

基于网络药理学和动物实验探讨管花肉苁蓉苯乙醇苷对糖尿病肾病的作用

马冲¹, 耿若愚¹, 杨建华^{1,2}, 居博伟³, 文丽梅², 胡君萍^{1*}

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 3. 新疆医科大学第五附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 基于网络药理学和动物实验探讨肉苁蓉苯乙醇苷 (CPhGs) 对糖尿病肾病 (DKD) 的作用。方法 UHPLC-QE-MS 法分析 CPhGs 化学成分, TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库筛选核心成分, OMIM、GeneCards 数据库获取 DKD 相关靶点, 获得共同靶标后使用 STRING 网站构建蛋白互作网络, DAVID 数据库进行 GO、KEGG 通路分析, Cytoscape 软件构建“CPhGs 核心成分-靶点-通路”网络。随机选取 10 只大鼠作为正常组, 其余大鼠用高糖高脂饲料喂养及单次腹腔注射 STZ 建立 DKD 模型, 分为模型组、达格列净 (1 mg/kg) 组和 CPhGs 高、中、低剂量 (500、250、125 mg/kg) 组, 每组 10 只, 药物干预 6 周, 观察一般情况, 每周称定体质量并检测血糖; 末次给药后收集 24 h 尿液, 检测 24 h 尿蛋白总量 (24-UTP); 腹主动脉取血并处死, 分离血清, 检测尿素氮 (BUN)、尿酸 (UA)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 水平, HE 染色及 Masson 染色观察肾组织病理变化, ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, Western blot 法检测肾组织 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、SOCS3 蛋白表达。结果 UHPLC-QE-MS 技术共检测得到 699 种成分, 经筛选后获得 CPhGs 核心成分 16 种, 相关靶点 323 个, CPhGs 与 DKD 共有靶点 99 个, 关键靶点为 STAT3、SRC、EGFR 等。KEGG 通路分析筛选了 151 条信号通路, 显示 IL-17 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、TNF 信号通路等可能在 CPhGs 治疗 DKD 的过程中发挥关键作用。CPhGs 能增加 DKD 大鼠体质量 ($P < 0.01$), 减少饮水量 ($P < 0.01$), 调节糖脂代谢, 降低 24-UTP、BUN 水平 ($P < 0.01$), 改善肾脏组织病理损伤, 降低肾组织 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白表达 ($P < 0.01$), 提高 SOCS3 蛋白表达 ($P < 0.01$)。结论 CPhGs 通过多成分、多靶点、多途径干预 DKD, 可能通过抑制 DKD 大鼠肾脏 JAK2/STAT3 信号通路来发挥作用。

关键词: 肉苁蓉苯乙醇苷; 糖尿病肾病; UHPLC-QE-MS; 网络药理学; 动物实验; JAK2/STAT3 信号通路

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)04-1365-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.04.050

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 作为糖尿病最重要的微血管并发症之一, 不仅是导致慢性肾脏病的首要因素, 亦是造成全球范围内终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD) 的主要原因^[1-2]。临床治疗 DKD 主要是首先控制血糖、血压、血脂, 其次保护肾功能, 以及避免使用肾毒性药物、改善生活方式等^[3-4]。然而, 由于 DKD 发病机制复杂, 缺乏特异性干预靶点, 目前的治疗方案都有局限性, 效果并不理想, 终末期 DKD 发生率仍在不断攀升, 因此, 寻找有效的天然药物具有重要意义。

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 或管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质茎^[5], 始载于《神农本草经》, 列为上品, 素有“沙漠人参”之美誉^[6], 其味甘、咸, 性温, 归肾、大肠

经, 具有补肾阳、益精血、润肠通便的功效。研究表明, 苯乙醇苷类 (CPhGs) 是其主要活性成分之一, 也是其发挥药理作用的物质基础; 肉苁蓉提取物具有抗糖尿病^[7-8]、抗肝癌^[9]、肾保护^[10-11]、神经保护^[12-13]等药理作用, 但目前对于 CPhGs 治疗 DKD 的作用及其机制尚不明确。

本研究采用网络药理学和分子对接的方法^[14], 以 CPhGs 为研究对象, 预测分析其主要活性成分及治疗 DKD 的潜在靶点, 再建立链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 诱导联合高脂饲料喂养的 DKD 大鼠模型作为体内研究对象, 以期为相关治疗的临床拓展应用及进一步作用机制研究提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 8 周龄雄性 SD 大鼠 70 只, 体质量

收稿日期: 2023-11-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160772); 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目 (2021D01D11, 2022D01D14); 新疆天然药物有效成分与药物释放技术重点实验室项目 (XJDX1713); 新疆医科大学大学生创新训练项目 (X202310760033)

作者简介: 马冲 (1999—), 男, 硕士生, 从事新疆特色药用资源开发研究。E-mail: machong_mmcc@163.com

*通信作者: 胡君萍 (1971—), 女, 博士, 教授, 从事新疆特色药用资源开发研究。E-mail: hjp_yxy@163.com

(240±20) g, 购自新疆医科大学动物实验中心 [实验动物使用许可证号 SYKX (新) 2018-0002], 在温度 (22±2)℃、相对湿度 50%~70%、光暗交替循环 12 h/12 h 下适应性饲养 1 周。实验获得新疆医科大学医学实验动物中心动物伦理委员会批准 (伦理号 IACUC-20220127-19)。

