

- [9] Deng G, Gao Y, Cen Z, et al. miR-136-5p regulates the inflammatory response by targeting the IKK β /NF- κ B/A20 pathway after spinal cord injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(2): 512-524.
- [10] 张健美, 景永帅, 张丹参. 动脉粥样硬化的发病机制及治疗[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(6): 472.
- [11] 张东献, 张 伟, 满永宏. 阿魏酸钠对同型半胱氨酸致人脐静脉内皮细胞功能障碍的影响及机制[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(17): 1667-1670.
- [12] 张东献, 陶俊良, 满永宏, 等. 阿魏酸钠对 CXCL1 基因的调控在防治动脉粥样硬化中的应用: 中国, CN104306365A [P]. 2015-01-28.
- [13] 高 翔. 阿魏酸钠治疗冠心病效果及对机体血管内皮功能的保护作用观察[J]. 心理医生, 2018, 24(3): 95-96.
- [14] 韩 杨, 蒋知新. microRNA 在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(4): 441-444.
- [15] Gao Z, Li Q, Zhang Y, et al. Ripasudil alleviated the inflammation of RPE cells by targeting the miR-136-5p/ROCK/NLRP3 pathway[J]. *BMC Ophthalmol*, 2020, 20(1): 134.
- [16] 丁趁趁, 霍清萍. 核因子- κ B 抑制蛋白在动脉粥样硬化中的作用及其中医药研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(2): 222-224.
- [17] 刘继红, 冯 斌. miR-98 通过调控 ox-LDL 诱导血管内皮损伤抑制动脉粥样硬化形成的作用机制研究[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(8): 970-974.
- [18] 戴 淳, 宋金春. 甲基莲心碱对 LPS 诱导人脐血管内皮细胞损伤中 NF- κ B 信号通路及相关因子表达的影响[J]. 中国药物警戒, 2017, 14(3): 129-132.
- [19] 李 溪, 朱 晔, 吴培洁, 等. 吐根碱对人脐静脉内皮细胞增殖、迁移、侵袭的影响及机制[J]. 山东医药, 2019, 59(11): 18-21.

桂枝抗肾病综合征作用机制的网络药理学研究

何 丹, 李 强, 孙继佳, 陈少丽, 宋哲平, 都广礼*
(上海中医药大学 基础医学院, 上海 201203)

摘要:目的 运用网络药理学构建桂枝活性成分-靶点网络、PPI 网络,并结合体外实验对靶点涉及的主要通路进行分析,探讨桂枝对肾病综合征影响的作用机制。方法 采用 TCMSPP 数据库检索桂枝的化合物,并筛选其中 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18、Caco-2 $\geq$ -0.4 的主要活性成分;利用 Hitpick、SEA、SwissTargetPrediction 数据库预测桂枝活性成分的作用靶点;依托 DisGeNET、GeneCards、OMIM 数据库预测肾病综合征相关靶点,并与桂枝作用靶点取交集;通过 Cytoscape 软件构建活性成分-靶点网络;采用 String 数据库和 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络;通过 Autodock Vina 对靶点与活性成分进行分子对接验证;采用 DAVID 数据库对靶点进行 GO 及 KEGG 通路分析;对 MAPK 通路进行体外实验验证。结果 桂枝关键活性成分包括 β -谷甾醇、谷甾醇、桂皮醛等;关键蛋白涉及 VEGFA、MAPK3、SRC、PTGS2、MAPK8 等;KEGG 主要涉及 MAPK 等信号通路。体外实验中,桂枝主要成分桂皮醛降低了 p-p38 MAPK 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 桂枝主要通过调控 MAPK 等信号通路来发挥对肾脏的保护作用。

关键词: 桂枝;肾病综合征;网络药理学;分子对接;MAPK 信号通路;桂皮醛

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-2014-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.053

肾病综合征是一种由多种病因引起的常见肾小球疾病,是仅次于急性肾小球肾炎的第二大肾脏疾病,其临床表现主要为“三高一低”,即大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症以及水肿^[1-2]。流行病学调查发现,肾病综合征发病率为 2/100 000~10/100 000,且好发于男性儿童^[3],该病并发症多、疗效差、复发率高,给人们的生活和健康带来巨大压力^[4]。因此,探讨肾病综合征发病机制,寻找安全有效的治疗药物是一个亟待解决的问题^[5]。

桂枝味辛、甘,性温,归肺、心、膀胱经,功能发汗解肌、温通经脉、通阳化气。研究表明桂枝可提高肾病综合征的临床疗效^[6],且本课题组前期研究也发现,桂枝对阿霉素肾病大鼠具有肾功能保护作用^[7]。目前,关于桂枝的药理作用研究报道较多,但不够全面系统,尚不能明确阐述桂枝通阳化气利水方面的作用机制。

