

糖尿病肾脏病竞争性内源 RNA 网络构建及潜在中药预测研究

安琪, 杨宇峰*, 石岩*

辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847

摘要: 目的 基于生物信息学构建糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 网络, 预测治疗 DN 潜在有效中药。方法 利用 GEO 数据库与 R 语言获取 DN 差异表达长链非编码 RNA (differentially expressed lncRNA, DElncRNA) 及差异表达信使 RNA (differentially expressed mRNA, DEmRNA), 借助 miRcode、TargetScan、miRTarBase、miRDB 数据库整合“DElncRNA-微小 RNA (microRNA, miRNA)”与“miRNA-DEmRNA”调控关系, 通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建 ceRNA 调控网络, 采用 Metascape 平台分析 ceRNA 调控网络主要涉及生物过程及信号通路, 借助 String 数据库与 Cytoscape 3.7.2 软件获取关键基因, 并将其映射到 Coremine Medical 数据库中, 预测治疗 DN 潜在中药, 通过 TCMSP、PubChem、UniProt、SwissTargetPrediction 数据库结合文献收集整理预测中药的核心成分与对应靶点, 构建“中药-活性成分-靶基因”网络, 采用 AutoDockTools、PyMOL 对主要活性成分与关键基因进行分子对接。结果 最终获得由 9 个 lncRNA、33 个 miRNA、106 个 mRNA 所构成的 ceRNA 网络, 主要涉及血小板衍生生长因子受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 级联、对雌二醇的反应等生物过程以及磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、p53、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等信号通路。中药预测结果显示, 雷公藤、藤黄、黄芪、三七等多味中药与 DN 密切相关, 槲皮素、藤黄酸、异藤黄酸、山柰酚、gambogellic acid 与关键基因具有良好的亲和力。结论 ceRNA 调控网络的构建有助于对 DN 发病机制的进一步理解, 预测中药可能成为治疗 DN 潜在药物来源。

关键词: 糖尿病肾脏病; 竞争性内源 RNA 网络; 中药预测; 长链非编码 RNA; 雷公藤; 藤黄; 黄芪; 三七; 槲皮素; 藤黄酸; 异藤黄酸; 山柰酚; gambogellic acid

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0620-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.030

Construction of competitive endogenous RNA network in diabetic nephropathy and prediction of potential Chinese medicine

AN Qi, YANG Yu-feng, SHI Yan

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: Objective To construct a competing endogenous RNA (ceRNA) network for diabetic nephropathy (DN) based on bioinformatics, and predict the potential effective traditional Chinese medicine for treating DN. **Methods** The GEO database and R language were used to obtain differentially expressed lncRNA (DElncRNA) and differentially expressed mRNA (DEmRNA), respectively. The regulates relationship between “DElncRNA-microRNA (miRNA)” and “miRNA-DEmRNA” was integrated with miRcode, TargetScan, miRTarBase and miRDB databases. Cytoscape 3.7.2 software was used to construct the ceRNA regulatory network. Metascape platform was used to analyze the ceRNA regulatory network mainly involved in biological processes and signaling pathways. Key genes were obtained by String database and Cytoscape 3.7.2 software, and it was mapped into Coremine Medical database to predict the potential traditional Chinese medicine (TCM) in the treatment of DN. The core components and corresponding targets of TCM were collated and predicted through TCMSP, PubChem, UniProt and SwissTargetPrediction database combined with literature collection. The “TCM-active ingredient-target gene” network was constructed, and AutoDockTools and PyMOL were used for molecular docking of main active ingredient and key gene. **Results** The ceRNA network consisting of nine lncRNA, 33 miRNA and 106 mRNA was finally obtained, which mainly involved in biological processes such as platelet-derived growth factor receptor signaling pathway, mitogen activated protein kinases (MAPK) cascade, response to estradiol and phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (PI3K)/ protein kinase B (Akt), p53, vascular endothelial growth factor

收稿日期: 2022-09-17

基金项目: 辽宁省“兴辽英才计划”青年拔尖人才项目 (XLYC1807145); 辽宁省人社厅百千万人才资助项目 (20200512)

作者简介: 安琪, 硕士研究生, 研究方向为中医内科学内分泌。E-mail: 2205283930@qq.com

*通信作者: 石岩, 博士研究生导师, 教授, 研究方向为糖尿病及代谢综合征的基础与临床研究。E-mail: shiyan@lntucm.edu.cn
杨宇峰, 硕士研究生导师, 教授, 研究方向为糖尿病及代谢综合征中西医结合临床与研究。E-mail: yyf701@163.com

(VEGF) and other signaling pathways. The prediction results of TCM showed that many TCMs such as Leigongteng (*Tripterygium wilfordii*), Tenghuang (*Garcinia hanburyi*), Huangqi (*Astragali Radix*) and Sanqi (*Notoginseng Radix et Rhizoma*) were closely related to DN, and the main active ingredients, including quercetin, morellic acid, isomorellic acid, kaempferol and gambogellic acid, had good affinity with key genes. **Conclusion** The construction of ceRNA regulatory network is helpful to further understand the pathogenesis of DN, and it is predicted that TCM may become a potential drug source for treating DN.

Key words: diabetic nephropathy; competitive endogenous RNA network; prediction of traditional Chinese medicine; long chain non-coding RNA; *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; *Garcinia hanburyi* Hook. f.; *Astragali Radix*; *Notoginseng Radix et Rhizoma*; quercetin; morellic acid; isomorellic acid; kaempferol; gambogellic acid