1.2 试剂与药物 CPhGs (批号 201610, 纯度>80%) 由新疆和田帝辰股份有限公司提供。达格列净 (批号 NB2248) 购自英国阿斯利康公司。高糖高脂饲料 (货号 Boaigang-B1135DM)、STZ (批号 2021110307) 均购自北京博爱港生物技术有限公司; 尿微量白蛋白 (批号 20220611)、尿素氮 (批号 20220626)、尿酸 (批号 20220613)、总胆固醇 (批号 20220615)、甘油三酯 (批号 20220616)、高密度脂蛋白 (批号 20220614)、低密度脂蛋白 (批号 20220615) 均购自南京建成生物工程研究所; 白介素-6 (IL-6, 批号 JL20896)、白介素-1 β (IL-1 β , 批号 JL20884)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 批号 13202) 均购自上海江莱生物科技有限公司; JAK2 兔多克隆抗体 (批号 22v9316)、p-JAK2 兔多克隆抗体 (批号 78g9360)、STAT3 兔多克隆抗体 (批号 15x8824)、p-STAT3 兔多克隆抗体 (批号 74m1478)、SOCS3 兔多克隆抗体 (批号 31d4841) 均购自江苏亲科生物研究中心有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (批号 20000758) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; β -actin 兔单克隆抗体 (批号 AC230205001)、RIPA 裂解液 (批号 20220416)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 20230401) 均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 仪器 Vanquish 超高效液相色谱仪、Q Exactive Focus 高分辨质谱仪、Heraeus Fresco17 离心机、FC 全自动酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); JXFSTPRP-24 研磨仪 (上海净信科技有限公司); 明澈 D24 UV 纯水仪 (德国 Merck Millipore 公司); ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (1.7 μ m, 2.1 mm×100 mm) (美国 Waters 公司); Accu-Chek Performa 血糖仪 (瑞士 Roche 公司); CM1850UV 冷冻切片机、DM300 正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); GL-88B 涡旋仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 电子分析天平 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 UHPLC-QE-MS 分析

2.1.1 供试品溶液制备 称取 100 mg CPhGs, 加入 500 μ L 80% 甲醇, 涡旋 30 s, 冰水浴超声处理 1 h, -40℃ 静置 1 h, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 即得, 在-80℃ 冰箱中保存。

2.1.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (1.7 μ m, 2.1 mm×100 mm); 流动相乙腈 (A) -1% 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0~11 min, 15%~75% A; 11~12 min, 75%~98% A; 12~14 min, 98% A; 14~14.1 min, 98%~15% A; 14.1~15 min, 15% A); 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 35℃; 进样量 5 μ L。

2.1.3 质谱条件 full-scan ddMS2 全扫描模式; 鞣气体积流量 45 arb; 辅助气体体积流量 15 arb; 毛细管温度 400℃; 碰撞能量在 NCE 模式下 15%~30%~45% 循环; 喷淋电压±4.0 kV。

2.2 网络药理学研究

2.2.1 CPhGs 成分靶点筛选 将 UHPLC-QE-MS 分析得到的化学成分按照相对含量大小进行排序, 删除化学结构尚未确定者。将被筛选成分的 InChIKey 序列号输入 TCMSP 数据库, 获得各成分的药动学参数, 以口服生物利用度 (OB) >30%、类药性 (DL) >0.18 为条件, 筛选得到符合要求者。在 Swiss Target Prediction 数据库中输入各成分的 SMILES 号进行靶点预测, 得到 CPhGs 化学成分靶点。

2.2.2 DKD 疾病靶点筛选 以“diabetic nephropathy”为检索词, 在 OMIM、GeneCards、NCBI 数据库中寻找疾病靶点。

2.2.3 成分-靶点-疾病网络构建 通过 R 软件映射得到 CPhGs 成分与疾病的交叉靶点, Cytoscape 3.7.2 软件构建成分-靶点网络系统, 其中的 analyze 插件检测核心靶点。

2.2.4 蛋白质-蛋白质相互作用网络 (PPI) 构建 将成分和疾病的交集靶点蛋白导入 STRING 数据库中, 构建蛋白质与蛋白质互作网络 (PPI), 删除网络中的无连接节点的蛋白, 将最低蛋白互作分数的置信度设置为 0.700, 构建 PPI 网络, 将其 TSV 格式结果下载, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 利用 analyze 插件进一步筛选核心靶点。

2.2.5 GO、KEGG 分析 使用 DAVID 数据库中的 Functional Annotation 板块, 对成分疾病交集靶点进行富集分析。首先设置分析参数, 在 Gene List 框中输入交集靶点, 靶点标识符 (identifier) 选择 official-gene-symbol, 数据类型 (List Type) 选择 Gene List, 靶点来源 (Species) 选择 “Homo Sapiens (人种)”, 确认分析参数后开始分析, 获取 GO 和 KEGG 分析结果, 再使用 ImageGP 在线绘图平台绘制 KEGG 和 GO 分析结果的气泡图, Cytoscape 3.7.2 软件构建成分-靶点-通路网络图。

2.2.6 分子对接 首先在 PubChem 数据库中下载活性成分 SDF 格式的 3D 结构图, 然后在美国全球蛋白质数据库 (PDB) 中下载交集靶点 PDB 格式的 3D 结构图, 最后上传至 CB-Dock 网站进行分子对接。筛选优势对接构象, 用 Pymol 进行可视化。

2.3 动物实验

2.3.1 造模、分组及给药 随机选取 10 只大鼠作为正常组, 给予普通饲料喂养, 其余大鼠给予高糖高脂饲料喂养, 6 周后一次性腹腔注射给予 30 mg/kg STZ (0.1 mmol/L STZ 溶于 pH 4.5 柠檬酸缓冲液中), 72 h 后尾静脉取血检测空腹血糖 (fasting blood-glucose, FBG), 若 FBG \geq 16.7 mmol/L, 则为糖尿病造模成功^[15]; 继续给予 2 周高糖高脂饲料喂养, 以尿糖阳性、24 h 尿蛋白总量 (24-UTP) \geq 20 mg 判定为 DKD 造模成功, 其中造模过程中死亡 3 只, 造模不成功 7 只, 共成功 50 只。将造模成功的大鼠随机分为

模型组、达格列净组 (1 mg/kg) 及 CPhGs 高、中、低剂量 (500、250、125 mg/kg) 组, 各给药组灌胃给予相应药物, 正常组和模型组大鼠灌胃给予等量生理盐水, 每天 1 次, 共 6 周。给药期间, 除正常组以外其余各组大鼠继续给予高脂饲料。