网络药理学作为中药研究的一种新思路,其多成分-多靶点-多通路的整体调控思维方法已被广泛应用于预测中药

收稿日期: 2021-09-22

基金项目: 上海中医药大学“杏林传承型人才培养计划”(上中医人字〔2019〕24号)

作者简介: 何 丹 (1990—),女,博士生,从事方剂配伍规律的理论 and 实验研究。Tel: 18217434056, E-mail: danhe2020@163.com

*通信作者: 都广礼 (1970—),男,教授,从事方剂配伍的理论及机制研究。Tel: 13916195505, E-mail: duguangli2002@126.com

主要活性成分、阐明中药作用机制^[8-9]，在新的层面为中药赋予新的科学内涵。本研究尝试运用网络药理学方法进行桂枝对肾病综合征影响的作用机制研究，对其机制进行预测分析，以期对肾病综合征的后续临床治疗提供理论支撑及科学参考。

1 网络药理学

1.1 软件与数据库 TCSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、HitPick 数据 (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/hitpick/cgi-bin/index.cgi?content=help.html>)、SEA 数据库 (<http://sea.bkslab.org/>)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>)、DisGeNET 数据库 (<http://disgenet.org/home/>)、GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)、Venny 软件 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)、Cytoscape 软件 (<http://www.cytoscape.org/>)、string 数据库 (<https://string-db.org/>)、RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>)、Pymol 软件 (<https://pymol.org/2/>)、PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、AutoDockTools 软件 (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>)、Autodock Vina 软件 (<http://vina.scripps.edu/>)、DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)。

1.2 桂枝化合物的获取与活性成分的筛选 通过 TCSP 数据库，以“桂枝”为关键词，检索桂枝的主要化合物，并筛选其中口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 、细胞渗透性 (Caco-2) ≥ -0.4 的主要活性成分。

1.3 药物靶点的获取 利用 Hitpick、SEA、SwissTargetPrediction 数据库的药物靶点预测功能，收集桂枝主要活性成分的作用靶点。将“1.2”项下筛选获得的桂枝主要活性成分分别输入 Hitpick、SEA、SwissTargetPrediction 数据库，选择物种为 *Homo sapiens*，获取对应的药物靶点，然后将 3 个数据库所预测靶点合并后删除重复项即所需药物靶点。

1.4 肾病综合征相关靶点的筛选 以“nephrotic syndrome”“adriamycin nephropathy”为关键词，利用 DisGeNET、GeneCards、OMIM 数据库预测肾病综合征相关疾病基因，去重后利用 Venny2.1.0 与桂枝主要活性成分的作用靶点取交集，得到桂枝治疗肾病综合征相关疾病的潜在作用靶点。

1.5 活性成分-靶点网络构建 将活性成分以及药物与疾病的交集靶点输入 Cytoscape 软件构建化学成分-靶点网络。活性成分节点大小以 degree 值大小为依据，节点越大，活性成分 degree 值越大。

1.6 PPI 网络构建 采用 String 数据库和 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络，将桂枝的作用靶点导入 String 数据库，设置 Organism 参数为 *Homo Sapiens*，获取蛋白相互作用文件，将文件导入 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络。

1.7 GO 和 KEGG 分析 采用 DAVID 数据库对靶点进行

GO 功能富集及 KEGG 通路分析，筛选 $P < 0.05$ 的 GO 条目，包括生物过程 (Biological Process, BP)、细胞组分 (Cellular Component, CC)、分子功能 (Molecular function, MF) 及 KEGG 信号通路，并绘制相应气泡图。

1.8 分子对接 从上述 PPI 网络中筛选出 degree 值排名前 5 位的靶点与 degree 值排名前 4 位的活性成分进行分子对接验证，使用 Autodock Vina 进行分子对接，结合能 (affinity) 越小，说明靶蛋白与活性成分之间的相互作用越稳定。

2 细胞实验

2.1 细胞 人肾小管上皮细胞 (HK-2) 购自中国科学院上海细胞库 (目录号 SCSP-511)，接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基，置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养，贴壁生长，当细胞生长到 80% 左右时进行实验。

2.2 药物 盐酸阿霉素购自上海沃凯化学试剂有限公司 (货号 25316-40-9)；桂皮醛购自上海源叶生物科技有限公司 (货号 104-55-2)。

2.3 细胞活力检测 MTT 法检测阿霉素、桂皮醛对 HK-2 的细胞毒性和细胞增殖能力，确定阿霉素的 IC₅₀ 及桂皮醛的无细胞毒性范围。HK-2 细胞以 5×10^3 /mL 密度接种于 96 孔板，培养过夜后，用不同质量浓度的桂皮醛 (0.312 5、0.625、1.25、2.5、5、10 μg/mL) 预处理 2 h，再用 16 μg/mL 阿霉素孵育 24 h。每孔加入 20 μL MTT 溶液，4 h 后去上清，加入 150 μL DMSO，用酶标仪在 570 nm 波长处测定光密度 (OD) 值。实验每组 5 个复孔，重复 3 次。

