

基于网络药理学和动物实验探讨济生肾气丸防治慢性肾脏病的作用

崔言坤^{1,2}, 王琳¹, 黄艳美², 陈丽梅³, 姜劼琳¹, 左铮云², 刘超^{3*}, 姚凤云^{1,2*}
(1. 江西中医药大学中医学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医药大学方-证研究中心, 江西 南昌 330004; 3. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006)

摘要: **目的** 基于网络药理学结合大鼠实验探讨济生肾气丸防治慢性肾脏病 (CKD) 的作用。**方法** 通过 TCMSP、PharmMapper、ETCM 数据库获取济生肾气丸活性成分和作用靶点, 通过 GeneCards、OMIM、TTD 数据库获取 CKD 相关靶点, 纳入 GSE62792 数据集差异基因。通过 STRING 数据库建立 PPI 网络, Cytoscape 软件构建“药物-成分-靶点”网络, 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 基于 AutoDockTools 对活性成分和关键靶点进行分子对接。通过腺嘌呤灌胃 4 周诱导建立 CKD 大鼠模型, 将模型大鼠随机分为模型组和济生肾气丸高、中、低剂量组 (43.2、21.6、10.8 g/kg), 给药 4 周后, 麻醉取材。Masson 染色观察肾组织病理变化, 生化法检测 24 h 尿蛋白、SCr、BUN 水平, ELISA 法检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, Western blot 法检测肾组织 p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达。**结果** 共筛选获得济生肾气丸活性成分 102 种, 对应靶点 645 个, 疾病靶点 2 168 个, 得到交叉靶点 232 个。靶点富集于 1 321 条生物过程, 130 条分子功能条目, 192 条 KEGG 信号通路。分子对接结果显示, 济生肾气丸核心成分与靶点具有稳定结合活性。Masson 染色显示, 济生肾气丸可缓解 CKD 大鼠肾脏组织纤维化。与模型组比较, 济生肾气丸各剂量组大鼠 24 h 尿蛋白, 血清 SCr、BUN 水平, 肾组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平和 p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 济生肾气丸可能是通过调控 p38 MAPK 和 ERK1/2 信号通路, 抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的释放, 改善炎症损伤发挥防治 CKD 的作用。

关键词: 济生肾气丸; 慢性肾脏病 (CKD); 网络药理学; 动物实验; 炎症; p38 MAPK; ERK1/2

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)08-2783-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.048

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是一种由多种原因引起肾脏结构和 (或) 功能异常的隐匿性疾病, 最终可能导致终末期肾病^[1]。研究数据显示, CKD 全球患病率约为 13.4%, 需进行肾脏替代疗法的终末期肾病患者高达 700 万。其中, 中国 CKD 患者人数位居全球首位, 已造成严重的社会经济负担^[2-3]。然而, 临床上的治疗手段有限, 化学药物易引起诸多不良反应, 因此, 研发出安全、高效的药物减缓或逆转肾功能持续恶化具有重要意义。中医药在 CKD 的治疗方面积累了丰富的理论和实践经验^[4]。

济生肾气丸出自宋代严用和《济生方》, 乃金匱肾气丸中干地黄熟地, 桂枝易肉桂, 加车前子、牛膝而成, 该方作为“温阳利水”的代表方剂之一^[5], 临床上广泛用于治疗肾脏相关疾病及各类表现为肾阳虚症状的病证。现代研究显示, 济生肾气丸能有效改善 CKD 患者临床症状、延

缓肾功能衰竭、抗纤维化等作用^[6-7]。目前关于济生肾气丸治疗 CKD 的研究多集中在临床疗效观察分析, 其复方配伍共同作用机制及网络化协同作用尚不明确。因此, 本研究拟通过网络药理学和分子对接技术预测济生肾气丸干预 CKD 的作用成分、靶点及信号通路, 并通过动物实验对相关靶点和信号通路进行验证, 以期为临床运用济生肾气丸提供依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 数据库 TCMSP 数据库 (<http://tcm.cmu.edu.tw/>); PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>); ETCM 数据库 (<http://www.tcmip.cn/ETCM/>); STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>); GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>);

收稿日期: 2024-01-25
基金项目: 国家自然科学基金 (82360812); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ201258); 江西省中医药管理局科技计划项目 (2022A353); 江西中医药大学重点学科青年教师培养计划项目 (2021jzdxk007)
作者简介: 崔言坤 (1991—), 女, 博士, 副教授, 从事方剂作用机理及药效物质基础的研究。E-mail: 20201020@jxutem.edu.cn
* **通信作者:** 刘超 (1991—), 男, 硕士, 讲师, 从事方剂配伍效应及机制的研究。E-mail: 214982794@qq.com
姚凤云 (1975—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事方剂配伍规律与现代应用的研究。E-mail: hrbyaoyao2000@163.com
网络出版日期: 2024-08-29
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240828.1622.002.html>.

Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); OMIM 数据库 (<https://omim.org/>); GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>); TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd/>); DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrk.gov/>); Venny 2.1 数据库 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>); PDB 数据库 (<https://www1.rcsb.org/>); PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

1.1.2 济生肾气丸活性成分及靶点获取 通过 TCMSP 数据库,以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 为筛选条件,获取济生肾气丸 (附子、茯苓、泽泻、牡丹皮、山茱萸、山药、熟地黄、川牛膝、车前子、肉桂) 的活性成分和靶点,利用 PharmMapper、ETCM 数据库对活性成分和作用靶点进行补充,应用 UniProt 数据库将靶点名翻译为基因名。

1.1.3 CKD 相关作用靶点筛选 通过 GeneCards、OMIM、TTD 数据库,以“CKD”“chronic kidney disease”为关键词筛选 CKD 作用靶点,使用 Uniprot 数据库对作用靶点进行名称标准化,得到 CKD 作用靶点。

1.1.4 CKD 相关 GEO 数据集靶点筛选 GSE62792 数据集包含 12 名 CKD 患者和 6 名正常志愿者数据,对该数据集用“limma”R 包行差异分析,以 $P < 0.01$ 为筛选条件,获取差异基因作为 CKD 相关基因,绘制火山图和聚类热图^[8]。

1.1.5 济生肾气丸抗 CKD 的交叉靶点筛选 将上述得到的药物靶点和疾病靶点取交集,获得交叉靶点,使用 Venny 2.1.0 软件生成韦恩图,得到济生肾气丸抗 CKD 的潜在作用靶点。

1.1.6 PPI 网络构建及核心靶点筛选 将济生肾气丸抗 CKD 的靶点导入 STRING 数据库,选择“multiple proteins”功能,种属为“*Homo sapiens*”,最低交互作用评分为 0.7,构建济生肾气丸抗 CKD 靶点的蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。将分析结果保存为 tsv 文件格式,使用 Cytoscape 3.8.2 软件对核心靶点进行可视化分析。

1.1.7 “药物-化学成分-靶点”网络构建 采用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“中药-成分-靶点”网络,可视化药物、活性成分与靶点之间的关系,使用 Network Analyzer 插件进行参数分析。

1.1.8 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析 基因本体 (gene ontology, GO) 分析可阐明靶点主要的生物过程,京都基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析可进一步了解效应靶点在代谢、信号转导等通路中的作用。将济生肾气丸抗 CKD 的靶点导入 DAVID 数据库,选择“functional annotation”功能,以“*Homo sapiens*”为筛选条件进行分析,阈值设定为 $P < 0.05$,筛选得到相关的生物过程和信号通路,运用微生信平台对结果进行可视化,制作条形图和气泡图。

1.1.9 分子对接验证 根据“药物-成分-靶点”网络分析,选取度值 (degree) 排名靠前的靶点与核心成分进行分子对接。通过 PubChem 数据库下载药物主要活性化合物的分子结构 (Mol2 结构),运用 AutoDock 4.2.6 软件进行半柔性分子对接计算得到每对小分子和作用靶点的亲和数值,通过 PDB 数据库提取核心蛋白质靶标的晶体结构。使用 PyMol 2.5.2 软件将对接结果可视化,绘制有效成分与靶点的结合构像图,并标注出结合位点。

1.2 动物实验

1.2.1 动物 健康 SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量 140 ~ 160 g,由江西中医药大学实验动物科技中心繁殖提供 [实验动物生产许可证号 SCXK (赣) 2022-0002],饲养于江西中医药大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (赣) 2022-0002],饲养环境温度 (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 60% ~ 70%,12 h/12 h 光暗交替,自由饮食、饮水。本实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准 (批准号 JZLLSC20210057)。