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN/DKD) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 严重微血管并发症, 是导致 DM 患者致残、致死的主要原因。DN 起病隐匿, 一旦进入临床蛋白尿期, 肾功能迅速下降, 其发展至终末期肾脏病的速度约是其他肾病的 14 倍, 故早期诊断加以有效防治是逆转病情恶化的关键^[1]。现阶段 DN 的防治以控制血压、降血糖、纠正血脂紊乱等综合治疗为主, 但上述措施仍不能完全阻止 DN 的进展, 长期服用化学药会引起一系列不良反应, 疗效尚不理想^[2]。因此, 深入探索 DN 发病机制、寻找诊断标志物、制定有效治疗方案是目前亟待解决的重点问题。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一种长度大于 200 个核苷酸且不具备编码蛋白质功能的 RNA, 曾被认为是“转录噪音”^[3]。近年来, 研究发现 lncRNA 可通过介导染色质重塑、DNA 甲基化、组蛋白修饰等多种机制, 参与基因的表达遗传、转录及转录后水平调控, 并具有细胞特异性、组织特异性, 在疾病中发挥重要作用^[4-5]。现有研究报道 lncRNA 可通过分子海绵机制与微 RNA (microRNA, miRNA) 结合形成竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 网络, 从而引发 DN 系膜细胞增殖、肾组织纤维化、炎症反应的发生^[6-8]。中医药可减轻蛋白尿、延缓肾衰竭, 常被用作 DN 主要或辅助治疗以及新药开发的来源, 且具有疗效稳定、安全性高等独特优势。因此, 本研究借助生物信息学初步构建 DN 潜在 ceRNA 调控网络, 从分子水平角度预测有效治疗中药, 以期为 DN 预防、诊断以及新药研发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 基因芯片的筛选

在 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中以“diabetic kidney disease”“DKD”“diabetic nephropathy”“DN”为检索词, 设置研究物种为“Homo sapiens”, 研究类型为“expression profiling by

array”检索 DN 基因芯片, 下载基因矩阵文件与平台注释文件。

1.2 差异表达 lncRNA (differentially expressed lncRNA, DELncRNA) 与差异表达信使 RNA (differentially expressed mRNA, DEMRNA) 的获取

根据平台注释文件提供信息将探针转换成对应的基因 ID, 利用 perl 对基因重注释, 区分出 lncRNA 和 mRNA, 采用 R 语言结合 limma 包对基因芯片进行校正、标准化、log₂ 转化处理以及差异性分析, 设置差异筛选条件为 $|\log_2 FC| > 0.5$, 调整 P 值 < 0.05 , 筛选出 DELncRNA 与 DEMRNA, 通过 GraphPad Prism 9 与 TBtools 软件分别绘制火山图及热图。

1.3 ceRNA 网络构建

通过 miRcode (<http://www.mircode.org/>)、miRDB (<http://mirdb.org>)、miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)、TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_80/) 数据库整合“DELncRNA-miRNA”和“miRNA-DEMRNA”的关系, 删除不存在靶向调控关系的 lncRNA、miRNA、mRNA, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件构建 DN 潜在“lncRNA-miRNA-mRNA”的 ceRNA 调控网络并进行可视化展示。

1.4 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction network, PPI) 网络分析与关键基因的筛选

将 ceRNA 网络中 DEMRNA 导入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 设置研究物种为“Homo sapiens”, 最低相互作用阈值为“medium confidence (0.400)”, 隐藏游离基因构建 PPI 网络, 借助 Cytoscape 3.7.2 中插件计算 PPI 网络中每个节点的度值 (degree), 节点在 PPI 网络中与其他基因关联性强弱与度值呈正比, 根据度值选取排名前 15 的节点定义为关键基因。

1.5 基因本体论 (gene ontology, GO) 功能注释和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析

Metascape (<https://metascape.org/>) 数据库整合

Drugbank、GO、KEGG 等多个权威的数据库,拥有强大基因注释功能,操作简单,具有时效性和可靠性,因此本研究通过 Metascape 数据库对 ceRNA 网络进行 GO 及 KEGG 富集分析,将 DEmRNA 导入 Metascape 数据库,选择物种为“Homo sapiens”,设置“Min Overlap:3”“P Value Cutoff:0.01”“Min Enrichment:1.5”,根据 $-\lg P$ 值对结果进行排序,展示排名靠前的生物过程以及 KEGG 信号通路。

1.6 中药预测结果与“中药-活性成分-靶基因”网络构建

借助 Coremine Medical (<https://www.pubgene.com/coremine-medical/>)数据库查询关键基因相关信息,设置 $P < 0.05$,获取与关键基因具有统计学意义的中药。利用 TCMSP (<https://www.tcmsp-e.com/>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、UniProt (<https://www.uniprot.org/>)、SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库并结合文献收集整理预测中药的活性成分及对应靶点,将靶点转换为标准的基因名称,通过 Cytoscape 3.7.2 构建“中药-活性成分-靶基因”网络。

1.7 分子对接验证

利用 Cytoscape 3.7.2 中“Network Analyze”插件对“中药-活性成分-靶基因”进行分析,选取度值排名前 5 的活性成分与排名前 5 的关键基因进行分子对接。在 PubChem 数据库获取活性成分结构,通过 Open Babel 软件将其转存为 mol2 格式,在 PDB (<https://www.pdb.org/>)数据库中下载关键基因 3D 结构,通过 PyMOL 软件除去其的水分子与配体。利用 AutoDockTools-1.5.6 软件对关键基因和活性成分加氢、计算电荷等处理并保存为 pdbt 格式。通过 AutoDock vina 对关键基因和活性成分进行分子对接并计算结合能,选取结合能最低的前 5 组构象进行可视化展示。

2 结果

2.1 基因芯片获取

经筛选,将编号为 GSE30529 的芯片矩阵文件和编号为 GPL571 的平台注释文件纳入本研究,此芯片中共有 22 个样本,其中包含 12 个健康人(对照)的肾脏样本,10 个来自于 DN 患者提供的肾脏样本(表 1)。

2.2 DElncRNA 与 DEmRNA 筛选情况

利用 perl 脚本对基因重注释,以 $|\log_2 FC| > 0.5$,调整 P 值 < 0.05 差异基因筛选条件,最终获得 12

表 1 GSE30529 基因芯片样本信息

Table 1 Information of GSE30529 gene chip sample

样本编号	分组	组织来源
GSM757014~GSM757023	DN	肾小管
GSM757024~GSM757035	对照	肾小管

个 DElncRNA,其中包括上调 1 个,下调 11 个;1300 个 DEmRNA,其中包括上调 651 个,下调 649 个,借助 GraphPad Prism 9 绘制 lncRNA 和 mRNA 火山图(图 1、2),蓝色代表表达下调基因,红色代表表达上调基因,借助 TBtool 软件绘制 lncRNA 热图(图 3),选取上调和下调最显著前 20 个的 DEmRNA 绘制 mRNA 热图(图 4)。