2.3.2 生化指标检测 CPhGs 干预 6 周后, 收集大鼠 24 h 尿液, 测定 24 h 尿蛋白总量 (24-UTP); 空腹尾静脉采血, 检测 FBG 水平; 腹主动脉取血, 4 ℃、1 500 r/min 离心 10 min, 分离得到血清, 检测血清尿素氮 (urea nitrogen, BUN)、尿酸 (uric acid, UA)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein LDL) 水平。

2.3.3 肾组织病理形态观察 大鼠以戊巴比妥钠麻醉后处死, 剥离肾脏, 称定质量, 用 4% 多聚甲醛固定, 经脱水、透明、浸蜡、包埋后切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色和马松 (Masson) 染色, 于显微镜下观察组织形态, Image-Pro Plus 6.0 软件分析积分光密度, 量化相对胶原纤维面积。

2.3.4 ELISA 法检测大鼠血清炎症因子水平 按照试剂盒说明书检测 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平。

2.3.5 Western blot 法检测相关蛋白表达 取大鼠肾脏组织, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定浓度, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至 PVDF 膜, 封闭后分别加入 JAK2 (1 : 2 000)、p-JAK2 (1 : 1 000)、STAT3 (1 : 2 000)、p-STAT3 (1 : 2 000)、SOCS3 (1 : 2 000)、 β -actin (1 : 2 000) 抗体, 4 ℃ 孵育过夜, 加入 HRP 标记的 IgG 二抗 (1 : 5 000), 室温孵育 1 h, 电发光试剂盒显影, 经蛋白凝胶成像仪进行曝光, 采用 Image J 软件定量分析。以 β -actin 为内参, 目标条带与内参条带灰度值的比值为相对蛋白表达量。

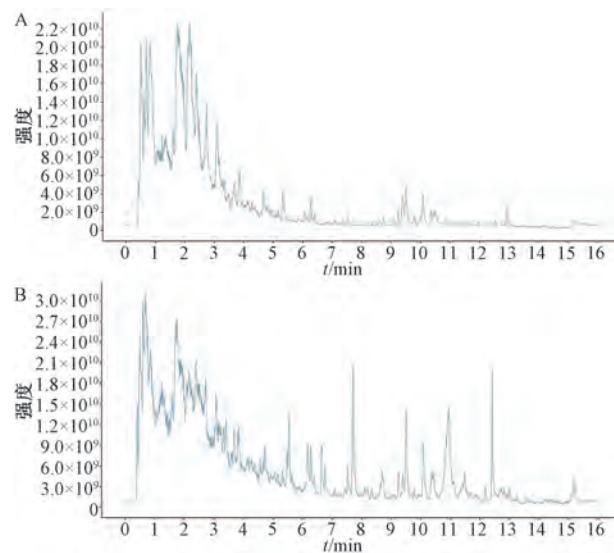
2.4 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 UHPLC-QE-MS 分析 CPhGs 正、负离子模式下的总离子流图见图 1, 共检测到 62 275 个色谱峰, 删去未鉴别者共得到 699 种化学成分, 包括萜类 85 种、苯丙素类 65 种、黄酮类 31 种、异戊烯醇酯类 55 种。

3.2 CPhGs 成分相关靶点 通过 UHPLC-QE-MS 得到 CPhGs 成分共 699 种, 以 OB>30%、DL>0.18 为条件筛选出核心成分 16 种, 见表 1。运用 Swiss Target Prediction 平台得到成分相关靶点共 323 个, GeneCards、OMIM 数据库筛选得到 870 个与 DKD 相关的靶点, 将上述两者取交集后得到 99 个疾病和药物共同靶点, 见图 2。

3.3 PPI 蛋白互作网络 CPhGs 与 DKD 交集靶点的 PPI 网络涉及 110 个节点, 平均节点邻居数为 10.345, 提示节点之间存在紧密相互作用, 见图 3 (图中颜色越深的节点代



注: A 为正离子模式, B 为负离子模式。

图 1 CPhGs UHPLC-QE-MS 总离子流图

表 1 CPhGs 核心成分筛选结果

编号	PubChem CID	成分	分子式	OB/%	DL
1	5281771	松果菊苷	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	3.14	0.38
2	5281800	毛蕊花糖苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	2.94	0.62
3	443024	无梗五加苷 B	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	43.35	0.77
4	168849	柳穿鱼叶苷	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	47.62	0.65
5	72703	小檗碱	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	35.74	0.73
6	10607	鬼臼毒素	C ₂₂ H ₂₂ O ₈	59.94	0.86
7	497203	乌药醇	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	52.05	0.18
8	68071	生松素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	64.72	0.18
9	163263	香紫苏醇	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	43.67	0.21
10	5281707	香豆雌酚	C ₁₅ H ₈ O ₅	32.49	0.34
11	173273	雷酚内酯	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	48.50	0.44
12	234823	桉脂素	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	33.29	0.62
13	5319081	龙血素 A	C ₁₇ H ₁₈ O ₄	40.43	0.19
14	10574	杠柳毒苷	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	36.61	0.74
15	173183	菜油甾醇	C ₂₈ H ₄₈ O	37.58	0.71
16	5280794	豆甾醇	C ₂₉ H ₄₈ O	43.83	0.76