1.2.2 试剂与药物 济生肾气丸由炮附子 15 g,茯苓、泽泻、山茱萸、炒山药、车前子、牡丹皮各 30 g,肉桂、川牛膝、熟地黄各 15 g 组成,饮片均由江西中医药大学岐黄中医门诊部提供,经江西中医药大学龚千锋教授鉴定为正品。腺嘌呤 (北京索莱宝科技有限公司,批号 705B021);肌酐 (SCr)、尿素氮 (BUN) 测试盒 (南京建成生物工程研究所有限公司,批号 20220710、20220712);IL-1 β 、IL-6、TNF- α 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒 (武汉云克隆科技股份有限公司,批号 L220413814、L220501723、L220423372);GAPDH、p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 抗体、HRP 山羊抗兔二抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 5174S、8690S、4511S、4695S、4370S、7074S);BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (福州飞净生物科技有限公司,批号 202110301)。

1.2.3 仪器 5430R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司);SN3001 型多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);EG1150 型石蜡包埋机、RM2255 型石蜡切片机、DM2000 型正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司);XRS+型化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2.4 药物制备 根据 2015 版《中医方剂大辞典》中记载古今配伍比例^[9],将济生肾气丸按成人用量改丸成方,中药饮片浸泡 30 min,先煎炮附子 1 h,合并其他药物,煎煮 2 次,每次 50 min,合并 2 次滤液,使用旋转蒸发仪,浓缩药液至生药量 1 g/mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.5 造模及给药 适应性饲养 7 d 后,随机分为空白组 (13 只) 和造模组 (43 只),造模组每天灌胃给予腺嘌呤 200 mg/kg,连续 28 d,制备 CKD 模型。末次灌胃腺嘌呤后,空白组和造模组分别随机选取 3 只大鼠,检测 24 h 尿蛋白及血清 BUN、SCr 水平,结果显示造模组大鼠蛋白尿、血清 SCr、BUN 水平升高,Masson 染色肾组织纤维化严重等病理表现,提示 CKD 模型制备成功^[10]。将造模组大鼠

随机分为模型组和济生肾气丸高、中、低剂量组，每组 10 只。大鼠给药剂量参考《药理实验方法学》中人和大鼠体表系数(0.018)进行换算，济生肾气丸高、中、低剂量组大鼠每天灌胃的剂量分别为 43.2、21.6、10.8 g/kg，相当于成人每天用药剂量的 2、1、0.5 倍，空白组和模型组大鼠灌胃给予相应体积蒸馏水，连续 28 d。

1.2.6 标本采集与处理 给药第 28 天收集大鼠 24 h 尿液，测定 24 h 尿蛋白。大鼠经末次给药后，麻醉取材，腹主动脉取血，离心，分离血清，置于-80 ℃冰箱保存备用。解剖取大鼠肾脏，左肾置于 4% 多聚甲醛中固定，右肾置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.2.7 肾脏组织病理学观察及肾纤维化评分 将固定后的肾脏组织经乙醇梯度脱水，石蜡包埋，切片厚度 4 μm，进行 Masson 染色。于光学显微镜(400 倍)下，每张切片取 3 个不重叠视野，应用 Image J 软件对胶原纤维的蓝色阳性区域进行分析，计算纤维化指数，评分标准为纤维化面积<1%计 0 分，纤维化面积 3%~10%计 1 分，纤维化面积 11%~20%计 2 分，纤维化面积 21%~30%计 3 分，纤维化面积>30%计 4 分。

1.2.8 检测血清 SCr、BUN 水平 应用全自动生化分析仪检测大鼠血清 SCr、BUN 水平。

1.2.9 ELISA 法检测肾组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平 取大鼠肾组织，制备 10% 肾组织匀浆液，离心取上清液，严格按照试剂盒说明书，检测大鼠肾组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平。

1.2.10 Western blot 法检测肾组织 p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解大鼠肾组织，提取蛋白，BCA 法检测蛋白含量，取等质量蛋白进行变性，加入蛋白上样缓冲液后冻存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% BSA 室温封闭 1 h，分别加入 p-p38 MAPK、p-ERK1/2、p38 MAPK、ERK1/2、GAPDH 抗体(1:1 000)，4 ℃孵育过夜，次日加入二抗(1:2 000)室温孵育 1 h，使用 XRS+型化学发光成像系统显影，以 GAPDH 为内参，通过 Image Lab 软件计算蛋白相对表达量。

1.2.11 统计学分析 通过 SPSS 24.0 软件进行处理，计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学

2.1.1 济生肾气丸有效成分及靶点筛选 得到活性成分附子 9 种、茯苓 7 种、泽泻 14 种、牡丹皮 8 种、山茱萸 11 种、山药 15 种、熟地黄 6 种、川牛膝 7 种、车前子 11 种、肉桂 10 种，剔除重复数据后，从数据库中共得到 102 种成分，见表 1。通过各数据库检索出的靶点进行整理并去除重复，获得 645 个潜在靶点。