2.3 ceRNA 网络构建

通过 miRcode 数据库预测共获得 190 个与 lncRNA 相互作用的 miRNA;将 190 个 miRNA 映射到 miRDB、miRTarBase 和 TargetScan 数据库中

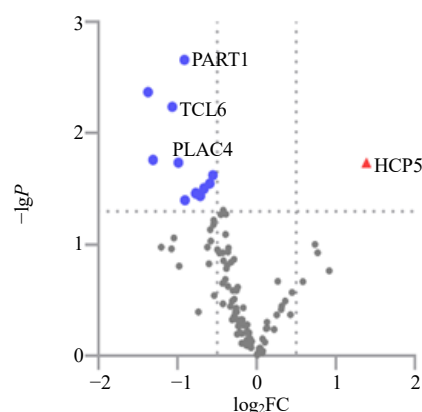


图 1 lncRNA 火山图

Fig. 1 Volcano plot of lncRNA

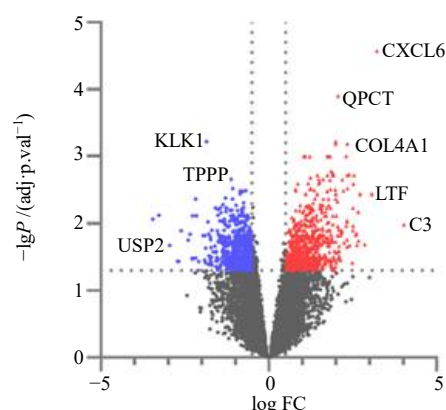


图 2 mRNA 火山图

Fig. 2 Volcano plot of mRNA

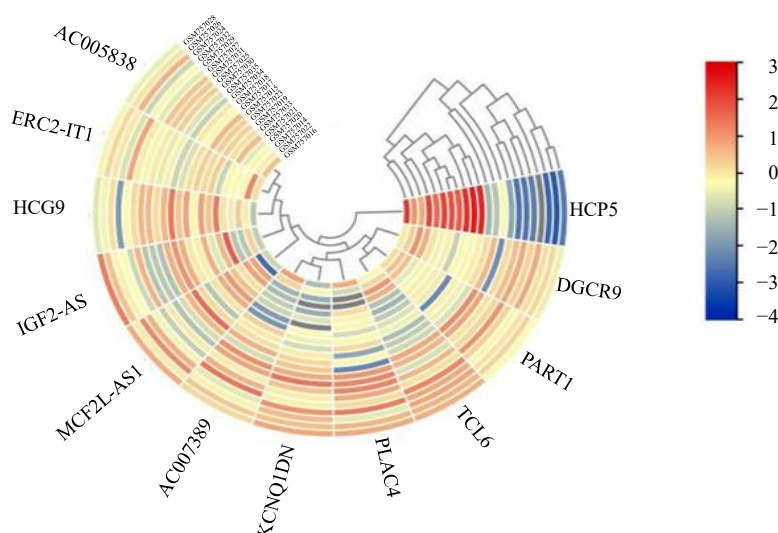


图 3 lncRNA 热图

Fig. 3 Heat map of lncRNA

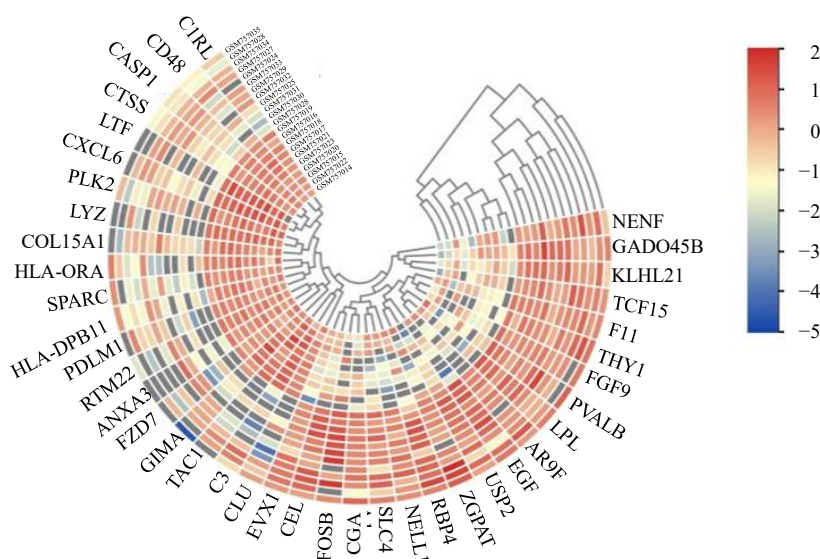


图 4 mRNA 热图

Fig. 4 Heat map of mRNA

共获得 1249 个 mRNA, 将预测获得 mRNA 与“2.2”项中 1300 个 DEmRNA 取交集, 删除不存在靶向调控关系的 lncRNA、miRNA, 整合 lncRNA-miRNA、miRNA-mRNA 的调控网络, 最终获得由 9 个 lncRNA、33 个 miRNA、106 个 mRNA、270 条边所构成的 ceRNA 网络 (图 5)。

2.4 PPI 网络构建及关键基因筛选

将“2.3”项中获得 106 个 mRNA 导入 STRING 在线平台工具, 选择物种为“Homosapiens”, 设置最低相互作用阈值为“medium confidence (0.400)”,

隐藏游离蛋白, 保存 tsv 格式, 借助 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络 (图 6), 并计算出每个节点度值, 将度值将排名前 15 的基因定义为关键基因 (图 7)。

2.5 GO 功能注释与 KEGG 通路富集分析结果

Metascape 平台对 106 个 mRNA 进行 GO 及 KEGG 富集分析。GO 富集分析结果显示, 106 个 mRNA 主要涉及血小板衍生生长因子受体信号通路 (platelet-derived growth factor receptor signaling pathway)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated

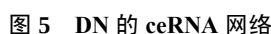


Fig. 5 ceRNA network of DN



Fig. 6 PPI network of DEmRNA

A network diagram showing interactions between 14 genes. The nodes are colored in two shades of green: light green and dark green. The dark green nodes are MYC, PTEN, VEGFA, and EZH2. The light green nodes are JAK2, RB1, MAPK8, NCOR2, FGFR3, NR3C1, MAPK1, NRP1, JAK1, PDGGRA, and PDGFR. The nodes are interconnected by a dense web of grey lines representing interactions.

