (Actinobacteria)。与对照组比较, 模型组大鼠肠道中拟杆菌门相对丰度显著升高 ( $P < 0.05$ ), 厚壁菌门相对丰度显著降低 ( $P < 0.05$ ), 拟杆菌门与厚壁菌门的比值显著上升 ( $P < 0.05$ ); 经过 SRP 干预后, 拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度均有不同程度的恢复 ( $P < 0.05$ )。表明 SRP 可以通过降低拟杆菌门的相对丰度、提高厚壁菌门的相对丰度以及降低拟杆菌门和厚壁菌门的比值来改善 HN 大鼠。

**3.5.3 SRP 对 HN 大鼠肠道菌群属水平上的影响** 在属水平上, 与 HN 相关的具有代表性的前 6 种肠

道微生物分别为乳杆菌属 *Lactobacillus*、拟杆菌属 *Bacteroides*、阿克曼菌属 *Akkermansia*、劳尔氏菌属 *Ralstonia*、Prevotellaceae Ga6A1 group、Ruminococcaceae UCG-014。如图 12 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肠道中乳杆菌属及 Ruminococcaceae UCG-014 的相对丰度降低 ( $P < 0.05$ ), 阿克曼菌属、劳尔氏菌属及 Prevotellaceae Ga6A1 group 的相对丰度升高 ( $P < 0.05$ ); 经过 SRP 治疗后, 乳杆菌属及 Ruminococcaceae UCG-014 的相对丰度总体上调 ( $P < 0.05$ ), 阿克曼菌属、劳尔氏菌属及 Prevotellaceae Ga6A1 group 的相对丰度整体下降 ( $P < 0.05$ )。表明 SRP 能够抑制阿克曼菌属、劳尔氏菌属及 Prevotellaceae Ga6A1 group 的生长, 促进乳杆菌属及 Ruminococcaceae UCG-014 的增殖来改善 HN 大鼠。



与对照组比较: # $P < 0.05$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$ , 图 12 同

# $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group, same as fig. 12

图 11 SRP 对 HN 大鼠肠道菌群门水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 11 Effect of SRP on intestinal flora at phylum level in HN rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