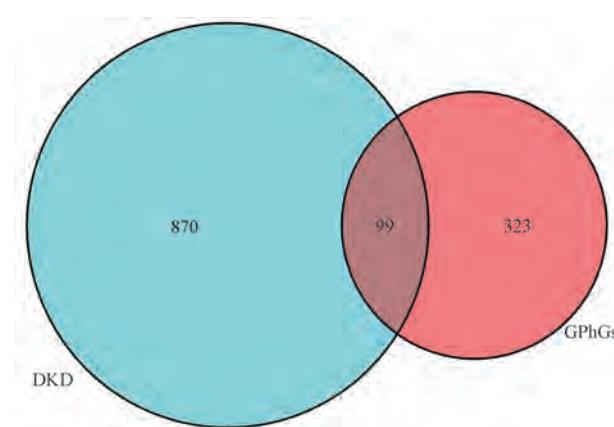


图 2 CPhGs 成分靶点与 DKD 交集靶点韦恩图

表其在网络中的自由度越大, 即该靶点在网络中更重要)。网络中关键节点蛋白主要是信号转导和转录激活因子 3

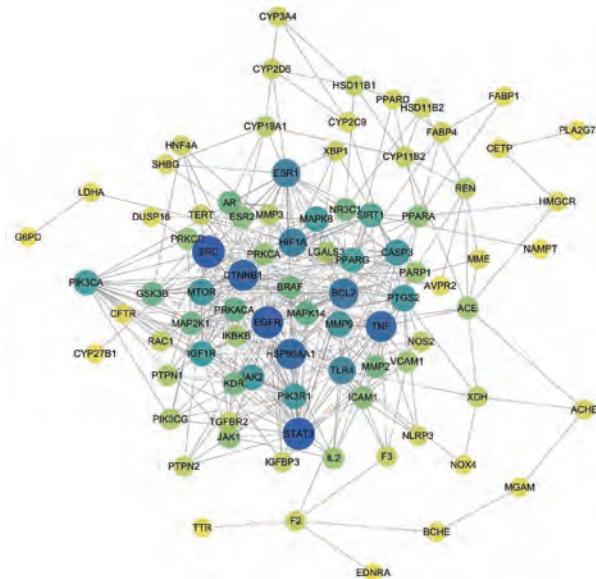


图 3 蛋白相互作用关系图

(STAT3, 37个)、非受体酪氨酸激酶 (SRC, 37个)、表皮生长因子受体 (EGFR, 36个)，在 PPI 网络中起着关键作用，可能是 CPhGs 治疗 DKD 的关键靶点。

使用 Cytoscape 软件中的 cytoHubba 插件对 PPI 网络中的核心靶点进行排序和提取, 得到网络中关联作用最强的前 20 位靶点, 前 3 个分别为 STAT3、EGFR、SRC, 在网络中的作用重要且稳定, 见图 4。

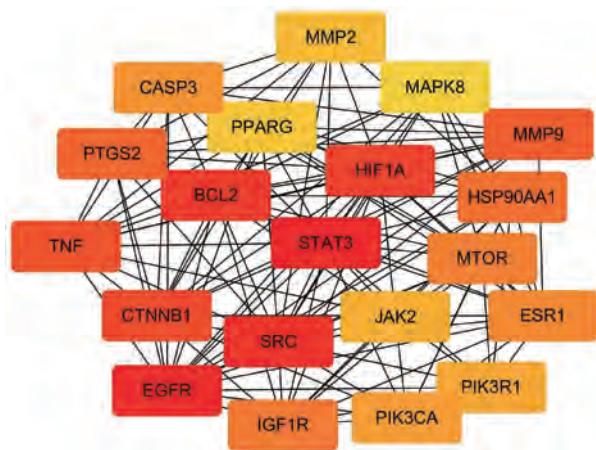


图 4 CytoHubba 中核心靶点

3.4 GO、KEGG 分析 GO 分析结果如图 5 所示, 交集靶点多数富集在细胞质、胞质溶胶、质膜、线粒体、核部位等生物细胞组成 (CC), 主要参与了细胞凋亡过程的负调控、对外源性刺激的反应、基因表达的负调控、对缺氧的反应、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控等生物过程 (BP), 涉及调解相同蛋白质结合、酶结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白激酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等分子功能 (MF)。

通过对交集靶点进行 KEGG 富集分析, 共得到 151 条靶点相关通路, 以靶点自由度为筛选条件对通路进行排序:

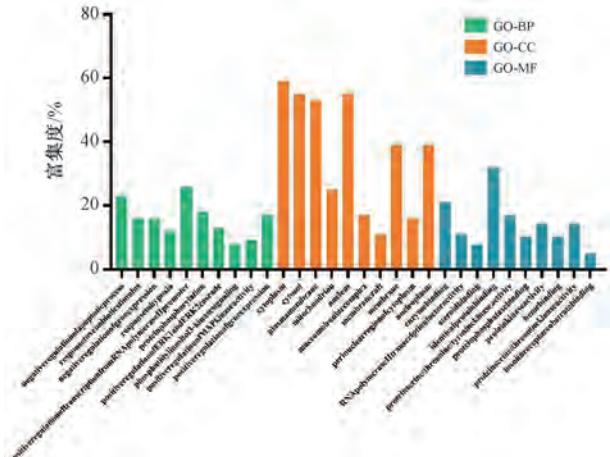


图 5 核心靶点 GO 分析

排名前 30 位的气泡图见图 6。由此可知, 主要通路为癌症的发病途径、脂质与动脉粥样硬化、癌症中的蛋白聚糖、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、内分泌抵抗, 可能为 CPhGs 中成分参与调节的关键通路。

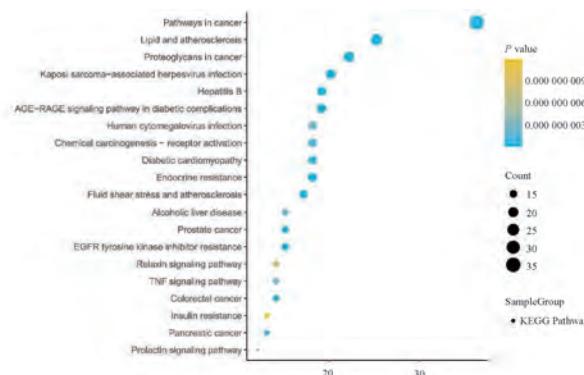


图 6 核心靶点 KEGG 分析

3.5 CPhGs 核心成分-靶点-通路网络构建 为了进一步探究 CPhGs 治疗 DKD 的可能作用机制, 将筛选得到的 16 种核心成分、99 个交集靶点和 20 条关键通路导入 Cytoscape 软件, 构建成分-靶点-通路网络, 见图 7 (图中菱形节点为 CPhGs 潜在成分, 圆形节点为 CPhGs 潜在活性成分与 DKD 交集靶点, 正方形节点为关键通路, 节点连线越多, 该节点在网络中越重要), 可知网络中节点之间联系紧密, 说明成分与靶点和通路之间存在潜在相互作用关系, 体现了中药多成分-多靶点-多途径治疗疾病的作用特点。

