

加味黄芪赤风汤调节慢性肾小球肾炎系膜细胞凋亡作用机制的网络药理学及实验研究

王阅军¹ 赵明明² 张昱²

1.杭州师范大学附属医院金华路院区 浙江老年关怀医院 杭州 310011 2.中国中医科学院西苑医院

摘要: [目的] 结合网络药理学及实验验证,探索加味黄芪赤风汤对慢性肾小球肾炎的潜在作用机制。[方法] 通过多个药物靶点数据库,构建加味黄芪赤风汤作用于慢性肾小球肾炎的“药物-成分-靶点”网络,并对作用靶点进行富集分析,并进一步进行实验验证。[结果] 加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的“药物-成分-靶点”网络共包含 184 个疾病靶点基因,富集分析结果提示其作用靶点主要集中在细胞凋亡相关通路。系膜细胞经脂多糖诱导增殖后,使用加味黄芪赤风汤含药血清进行干预,透射电镜观察显示,在中药各剂量组系膜细胞中,均可观察到细胞器减少、聚集及染色质固缩等凋亡相关的超微结构变化。流式细胞仪检测发现中药干预组的系膜细胞凋亡率高于其他组,并呈现剂量依赖性。而免疫印迹实验结果也显示,中药干预组中抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的表达量显著减少 ($P < 0.01$), 而促凋亡的 Bcl-2 相关 X (Bcl-2 associated X, Bax) 蛋白和半胱氨酸蛋白酶-3 的表达量显著升高 ($P < 0.01$)。[结论] 加味黄芪赤风汤可通过调节细胞凋亡,控制系膜细胞的炎性增殖,从而缓解慢性肾小球肾炎的发生和发展。

关键词: 网络药理学; 加味黄芪赤风汤; 慢性肾小球肾炎; 细胞凋亡; 系膜细胞; 药物靶点; 活性成分; 实验验证

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1005-5509(2022)11-1199-12

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2022.11.004

Network Pharmacology and Experimental Study of Modified Huangqi Chifeng Decoction on the Apoptotic Mechanism of Mesangial Cell in Glomerulonephritis WANG Yuejun¹, ZHAO Mingming², ZHANG Yu² 1. Zhejiang Aged Care Hospital, Jianhua Road Sub-hospital of the Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou(310011), China; 2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences

Abstract: [Objective] To explore the mechanism of treating chronic glomerulonephritis with modified Huangqi Chifeng decoction through network pharmacology and experimental validation. [Methods] The “drug-component-target” network of modified Huangqi Chifeng decoction on chronic glomerulonephritis was constructed through multiple drug-target databases, and the enrichment analysis and further experimental verification of the targets were carried out. [Results] The “drug-component-target” network of modified Huangqi Chifeng decoction for chronic glomerulonephritis contained 184 disease target genes, and the results of enrichment analysis suggested that its targets were mainly in apoptosis-related pathways. The results of transmission electron microscopy showed that apoptosis-related ultrastructural changes, such as organelle reduction, organelle aggregation and chromatin shrinkage in mesangial cells could be observed in all dose groups of modified Huangqi Chifeng decoction. Flow cytometry revealed that the apoptosis rate of mesangial cells was higher in modified Huangqi Chifeng decoction intervention group than in the other groups and showed a dose-dependent pattern. Western blot results also showed that the expression of anti-apoptotic B-cell lymphoma-2(Bcl-2) protein was significantly reduced ($P < 0.01$), while the expression of pro-apoptotic Bcl-2 associated X(Bax) protein and cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (caspase-3) protein were significantly increased in modified Huangqi Chifeng decoction group ($P < 0.01$). [Conclusion] The target and mechanism of modified Huangqi Chifeng decoction in treating chronic glomerulonephritis may be related to its regulation of apoptosis.

Key words: network pharmacology; modified Huangqi Chifeng decoction; chronic glomerulonephritis; cell apoptosis; mesangial cells; drug targets; active components; experimental verification

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81873300)

Fund project: General Program of National Natural Science Foundation Project(81873300)

通信作者:张昱, E-mail: zhangyu8225@126.com

肾小球系膜细胞 (glomerular mesangial cell, GMC) 是维持肾小球内环境稳定的重要基质细胞, 具有多种功能, 如维持基质稳态、调节滤过膜面积、吞噬凋亡细胞或免疫复合物、产生细胞因子等^[1]。在生理情况下, GMC 位于肾小球毛细血管和肾小球间质之间, 对于维持肾小球的血液动力学和内环境稳态起到重要作用, 此外, 还可以清除循环免疫复合物, 并且通过基质金属蛋白酶调节 GMC 外基质的形成和分解^[2]。在病理情况下, 免疫球蛋白或免疫复合物在系膜中沉积被认为是肾小球损伤的原因之一, 而免疫复合物或细胞因子可通过激活 GMC 的异常增殖产生炎症反应, 从而导致肾小球硬化^[3]。

细胞凋亡的形态学特征为核染色质和细胞质的凝结, 这种形态学变化是细胞内一系列有序的生化事件的结果。细胞凋亡过程中伴有半胱氨酸蛋白酶家族的激活, 并作用于多个细胞靶点, 导致凋亡特征性变化。细胞凋亡被认为是维持组织内稳态的关键事件, 通过凋亡可以快速去除和降解死亡细胞, 防止有害的细胞内容物释放而损伤周围组织^[4]。在慢性肾小球肾炎的病理过程中, 可见到 GMC 过度增殖并伴有白细胞浸润和细胞外基质累积, 从而导致肾小球纤维化。细胞凋亡有助于清除过度增殖的 GMC 及浸润性白细胞, 从而在维持肾小球内环境稳态以及增殖性病变的消散过程中起着非常重要的作用^[5-6]。

张昱教授出身医学世家, 师从于首届国医大师王绵之教授和中西医结合病理学家黄启福教授, 精研中医方药及其作用机制, 颇得薪传。张师临证过程中, 将《医林改错》中的黄芪赤风汤化裁为加味黄芪赤风汤, 作为治疗慢性肾小球肾炎的经验方^[7]。前期研究表明, 该方可以明显降低脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的增殖 GMC 中基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶抑制剂-2 的表达^[8], 同时可能通过转化生长因子- β_1 信号通路抑制 GMC 外基质中纤维连接蛋白、IV 型胶原蛋白和层粘连蛋白的过度表达, 从而延缓肾小球硬化的病理进程^[9-10]。而在肾脏足细胞程序性死亡方面, 加味黄芪赤风汤可以通过活性氧-自噬通路, 上调血管紧张素 II 诱导的肾病蛋白和足细胞裂隙膜蛋白的表达, 从而缓解足细胞损伤^[11]。本研究首先通过网络药理学方法构建加味黄芪赤风汤“药物-成分-靶点”网络, 对其治疗慢性肾小球肾炎的作用机制进行探索, 再加以实验验证, 以期对加味黄芪赤风