2.4 ROS 水平的检测 HK-2 细胞以 3.5×10^4 /mL 密度接种于 6 孔板，培养过夜后，分别用低、中、高剂量 (1.25、2.5、5 μg/mL) 桂皮醛预处理 2 h，再用 16 μg/mL 阿霉素孵育 24 h。每孔加入无血清培养基稀释的终浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA 荧光素 500 μL，避光孵育 30 min 并不时轻轻摇晃，PBS 洗掉探针后荧光显微镜下观察并拍摄图片，并用 Image J 软件分析荧光强度。

2.5 Western blot 法检测 p38MAPK、p-p38MAPK 的蛋白表达 HK-2 细胞以 3×10^5 /mL 密度接种于 6 孔板，过夜后用低、中、高剂量桂皮醛预处理 2 h，再用 16 μg/mL 阿霉素孵育 24 h。收集各组细胞，用 PBS 清洗后裂解，提取细胞全蛋白，用 BCA 法进行蛋白定量。常规电泳、转膜，孵育一抗、二抗，曝光、显影，得到蛋白条带图，并用 Image J 软件分析灰度值。

2.6 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间均数比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 桂枝活性成分 TCSP 数据库共收录桂枝化合物 220 种，其中 OB $\geq 30\%$ 、DL ≥ 0.18 、Caco-2 ≥ -0.4 的主要活性成分共 7 种。桂皮醛 (cinnamaldehyde) OB = 31.99%、DL = 0.02、Caco-2 = 1.35，不在主要活性成分筛选结果内，

但本课题组前期研究发现，桂皮醛可能是桂枝的重要活性成分^[7]。因此，本研究将桂皮醛纳入候选活性成分，见表 1。

表 1 桂枝的主要活性成分

编号	活性成分	中文名称	OB/%	DL	Caco-2
MOL001736	(-)-taxifolin	(-)-花旗松素	60. 51	0. 27	-0. 24
MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇	36. 91	0. 75	1. 32
MOL000359	sitosterol	谷甾醇	36. 91	0. 75	1. 32
MOL000492	(+)-catechin	儿茶素	54. 83	0. 24	-0. 03
MOL000073	ent-epicatechin	表儿茶素	48. 96	0. 24	0. 02
MOL004576	taxifolin	花旗松素	57. 84	0. 27	-0. 23
MOL011169	peroxyergosterol	过氧麦角甾醇	44. 39	0. 82	0. 86
MOL000991	cinnamaldehyde	桂皮醛	31. 99	0. 02	1. 35

3.2 桂枝药物靶点 将桂枝的 8 个主要活性成分输入 Hitpick、SEA、SwissTargetPrediction 数据库，分别收集到 7、89、261 个作用靶点，合并之后删除重复项，共筛选出 317 个潜在作用靶点。

3.3 肾病综合征相关疾病靶点 在 DisGeNET、GeneCards、OMIM 数据库中 输入 关 键 词 “nephrotic syndrome” “adriamycin nephropathy”，共有 2 125 个靶点。利用 Venny2. 1. 0 与桂枝药物靶点取交集（图 1），最终得到 93 个桂枝可能作用于肾病综合征相关疾病的潜在作用靶点，见表 2。