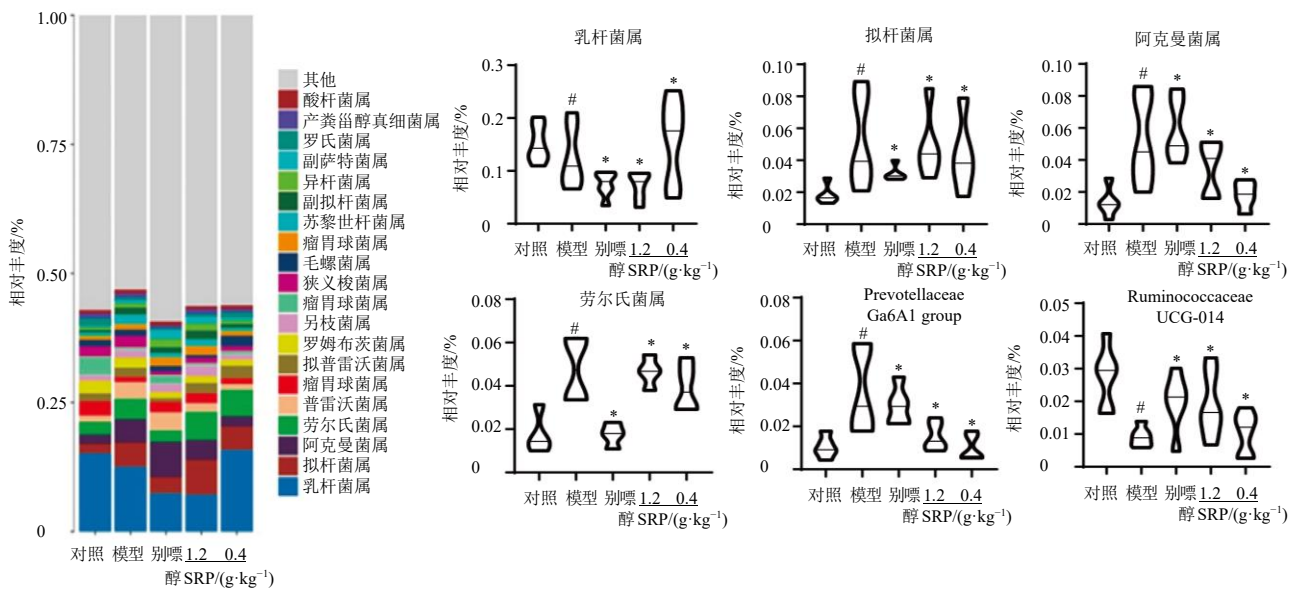
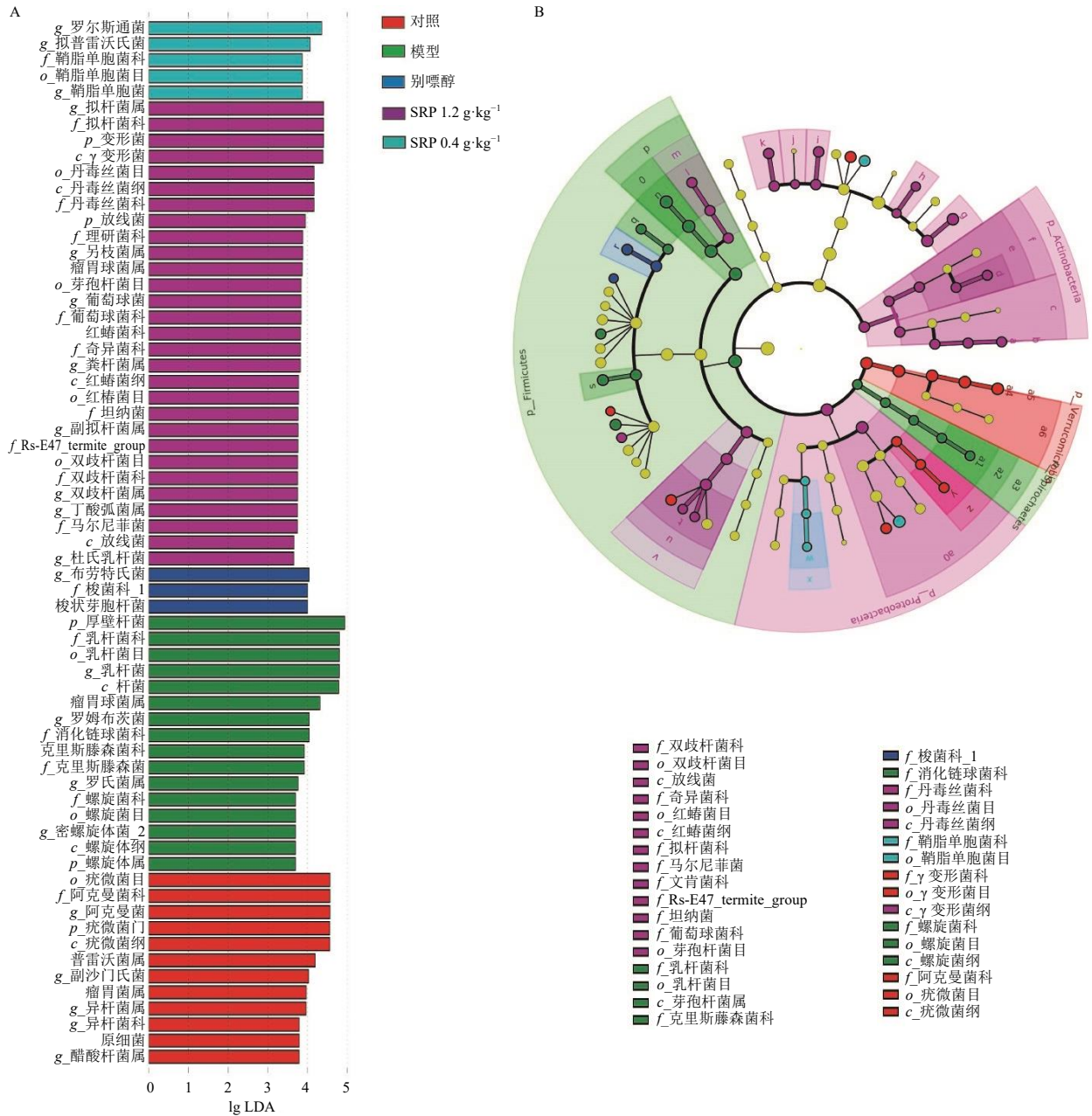