汤临床运用提供依据。

1 材料和方法

1.1 仪器 GS-152 低温高速离心机及 EPICS ELITE 流式细胞仪均购于美国贝克曼库尔特有限公司; TECNAI G2 SPIRIT 透射电子显微镜及 -80 °C 超低温冰箱为美国赛默飞世尔科技公司产品; TH4-200 倒置相差显微镜购于日本 Olympus 公司。

1.2 药品与试剂 LPS 购于美国 Sigma 公司 (批号: L6529); 膜联蛋白-V (Annexin V)/异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 试剂盒购于美国 BD 公司 (批号: 556547); 半胱氨酸蛋白酶-3 (cysteiny aspartate specific proteinase-3, caspase-3) 抗体、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体及 Bcl-2 相关 X (Bcl-2 associated X, Bax) 蛋白抗体均购于武汉 Boster 公司 (批号: 20181011、20180823、20180910); 替米沙坦购于德国勃林格殷格翰公司 (商品名: 美卡素, 规格: 80 mg \times 7 片, 批号: 207915)。加味黄芪赤风汤由生黄芪 30 g, 赤芍 20 g, 防风 10 g, 芡实 10 g, 金樱子 10 g, 白花蛇舌草 20 g 组成, 中药煎剂由中国中医科学院西苑医院药剂科制备。在前期实验基础上, 根据实验动物学人体与动物等效剂量换算公式确定中等给药剂量, 即人给药剂量 [g/(kg \cdot d)] \div 70 \times 6.3=大鼠给药剂量 [g/(kg \cdot d)], 并且按照 1:2:4 的比例确定低、中、高组药物浓度分为 0.23、0.46 和 0.92 g \cdot mL⁻¹。

1.3 动物与细胞 无病毒抗体 (virus antibodies free, VAF)/无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级健康雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 200~210 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2012-0001], 饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级动物房 [实验动物使用许可证号: SYXK (京) 2015-0011]。实验期间保持温度 24~28 °C, 湿度 75%, 大鼠以标准饲料饲养, 自由摄食及饮水。本实验已经通过中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会审查 (批号: 2019XLC018-3)。小鼠肾小球系膜细胞 (mouse mesangial cells, MMC) 购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 名称 SV40MES13 (目录号: GNM21)。

1.4 方法

1.4.1 网络药理学研究部分

1.4.1.1 筛选加味黄芪赤风汤有效活性成分及药物靶点基因 基于中药系统药理学分析平台 (Traditional

Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform,TCMSP)数据库(<http://tcmssp.com/>)^[12],检索加味黄芪赤风汤中6味中药的所有化学成分,并且以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%、类药性(drug likeness, DL)≥0.18和半衰期(half-life, HL)≥4 h作为阈值,筛选候选化合物及其药物靶点信息,将药物靶点信息上传至蛋白质序列数据库(Unified Protein Database, UniProt) (<https://www.uniprot.org/>)^[13],获得蛋白靶点对应的基因信息。

1.4.1.2 获取加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的靶点基因 以“glomerulonephritis”“glomerular disease”“glomerulopathies”“chronic nephritis”“chronic kidney diseases”为关键词,分别通过疾病相关的基因与突变位点数据库 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/home/>)^[14]、在线人类孟德尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) (<https://omim.org/>)、人类基因组注释数据库(Human Genome Annotation Database, GeneCards) (<https://www.genecards.org/>)^[15]进行检索,对检索结果进行并集,剔除重复基因,与上述加味黄芪赤风汤药物靶点基因取交集,最终获得加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的靶点信息。

1.4.1.3 构建加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的“药物-成分-靶点”网络 使用CytoScape 3.6.2软件,将获得的加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的靶点基因和相应的药物活性成分进行映射,构建黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的“药物-成分-靶点”网络。

1.4.1.4 基因功能和通路富集分析 将“药物-成分-靶点”网络中的基因信息导入生物学信息注释数据库(The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/>)^[16],将其中标识符设置为“official gene symbol”,列表类型设置为“gene list”,物种设置为“*Homo sapiens*”,进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析,根据校正后 P 值<0.05,对富集分析得到的结果进行筛选。

1.4.1.5 构建凋亡机制相关“药物-成分-靶点”网络 根据KEGG通路富集结果,选取其中凋亡通路相关靶点,结合上述步骤中获得的加味黄芪赤风汤治疗慢性

肾小球肾炎的“药物-成分-靶点”网络,匹配凋亡相关靶点所对应的药物及成分,最终使用桑基图对结果进行可视化。

1.4.2 动物及细胞实验验证部分

1.4.2.1 含药血清制备 SD大鼠随机分为5组,空白对照组(纯净水灌胃)、替米沙坦组(80 mg替米沙坦灌胃)和高、中、低剂量加味黄芪赤风汤组(分别为18.3、9.17、4.56 g/kg加味黄芪赤风汤灌胃),灌胃体积为2 mL/100 g,每天9点和17点各一次,持续给药3 d。末次灌胃2 h后,以戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉取血,使用1.5 mL冻存管分装血清,-20 ℃保存。

1.4.2.2 细胞培养及给药 取对数生长期MMC,以10%胎牛血清的培养基制成 5×10^3 /mL细胞悬液,接种于6孔板,待细胞贴壁后,换无血清DMEM培养基继续培养,实验分组如下:对照组(10%胎牛血清)、LPS组(10%胎牛血清+10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS)、替米沙坦组(10%替米沙坦血清+10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS)、加味黄芪赤风汤低剂量组(10%低剂量含药血清+10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS)、加味黄芪赤风汤中剂量组(10%中剂量含药血清+10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS)、加味黄芪赤风汤高剂量组(10%高剂量含药血清+10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS)。

1.4.2.3 透射电镜观察MMC超微结构改变 各组细胞培养36 h后终止培养,洗脱,用2.5%戊二醛和1%锇酸固定1~2 h,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗3次,梯度乙醇脱水,环氧树脂Epon-12包埋液浸泡2 h,40 ℃条件下聚合10 h,超薄切片,观察MMC超微结构的改变。

1.4.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 各组细胞培养36 h后,收集细胞并依次加入Annexin V缓冲液500 μL , Annexin V-FITC 5 μL 及碘化丙啶(propidium iodide, PI)5 μL 混匀,在室温下避光反应15 min,使用流式细胞仪检测。

1.4.2.5 免疫印迹法检测细胞Bcl-2、Bax、caspase-3蛋白表达 各组共培养36 h后收集细胞,提取总蛋白并以二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后转膜,5%胎牛血清白蛋白37 ℃封闭1.5 h,洗膜后分别加入Bcl-2、Bax以及caspase-3一抗及内参 β -actin(按1:1 000稀释),4 ℃摇床孵育过夜,二抗(1:2 000)37 ℃孵育1.5 h,洗膜后采

用凝胶成像分析系统显影,以ImageJ软件分析条带灰度值,以目的蛋白和内参蛋白灰度值之比表示蛋白相对表达量。

1.5 统计学分析 应用R语言进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,方差齐者组间比较使用单因素方差分析,两两比较采用Student-Newman-Keuls法;方差不齐者采用Kruskal-Wallis非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 加味黄芪赤风汤活性成分筛选及其靶点预测