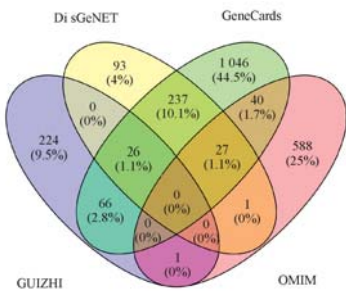


图 1 桂枝与肾病综合征的韦恩图

表 2 桂枝与肾病综合征的交集靶点

编号	基因	编号	基因	编号	基因	编号	基因
1	ABCB1	25	CYP3A4	48	ITGAL	71	PLA2G7
2	ABCC2	26	DNMT1	49	ITGB2	72	PPARA
3	ABCG2	27	DUSP1	50	KAT2B	73	PRKCB
4	ACE	28	ELANE	51	KCNH2	74	PRKCD
5	ACHE	29	ELAVL1	52	KDR	75	PSEN1
6	ACP1	30	ESR1	53	MAP2K1	76	PTGS2
7	AKR1B1	31	ESR2	54	MAPK14	77	PTK2B
8	AKR1B10	32	F10	55	MAPK3	78	PTPN11
9	ALK	33	F2	56	MAPK8	79	PTPN2
10	APP	34	F2R	57	MAPT	80	PTPRC
11	AR	35	F3	58	MCL1	81	RELA
12	AVPR1A	36	FABP1	59	MDM2	82	SLC6A2
13	CASR	37	G6PD	60	MET	83	SNCA
14	CCR1	38	GC	61	MMP12	84	SRC
15	CD4	39	GLO1	62	MPO	85	TGM2
16	CDK4	40	HDAC2	63	NFE2L2	86	TLR4
17	CTSB	41	HIF1A	64	NOS1	87	TOP1
18	CTSL	42	HMGCR	65	NOS2	88	TRPA1
19	CYP11B2	43	HSD11B1	66	NOS3	89	TYMP
20	CYP19A1	44	HSD11B2	67	NR1H2	90	TYMS
21	CYP1A1	45	HTR2B	68	NR3C1	91	VDR
22	CYP1B1	46	ICAM1	69	PARP1	92	VEGFA
23	CYP2A6	47	IGF1R	70	PLA2G1B	93	XDH
24	CYP2C19						

3.4 活性成分-靶点网络构建与分析 将 93 个交集靶点输入 Cytoscape 软件中构建活性成分-靶点相互作用网络（图 2），共有 101 个节点，169 个边。其中橙色圆形节点表示活

性成分，黄色倒三角形表示作用靶点。不同活性成分对应不同作用靶点，体现了桂枝多成分-多靶点的特点。其中，beta-sitosterol、sitosterol、cinnamaldehyde、peroxyergosterol 的

degree 值分别为 37、37、36、29，可能为该网络中较为重要的活性成分，见表 3。

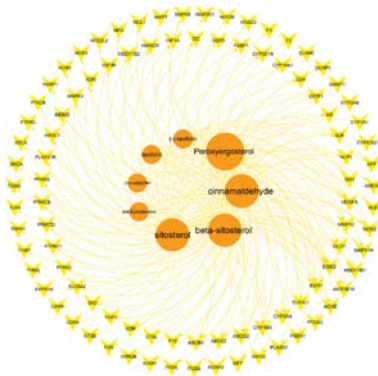


图 2 活性成分-靶点网络

表 3 桂枝主要活性成分 degree 值

编号	活性成分	中文名称	degree 值
MOL000359	sitosterol	谷甾醇	37
MOL000358	beta-sitosterol	β -谷甾醇	37
MOL000991	cinnamaldehyde	桂皮醛	36
MOL011169	peroxyergosterol	过氧麦角甾醇	29
MOL001736	(-)-taxifolin	(-)-花旗松素	12
MOL004576	taxifolin	花旗松素	12
MOL000492	(+)-catechin	儿茶素	3
MOL000073	ent-epicatechin	表儿茶素	3

3.5 PPI 网络构建与分析 将 93 个交集靶点导入 String 数据库，把所得信息导入 Cytoscape 软件构建 PPI 网络（图 3A），图中共涉及节点 93 个，边 1 478 条，其中节点代表蛋白，边代表蛋白之间的相互作用关系，节点的大小和颜色反映 degree 值的大小，节点越大，颜色由黄变紫表示 degree 值越大，边的粗细反映 combine score 的大小，边越

粗代表 combine score 值越大。根据 degree 值大小绘制了排名前 10 的靶蛋白条形图（图 3B）。其中，VEGFA、MAPK3、SRC、PTGS2、MAPK8 的 degree 值分别为 58、52、49、43、42，是该网络图的核心节点，提示可能在桂枝对肾病综合征保护作用中发挥关键作用。

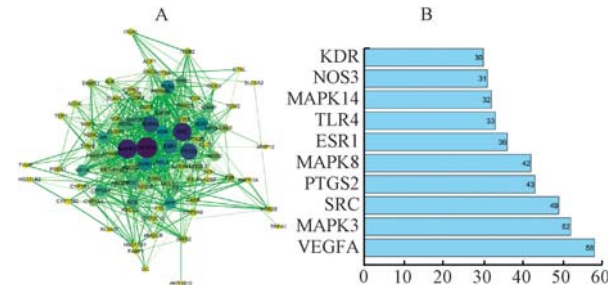


图 3 PPI 网络图 (A) 与靶蛋白条形图 (B)