图 12 SRP 对 HN 大鼠肠道菌群属水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 12 Effect of SRP on intestinal flora at genus level in HN rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**3.5.4 SRP 对 HN 大鼠肠道差异菌群的分析** 为确定 SRP 治疗 HN 大鼠相关的肠道菌群, 采用线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSs) 比较 5 组间肠道菌群。如图 13 所示, 对照组显著差异的菌种有 12 中, 主要为疣微菌目、阿克曼菌科、阿克曼菌属及疣微菌门等; 模型组显著差异的菌种有 16 种, 主要为厚壁菌门、乳杆菌科、乳

杆菌目及乳杆菌等; 别嘌醇组显著差异的菌种有 3 种, 分别为布劳特氏菌属 *Blautia*、梭菌科及梭状芽胞杆菌; SRP 给药组差异显著的菌群有 34 种, 主要为劳尔氏菌属、拟普雷沃氏菌属 *Alloprevotella*、鞘脂单胞菌科、拟杆菌属、拟杆菌科等。在 Cladogram 分析结果中, 对照组与模型组差异显著, 组间能明显分开, SRP 给药组与对照组略有重叠。



A-LDA 值分布柱状图 B-物种分支进化图  
A-histogram of LDA value distribution B-species bifurcation evolution diagram

图 13 各组大鼠肠道菌群 LefSe 分析 (x̄ ± s, n = 6)

Fig. 13 LefSe analysis of intestinal flora of rats in each group (x̄ ± s, n = 6)

4 讨论

藏医药治疗高尿酸血症的历史悠久、经验丰富。近年来，无数藏药进入大众的视野，大量国内外研究者也展开了对藏药的相关研究。已有多个藏药经典配方被证实有效，如二十五味儿茶丸、复方猫乳儿散以及七味罗堆多吉颗粒等。藏医对于高尿酸血症患者的治疗，遵照多数共性和个体差异化的原则，采取单方治疗、三果和三黄水药为核心药材的复方

治疗及药浴联合放血治疗等，对于高尿酸血症患者的各个临床指标均有明显改善。近期，也有研究针对于藏药复方制剂抗高尿酸血症的药理作用机制，其主要涉及抑制 UA 合成、促进 UA 排泄和抑制炎症反应等。

SRP 作为藏医经典名方，是藏医数千年流传下来的宝贵财富，其治疗痛风的作用已经经过多年的临床验证。其可通过降低 UA 水平以及炎症指标，而

改善患者痛风症状,但其作用机制尚不明确。因此本研究借助网络药理学、分子对接技术及肠道菌群分析 SRP 治疗 HN 的作用机制,再采用 qRT-PCR 验证, 以期为藏药治疗 HN 提供方向和参考。

动物实验结果显示, SRP 能改善 HN 大鼠肾脏病理变化,降低大鼠血清中 UA、CREA 及 BUN 水平,且 SRP 疗效优于阳性对照组别嘌醇,证明 SRP 抗 HN 具有多靶点的高效治疗作用。网络药理学共筛选出 SRP 中 121 个活性成分,疾病靶点与药物靶点交集后得到 147 个共同靶点。活性成分-靶点网络显示槲皮素、山柰酚、表没食子儿茶素没食子酸酯、木犀草素、儿茶素能对接更多的靶点,是 SRP 主要的活性成分。研究表明,木犀草素<sup>[8-9]</sup>和槲皮素<sup>[10-11]</sup>能够通过降低黄嘌呤氧化酶活性而减少 UA 合成,并能抑制炎症细胞因子而减轻炎症反应的产生。槲皮素能显著改善胸腺和脾脏等免疫器官的功能<sup>[12]</sup>;通过提高 Toll 交互蛋白的表达从而抑制 NF- $\kappa$ B 的表达,而发挥保护肾脏功能<sup>[13-14]</sup>。木犀草素被认为在肾病治疗中具有较大潜力的有效成分,有研究表明,木犀草素能够通过上调核转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2), 减弱活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 促进抗氧化蛋白及酶的释放,下调 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) /髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, Myd88) /NF- $\kappa$ B 通路,并减缓氧化应激损伤,发挥抗炎作用<sup>[15]</sup>。儿茶素是绿茶中的一组多酚,研究发现大鼠的肾脏切除 5/6 后使用儿茶素,使大鼠的肾脏微血管密度减小的程度得到抑制,且还可以延缓肾小球硬化和肾间质纤维化的进程,从而起到保护肾脏作用<sup>[16]</sup>。在肾病中,山柰酚在底物与黄嘌呤氧化酶结合之前,到达结合位点与黄嘌呤氧化酶结合,从而发挥抑制黄嘌呤氧化酶活性<sup>[17]</sup>;且山柰酚能有效抑制肾病大鼠细胞凋亡和肾组织炎症反应,改善肾功能<sup>[18]</sup>。表没食子儿茶素没食子酸酯是茶叶中的主要活性成分之一,是一种强效的抗氧化剂和活性氧清除剂,具有强大的抗炎作用<sup>[19]</sup>。肾损伤大鼠给予表没食子儿茶素没食子酸酯干预后,血清中 BUN、CREA 和炎症因子水平均降低,说明表没食子儿茶素没食子酸酯能够抑制炎症因子表达,从而保护肾脏<sup>[20]</sup>。以上研究表明,SRP 的主要活性成分通过增强 UA 排泄、抑制 UA 合成和抵抗炎症反应发挥治疗 HN 的作用,且优势明显。