根据筛选条件,在TCMSP数据库中得到加味黄芪赤风汤活性成分83个,其中黄芪20个、赤芍29个、防风18个、芡实2个、金樱子7个、白花蛇舌草7个。见表1。在TCMSP数据库中预测83个活性成分的作用靶点,最终得到232个靶点信息,将靶点蛋白通过UniProt数据库查询对应的基因。

2.2 加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的“药物-成分-靶点”网络 合并DisGeNET、OMIM和GeneCards数据库的检索结果并去重,得到慢性肾小球肾炎疾病靶点2 279个,与加味黄芪赤风汤活性成份作用靶点取交集后,得到加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的潜在作用靶点184个。见图1。将得到的靶点与对应的药物和成分导入CytoScape3.6.2软件进行网络构建,该网络包含184个疾病靶点基因,46种药物成分,6种药物及625种相互作用关系。见图2。

2.3 靶点基因富集分析结果 为进一步研究加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的潜在机制,对靶点基因信息进行GO和KEGG富集分析。按照富集程度,对前5位的GO和KEGG富集结果进行了可视化。GO富集结果显示,生物过程(biological process, BP)主要富集在凋亡过程调节(regulation of apoptotic process)、脂多糖反应(response to lipopolysaccharide)、缺氧反应(response to hypoxia)等;细胞组成(cellular component, CC)主要涉及细胞外空隙(extracellular space)、细胞质(cytosol)、膜筏(membrane raft)等;分子功能(molecular function, MF)方面主要涉及酶结合(enzyme binding)、蛋白结合(protein binding)和转录因子结合(transcription factor binding)等。见图3A。

根据 P 值对KEGG信号通路富集进行排序,前3位的通路为肿瘤坏死因子信号通路(tumor necrosis

factor signaling pathway, TNF signaling pathway)、凋亡(apoptosis)和Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)。见图3B。

2.4 凋亡机制相关的加味黄芪赤风汤“药物-成分-靶点”网络 从上述富集分析结果中选取凋亡机制相关靶点,与加味黄芪赤风汤中所对应的药物成分相匹配,得到加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的凋亡相关靶点19个,药物成分13个。见图4。方中6种中药都有相应的成分参与了细胞凋亡相关机制。其中MOL000098(槲皮素, quercetin)、MOL000358(β -谷甾醇, β -sitosterol)、MOL000422(山奈酚, kaempferol)和MOL000173(汉黄芩素, wogonin)在调节GMC凋亡相关靶点中起到了比较重要的作用。

2.5 透射电镜下MMC超微病理结构的变化 透射电镜结果显示,对照组(图5A)和LPS组(图5B)细胞胞体正常,细胞中细胞器数量较多,细胞核的核仁和核膜完整度高,未见凋亡小体;而替米沙坦组(图5C)细胞内细胞器明显减少,细胞形状皱缩,可见数量较多的突起,细胞核尚清晰;与对照组和LPS组比较,加味黄芪赤风汤低剂量组(图5D)细胞内细胞器数量减少且明显聚集,细胞膜表面见多量突起,形态皱缩,细胞核核仁不明显,染色质缩小凝聚;加味黄芪赤风汤中剂量组(图5E)细胞皱缩明显,表面突起明显,胞质内细胞器拥挤且数量减少,细胞核核仁缩小,核膜增厚,染色质固缩边集;加味黄芪赤风汤高剂量组(图5F)中MMC胞体减小,胞质浓缩,细胞核破裂,大部分核染色质凝聚成块,细胞内见大量空泡。

2.6 加味黄芪赤风汤对LPS诱导的MMC凋亡率的影响 加味黄芪赤风汤各剂量组均能有效诱导炎症增生的MMC凋亡,且凋亡率呈剂量累积趋势。LPS组细胞凋亡率($14.4\pm 2.80\%$),加味黄芪赤风汤低、中、高剂量组MMC凋亡率分别为($21.32\pm 2.25\%$)、($24.23\pm 1.98\%$)及($30.67\pm 0.96\%$),分别为LPS组的1.47倍、1.68倍及2.13倍,差异均有统计学意义($P<0.01$)。替米沙坦组MMC凋亡率明显低于加味黄芪赤风汤中、高剂量组($P<0.05$, $P<0.01$)。见图6。

2.7 加味黄芪赤风汤对LPS诱导的MMC中Bcl-2、Bax、caspase-3蛋白表达的影响 与对照组及LPS组比较,加味黄芪赤风汤各剂量组抗凋亡的Bcl-2蛋白表达量及Bcl-2/Bax比值显著减少($P<0.01$, $P<0.05$),而促凋亡的Bax和caspase-3蛋白的表达量显著升高

表 1-1 加味黄芪赤风汤的主要有效活性成分

Tab.1-1 The principal effective components of modified Huangqi Chifeng decoction

中药	成分编号	成分名称	OB(%)	DL(%)	HL(h)
	MOL000211	Mairin	55.38	0.78	8.87
	MOL000239	Jaranol	50.83	0.29	15.50
	MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	5.35
	MOL000033	(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	5.22
	MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31	14.34
	MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin	53.74	0.48	9.00
	MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	41.72	0.69	4.52
	MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.30	4.98
	MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside	36.74	0.92	13.06
黄芪	MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42	8.49
	MOL000387	Bifendate	31.10	0.67	17.96
	MOL000392	formononetin	69.67	0.21	17.04
	MOL000398	isoflavanone	109.99	0.30	15.51
	MOL000417	Calycosin	47.75	0.24	17.10
	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	14.74
	MOL000433	FA	68.96	0.71	24.81
	MOL000438	(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.67	0.26	4.90
	MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucoside	49.28	0.62	4.93
	MOL000442	1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48	7.95
	MOL000098	quercetin	46.43	0.28	14.40
	MOL001002	ellagic acid	43.06	0.43	4.04
	MOL001918	paeoniflorgenone	87.59	0.37	7.45
	MOL001921	Lactiflorin	49.12	0.80	7.26
	MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79	13.88
	MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	8.81
	MOL002714	baicalein	33.52	0.21	16.25
	MOL002776	Baicalin	40.12	0.75	17.36
赤芍	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	5.36
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	5.37
	MOL004355	Spinasterol	42.98	0.76	5.32
	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76	5.57
	MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	4.61
	MOL006990	(1S,2S,4R)-trans-2-hydroxy-1,8-cineole-B-D-glucopyranoside	30.25	0.27	4.98
	MOL006992	(2R,3R)-4-methoxyl-distylin	59.98	0.30	15.08
	MOL006994	1-o-beta-d-glucopyranosyl-8-o-benzoylpaeonisuffrone_qt	36.01	0.30	5.98
	MOL006996	1-o-beta-d-glucopyranosylpaeonisuffrone_qt	65.08	0.35	7.19