3.6 GO 和 KEGG 分析 将 93 个交集靶点导入 DAVID 数据库，筛选 $P < 0.05$ 的 GO 条目及 KEGG 信号通路。通过 GO 功能富集分析发现，BP 相关的条目共 524 个，主要涉及刺激反应、细胞增殖、凋亡及代谢等；CC 相关的条目共 45 个，主要涉及细胞表面、质膜部分及微粒体等；MF 相关的条目共 76 个，主要涉及类固醇结合、血红素结合、铁离子结合及酶结合等。说明肾病综合征作为一种复杂的疾病涉及多种生物过程，桂枝可以通过调节这些生物过程来发挥对肾病综合征的保护作用。通过 KEGG 信号通路分析发现，交集靶点映射出 42 条信号通路，主要涉及 MAPK 等信号通路，表明桂枝可能主要通过 MAPK 信号通路来发挥对肾病综合征的保护作用。根据 P 值分别选取 BP、CC、MF 排名前 10 的条目绘制 GO 富集分析气泡图（图 4）。根据 P 值选取 KEGG 排名前 30 的信号通路绘制 KEGG 富集分析气泡图（图 5）。

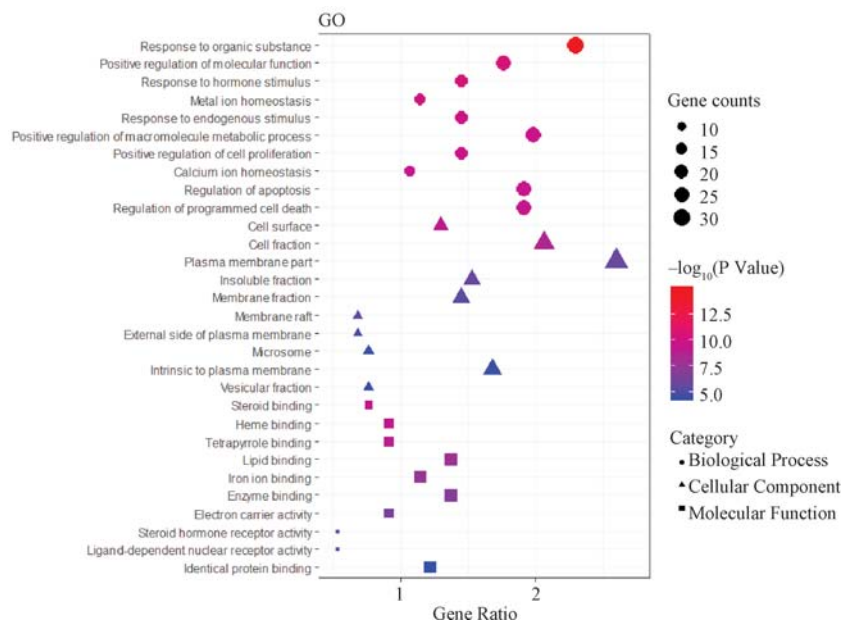


图 4 GO 富集分析气泡图

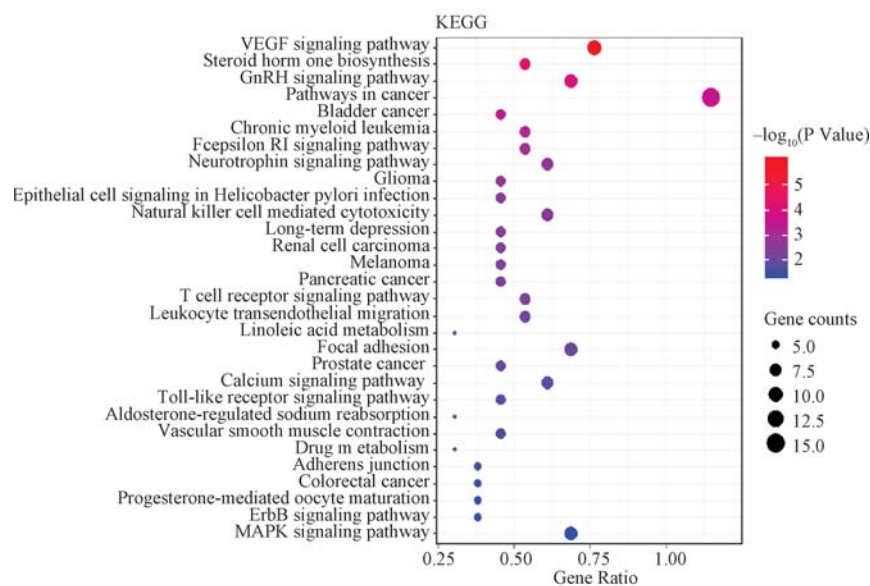


图 5 KEGG 富集分析气泡图

3.7 分子对接 对 PPI 网络中 degree 值排名前 5 的重要靶点（表 4）进行分子对接验证，发现这 5 个重要靶点与桂枝活性成分均具有较好结合活性见表 5。