本研究结果显示,SRP 治疗 HN 的主要潜在靶点为 TNF、ALB、MYC、PPARG 及 STAT3。这 5 个潜在靶点与主要活性成分的分子对接结果显示出较高的结合能,从而进一步验证了本研究预测结果的可靠性。ALB 是一种非急性时相蛋白,在疾病急性期时会减少。有研究表明,痛风患者血清中 ALB 水平显著降低<sup>[21]</sup>。TNF- $\alpha$  可由巨噬细胞分泌,参与免疫反应和炎症反应各个阶段,有研究表明肾脏损伤程度与 TNF- $\alpha$  水平呈正相关<sup>[22]</sup>。TNF- $\alpha$  作为前炎症细胞因子,可加重中性粒细胞炎症反应,迅速放大炎症反应,是肾脏炎症的产生和持续的关键因子<sup>[23-24]</sup>。TNF 抑制剂不仅能改善炎症反应,还可以辅助降 UA 治疗<sup>[25]</sup>。PPARG 是一种过氧化物酶体增殖受体,具有调节炎症的作用<sup>[26]</sup>。PPARG 激动剂可通过增加肾病大鼠外周组织的血管生成素样蛋白 4 的表达来减少蛋白尿的产生,从而保护肾脏<sup>[27]</sup>。MYC 是一种多功能的转录因子,可以调控细胞生长、增殖和凋亡等生物过程中的许多基因<sup>[28]</sup>。此外,MYC 可参与分泌型糖蛋白/ $\beta$ -链蛋白 (Wnt/ $\beta$ -catenin) 和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide-3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 通路,与肾病的发病有关<sup>[29]</sup>。STAT3 是信号转导和转录激活因子,活化的 STAT3 在机体免疫反应、修复损伤等多种生理病理过程中发挥着重要的作用<sup>[30]</sup>。IL-6 可以活化 STAT3,并诱导多种炎症因子表达,从而促进炎症反应<sup>[31-32]</sup>。

GO 功能和 KEGG 通路富集分析结果显示,SRP 可能通过作用于 NK- $\kappa$ B 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、HIF-1 信号通路以及癌症信号通路对氮化合物、外来刺激及细菌来源分子产生反应,并且通过靶向转录因子结合、蛋白质结构域特异性结合以及细胞因子受体结合对 ALB、PPARG、MYC、STAT3 及 TNF 等靶点进行调控,而发挥抑制炎症反应、调节 UA 合成代谢及改善肾脏损伤的作用。AGE-RAGE 信号通路与炎症的发生密切相关,可通过提高丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 磷酸化水平,而促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 及 IL-6 等炎症因子的表达<sup>[33]</sup>。肾脏对于缺氧环境非常敏感,而以小管间质病变为主的肾脏疾病会由于水肿以及炎症等反应导致局部血和氧的运输<sup>[34]</sup>。大多数慢性肾病都存在进行性纤维化以及肾脏微血管丢失导致的局部缺氧缺血,小鼠肝纤维化模型中检测到缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ,