表1-2 加味黄芪赤风汤的主要有效活性成分

Tab.1-2 The principal effective components of modified Huangqi Chifeng decoction

中药	成分编号	成分名称	OB(%)	DL(%)	HL(h)
赤芍	MOL006999	stigmast-7-en-3-ol	37.42	0.75	5.85
	MOL007003	benzoyl paeoniflorin	31.14	0.54	15.66
	MOL007004	Albiflorin	30.25	0.77	7.83
	MOL007005	Albiflorin_qt	48.70	0.33	5.91
	MOL007008	4-ethyl-paeoniflorin_qt	56.87	0.44	8.88
	MOL007012	4-o-methyl-paeoniflorin_qt	56.70	0.43	8.94
	MOL007014	8-debenzoylpaeonidanin	31.74	0.45	7.63
	MOL007016	Paeoniflorigenone	65.33	0.37	6.18
	MOL007018	9-ethyl-neo-paeoniaflorin A_qt	64.42	0.30	6.08
	MOL007022	evofolinB	64.74	0.22	17.01
	MOL007025	isobenzoylpaeoniflorin	31.14	0.54	21.10
	MOL002883	Ethyl oleate (NF)	32.40	0.19	4.85
	MOL005043	campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71	4.43
	防风	MOL000011	(2R,3R)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methylol-2,3-dihydropyrano [5,6-h][1,4]benzodioxin-9-one	68.83	0.66
MOL011730		11-hydroxy-sec-o-beta-d-glucosylhamaudol_qt	50.24	0.27	12.71
MOL011732		anomalin	59.65	0.66	5.59
MOL011737		divaricatacid	87.00	0.32	14.83
MOL011740		divaricatol	31.65	0.38	13.41
MOL001941		Ammidin	34.55	0.22	4.35
MOL011747		ledebouriellol	32.05	0.51	14.57
MOL011749		phelloptorin	43.39	0.28	4.74
MOL011753		5-O-Methylvisamminol	37.99	0.25	14.67
MOL002644		Phellopterin	40.19	0.28	4.64
MOL000359		sitosterol	36.91	0.75	5.37
MOL000173		wogonin	30.68	0.23	17.75
MOL000358		beta-sitosterol	36.91	0.75	5.36
MOL001494		Mandenol	42.00	0.19	5.39
芡实	MOL001942	isoimperatorin	45.46	0.23	4.44
	MOL003588	Prangenidin	36.31	0.22	4.39
	MOL007514	methyl icoso-11,14-dienoate	39.67	0.23	5.24
	MOL013077	Decursin	39.27	0.38	4.77
金樱子	MOL002773	beta-carotene	37.18	0.58	4.36
	MOL007180	vitamin-e	32.29	0.70	4.04
金樱子	MOL001494	Mandenol	42.00	0.19	5.39
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	5.36
	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	14.74

王阅军,等:加味黄芪赤风汤调节慢性肾小球肾炎系膜细胞凋亡作用机制的网络药理学及实验研究

表1-3 加味黄芪赤风汤的主要有效活性成分

Tab.1-3 The principal effective components of modified Huangqi Chifeng decoction

中药	成分编号	成分名称	OB(%)	DL(%)	HL(h)
金樱子	MOL005030	gondoic acid	30.70	0.20	4.79
	MOL008622	Methyl trametenolate	42.88	0.82	8.82
	MOL008628	4'-Methyl-N-methylcoclaurine	53.43	0.26	4.34
	MOL000098	quercetin	46.43	0.28	14.40
	MOL001646	2,3-dimethoxy-6-methyanthraquinone	34.86	0.26	28.98
	MOL001659	Poriferasterol	43.83	0.76	5.34
白花蛇舌草	MOL001663	(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10R,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydricene-4a-carboxylic acid	32.03	0.76	4.34
	MOL001670	2-methoxy-3-methyl-9,10-anthraquinone	37.83	0.21	28.82
	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76	5.57
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	5.36
	MOL000098	quercetin	46.43	0.28	14.40

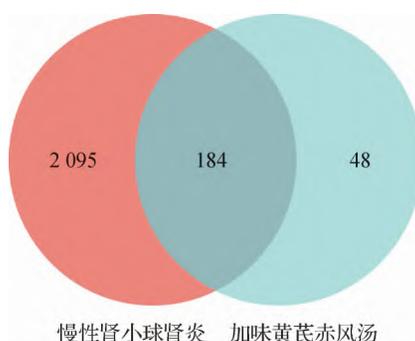


图1 加味黄芪赤风汤成分作用靶点与慢性肾小球肾炎靶点韦恩图

Fig.1 The Venn diagram of the targets of the modified Huangqi Chifeng decoction and chronic glomerulonephritis

($P < 0.01$), 表明黄芪赤风汤可以通过调节凋亡相关蛋白促进炎症增生的MMC凋亡。与替米沙坦组比较, 中药各剂量组Bcl-2表达及Bcl-2/Bax比值显著减少($P < 0.01$), Bax和caspase-3蛋白的表达显著升高($P < 0.01$), 提示加味黄芪赤风汤比替米沙坦促进MMC凋亡的作用更强。见图7。

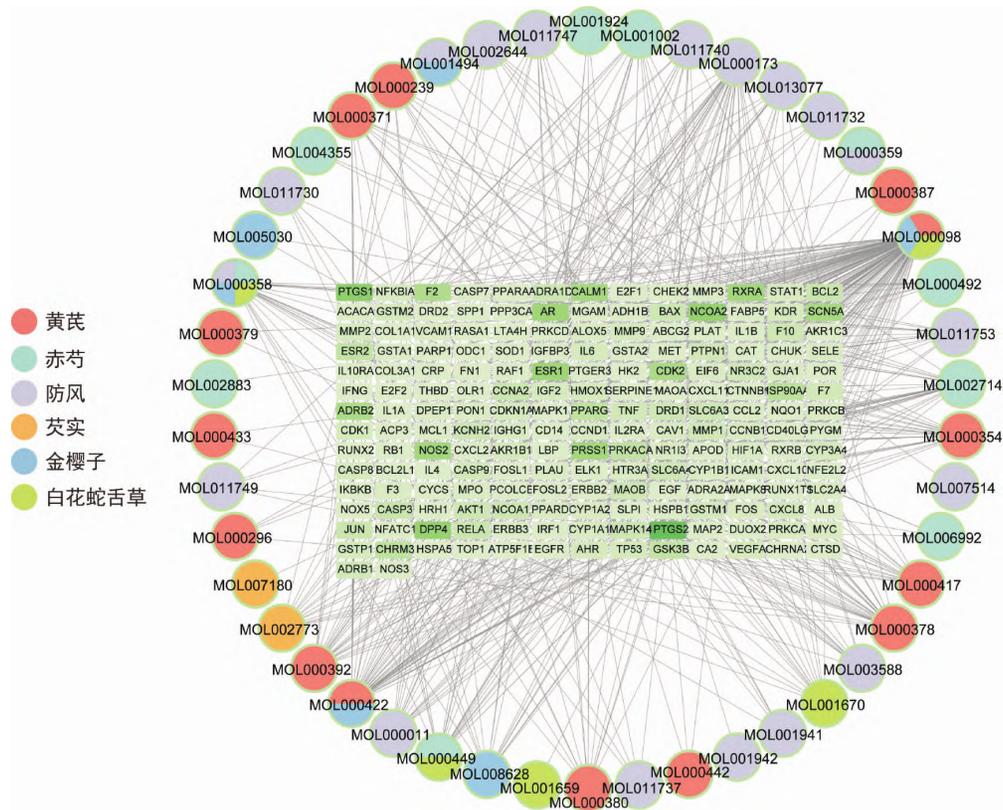
3 讨论

本研究结合网络药理学与实验研究, 对加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的机制进行了研究。由于中药具有多成分、多通路和多靶点的特点, 目前对于中药的作用机制和靶点还认识不清, 严重限制了中药临床使用的潜在价值。网络药理学结合生物信息学和药理学方法, 为中药复杂机制研究提供了新的思路。本研究构建了包含6味中药, 46种药物成分和184个疾病靶点基因的加味黄芪赤风汤“药物-成分-靶