图 7 关键基因的 PPI 网络

Fig. 7 PPI network of key genes

Akt signaling pathway)、调节干细胞多能性的信号通路 (signaling pathways regulating pluripotency of stem cells)、乙型肝炎 (hepatitis B)、膀胱癌 (bladder cancer)、p53 信号通路 (p53 signaling pathway)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路 (VEGF signaling pathway) 等通路 (图 9)。

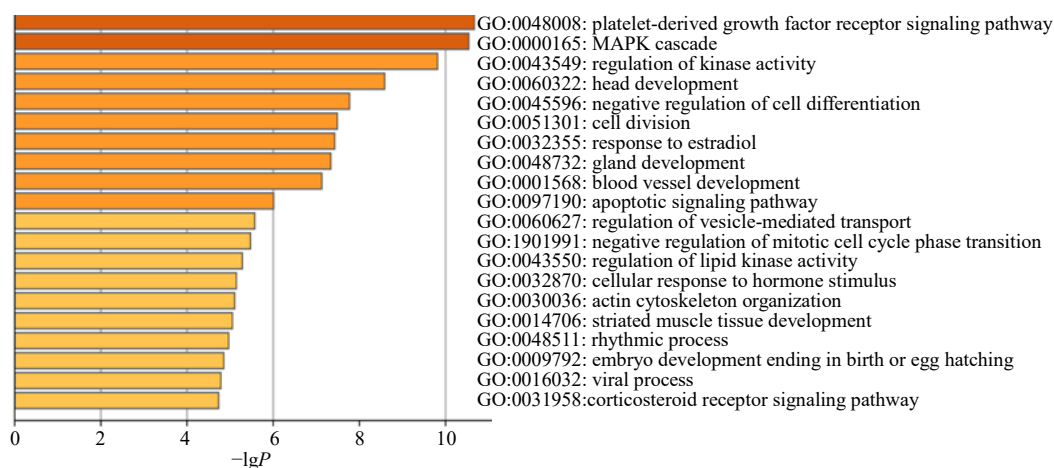


图 8 GO 生物过程富集分析

Fig. 8 Enrichment analysis of GO biological processes

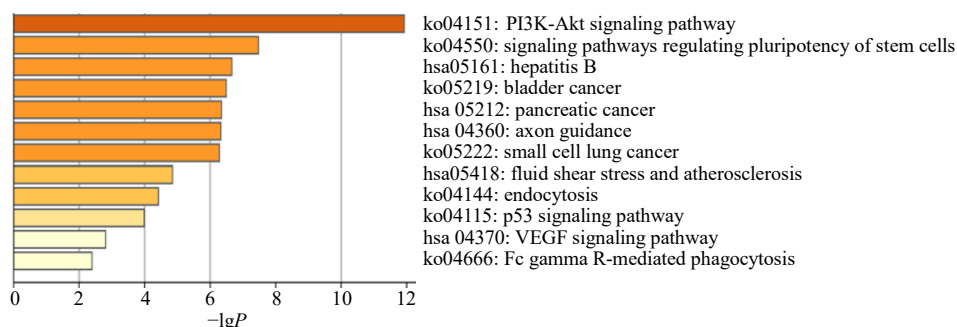


图 9 KEGG 通路富集分析

Fig. 9 Enrichment analysis of KEGG pathway

2.6 中药预测与“中药-活性成分-靶基因”网络构建

将关键基因映射到 Coremine Medical 数据库, 设置 $P < 0.05$, 获取治疗 DN 潜在有效中药, 结果显示雷公藤、藤黄、黄芪、三七、黄芩、白花丹等多味中药与 DN 密切相关 (表 2)。选取频次前 4 味中药构建“中药-活性成分-靶基因”网络图。设置口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $> 30\%$, 类药性 (drug-likeness, DL) > 0.18 , 在 TCMSP 数据库收集雷公藤、黄芪、三七活性成分与靶点, 通过 UniProt 将靶点进行规范化命名, TCMSP 数据库尚未收入藤黄, 因此查阅文献整理藤黄成分, 通过 PubChem、SwissTargetPrediction 数据库获取对应成分靶基因, 采用 Cytoscape 3.7.2 将“中药-活性成分-靶基因”进行可视化展示 (图 10)。

2.7 分子对接结果

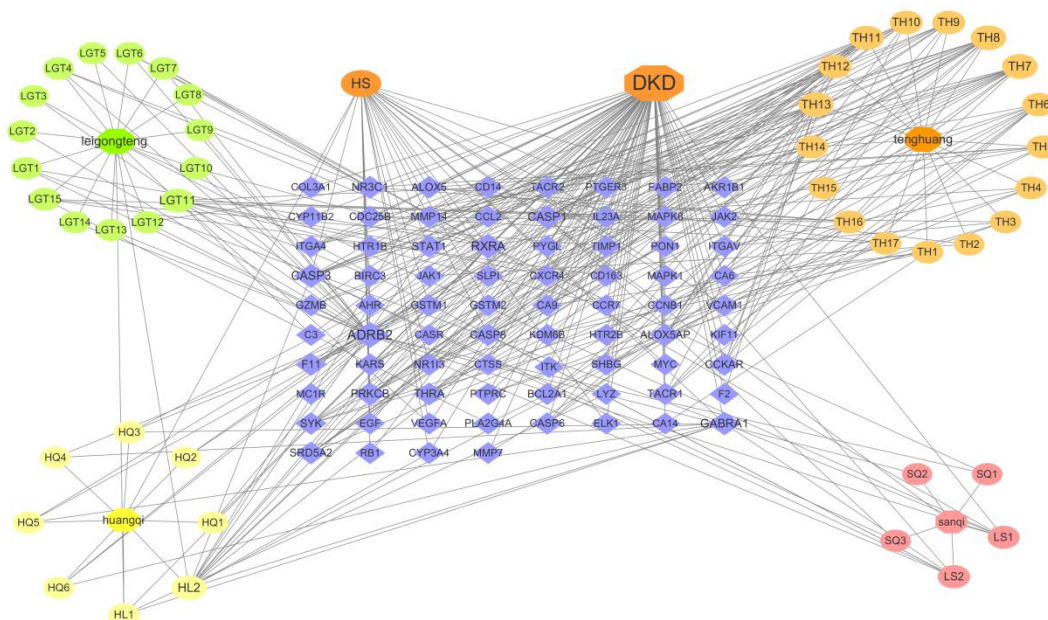
对“中药-活性成分-靶基因”进行“Network Analyze”分析, 排名前 5 位的活性成分为槲皮素