表 4 PPI 网络中 degree 值排名前 5 的靶点

编号	靶点名称	PDB ID	degree 值
1	VEGFA	6BFT	58
2	MAPK3	2ZOQ	52
3	SRC	6HTY	49
4	PTGS2	5IKV	43
5	MAPK8	4L7F	42

表 5 靶点与活性成分的分子对接结果

靶点名称	PDB ID	活性成分	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)
VEGFA	6BFT	过氧麦角甾醇	-6.8
		β-谷甾醇	-6.4
		谷甾醇	-6.3
		桂皮醛	-4.9
MAPK3	2ZOQ	β-谷甾醇	-8.7
		过氧麦角甾醇	-8.1
		谷甾醇	-7.3
		桂皮醛	-5.4
SRC	6HTY	过氧麦角甾醇	-8.7
		β-谷甾醇	-8.5
		谷甾醇	-8.5
		桂皮醛	-6.6
PTGS2	5IKV	桂皮醛	-6.1
		过氧麦角甾醇	-3.8
		β-谷甾醇	-3.7
		谷甾醇	-3.7
MAPK8	4L7F	β-谷甾醇	-9.8
		谷甾醇	-9.8
		过氧麦角甾醇	-8.5
		桂皮醛	-6.0

3.8 桂皮醛对细胞活力的影响 如图 6A 所示，阿霉素的

IC₅₀ 为 16 μg/mL，故选择 16 μg/mL 作为 HK-2 造模剂量。如图 6B 所示，与空白组比较，桂皮醛质量浓度小于 10 μg/mL 时对细胞没有抑制作用（ $P>0.05$ ），可认定为对 HK-2 无细胞毒性，当桂皮醛质量浓度增加到 20 μg/mL 时，细胞活力下降至 50% 左右，具有细胞毒性（ $P<0.01$ ）。如图 6C 所示，与模型组比较，桂皮醛在 5 μg/mL 时有细胞增殖作用（ $P<0.05$ ），因此，在后续实验中，桂皮醛剂量限制在 5 μg/mL 以下。

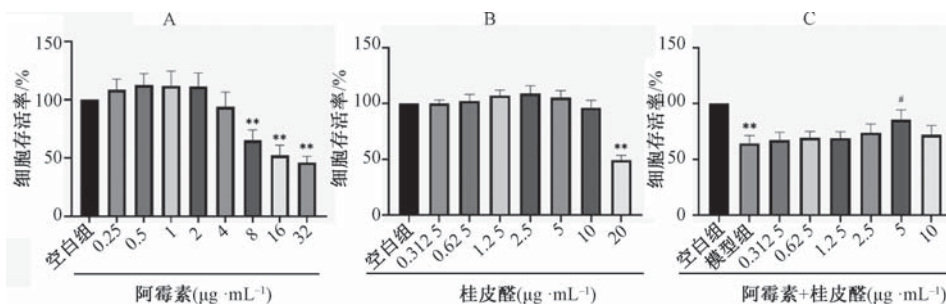
3.9 桂皮醛对细胞 ROS 水平的影响 如图 7 所示，与空白组比较，模型组 HK-2 细胞 ROS 水平升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，桂皮醛中、高剂量组降低了 HK-2 细胞 ROS 水平（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。

3.10 桂皮醛对 HK-2 细胞 MAPK 信号通路的影响 如图 8 所示，与空白组比较，模型组 HK-2 细胞 p-p38 MAPK 蛋白表达升高（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，桂皮醛处理降低了 p-p38 MAPK 的蛋白表达（ $P<0.05$ ），且呈剂量依赖性。

4 讨论

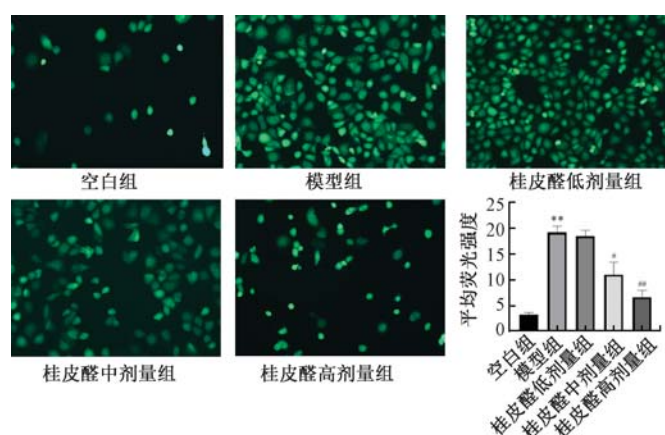
肾病综合征总属本虚标实，虚实错杂之证^[10]。《景岳全书·肿胀》中指出“凡水肿等证，乃肺脾肾三脏相干之病”，故肺失通调、脾失健运、肾失开合，最终致膀胱气化无权，三焦水道失畅，发而为水肿。《诸病源候论》言“水病者，由肾脾俱虚故也，肾虚不能宣通水气，脾虚又不能制水，故水气盈溢，渗水皮肤，流遍四肢，所以遍身肿也”。裘沛然教授认为，肾病综合征的治疗主要以补肺健脾益肾，行气利水祛湿为主^[11]。桂枝具有发汗解表、散寒止痛、通阳化气之功效，可使停蓄之水经由肌表、小便分消，水湿尽去。