点”网络, 体现了加味黄芪赤风汤治疗机制的复杂性。目前对于GMC凋亡有两种不同观点, 一方面, 细胞凋亡可以帮助肾小球清除浸润的中性粒细胞, 从而促进恢复正常的肾小球结构和功能^[17]; 另一方面, 过度的细胞凋亡可导致肾脏固有细胞的流失, 并加剧肾小球纤维化、肾小管萎缩和肾功能恶化^[18]。本研究网络药理学结果显示, 加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的生物学功能和通路主要富集在凋亡过程的调节相关通路中, 而本课题前期研究结果亦显示, 加味黄芪赤风汤可改善由阿奇霉素诱导的肾小球足细胞的凋亡^[19], 表明加味黄芪赤风汤可能通过细胞凋亡机制发挥治疗慢性肾小球肾炎的作用。

在“药物-成分-靶点”网络的基础上, 提取与凋亡相关的靶点网络, 结果显示槲皮素、 β -谷甾醇、山奈酚和汉黄芩素在调节GMC凋亡相关靶点中起到了

王阅军, 等: 加味黄芪赤风汤调节慢性肾小球肾炎系膜细胞凋亡作用机制的网络药理学及实验研究

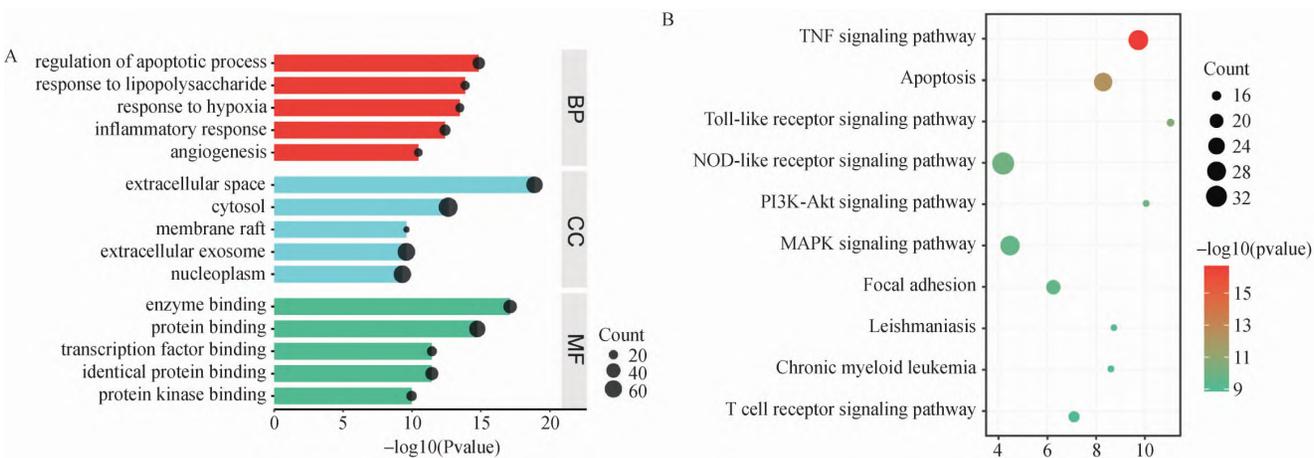


注: 网络图外圆形靶点为加味黄芪赤风汤药物成分, 药物成分的颜色为相应的中药。中间绿色方块为药物成分作用的靶基因, 绿色程度越深表示与其连接的成分数量越多。灰色连线代表药物成分和靶基因之间的互作关系。

Note: The circular targets on the periphery of the network diagram are the drug components of modified Huangqi Chifeng decoction, and the colors of the drug components are the corresponding drug. The green square in the middle represents the target gene of the drug component, and the darker the green degree, the more the number of components connected to it. Gray lines represent interactions between drug components and target genes.

图2 加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的“药物-成分-靶点”网络图

Fig.2 Drug-component-target network diagram for the treatment of chronic glomerulonephritis with modified Huangqi Chifeng decoction

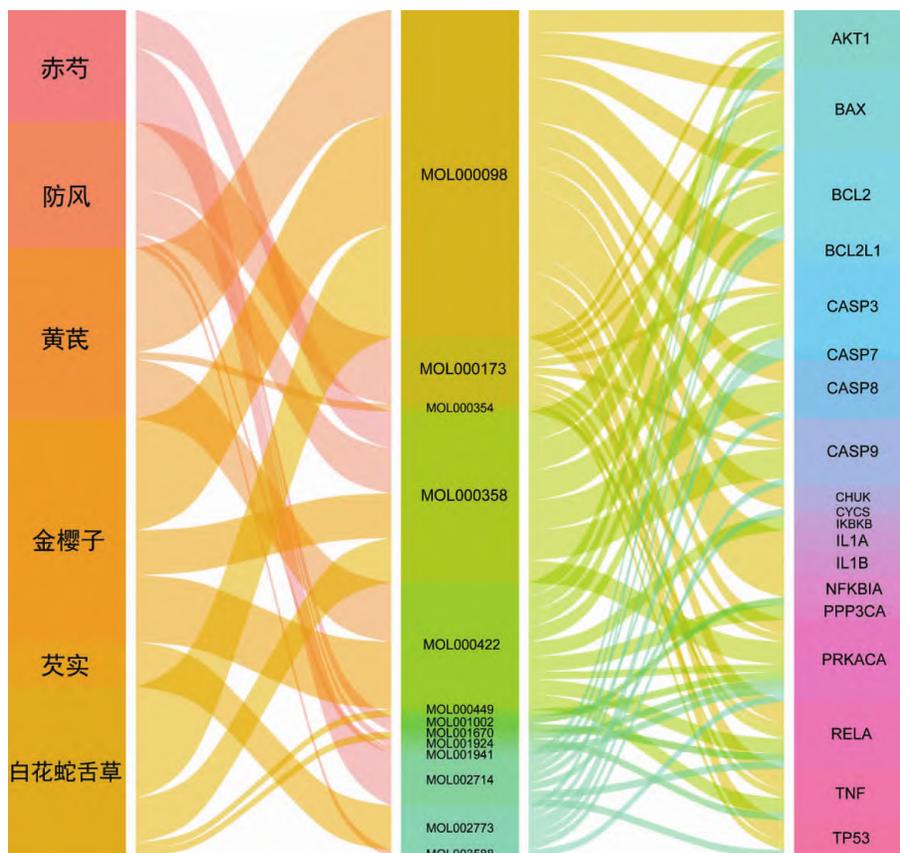


注: A. GO富集分析条形图; B. KEGG通路富集分析结果气泡图。BP: 生物过程; CC: 细胞组分; MF: 分子功能。

Note: A. GO enrichment bar chart; B. KEGG Pathway enrichment bubble chart. BP: Biological Process; CC: Cellular Component; MF: Molecular Function.