表 2 中药预测结果 (频次 > 3)

Table 2 Prediction results of traditional Chinese medicine (frequency > 3)

中药	基因	频次
雷公藤	<i>EZH2</i> 、 <i>JAK1</i> 、 <i>MYC</i> 、 <i>MAPK8</i> 、 <i>MAPK1</i> 、 <i>VEGFA</i>	6
藤黄	<i>VEGFA</i> 、 <i>PTEN</i> 、 <i>JAK1</i> 、 <i>MAPK8</i> 、 <i>MYC</i> 、 <i>MAPK1</i>	6
黄芪	<i>JAK1</i> 、 <i>JAK2</i> 、 <i>NCOR2</i> 、 <i>MAPK1</i> 、 <i>VEGFA</i>	5
三七	<i>PTEN</i> 、 <i>MAPK8</i> 、 <i>MAPK1</i> 、 <i>RBI</i> 、 <i>VEGFA</i>	5
黄芩	<i>CCND2</i> 、 <i>MAPK1</i> 、 <i>MYC</i> 、 <i>VEGFA</i>	4
白花丹	<i>JAK1</i> 、 <i>JAK2</i> 、 <i>MYC</i> 、 <i>VEGFA</i>	4
白花蛇	<i>MAPK1</i> 、 <i>VEGFA</i> 、 <i>MAPK8</i> 、 <i>JAK2</i>	4
舌草		
吴茱萸	<i>PTEN</i> 、 <i>MYC</i> 、 <i>RBI</i> 、 <i>MAPK8</i>	4

(quercetin)、藤黄酸 (morellic acid)、异藤黄酸 (isomorellic acid)、山柰酚 (kaempferol)、gambogellic acid, 分别与排名前 5 的关键基因 *MYC* (一类核蛋白类癌基因)、*VEGFA*、*zeste* 同系物增强剂 2



HL1、HL2 为黄芪、雷公藤共有成分，LS1、LS2 为雷公藤、三七共有成分，HS 为黄芪、三七共有成分

HL1 and HL2 were the common components of *Astragali Radix* and *T. wilfordii*; LS1 and LS2 were the common components of *T. wilfordii* and *Notoginseng Radix et Rhizoma*; HS were the common components of *Astragali Radix* and *Notoginseng Radix et Rhizoma*

图 10 “中药-活性成分-靶基因”网络

Fig. 10 “Traditional Chinese medicine-active ingredient-target gene” network

(enhancer of zeste homologue 2, *EZH2*)、第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*)、*MAPK1* 进行分子对接并计算结合能(表 3)，配体与蛋白之间亲和力越强，结合能越低，当结合能 $< -4.25 \text{ kcal/mol}$ ($1 \text{ kcal} = 4.2 \text{ kJ}$)，表示配体与蛋白受体具有结合活性；结合能 $< -5.0 \text{ kcal/mol}$ ，表示二者具有良好的亲和力，结合能 $< -7.0 \text{ kcal/mol}$ ，表示二者具有强烈的亲和力，本研究分子对接结果显示结合能均 $< -7.0 \text{ kcal/mol}$ ，说明活性成分与关键基因具有强烈对接活性，进一步提示中药预测结果的可靠性，运用 PyMOL 软件将结合能最低的前 5 组对接结果可视化，并展示结合残基名称和连接氢键

及距离(图 11)。

3 讨论

ceRNA 网络是一种全新且更加精准的基因调控模式，该学说认为 lncRNA 可通过竞争性吸附 miRNA 的反应元件来抑制 miRNA 对 mRNA 的靶向调控^[9]。ceRNA 网络的提出颠覆“蛋白质编码基因只有翻译成蛋白质才能发挥作用”这一传统观念，缩小研究范围，提高靶点预测结果的准确性，可为疾病筛选潜在的诊断标志物与治疗靶基因^[10]。中医药多成分、多靶点、多途径等特点，在 DN 的治疗上具有广泛前景，因此，基于 ceRNA 网络角度挖掘 DN 潜在的有效中药也将为 DN 诊治提供新的方向。

表 3 活性成分与关键基因分子对接结合能

Table 3 Binding energy of active ingredients and key gene molecules

活性成分	结合能/($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)				
	<i>MYC</i>	<i>VEGFA</i>	<i>EZH2</i>	<i>PTEN</i>	<i>MAPK1</i>
槲皮素	-8.2	-7.3	-7.3	-7.6	-7.3
藤黄酸	-8.1	-7.9	-8.5	-10.2	-7.3
异藤黄酸	-8.7	-8.4	-8.8	-10.0	-8.0
山柰酚	-7.9	-7.2	-8.0	-7.6	-7.0
gambogellic acid	-9.0	-7.7	-7.8	-9.7	-7.0