HIF-1 $\alpha$ ) 表达, 且其表达量与肾间质纤维化程度有关<sup>[35-36]</sup>。qRT-PCR 结果显示, SRP 能够显著降低 HN 大鼠肾组织中 *TNF- $\alpha$* 、*ALB*、*STAT3* 等炎症因子表达, 且优于别嘌醇, 说明 SRP 在治疗高尿酸血症大鼠中主要发挥抗炎、减少渗出等作用, 且基本能恢复到正常水平, 更进一步说明 SRP 治疗高尿酸血症肾病的多靶向高效性。

肠道菌群的紊乱通常表现在肠道微生物菌群多样性的改变以及群落结构组成的变化。在门水平上, SRP 可以降低拟杆菌门的相对丰度、提高厚壁菌门的相对丰度以及降低拟杆菌门和厚壁菌门比值<sup>[37]</sup>。研究表明, 拟杆菌等细菌与 UA 水平呈正相关, 且拟杆菌能够产生血清及盲肠内毒素, 进而引发全身慢性低度炎症反应<sup>[38]</sup>。厚壁菌门可以产生丁酸, 且直肠给予丁酸可以有效改善体内 UA 代谢<sup>[39-40]</sup>。乳杆菌是肠道中重要的有益菌, 患有高尿酸血症会导致乳杆菌等有益菌群数量减少, 因此一些特征菌属可作为高尿酸血症的靶微生物<sup>[41]</sup>。本研究结果显示, SRP 能够上调乳杆菌的相对丰度, 因此乳杆菌可能是 SRP 的靶细菌之一。阿克曼菌与肠上皮细胞的黏蛋白以及倡导屏障有关, 并且其代谢物能够通过降低肠道通透性从而调节免疫<sup>[42]</sup>。由此可见, SRP 能够提高粪便中丁酸的含量, 并富集产生短链脂肪酸的有益菌群。

高尿酸血症引起肾脏损伤与肠道菌群的变化有关<sup>[43-44]</sup>。肠道菌群通过参与体内蛋白质、膳食纤维等营养物质的代谢, 能够产生氧化三甲胺 (trimethylamine *N*-oxide, TMAO) 等代谢物影响 HN 的发展。TMAO 能通过上调巨噬细胞清道夫受体, 促进血管斑块的形成, 释放炎症因子, 导致血管炎症反应, 而加重肾脏损伤<sup>[45-46]</sup>。巨噬细胞上的内源性 G 蛋白偶联受体 5 (G protein coupled receptor 5, TGR5) 参与炎症反应中的许多重要过程, 如 NF- $\kappa$ B 信号通路。胆汁酸是 TGR5 的配体且也是肠道菌群的主要产物。TGR5 受体被激活后还会抑制 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 激酶的磷酸化, 降低 NF- $\kappa$ B 的活性, 从而影响巨噬细胞的炎症反应<sup>[47]</sup>。短链脂肪酸具有增强肠道屏障以及抑制肠道炎症的功能, 丁酸作为短链脂肪酸的一种, 可以通过减少 IL-1 $\beta$  的合成与释放, 有效减轻炎症反应<sup>[48]</sup>。另有研究表明, 丁酸可以通过调节 NF- $\kappa$ B 信号通路、AGE-RAGE 信号通路等炎症通路的活性, 抑制炎症因子的释放<sup>[49-50]</sup>。以上结果表明肠道菌群通过

作用于 NF- $\kappa$ B 信号通路以及 AGE-RAGE 信号通路等产生炎症因子, 从而影响 HN 的发生发展。根据网络药理学结果分析发现, SRP 治疗 HN 的靶点所富集的通路肠道菌群影响肾病的通路 NF- $\kappa$ B 和 AGE-RAGE 一致, 所涉及的靶点主要有炎症蛋白如 ALB、TNF 及 PPARG 等。表明 SRP 可能通过调节 NF- $\kappa$ B 通路以及 AGE-RAGE 通路来影响体内炎症因子的合成与释放, 从而改善由肠道菌群失调所导致的 HN。