图3 加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的GO富集分析和KEGG通路富集分析结果

Fig.3 GO enrichment and KEGG Pathway enrichment results of modified Huangqi Chifeng decoction in the treatment of chronic glomerulonephritis

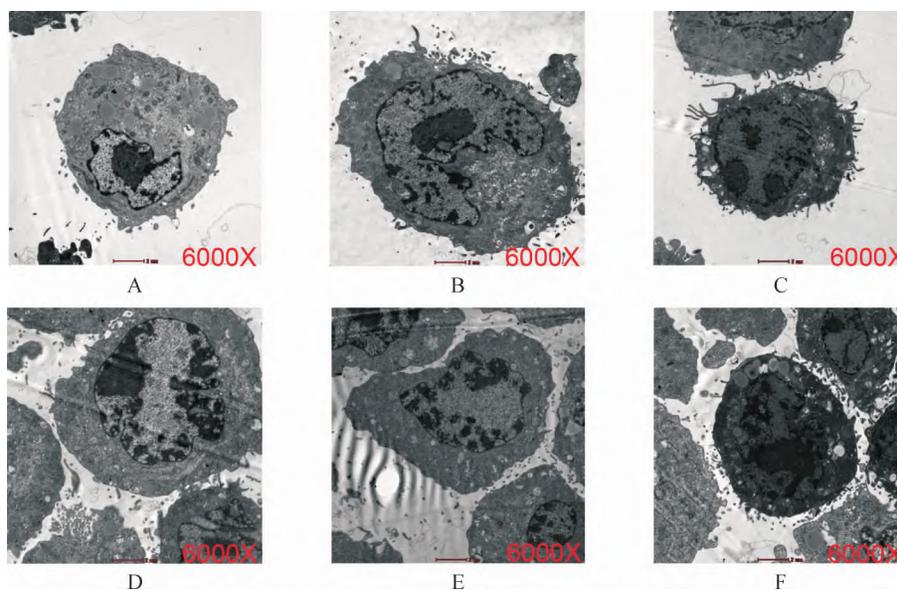


注: 冲积图左列为加味黄芪赤风汤中药, 中间列为相应的中药成分, 右列为相应的细胞凋亡靶点基因。

Note: The left side of the alluvial diagram is listed as drugs of modified Huangqi Chifeng decoction, the middle side is listed as the corresponding components, and the right side is listed as the corresponding apoptotic target genes.

图4 细胞凋亡机制相关加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的“药物-成分-靶点”冲积图

Fig.4 The alluvial plot of “drug-component-target” of modified Huangqi Chifeng decoction in the treatment of chronic glomerulonephritis

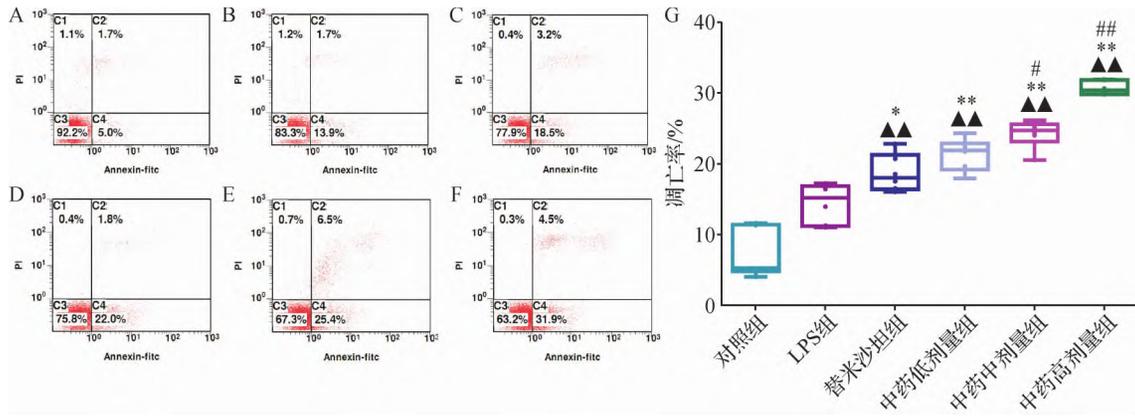


注: A. 对照组; B. LPS组; C. 替米沙坦组; D. 加味黄芪赤风汤低剂量组; E. 加味黄芪赤风汤中剂量组; F. 加味黄芪赤风汤高剂量组(标尺: 2 μm)。

Note: A. Control group; B. LPS group; C. Telmisartan group; D. Modified Huangqi Chifeng decoction low-dose group; E. Modified Huangqi Chifeng decoction medium-dose group; F. Modified Huangqi Chifeng decoction high-dose group(Scale: 2 μm).

图5 透射电镜下系膜细胞的超微结构改变(6 000x)

Fig.5 Ultrastructural changes of mesangial cells under transmission electron microscopy(6 000x)