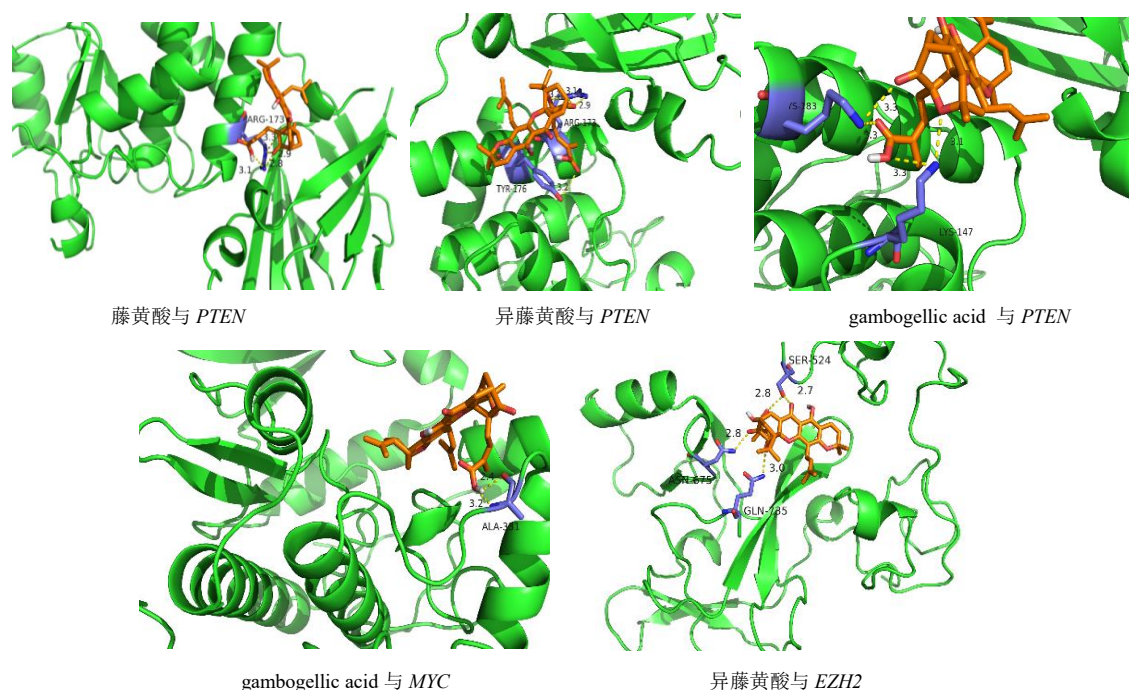


图 11 结合能最低的前 5 组对接结果可视化图

Fig. 11 Visualization of docking results of first five groups with lowest binding energy

本研究采用生物信息学技术筛选, 最终获得由 9 个 lncRNA、33 个 miRNA、106 个 mRNA 所组成的 ceRNA 网络。在 DN 细胞模型中 lncRNAHLA 复合体 P5 (HLA complex P5, HCP5) 通过介导 miR-93-5p/高迁移率族蛋白 A2 (highmobility group A2, HMGA2) 轴, 激活 Akt-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号, 诱导肾小球系膜细胞过度增殖、肾组织纤维化和炎症反应的发生^[11]。氧化反应是高血糖介导的肾功能损伤的致病基础, 参与 DN 病程中多个环节^[12]。Zhao 等^[13]发现 miR-142-3p 过表达可减轻高糖状态下肾小管上皮细胞的凋亡和氧化应激反应, 从而延缓疾病进展。Hong 等^[14]发现在 DN 患者血浆中, miR-193a-3p 表达上调, 与尿蛋白水平呈正相关, 与肾小球滤过率水平呈负相关, 且 miR-193a-3p 高表达的患者非透析生存期显著缩短, 因此认为 miR-193a-3p 有望成为 DN 新型诊断标志物。此外, 以 miR-23b-3p^[15]、miR-17-5p^[16]、miR-206^[17]为中心构成 ceRNA 网络调控 DN 的发生与发展也均得到证实。研究发现, PTEN 蛋白丢失, 可加剧 DN 肾脏纤维化程度、破坏足细胞导致蛋白尿的形成^[18-19]。肾小管上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是引起肾小管间质纤维化的中心环节^[20]。高糖状态下, EZH2 过表达可导致上皮钙

黏蛋白丢失、 α 平滑肌肌动蛋白以及肾间质中的胶原蛋白异常沉积, 从而促进 EMT 进程^[21]。

GO 富集结果显示, ceRNA 调控网络主要通过血小板衍生生长因子受体信号通路、MAPK 级联、对雌二醇的反应等过程参与 DN 的发生与发展。研究发现, 血小板衍生生长因子受体- β 基因的缺失可显著降低 DN 小鼠的尿白蛋白/肌酐值, 并减少 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-deoxyguanosine, 8-OHdG)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase4, NOX4)、谷胱甘肽过氧化物酶 1 (glutathione peroxidase1, GPX1)、锰超氧化物歧化酶 (manganese-superoxide dismutase, Mn-SOD) 的表达, 抑制氧化应激反应和肾小球系膜扩张^[22]。MAPK 级联途径中的氨基末端激酶 (jun kinase, JNK)、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p38 MAPK 等信号通路均与 DN 存在紧密联系, 其中 p38 MAPK 的研究最为广泛。p38 MAPK 信号可激活下游炎症细胞, 加快炎症介质和细胞因子的释放, 而炎症因子又可反向激活 p38 MAPK 信号, 陷入恶性循环, 加重 DN 肾组织炎症损伤^[23]。此外, p38 MAPK 信号活化又可触发肾组织纤维化和氧化应激的发生^[24-25]。雌二醇对女性 DN 患者具有保护作用, 其可抑制胶原蛋

白合成，刺激基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase, MMP）的合成，减轻肾小管间质纤维化以及肾小球硬化，同时还可降低血管紧张素 II 和内皮素的合成，促进 NO 的释放，抑制肾脏血管的收缩，改善 NO 和炎症对肾脏的损伤^[26]。

KEGG 富集分析显示 ceRNA 调控网络主要通过 PI3K-Akt、p53、VEGF 等信号通路参与 DN 的发生与发展。PI3K-Akt 信号通路是参与细胞增殖、生长和存活的重要通路^[27]。PI3K 作为通路的起始因子，首先通过磷脂酰肌醇二磷酸（phosphatidylinositol diphosphate, PIP2）磷酸化作用生成 PIP3，进而激活 Akt，Akt 活化后可靶向调控其下游分子 mTOR、叉头框蛋白 O1（forkhead box protein O1, FoxO1）、核因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）、糖原合成酶激酶 3 β （glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β ）、葡萄糖转运蛋白 4（glucose transporter 4, GLUT4）等的表达，从而介导机体自噬、凋亡、炎症、糖脂代谢反应，推动 DN 的进展^[28]。p53 是重要的核转录因子，在诱导细胞周期停滞或凋亡等损伤性反应中起着核心作用。现有研究证实 p53 信号通路介导高糖诱导足细胞凋亡与自噬反应^[29-30]。在肾脏中，VEGF 主要由足细胞分泌，VEGF 表达失衡可增强血管通透性和肾小球滤过率，促进蛋白尿产生^[31]。姚向飞等^[32]发现 VEGF 随着 DN 病情的进展而不断升高，与尿微量蛋白水平呈正相关。但另有研究发现当疾病进入大量蛋白尿期，VEGF 表达却有所下降，推测其原因可能是由于肾功能严重损伤，足细胞大量丢失，导致 VEGF 合成量减少所致，提示监测 VEGF 的水平变化对评估 DN 肾脏损伤程度具有重要意义^[33]。