3.6 分子对接验证 如图 8 所示, 分别选取 16 种 CPhGs 核心成分和关键靶点 STAT3、SRC、EGFR 进行分子对接, 发现其结合能均小于 -6.0 kcal/mol , 表明所筛选的活性成分和关键靶点具有良好的结合活性, 排名前 9 位的分子对接模式见图 9。

3.7 动物实验

3.7.1 CPhGs 对 DKD 大鼠体质量、饮水量和肾脏指数的影响 如表 2 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠体质量降低 ($P<0.01$)。肾脏指数和饮水量均升高 ($P<0.01$)；与

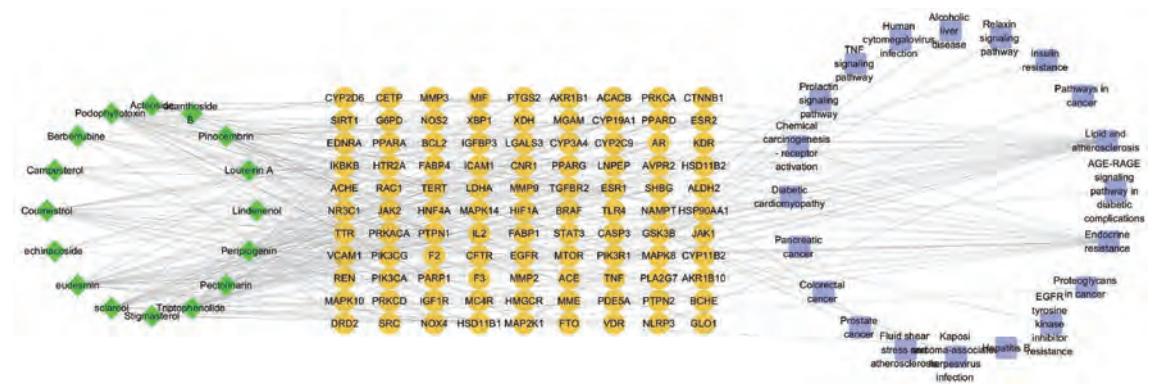


图 7 CPhGs 核心成分-靶点-通路网络图

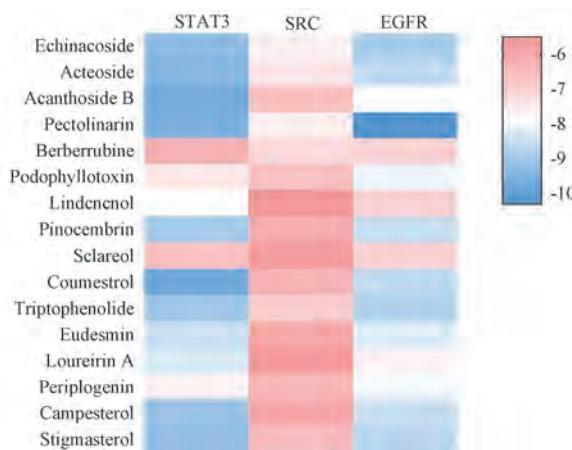


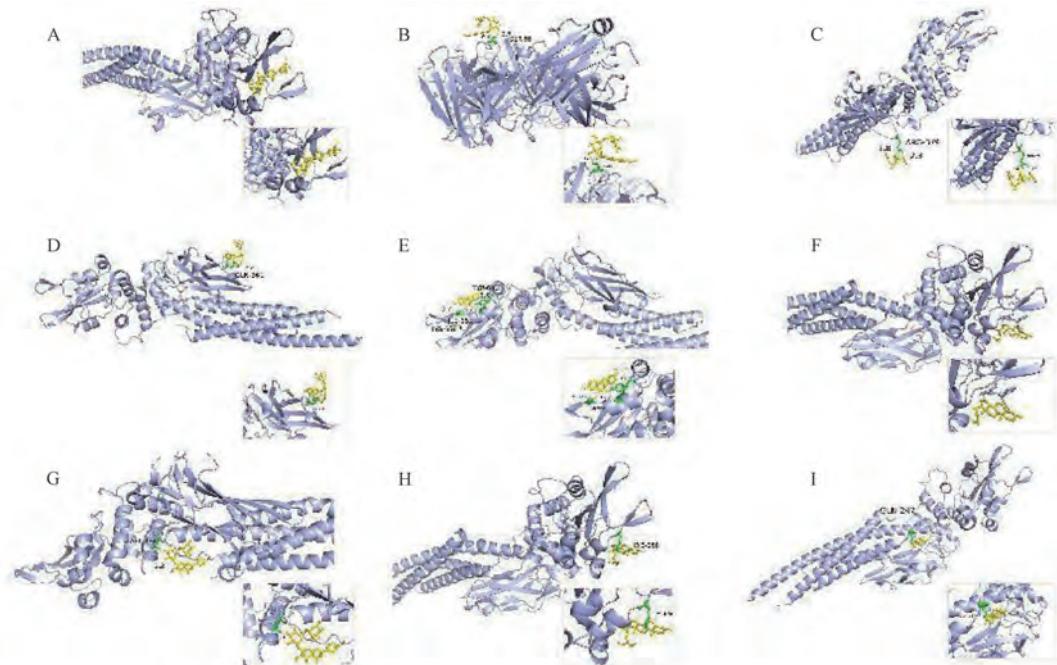
图 8 CPhGs 核心成分与靶点蛋白对接结合能热图

模型组比较, 达格列净组和 CPhGs 高、中剂量组大鼠体质量均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 达格列净组和 CPhGs 各剂量组饮水量和肾脏指数均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 以达格列净组和 CPhGs 高剂量组效果较好。