本研究通过网络药理学方法探讨了桂枝对肾病综合征影响的作用机制。从活性成分-靶点网络图中发现，β-谷甾醇、谷甾醇、桂皮醛、过氧麦角甾醇为该网络中较为重要的活性成分。其中，桂皮醛是烯醛类有机化合物，是桂枝



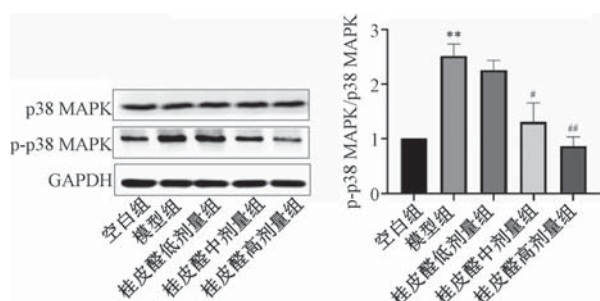
注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ 。

图 6 阿霉素、桂皮醛对 HK-2 细胞毒性及桂皮醛对阿霉素诱导 HK-2 细胞的增殖作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 7 桂皮醛对 HK-2 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 8 桂皮醛对 HK-2 细胞 MAPK 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

发挥利尿作用的主要成分，具有抗炎^[12]、抗肿瘤^[13]、降压^[14]、降脂^[15]、降糖^[16]、保护血管内皮功能^[17]等多种药理活性，可从多方面发挥对肾脏的保护作用。分子对接结果显示，桂皮醛与关键靶点具有较好的结合性能。本课题组前期研究也发现，桂皮醛是桂枝的主要活性成分，对阿霉素肾病大鼠具有保护作用^[7]。因此，后续细胞实验中选取桂皮醛进行实验验证。

KEGG 分析结果表明，关键靶点主要富集在 MAPK 等信号通路上，且与肾脏疾病密切相关。MAPK 信号通路可通过氧化应激、触发炎症因子及活化炎症途径等过程，参

与肾脏功能及器质改变，引起蛋白尿和肾小球硬化^[18]。Munkonda 等^[19]发现，MAPK 还可促进近端小管病变，进而介导肾脏疾病的发展。Zhang 等^[20]用 HK-2 细胞模拟体外肾损伤，发现三乙酰曲霉蛋白过表达可降低阿霉素引起的不良后果，从而预防肾损伤。

氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态，能制造过氧化物与自由基而产生毒性作用，损害细胞的蛋白质、脂类和核酸^[21-22]。研究报道，阿霉素可造成肾小管细胞的氧化应激损伤^[23-24]。ROS 是氧化应激的重要指标，Hermle 等^[25]研究发现，ROS 的形成可能是肾病的潜在发病机制。

本研究采用阿霉素诱导 HK-2 细胞模拟体外肾损伤，结果显示，阿霉素处理升高了 HK-2 细胞 ROS 水平，桂皮醛干预后 ROS 水平下降，说明桂皮醛可以减轻阿霉素诱导的 HK-2 细胞氧化损伤。此外，在阿霉素的刺激下，MAPK 信号通路中的 p38 MAPK 被激活，而桂皮醛干预后可减轻 p38 MAPK 磷酸化水平。因此，可以推测桂皮醛可能通过抗氧化应激作用抑制 MAPK 通路的激活从而减轻肾损伤。