祖国医学虽无 DN 这一病名，但对其相关描述却早有记载，如《圣济总录》曰：“消渴病久，肾气受伤，肾主水，肾气虚衰，气化失常，开阖不利，能为水肿”。根据临床症状将其归属为“消渴肾病”“肾消”“下消”等范畴。DN 病机复杂，证候多样性，医家对其见解各有不同。但普遍认为 DN 为素体肾虚，加之消渴迁延日久，耗气伤阴，以致五脏虚损；虚则气血津液运行无力，痰湿瘀血内停，聚而不散，日久郁而化热成毒，最终导致虚、痰、热、瘀、毒等病理因素相互胶结而致病，“本虚标实”“虚实夹杂”为本病病机特点^[34]。临床上治疗以补脾益肾、清热解毒、活血化瘀为主。预测所获得的核心中药雷公藤、藤黄、黄芪、三七、黄芩等属于上述

治疗范畴，现代药理研究表明，这些药物均具有抗炎、抗氧化、抗凋亡的作用^[35-39]。Wu 等^[40]发现雷公藤的有效成分雷公藤多苷可通过抑制肾小球巨噬细胞浸润和炎症因子表达，并下调 p38 MAPK、NF- κ B 通路活性，减少转化生长因子- β 1（transforming growth factor- β 1, TGF- β 1）生成，从而改善肾组织炎症损伤以及肾小球硬化。黄芪主要活性成分黄芪甲苷及黄芪多糖通过多方面对 DN 起到治疗作用，首先可抑制内质网应激发生的关键分子如转录激活因子 6（activating transcription factor 6, ATF6）、蛋白激酶 R 样内质网激酶（protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase, PERK）、肌醇依赖酶 1 α （inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α ）等的活化，维持内质网功能稳态，延缓 DN 进展；其次，可抑制 TGF- β 1/Smad（small mothers against decapentaplegic）通路，调控 MMP 家族基因的表达，减轻系膜细胞的增殖以及细胞外基质异常堆积，改善肾组织纤维化；再次，可通过活化核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2）/抗氧化反应元件（anti-oxidant response element, ARE）通路，抑制 NF- κ B、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）、单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemoattractant proteins-1, MCP-1）等表达，减轻肾脏组织凋亡与炎症反应；最后，可促进过氧化物酶体增殖物激活受体 γ （peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR γ ）及 CCAAT/增强子结合蛋白 α （CCAAT/enhancer binding protein α , C/EBP α ）的表达，增强胰岛素敏感性，调节糖脂代谢紊乱^[41]。董苏敏等^[42]发现三七总皂苷可通过激活 Nrf2/血红素加氧酶-1（heme oxygenase-1, HO-1）信号通路抑制炎症与氧化应激反应，对损伤的肾组织起到保护作用。吴军等^[43]发现黄芩苷可下调 miR-141 而促进沉默信息调节因子 1（silent information regulator 1, SIRT1）表达，从而缓解高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡。预测结果显示藤黄与 DN 存在紧密联系，但目前尚未见相关报道，因此，有待后续进一步研究。