综上所述, 本研究通过网络药理学、分子对接技术及肠道菌群, 探讨了 SRP 治疗 HN 的作用机制, 并找出其可能的潜在靶点, 利用动物实验验证了该靶点, 体现了 SRP 具有多组分、多靶点和多途径的特点, 为 SRP 治疗 HN 提供了依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Strilchuk L, Fogacci F, Cicero A F. Safety and tolerability of available urate-lowering drugs: A critical review [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2019, 18(4): 261-271.
- [2] Wang J, Chen Y, Zhong H, et al. The gut microbiota as a target to control hyperuricemia pathogenesis: Potential mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(14): 3979-3989.
- [3] 寇毅英, 李永芳, 杨梅, 等. 五味乳鹏散对尿酸钠致大鼠急性痛风性关节炎 COX-2, PGE<sub>2</sub> 水平的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(1): 117-120.
- [4] Kou Y Y, Li Y F, Ma H S, et al. Uric acid lowering effect of Tibetan Medicine RuPeng15 powder in animal models of hyperuricemia [J]. *J Tradit Chin Med*, 2016, 36(2): 205-210.
- [5] Kou Y Y, Li Y F, Xu M, et al. Effects of RuPeng15 powder (RPP15) on monosodium urate crystal-induced gouty arthritis in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 527019.
- [6] 黄亚敏, 陈旅翼. 三种藏药五味乳鹏丸、十味乳香散与五味麝香丸抗痛风作用研究 [J]. *绿色科技*, 2017(16): 195-197.
- [7] 拉青才让. 藏药五味乳鹏丸等治疗类风湿关节炎 100 例疗效观察 [J]. *医学文选*, 2003(6): 900-901.
- [8] Ren J Y, Liao L F, Shang S M, et al. Purification, characterization, and bioactivities of polyphenols from *Platycladus orientalis* (L.) Franco [J]. *J Food Sci*, 2019, 84(3): 667-677.
- [9] Lin Y, Liu P G, Liang W Q, et al. Luteolin-4'-*O*-glucoside and its aglycone, two major flavones of *Gnaphalium affine* D. Don, resist hyperuricemia and acute gouty arthritis

- activity in animal models [J]. *Phytomedicine*, 2018, 41: 54-61.
- [10] Wu Z Y, Zhang H, Li F, *et al.* Evaluation of xanthine oxidase inhibitory activity of flavonoids by an online capillary electrophoresis-based immobilized enzyme microreactor [J]. *Electrophoresis*, 2020, 41(15): 1326-1332.
- [11] Rahmi E P, Kumolosasi E, Jalil J, *et al.* Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of *Marantodes pumilum* as potential treatment for gout [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 289.
- [12] 叶清. 植物槲皮素对东方田鼠免疫功能的影响 [D]. 吉首: 吉首大学, 2018.
- [13] Byun E B, Yang M S, Choi H G, *et al.* Quercetin negatively regulates TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide through Tollip expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(4): 698-705.
- [14] Lee K W, Kang N J, Heo Y S, *et al.* Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3): 946-955.
- [15] 赵家玲. 木犀草素激活 Nrf2 途径对高糖环境下肾脏系膜细胞的保护作用 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [16] 曹艳, 何小解, 向伟, 等. 儿茶素对 5/6 肾切除大鼠肾脏微血管的保护作用及其机制 [J]. *中西医结合学报*, 2009, 7(6): 557-562.
- [17] Wang Y J, Zhang G W, Pan J H, *et al.* Novel insights into the inhibitory mechanism of kaempferol on xanthine oxidase [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(2): 526-534.
- [18] 焦晓翠. Sirt3 对糖尿病肾小管氧化损伤的影响及分子机制的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [19] Guo R, Zhou F M, Su C J, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate attenuates acute and chronic psoriatic itch in mice: Involvement of antioxidant, anti-inflammatory effects and suppression of ERK and Akt signaling pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(4): 1062-1068.
- [20] 李木子, 陈克研, 孙倩, 等. TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B 通路介导表没食子儿茶素没食子酸酯对脓毒血症大鼠急性肾损伤的保护作用 [J]. *中国医科大学学报*, 2019, 48(2): 109-113.
- [21] 覃柳群, 石祥, 李文朝, 等. 血清前白蛋白水平与痛风疾病活动的相关性分析 [J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36(1): 87-90.
- [22] 危正南, 李涛, 张庆红, 等. MIF、TLR4、TNF- $\alpha$  水平在糖尿病肾病患者中的变化及其临床意义 [J]. *疑难病杂志*, 2016, 15(2): 165-168.
- [23] Nakae S, Lunderius C, Ho L H, *et al.* TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(3): 680-686.
- [24] Wilson S J, Wallin A, Della-Cioppa G, *et al.* Effects of budesonide and formoterol on NF-kappaB, adhesion molecules, and cytokines in asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(6): 1047-1052.
- [25] Zhang Y, Pan R Z, Xu Y, *et al.* Treatment of refractory gout with TNF- $\alpha$  antagonist etanercept combined with febuxostat [J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(6): 4332-4338.
- [26] Young S G, Davies B S, Fong L G, *et al.* GPIHBP1: An endothelial cell molecule important for the lipolytic processing of chylomicrons [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2007, 18(4): 389-396.
- [27] 吴艺芳. PPAR $\gamma$  激动剂对肾病大鼠血清和肾组织 ANGPTL4 以及尿蛋白排泄的影响 [D]. 福州: 福建医科大学, 2018.
- [28] Bretones G, Delgado M D, León J. Myc and cell cycle control [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(5): 506-516.
- [29] Cox S N, Pesce F, El-Sayed Moustafa J S, *et al.* Multiple rare genetic variants co-segregating with familial IgA nephropathy all act within a single immune-related network [J]. *J Intern Med*, 2017, 281(2): 189-205.
- [30] Forbes L R, Milner J, Haddad E. Signal transducer and activator of transcription 3: A year in review [J]. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23(1): 23-27.
- [31] 陈海云. 负调节因子 SOCS1 和 SOCS3 的表达对 Stat3 信号分子活化的影响及其在胃癌预后中的意义 [D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [32] Zhong Z, Wen Z, Darnell J E Jr. Stat3: A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 [J]. *Science*, 1994, 264(5155): 95-98.
- [33] Haugen J, Chandyo R K, Brokstad K A, *et al.* Cytokine concentrations in plasma from children with severe and non-severe community acquired pneumonia [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138978.
- [34] Fine L G, Bandyopadhyay D, Norman J T. Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia [J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, 75: S22-S26.
- [35] Higgins D F, Kimura K, Bernhardt W M, *et al.* Hypoxia promotes fibrogenesis *in vivo* via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12): 3810-3820.
- [36] Kimura K, Iwano M, Higgins D F, *et al.* Stable expression of HIF-1 $\alpha$  in tubular epithelial cells promotes