表 2 CPhGs 对 DKD 大鼠体质量、饮水量和肾脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	体质量/g	饮水量/mL	肾脏指数/%
正常组	525.50±30.52	38.70±5.70	0.555±0.038
模型组	380.50±32.35**	250.00±12.08**	1.105±0.093**
达格列净组	425.50±30.52##	219.60±8.71##	0.820±0.078##
CPhGs 高剂量组	416.60±22.61#	177.80±9.16##	0.794±0.039##
CPhGs 中剂量组	405.30±23.88#	203.00±15.83##	0.892±0.027##
CPhGs 低剂量组	393.00±24.30	221.50±10.14##	0.926±0.079#

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。



注: A 为 STAT3-无梗五加苷 B 为 EGFR-柳穿鱼叶苷, C 为 STAT3-毛蕊花糖苷, D 为 STAT3-松果菊苷, E 为 STAT3-香豆雌酚, F 为 STAT3-菜油甾醇, G 为 STAT3-柳穿鱼叶苷, H 为 STAT3-豆甾醇, I 为 STAT3-雷酚内酯。

图 9 分子对接模式图

3.7.2 CPhGs 对 DKD 大鼠空腹血糖和血脂的影响 如表 3 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠 FBG 及血清 TC、TG、LDL 水平均升高 ($P<0.01$), HDL 水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 达格列净组和 CPhGs 高剂量组大鼠 FBG 及血清 TC、TG、LDL 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), HDL

水平升高 ($P<0.01$), CPhGs 中剂量组大鼠 FBG 及血清 TG 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), HDL 水平升高 ($P<0.05$), CPhGs 低剂量组大鼠 FBG 及血清 TG 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 表明 CPhGs 可以改善 DKD 大鼠的血糖血脂水平, 并且有效逆转 TG 水平升高的现象。

表 3 CPhGs 对 DKD 大鼠 FBG 和血脂水平的影响 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	FBG	TG	TC	LDL	HDL
正常组	4.75±0.11	0.41±0.07	1.26±0.08	0.26±0.03	1.48±0.09
模型组	26.48±1.86 **	1.73±0.15 **	1.60±0.16 **	0.51±0.07 **	0.84±0.08 **
达格列净组	11.26±2.02 ##	0.49±0.07 ##	1.31±0.09 ##	0.28±0.04 ##	1.13±0.07 ##
CPhGs 高剂量组	18.28±2.94 ##	0.56±0.08 ##	1.34±0.19 *	0.39±0.07 ##	1.12±0.11 ##
CPhGs 中剂量组	19.98±4.15 *	0.73±0.08 ##	1.52±0.17	0.42±0.07	0.92±0.07 *
CPhGs 低剂量组	21.32±3.44 *	0.90±0.14 ##	1.59±0.10	0.49±0.09	0.89±0.07

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3.7.3 CPhGs 对 DKD 大鼠肾功能的影响 如表 4 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠 24-UTP 及血清 UA、BUN 水平均升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 达格列净组大鼠 24-UTP 及血清 UA、BUN 水平均降低 ($P<0.01$), CPhGs 高、中剂量组大鼠 24-UTP 及 BUN 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), CPhGs 低剂量组大鼠 24-UTP 水平降低 ($P<0.05$); CPhGs 各剂量组大鼠 UA 水平均未得到明显改善 ($P>0.05$)。

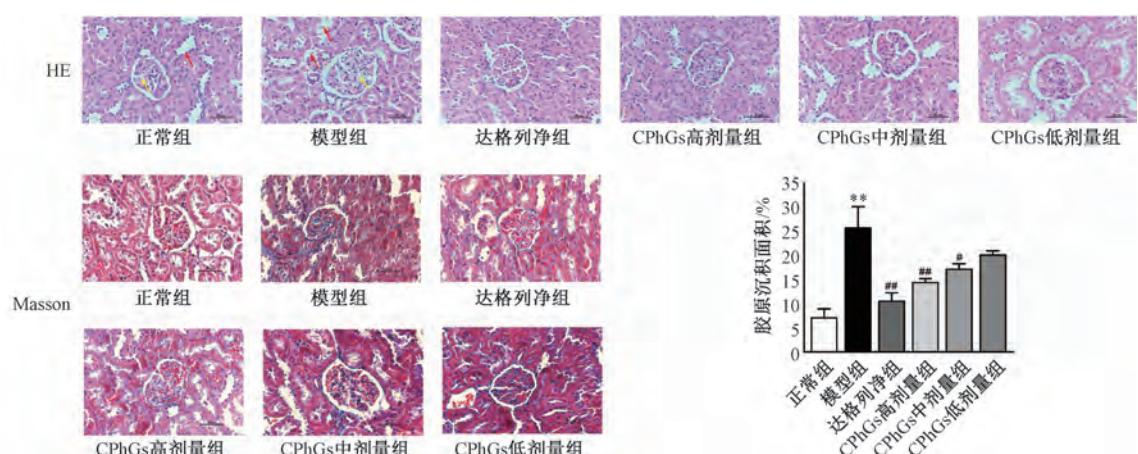
表 4 CPhGs 对 DKD 大鼠肾功能的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	24-UTP/mg	UA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	BUN/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
正常组	5.53±1.06	48.57±10.17	7.69±0.34
模型组	59.10±5.92 **	90.29±18.03 **	20.84±2.98 **
达格列净组	35.67±3.35 ##	69.71±10.36 ##	14.88±0.63 ##
CPhGs 高剂量组	44.12±5.11 ##	76.57±14.56	15.14±0.91 ##
CPhGs 中剂量组	48.27±4.52 ##	84.00±15.49	16.71±1.00 *
CPhGs 低剂量组	50.98±4.78 *	89.14±11.17	18.01±1.06