综上所述，桂皮醛是桂枝的主要活性成分，桂枝可能通过抑制氧化应激以及对 MAPK 信号通路的干预，来达到对肾脏的保护作用。

参考文献：

[1] 王站旗. 肾病综合征中医治疗的研究进展述评[J]. 现代诊

- 断与治疗, 2016, 27(15): 2790-2792.
- [2] Krishnan R G. Nephrotic syndrome[J]. *Paediatr Child Health (Oxford)*, 2012, 22(8): 337-340.
 - [3] Shah S S, Akhtar N, Sunbleen F, *et al.* Histopathological patterns in paediatric idiopathic steroid resistant nephrotic syndrome[J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2015, 27(3): 633-636.
 - [4] Aaltonen S, Honkanen E. Outcome of idiopathic membranous nephropathy using targeted stepwise immunosuppressive treatment strategy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(9): 2871-2877.
 - [5] Eckardt K U, Coresh J, Devuyst O, *et al.* Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden[J]. *Lancet*, 2013, 382(9887): 158-169.
 - [6] 金汝真, 余仁欢, 高 辉, 等. 五苓散与五苓汤治疗肾病综合征水湿内停证的临床对照研究[J]. 中医杂志, 2012, 53(7): 572-573; 577.
 - [7] 张倩霞, 陈少丽, 文小平, 等. 五苓散要药" 桂枝" 在五苓散对阿霉素肾病大鼠肾脏保护中的作用[J]. 中医杂志, 2019, 60(2): 150-154.
 - [8] Barlow D J, Buriani A, Ehrman T, *et al.* *In-silico* studies in Chinese herbal medicines' research: Evaluation of *in-silico* methodologies and phytochemical data sources, and a review of research to date [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(3): 526-534.
 - [9] Dai W, Chen J X, Lu P, *et al.* Pathway Pattern-based prediction of active drug components and gene targets from H1N1 influenza's treatment with maxingshigan-yinqiaosan formula[J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9(3): 375-385.
 - [10] 郑东海, 郑伟鸿, 郑伟达, 等. 郑伟达教授肾病综合征治验[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(7): 666-668.
 - [11] 刘淑红, 高尚社. 国医大师裘沛然辨治肾病综合征验案赏析[J]. 光明中医, 2011, 26(4): 654-656.
 - [12] Kim B H, Lee Y G, Lee J, *et al.* Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses[J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2021: 529359.
 - [13] Lin L T, Tai C J, Chang S P, *et al.* Cinnamaldehyde-induced apoptosis in human hepatoma PLC/PRF/5 cells involves the mitochondrial death pathway and is sensitive to inhibition by cyclosporin A and z-VAD-fmk[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(10): 1565-1574.
 - [14] Yao Y, Huang H Y, Yang Y X, *et al.* Cinnamic aldehyde treatment alleviates chronic unexpected stress-induced depressive-like behaviors *via* targeting cyclooxygenase-2 in mid-aged rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 97-103.
 - [15] Huang B, Yuan H D, Kim D Y, *et al.* Cinnamaldehyde prevents adipocyte differentiation and adipogenesis *via* regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(8): 3666-3673.
 - [16] Nikzamir A, Palangi A, Kheirollahi A, *et al.* Expression of glucose transporter 4 (GLUT4) is increased by cinnamaldehyde in C2C12 mouse muscle cells[J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2014, 16(2): e13426.
 - [17] Wang F, Pu C H, Zhou P, *et al.* Cinnamaldehyde prevents endothelial dysfunction induced by high glucose by activating Nrf2[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1): 315-324.
 - [18] Hakim F A, Pflueger A. Role of oxidative stress in diabetic kidney disease [J]. *Med Sci Monit*, 2010, 16(2): RA37-RA48.
 - [19] Munkonda M N, Akbari S, Landry C, *et al.* Podocyte-derived microparticles promote proximal tubule fibrotic signaling *via* p38 MAPK and CD36 [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1432206.
 - [20] Zhang Q, Wu G, Guo S Y, *et al.* Effects of tristetraprolin on doxorubicin (adriamycin) -induced experimental kidney injury through inhibiting IL-13/STAT6 signal pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(4): 1203-1221.
 - [21] Hu H L, Batteux F, Chéreau C, *et al.* Clopidogrel protects from cell apoptosis and oxidative damage in a mouse model of renal ischaemia-reperfusion injury [J]. *J Pathol*, 2011, 225(2): 265-275.
 - [22] Li W N, Han H, Jing Z Y, *et al.* Mitochondrial oxidative damage and apoptosis induced by high glucose through Rho kinase signal pathway in renal tubular epithelial cells[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2018, 11(6): 399-404.
 - [23] Khan T H, Ganaie M A, Alharthy K M, *et al.* Naringenin prevents doxorubicin-induced toxicity in kidney tissues by regulating the oxidative and inflammatory insult in Wistar rats [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2020, 126(4): 300-307.
 - [24] Tian T, Li J, Wang M Y, *et al.* Protective effect of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) on adriamycin-induced toxicity of human renal tubular epithelial cell (HK-2) [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 683(1-3): 246-251.
 - [25] Hermle T, Braun D A, Helmstädter M, *et al.* Modeling monogenic human nephrotic syndrome in the *Drosophila* garland cell nephrocyte [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(5): 1521-1533.