表 1 济生肾气丸有效活性成分信息 (OB 值前 30 位)

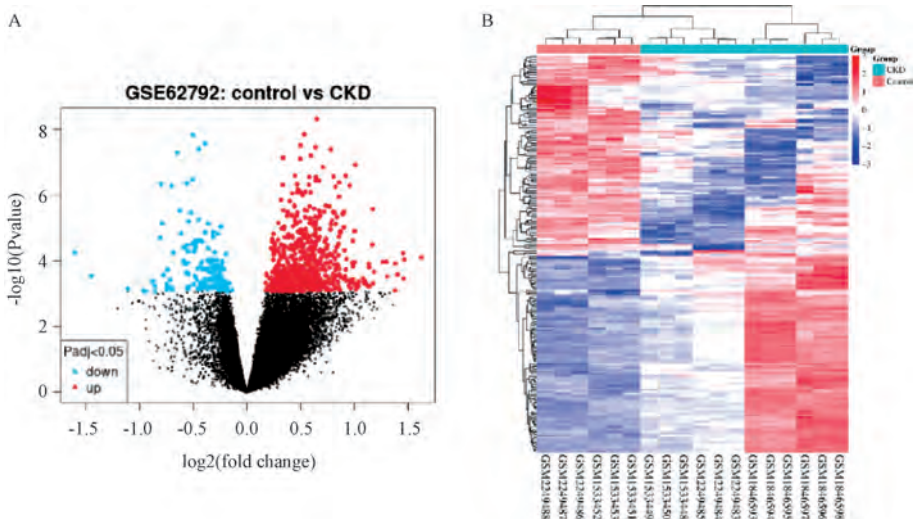
序号	MOL 编号	活性成分	OB/%	DL
1	MOL002421	脒碱	84.08	0.25
2	MOL002419	去甲乌药碱	82.54	0.21
3	MOL000546	薯蓣皂苷元	80.88	0.81
4	MOL005531	远华蟾毒精	69.99	0.79
5	MOL002398	水黄皮素	69.56	0.34
6	MOL005552	<i>D</i> -吡喃葡萄糖	68.83	0.56
7	MOL012286	betavulgarin	68.75	0.39
8	MOL001925	芍药苷	68.18	0.40
9	MOL007369	4- <i>O</i> -methypaeoniflorin_qt	67.24	0.43
10	MOL007384	芍药酮苷	65.31	0.35
11	MOL005429	山萘醇	64.01	0.37
12	MOL000310	白玉兰亭 B	61.47	0.38
13	MOL001736	(-)-花旗松素	60.51	0.27
14	MOL005430	山萘酮 C	59.05	0.39
15	MOL002388	花翠素二葡萄糖苷	57.76	0.28
16	MOL005360	malkangunin	57.71	0.63
17	MOL002395	去氧穿心莲内酯	56.30	0.31
18	MOL000208	(+)-芳香烯	55.74	0.10
19	MOL000612	α-柏木烯	55.56	0.10
20	MOL000211	白桦脂酸	55.38	0.78
21	MOL000492	儿茶素	54.83	0.24
22	MOL000322	海风藤酮	54.72	0.38
23	MOL002415	6-demethyldesoline	51.87	0.66
24	MOL003538	(+)-喇叭烯	51.84	0.10
25	MOL002397	多根乌头碱	51.73	0.73
26	MOL002422	异塔拉定	50.82	0.73
27	MOL000057	邻酞酸二异丁酯	49.63	0.13
28	MOL002392	三角叶皂苷	46.69	0.37
29	MOL005486	3,4-去氢-16-番茄醛	46.64	0.49
30	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28

2.1.2 济生肾气丸与 CKD 作用靶点的交集 从 GeneCards、OMIM、TTD 数据库中分别获取了 1 679、145、30 个 CKD 潜在靶点，合并去重后得到 1 691 个。GSE8762 数据集差异分析后得到 485 个差异基因，包括 240 个上调基因和 245 个下调基因，见图 1。将所有数据库预测靶点与 GEO 数据集合并去重后得到 2 168 个 CKD 作用靶点，这些靶点与 CKD 的发生发展关系密切。通过交叉比对，得到济生肾气丸药物与 CKD 交叉靶点 232 个，见图 2。