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

3.7.4 CPhGs 对 DKD 大鼠肾组织病理变化的影响 如图 10 所示, HE 染色中正常组大鼠肾小球和小管结构正常, 未见系膜或系膜基质增生, 无明显炎症细胞浸润; 模型组大鼠局灶性肾小管变性和萎缩, 肾小球肥大, 基底膜轻微增厚, 系膜增生; 与模型组比较, 达格列净组和 CPhGs 各剂量组大鼠肾组织病变减轻, 以达格列净组和 CPhGs 高剂量组改善更显著。Masson 染色中正常组大鼠胶原蛋白表达正常; 模型组大鼠肾小球系膜区和基底膜的胶原面积较正常组增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 达格列净组和 CPhGs 各剂量组大鼠胶原基质沉积均有不同程度的改善 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.7.5 CPhGs 对 DKD 大鼠血清炎症因子水平的影响 如表 5 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 达格列净组和 CPhGs 高、中剂量组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。



注: HE 染色图中红色箭头表示肾小管萎缩情况, 黄色箭头表示肾小球基底膜增厚情况。与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

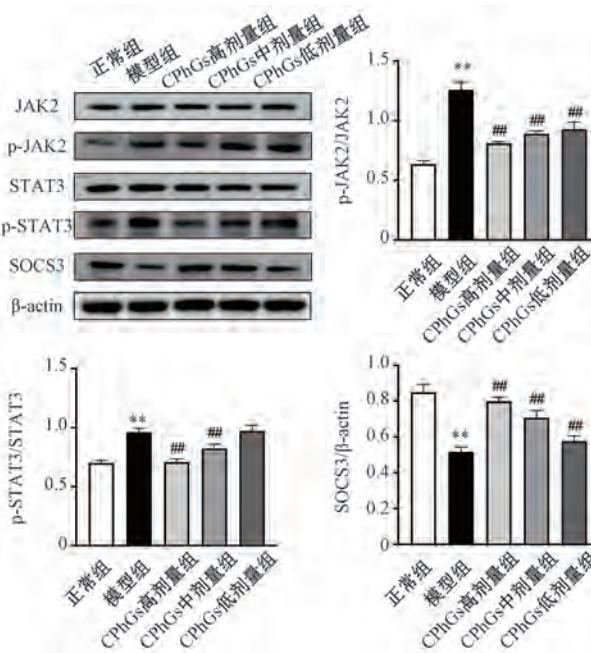
图 10 CPhGs 对 DKD 大鼠肾组织病理变化的影响 ($\times 400$, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

表5 CPhGs对DKD大鼠血清炎症因子水平的影响
(pg/mL, $\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常组	25.79±3.81	52.79±8.74	30.70±8.97
模型组	57.54±5.02 **	120.86±24.66 **	88.70±7.05 **
达格列净组	38.40±6.28 **	72.09±6.95 **	50.67±9.31 **
CPhGs高剂量组	40.40±5.03 **	66.27±3.74 **	56.82±8.86 **
CPhGs中剂量组	49.28±3.82 **	71.81±7.50 **	67.01±10.91 **
CPhGs低剂量组	52.25±9.50 *	83.46±9.09 **	71.75±9.05 **

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.7.6 CPhGs对DKD大鼠肾组织JAK2/STAT3信号通路及SOCS3蛋白表达的影响 如图11所示, 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达比值均升高 ($P < 0.01$), SOCS3蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CPhGs各剂量组大鼠肾组织p-JAK2/JAK2蛋白表达比值均降低 ($P < 0.01$), SOCS3蛋白表达均升高 ($P < 0.01$), CPhGs高、中剂量组大鼠肾组织p-STAT3/STAT3蛋白表达比值均降低 ($P < 0.01$)。



注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$ 。

图11 CPhGs对DKD大鼠肾组织JAK2/STAT3信号通路及SOCS3蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

4 讨论

DKD的主要临床特征为持续性白蛋白尿升高和肾小球滤过率进行性下降、尿白蛋白和肌酐比值升高、肾动脉高压、肾脏多功能丧失^[16], 以及肾小球肥大和肾小球系膜增宽和基底膜增厚、结节性肾小球硬化和足细胞丢失、肾小管萎缩和基底膜增厚、肾间质炎性浸润和纤维化和肾小球出入动脉玻璃样变等病理改变^[17]。目前研究表明, DKD发病机制是多因素的, 其中包括炎症与免疫^[18]、氧化应

激^[19]、肾组织纤维化^[20]、糖基化^[21]、DNA甲基化和非编码RNA的表观遗传^[22]、高血糖引起的血流动力学改变和代谢紊乱等。单一成分或靶点触发的通路往往只能改善部分指标, 且易导致不良反应, 而中药具有多成分、多途径、多靶点协同作用的特点^[23], 可从多方面改善DKD。本研究通过UHPLC-QE-MS分析得到CPhGs中化学成分, 运用网络药理学方法构建了“CPhGs成分-靶点-信号通路”网络, 辅以分子对接验证和动物实验评价药效, 探讨CPhGs治疗DKD的主要活性物质和潜在作用机制。

本研究发现, STAT3、SRC、EGFR为核心靶点, 分子对接验证结果显示, CPhGs核心成分与STAT3靶点结合能较低, 提示STAT3可能是CPhGs治疗DKD的关键靶点。JAK/STAT通路参与炎症、纤维化和细胞增殖等生理反应, 并且是高血糖导致肾损伤的主要机制^[24], 它主要由3个部分组成, 即酪氨酸激酶相关受体、酪氨酸激酶JAK和信号转导和转录激活因子STAT, 细胞外刺激因素与细胞表面的酪氨酸激酶相关受体结合后, 可导致结合受体亚基上的JAK相互靠近, 并相继磷酸化而被激活。JAK激酶可进一步使STAT磷酸化, 磷酸化的STAT转移到细胞核内, 结合于特定的基因启动子序列, 调控下游相应基因的表达, 是完成胞质到核内信号转导的重要信号转导途径^[25]。SOCS被认为是JAK/STAT通路的负调控因子, 而高糖诱导下JAK/STAT通路激活逆转了SOCS3的过度表达, 通过下调JAK/STAT信号通路可以缓解DKD发展进程^[26]。JAK2/STAT3通路作用于肾小球系膜细胞并介导SOCS3、IL-6、TNF- α 等因子水平, 激活炎症反应^[27]和氧化应激, 导致系膜细胞增殖, 进一步促进细胞外基质IV型胶原蛋白和纤维连接蛋白的分泌, 加重DKD发展。本研究结果表明, CPhGs可上调DKD大鼠肾组织SOCS3表达, 下调JAK/STAT信号通路以及IL-6、TNF- α 等下游炎症因子水平, 同时也验证了SOCS3负反馈调节JAK/STAT信号通路的作用。