- interstitial fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295(4): F1023-F1029.
- [37] Yu Y R, Liu Q P, Li H C, *et al.* Alterations of the gut microbiome associated with the treatment of hyperuricaemia in male rats [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2233.
- [38] 耿琳, 闫朝丽. 肠道菌群与2型糖尿病的相关性研究进展 [J]. *医学综述*, 2019, 25(10): 2034-2038.
- [39] Parada Venegas D, de la Fuente M K, Landskron G, *et al.* Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 277.
- [40] Hamer H M, Jonkers D M, Bast A, *et al.* Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans [J]. *Clin Nutr*, 2009, 28(1): 88-93.
- [41] Xing S C, Meng D M, Chen Y, *et al.* Study on the diversity of *Bacteroides* and *Clostridium* in patients with primary gout [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2): 707-715.
- [42] Everard A, Belzer C, Geurts L, *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(22): 9066-9071.
- [43] Xiao J, Zhang X L, Fu C S, *et al.* Impaired Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase signaling in renal proximal tubule contributes to hyperuricemia-induced renal tubular injury [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(3): e452.
- [44] Guo Y J, Li H L, Liu Z, *et al.* Impaired intestinal barrier function in a mouse model of hyperuricemia [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3292-3300.
- [45] Zhu W F, Gregory J C, Org E, *et al.* Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk [J]. *Cell*, 2016, 165(1): 111-124.
- [46] Liu J F, Lai L Y, Lin J J, *et al.* Ranitidine and finasteride inhibit the synthesis and release of trimethylamine *N*-oxide and mitigates its cardiovascular and renal damage through modulating gut microbiota [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(5): 790-802.
- [47] Pols T W H. TGR5 in inflammation and cardiovascular disease [J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(2): 244-249.
- [48] Cleophas M C P, Crişan T O, Lemmers H, *et al.* Suppression of monosodium urate crystal-induced cytokine production by butyrate is mediated by the inhibition of class I histone deacetylases [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(3): 593-600.
- [49] 张锦涛, 伊曼, 李志嘉, 等. 丁酸盐在炎症反应中作用机制的研究进展 [J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(12): 1101-1104.
- [50] Kaur H, Das C, Mande S S. *In silico* analysis of putrefaction pathways in bacteria and its implication in colorectal cancer [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2166.

[责任编辑 李亚楠]