综上，本研究通过初步构建 DN 潜在 ceRNA 网络，丰富了 DN 发病机制研究内容，使后续的基础与临床研究更有针对性。此外，本研究将现代技术与传统中医药相结合，以期从基因水平的角度挖掘中药的潜在功效。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组. 糖尿病肾病防治专家共识 (2014 年版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(11): 792-801.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版) [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2021, 41(5): 482-548.
- [3] Zhang X L, Hong R Y, Chen W Q, *et al.* The role of long noncoding RNA in major human disease [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 92: 103214.
- [4] Schmitz S U, Grote P, Herrmann B G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(13): 2491-2509.
- [5] Rinn J L, Chang H Y. Genome regulation by long noncoding RNAs [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 145-166.
- [6] Chen W Y, Peng R, Sun Y, *et al.* The topological key lncRNA H2k2 from the ceRNA network promotes mesangial cell proliferation in diabetic nephropathy via the miR-449a/b/Trim11/Mek signaling pathway [J]. *FASEB J*, 2019, 33(10): 11492-11506.
- [7] Cai S Y, Liu J, Ma Q Y, *et al.* Coptis inhibited epithelial-mesenchymal transition and fibrogenesis of diabetic nephropathy through lncRNA CLYBL-AS2-miR-204-5p-SNAI1 axis [J]. *J Drug Target*, 2020, 28(9): 939-948.
- [8] Qin B Y, Cao X L. LncRNA PVT1 regulates high glucose-induced viability, oxidative stress, fibrosis, and inflammation in diabetic nephropathy via miR-325-3p/Snai1 axis [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 1741-1750.
- [9] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, *et al.* A CeRNA hypothesis: The Rosetta stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358.
- [10] 高显华, 傅传刚, 劳昕元, 等. 竞争性内源性 RNA 调控机制及其在结直肠癌发生发展中的作用 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2012, 15(12): 1318-1321.
- [11] Wang X, Liu Y, Rong J, *et al.* LncRNA HCP5 knockdown inhibits high glucose-induced excessive proliferation, fibrosis and inflammation of human glomerular mesangial cells by regulating the miR-93-5p/HMGA2 axis [J]. *BMC Endocr Disord*, 2021, 21(1): 134.
- [12] 张尚维, 李明星, 赵蕊, 等. 糖尿病肾病发生的氧化应激机制及抗氧化治疗的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(8): 634-640.
- [13] Zhao N M, Luo Q, Lin R J, *et al.* miR-142-3p ameliorates high glucose-induced renal tubular epithelial cell injury by targeting BOD1 [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2021, 25(11): 1182-1192.
- [14] Hong Y, Wang J D, Zhang L, *et al.* Plasma miR-193a-3p can be a potential biomarker for the diagnosis of diabetic nephropathy [J]. *Ann Clin Biochem*, 2021, 58(2): 141-148.
- [15] Yu D M, Yang X H, Zhu Y, *et al.* Knockdown of plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1) inhibits high glucose-induced proliferation and renal fibrosis in HRMCs by regulating miR-23b-3p/early growth response factor 1 (EGR1) [J]. *Endocr J*, 2021, 68(5): 519-529.
- [16] Shen Y, Tong Z W, Zhou Y, *et al.* Inhibition of lncRNA-PAX8-AS1-N directly associated with VEGF/TGF- β 1/8-OHdG enhances podocyte apoptosis in diabetic nephropathy [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(12): 6864-6872.
- [17] Yu R C, Zhang Y, Lu Z H, *et al.* Long-chain non-coding RNA UCA1 inhibits renal tubular epithelial cell apoptosis by targeting microRNA-206 in diabetic nephropathy [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2022, 128(1): 231-239.
- [18] Liu X M, Zhang Y Y, Shi M J, *et al.* Notch1 regulates PTEN expression to exacerbate renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy by inhibiting autophagy via interactions with Hes1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(4): 1110-1116.
- [19] Xing L, Liu Q, Fu S, *et al.* PTEN inhibits high glucose-induced phenotypic transition in podocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(8): 1776-84.
- [20] Liu Y H. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(2): 212-222.
- [21] 阮媛媛, 张莹莹, 赵俊琳, 等. zeste 2 多梳抑制复合物 2 亚基增强子 (EZH2) 促进糖尿病肾病发生及进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(3): 212-219.
- [22] Suzuki H, Usui I, Kato I, *et al.* Deletion of platelet-derived growth factor receptor- β improves diabetic nephropathy in Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α (Thr286Asp) transgenic mice [J]. *Diabetologia*, 2011, 54(11): 2953-2962.
- [23] 陈好利, 万毅刚, 赵青, 等. 糖尿病肾病肾组织炎症信号通路 p38MAPK 的调节机制及中药的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2268-2272.
- [24] Li J, Jin S Y, Barati M T, *et al.* ERK and p38 MAPK inhibition controls NF-E2 degradation and profibrotic signaling in renal proximal tubule cells [J]. *Life Sci*, 2021, 287: 120092.
- [25] Qin C M, Xia T, Li G, *et al.* Hawthorne leaf flavonoids prevent oxidative stress injury of renal tissues in rats with diabetic kidney disease by regulating the p38 MAPK signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(9): 3440-3446.

- [26] 阮曙峰, 丁选胜. 糖尿病肾病与性激素相关性研究进展 [J]. 安徽医药, 2016, 20(6): 1021-1024.
- [27] Jing D Q, Bai H, Yin S N. Renoprotective effects of emodin against diabetic nephropathy in rat models are mediated via PI3K/Akt/GSK-3 β and Bax/caspase-3 signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 5163-5169.
- [28] 万金艳, 龙宇, 张羽璐, 等. PI3K/Akt 信号通路在糖尿病肾病中的作用及中药干预的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3705-3716.
- [29] Liang Y R, Liu H, Zhu J M, *et al.* Inhibition of p53/miR-34a/SIRT1 axis ameliorates podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 559: 48-55.
- [30] Ma Z, Li L, Livingston M J, 等. p53/microRNA-214/ULK1 信号通路调控的自噬在糖尿病肾病中的作用机制 [J]. 中华医学杂志, 2021, 101(42): 3512.
- [31] Dei Cas A, Gnudi L. VEGF and angiopoietins in diabetic glomerulopathy: How far for a new treatment? [J]. *Metabolism*, 2012, 61(12): 1666-1673.
- [32] 姚向飞, 蔡东, 权皎洁. 2 型糖尿病肾病患者外周血 IGF-1、TGF- β 和 VEGF 水平及临床意义 [J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(6): 78-81.
- [33] 范晓琳, 苏如婷, 韩晓骏, 等. 2 型糖尿病肾病患者血浆 vWF 与血清 VEGF 的水平变化及意义 [J]. 南通大学学报: 医学版, 2015, 35(6): 600-602.
- [34] 高彦彬, 刘铜华, 李平. 糖尿病肾病中医防治指南 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(4): 151-153.
- [35] 白雪, 付瑞嘉, 乐世俊, 等. 雷公藤治疗类风湿性关节炎研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 265-275.
- [36] 张莉, 蔡双璠, 孔思远, 等. 中国藤黄属植物的药理作用研究进展 [J]. 世界中医药, 2016, 11(7): 1189-1194.
- [37] 刘耀晨, 张铁军, 郭海彪, 等. 三七的研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2733-2745.
- [38] 尤良震, 林逸轩, 方朝晖, 等. 黄芪甲苷治疗糖尿病及其并发症药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4700-4706.
- [39] 朱亚南, 杨七妹, 张硕, 等. 黄芩苷与黄芩素药理作用及机制研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(4): 921-925.
- [40] Wu W, Yang J J, Yang H M, *et al.* Multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. attenuates glomerulosclerosis in a rat model of diabetic nephropathy by exerting anti-microinflammatory effects without affecting hyperglycemia [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(3): 721-730.
- [41] 倪慧明, 董哲毅, 陈香美. 黄芪主要活性成分对糖尿病肾病的疗效机制研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(3): 294-299.
- [42] 董苏敏, 胡相卡, 赵苗鑫, 等. 三七总皂苷对糖尿病肾病小鼠的肾保护作用机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(17): 2303-2307.
- [43] 吴军, 夏瑗瑜, 陈杰, 等. 黄芩苷通过影响 miR-141 上调 Sirt1 表达而抑制高糖诱导的小鼠肾小球系膜细胞凋亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(9): 1571-1577.

[责任编辑 潘明佳]