综上所述, 本研究采用网络药理学和动物实验对CPhGs治疗DKD的作用机制进行了探索, 证实了它通过多成分、多靶点和多通路发挥治疗DKD的作用机制, 为进一步揭示其药理作用机制提供理论依据。

参考文献:

- [1] 翟丹, 苏卿. 芹菜素对糖尿病大鼠肾功能的保护作用及机制研究[J]. 中成药, 2023, 45(2): 630-634.
- [2] Bikbov B, Purcell C A, Levey A S, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet, 2020, 395(10225): 709-733.
- [3] Andrésdóttir G, Jensen M L, Carstensen B, et al. Improved survival and renal prognosis of patients with type 2 diabetes and nephropathy with improved control of risk factors [J]. Diabetes Care, 2014, 37(6): 1660-1667.
- [4] Look AHEAD Research Group. Effect of a long-term behavioural weight loss intervention on nephropathy in overweight or obese

- adults with type 2 diabetes: a secondary analysis of the Look AHEAD randomised clinical trial [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(10): 801-809.
- [5] 胡君萍, 曹丹丹, 居博伟, 等. 肉苁蓉苯乙醇总苷纳米乳在体鼻腔吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4896-4901.
- [6] Song Y, Zeng K, Jiang Y, et al. *Cistanches Herba*, from an endangered species to a big brand of Chinese medicine[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(3): 1539-1577.
- [7] Xiong W T, Gu L, Wang C, et al. Anti-hyperglycemic and hypolipidemic effects of *Cistanche tubulosa* in type 2 diabetic db/db mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3): 935-945.
- [8] Ran Z, Ju B, Cao L, et al. Microbiome-metabolomics analysis reveals the potential effect of verbascoside in alleviating cognitive impairment in db/db mice[J]. *Food Funct*, 2023, 14(8): 3488-3508.
- [9] Wen L, Hu J, Zhang J, et al. Phenylethanol glycosides from *Herba Cistanche* improve the hypoxic tumor microenvironment and enhance the effects of oxaliplatin via the HIF-1 α signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(1): 517.
- [10] 马晓晴, 王捷, 胡君萍, 等. 肉苁蓉苯乙醇总苷对庆大霉素诱导急性肾损伤大鼠的药效学研究[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(7): 942-946.
- [11] 何琴, 刘帆, 王鸿利, 等. 松果菊苷对糖尿病肾病大鼠肾功能、肾组织及系膜细胞损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(9): 1029-1036.
- [12] 居博伟, 杨建华, 胡君萍. 肉苁蓉苯乙醇苷对APP/PS1双转基因模型小鼠海马脑区 β 淀粉样蛋白表达的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(7): 1155-1162.
- [13] Yang J, Ju B, Hu J. Effects of phenylethanoid glycosides extracted from *Herba Cistanches* on the learning and memory of the APP/PS1 transgenic mice with Alzheimer's disease [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 1291549.
- [14] 郭金铭, 周峰, 谭洋, 等. 基于网络药理学探讨茯苓治疗糖尿病肾病的研究[J]. 中成药, 2020, 42(6): 1640-1646.
- [15] Su X, Yu W, Liu A, et al. San-Huang-Yi-Shen Capsule ameliorates diabetic nephropathy in rats through modulating the gut microbiota and overall metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 808867.
- [16] Yahya M J, Ismail P B, Nordin N B, et al. Association of CCL2, CCR5, ELMO1, and IL8 polymorphism with diabetic nephropathy in malaysian type 2 diabetic patients [J]. *Int J Chronic Dis*, 2019, 2019: 2053015.
- [17] Hinden L, Kogot-Levin A, Tam J, et al. Pathogenesis of diabetes-induced kidney disease: role of kidney nutrient sensing [J]. *FEBS J*, 2022, 289(4): 901-921.
- [18] Pérez-Morales R E, Del Pino M D, Valdivielso J M, et al. Inflammation in diabetic kidney disease [J]. *Nephron*, 2019, 143(1): 12-16.
- [19] Winiarska A, Knysak M, Nabrdalik K, et al. Inflammation and oxidative stress in diabetic kidney disease: The targets for SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10822.
- [20] Hung P H, Hsu Y C, Chen T H, et al. Recent advances in diabetic kidney diseases: From kidney injury to kidney fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11857.
- [21] Rabbani N, Thornalley P J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(4): 803-813.
- [22] Kato M, Natarajan R. Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(6): 327-345.
- [23] 田彦芳, 万海同, 朱紫烨, 等. 基于熵权法的多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺[J]. 中草药, 2016, 47(7): 1118-1125.
- [24] Bousoik E, Aliabadi H M. "Do We Know Jack" About JAK? A closer look at JAK/STAT signaling pathway [J]. *Front Oncol*, 2018, 31(8): 287.
- [25] Philips R L, Wang Y, Cheon H, et al. The JAK-STAT pathway at 30: Much learned, much more to do [J]. *Cell*, 2022, 185(21): 3857-3876.
- [26] Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, et al. Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(5): 763-772.
- [27] Yang W, Liu Y, Zhang S, et al. Epac activation ameliorates tubulointerstitial inflammation in diabetic nephropathy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(3): 659-671.