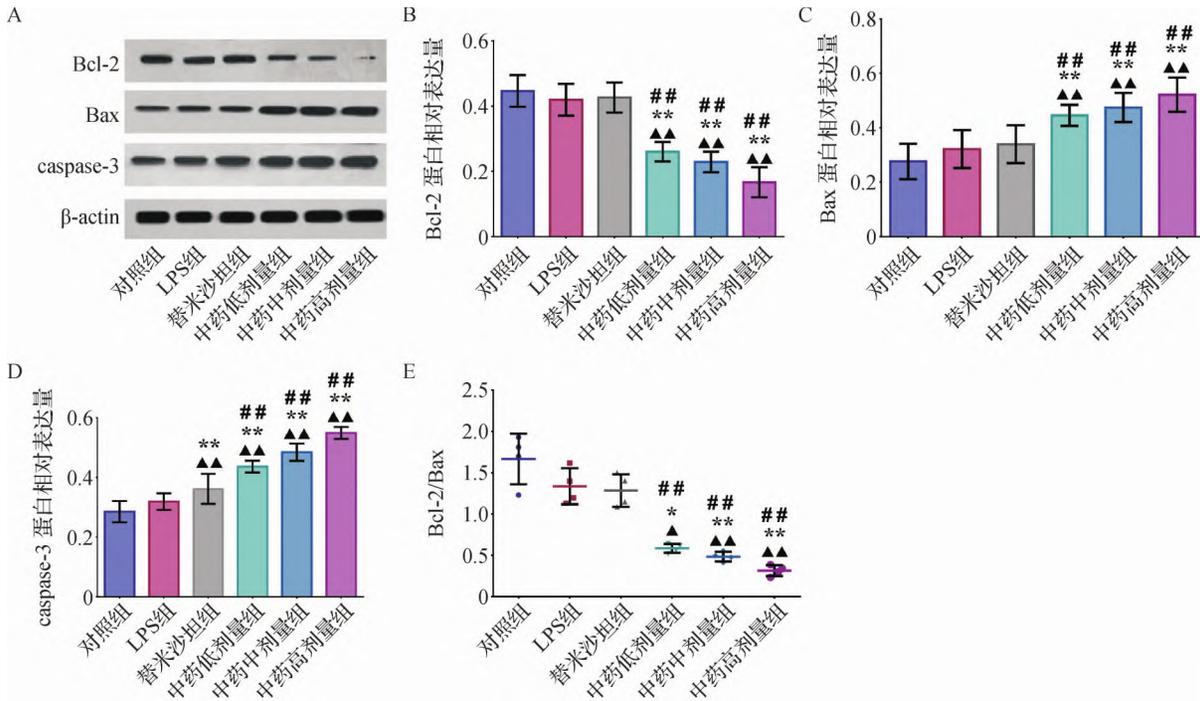


注:A.对照组;B.LPS组;C.替米沙坦组;D.加味黄芪赤风汤低剂量组;E.加味黄芪赤风汤中剂量组;F.加味黄芪赤风汤高剂量组;G.各组凋亡率。与对照组比较,▲▲ $P<0.01$;与LPS组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与替米沙坦组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

Note: A. Control group; B. LPS group; C. Telmisartan group; D. modified Huangqi Chifeng decoction low-dose group; E. modified Huangqi Chifeng decoction medium-dose group; F. modified Huangqi Chifeng decoction high-dose group; G. The rate of apoptosis in each group. Compared with control group, ▲▲ $P<0.01$; compared with LPS group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with Telmisartan group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

图6 加味黄芪赤风汤对炎症增生的GMC凋亡率的影响

Fig.6 Effect of modified Huangqi Chifeng decoction on apoptosis rate of mesangial cells with inflammatory hyperplasia



注:A.免疫印迹法检测Bcl-2、Bax和caspase-3蛋白表达;B.Bcl-2蛋白相对表达量;C.Bax蛋白相对表达量;D.caspase-3蛋白相对表达量;E.Bcl-2与Bax蛋白相对表达量之比。与对照组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与LPS组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与替米沙坦组比较,## $P<0.01$ 。

Note: A. The expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 detected by Western blot; B. Relative expression of Bcl-2 protein; C. Relative expression of Bax protein; D. Relative expression of caspase-3 protein; E. Relative expression of Bcl-2/Bax protein. Compared with control group, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$; compared with LPS group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with Telmisartan group, ## $P<0.01$.

图7 加味黄芪赤风汤对炎症增生的系膜细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of modified Huangqi Chifeng decoction on expression of apoptosis-related proteins in inflammatory hyperplasia mesangial cells

比较重要的作用。槲皮素是一种存在于多种中药中的黄酮类化合物,具有广泛的生物活性,包括抗癌、抗氧化、抗炎等作用。相关研究显示,槲皮素可以通过靶向抑制磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B,PI3K/Akt) 通路,从而缓解慢性肾衰大鼠肾脏纤维化及细胞凋亡^[20]。 β -谷甾醇是植物中发现的一种主要的膳食植物甾醇,具有预防和治疗癌症的潜在作用^[21]。研究证明, β -谷甾醇能够通过Bcl-2和PI3K/Akt信号通路,诱导细胞周期G₂/M期阻滞和细胞凋亡^[22]。其他研究也显示, β -谷甾醇能够降低缺血再灌注肾脏中的丙二醛、TNF- α 和白细胞介素-6的水平,通过缓解炎症反应和氧化应激,对急性肾损害有潜在的治疗作用^[23]。山奈酚是一种天然黄酮类化合物,广泛存在于水果和蔬菜中,可以通过抑制Src激酶,下调核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)通路,从而抑制白细胞介素-4和环加氧酶2的表达,从而起到抗炎作用^[24]。此外,山奈酚还具有抑制卵巢癌血管生成和诱导癌细胞凋亡的作用^[25]。糖尿病肾病的相关研究发现,山奈酚可以提高糖尿病肾病GMC中超氧化物歧化酶的活性,降低丙二醛和活性氧的生成,并抑制V型胶原和转化生长因子- β ₁的表达,从而抑制线粒体/细胞色素C介导的凋亡途径^[26]。此外,山奈酚还能够通过调节巨噬细胞M1/M2极化,对高糖诱导的足细胞凋亡发挥保护作用^[27]。汉黄芩素是一种具有细胞渗透性的口服类黄酮,具有抗炎和抗癌的特性,作为细胞周期蛋白依赖性激酶9的抑制剂,可以阻断RNA聚合酶II羧基端的磷酸化,从而减少RNA的合成,随后快速下调髓细胞白血病基因-1,从而诱导细胞凋亡^[28]。此外,还可以抑制肺癌A549细胞中c-Jun和激活蛋白-1的表达,抑制环氧化酶-2的生成^[29]。此外,糖尿病肾病动物实验提示,汉黄芩素能够通过调节Bcl-2介导的细胞自噬与凋亡,减轻肾小球病变和足细胞损伤^[30]。

本研究进一步结合血清药理学和细胞实验,对加味黄芪赤风汤诱导炎症增殖的GMC凋亡的机制进行了验证。透射电镜结果显示,在中药各剂量组中都观察到了增殖的MMC凋亡,与正常组和LSP组比较,凋亡的特征更加明显。流式细胞检测发现,中药各剂量组细胞凋亡率高于其他组,并呈现剂量依赖性。而免疫印迹结果也显示抗凋亡蛋白Bcl-2的表达量显著减低,而促凋亡的Bax和Caspase-3蛋白的表达量显著升

高,进一步证明了加味黄芪赤风汤可以通过细胞凋亡机制,清除过度增殖的GMC,从而减缓慢性肾小球肾炎的病理进程。

综上所述,本研究基于网络药理学预测了加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的活性成分、作用靶点及机制,并构建了其治疗慢性肾炎的“药物-成分-靶点”网络,充分体现出中药多成分多靶点的复杂药理作用网络关系;并初步验证了加味黄芪赤风汤可通过细胞凋亡机制发挥抗炎的作用。本课题组将以此为基,进一步明确加味黄芪赤风汤治疗慢性肾小球肾炎的关键成分和关键靶点。

参考文献:

References:

- [1] AVRAHAM S, KORIN B, CHUNG J J, et al. The mesangial cell—the glomerular stromal cell[J]. *Nat Rev Nephrol*,2021,17(12):855–864.
- [2] 胡营杰,任现志.系膜增生性肾小球肾炎与MMP-2、TIMP-2的关系及中医药研究进展[J]. *浙江中医药大学学报*,2014,38(11):1342–1345.
HU Yingjie, REN Xianzhi. Correlation of MMP-2 and TIMP-2 with mesangial proliferative glomerulo-nephritis and its research progress in traditional Chinese medicine [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*,2014,38(11):1342–1345.
- [3] LIU P, LASSEN E, NAIR V, et al. Transcriptomic and proteomic profiling provides insight into mesangial cell function in IgA nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*,2017,28(10):2961–2972.
- [4] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2019,20(3):175–193.
- [5] PRIANTE G, GIANESELO L, CEOL M, et al. Cell death in the kidney[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(14):3598.
- [6] SARHAN M, VON MASSENHAUSEN A, HUGO C, et al. Immunological consequences of kidney cell death[J]. *Cell Death Dis*,2018,9(2):114.
- [7] 王如梦,张昱.张昱教授运用药对治疗慢性肾炎经验总结[J]. *浙江中医药大学学报*,2021,45(8):895–899.
WANG Rumeng, ZHANG Yu. Analysis of Professor ZHANG Yu's experience in treating chronic nephritis with drug pairs[J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*,2021,45(8):895–899.
- [8] 刘红霞,张昱,李澎,等.加味黄芪赤风汤含药血清对LPS诱导的小鼠肾小球系膜细胞ColIV、MMP-2及TIMP-2表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*,2016,36(5):592–596.
LIU Hongxia, ZHANG Yu, LI Peng, et al. Effect of modified Huangqi Chifeng decoction containing serum on the expression of ColIV, MMP-2, and TIMP-2 in glomerular mesangial cells induced by LPS[J]. *Chin J Integr Tradit*

- West Med,2016,36(5):592-596.
- [9] 焦志娜,张昱,李澎,等.加味黄芪赤风汤对小鼠系膜细胞增殖及分泌细胞外基质的影响[J].世界中西医结合杂志,2016,11(7):941-944.
- JIAO Zhina, ZHANG Yu, LI Peng, et al. Impacts of the modified Huangqi Chifeng decoction on the proliferation of glomerular mesangial cell and the secretion of extracellular matrix in mice[J]. World J Integr Tradit West Med,2016,11(7):941-944.
- [10] 高艳红,张昱,李澎,等.基于TGF- β /Smad信号通路的加味黄芪赤风汤抗肾脏纤维化机制研究[J].中国中西医结合杂志,2016,36(12):1486-1490.
- GAO Yanhong, ZHANG Yu, LI Peng, et al. Anti-renal fibrosis mechanism of modified Huangqi Chifeng decoction based on TGF- β /Smad signal pathway[J]. Chin J Integr Tradit West Med,2016,36(12):1486-1490.
- [11] 赵明明,李澎,杨斌,等.基于活性氧簇-自噬通路调控的加味黄芪赤风汤对肾小球足细胞的保护机制研究[J].中国中西医结合杂志,2020,40(6):727-732.
- ZHAO Mingming, LI Peng, YANG Bin, et al. Study on the protective mechanism of modified Huangqi Chifeng decoction based on the regulation of ROS-autophagy pathway on glomerular podocytes[J]. Chin J Integr Tradit West Med,2020,40(6):727-732.
- [12] RU J, LI P, WANG J, et al. TC MSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform,2014,6:13.
- [13] The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021[J]. Nucleic Acids Res,2021,49(D1):D480-D489.
- [14] PINERO J, RAMIREZ-ANGUITA J M, SAUCH-PITARCH J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. Nucleic Acids Res,2020,48(D1):D845-D855.
- [15] BARSHIR R, FISHILEVICH S, INY-STEIN T, et al. GeneCaRNA: a comprehensive gene-centric database of human non-coding RNAs in the GeneCards Suite[J]. J Mol Biol,2021,433(11):166913.
- [16] DENNIS G J, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery[J]. Genome Biol,2003,4(5):P3.
- [17] WATSON S, CAILHIER J F, HUGHES J, et al. Apoptosis and glomerulonephritis[J]. Curr Dir Autoimmun,2006,9:188-204.
- [18] HOSNY G, ISMAIL W, MAKBOUL R, et al. Increased glomerular Bax/Bcl2 ratio is positively correlated with glomerular sclerosis in lupus nephritis[J]. Pathophysiology,2018,25(2):83-88.
- [19] 李双,李澎,张昱,等.加味黄芪赤风汤对阿霉素诱导肾小球足细胞凋亡的影响[J].中国中医基础医学杂志,2018,24(3):326-330.
- LI Shuang, LI Peng, ZHANG Yu, et al. Effect of modified Huangqi Chifeng decoction on adriamycin induced apoptosis of glomerular podocytes[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med,2018,24(3):326-330.
- [20] TU H, MA D, LUO Y, et al. Quercetin alleviates chronic renal failure by targeting the PI3k/Akt pathway[J]. Bioengineered,2021,12(1):6538-6558.
- [21] BIN S M, AMEEN S S. Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer[J]. Nutr Cancer,2015,67(8):1214-1220.
- [22] MOON D O, KIM M O, CHOI Y H, et al. Beta-sitosterol induces G₂/M arrest, endoreduplication, and apoptosis through the Bcl-2 and PI3K/Akt signaling pathways[J]. Cancer Lett,2008,264(2):181-191.
- [23] KOC K, GEYIKOGLU F, CAKMAK O, et al. The targets of beta-sitosterol as a novel therapeutic against cardio-renal complications in acute renal ischemia/reperfusion damage[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,2021,394(3):469-479.
- [24] REN J, LU Y, QIAN Y, et al. Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases[J]. Exp Ther Med,2019,18(4):2759-2776.
- [25] LUO H, JIANG B, LI B, et al. Kaempferol nanoparticles achieve strong and selective inhibition of ovarian cancer cell viability[J]. Int J Nanomedicine,2012,7:3951-3959.
- [26] JIANG W, WANG R, LIU D, et al. Protective effects of kaempferitrin on advanced glycation end products induce mesangial cell apoptosis and oxidative stress[J]. Int J Mol Sci,2018,19(11):3334.
- [27] LI Y, ZHENG D, SHEN D, et al. Protective effects of two safflower derived compounds, kaempferol and hydroxysafflor yellow A, on hyperglycaemic stress-induced podocyte apoptosis via modulating of macrophage M1/M2 polarization[J]. J Immunol Res,2020,2020:2462039.
- [28] WANG J, LI T, ZHAO T, et al. Design of wogonin-inspired selective cyclin-dependent kinase 9(CDK9) inhibitors with potent in vitro and in vivo antitumor activity[J]. Eur J Med Chem,2019,178:782-801.
- [29] WANG S J, ZHAO J K, REN S, et al. Wogonin affects proliferation and the energy metabolism of SGC-7901 and A549 cells[J]. Exp Ther Med,2019,17(1): 911-918.
- [30] LIU X Q, JIANG L, LI Y Y, et al. Wogonin protects glomerular podocytes by targeting Bcl-2-mediated autophagy and apoptosis in diabetic kidney disease[J]. Acta Pharmacol Sin,2022,43(1):96-110.

(收稿日期:2022-03-15)