2.1.3 济生肾气丸治疗 CKD 的蛋白互作 PPI 网络分析 通过 PPI 对靶点进行分析，得到 201 个效应靶点，1 815 条边。采用 CytoNCA 插件根据网络节点的拓扑属性筛选关键节点，得到 PPI 网络核心靶点，发现 ERK1/2、IL-6、IL-1β、TNF-α、p38 MAPK、AKT1 等核心靶点，见图 3。

2.1.4 “药物-成分-靶点”网络 将潜在活性成分与靶点的关系构建“药物-成分-靶点”网络，多靶点可对应同一潜在活性成分，一个靶点也可对应不同潜在活性成分，说明济生肾气丸治疗 CKD 多成分、多靶点的效应，见图 4。

2.1.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 GO 功能分析共鉴定得到 1 321 条生物过程(biological process, BP)、73 条细胞组分(cellular component, CC)、130 条分子功能(molecular function, MF)，分别取前 *P* 值排名前十的条目进行可视化，见图 5。结果显示，BP 主要涉及细胞对脂质



注：A 为差异基因火山图，B 为差异基因表达热图。

图 1 GSE8762 数据集差异分析结果

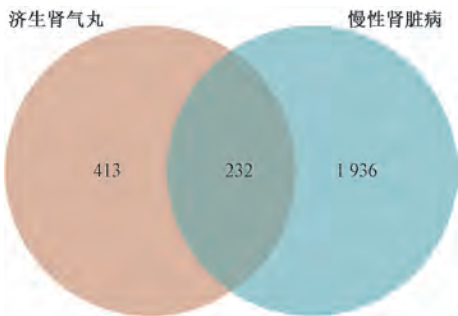


图 2 药物-疾病交叉靶点韦恩图

的反应、脂多糖反应、细胞因子刺激反应、TNF 反应。CC 主要与薄膜筏、质膜蛋白复合物、囊腔等有关。MF 主要涉及转录因子结合、RNA 聚合酶 II 转录因子结合、转录共调节因子结合、核受体结合等。KEGG 通路富集分析得到具有显著差异的信号通路 192 条，取 P 值排名前二十的信号通路进行可视化，见图 6。结果显示济生肾气丸防治 CKD 主要涉及 MAPK 信号通路、晚期糖基化终末产物/晚期糖基化终末产物受体（AGE/RAGE）信号通路、肿瘤坏死因子（TNF）信号通路、磷脂酰肌醇激酶/蛋白激酶 B（PI3K/Akt）信号通路等。

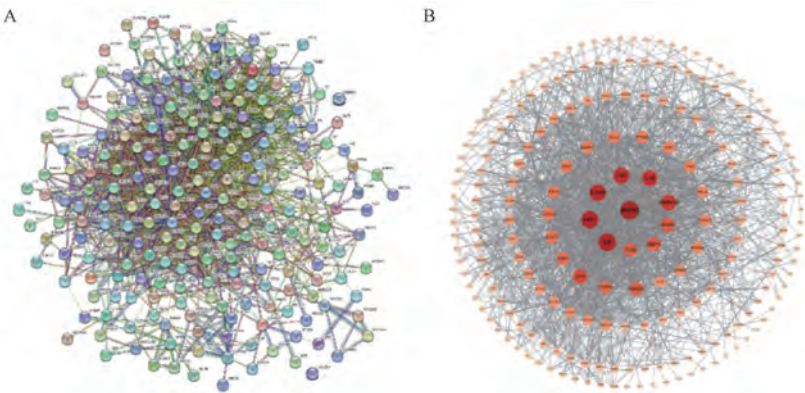


图 3 济生肾气丸治疗 CKD 效应靶点的 PPI 网络图（A）和核心靶点图（B）

2.1.6 分子对接 根据“药物-成分-靶点”网络分析，将核心靶点按照度值进行排名，选取排名前 5 位的关键靶点（ERK1/2、p38 MAPK、IL-1 β 、IL-6、TNF- α ）与济生肾气丸中的核心成分进行分子对接，以验证化合物-靶标的相互作用，低于-5.0 kcal/mol 的结合亲和力则认为具有良好的相互作用。结果显示，各靶点蛋白与济生肾气丸中潜在活性成分的最低结合能均小于-5.0 kcal/mol，见表 2。选取结合能高的药物配体与靶点进行可视化处理，见图 7。

2.2 动物实验

2.2.1 济生肾气丸对 CKD 大鼠肾组织病理变化的影响

表 2 部分核心靶点蛋白与济生肾气丸潜在活性成分的分子对接结果

关键靶点	PDB ID	化合物名称	PubChem CID	结合能/ (kcal·mol ⁻¹)
ERK1/2	4QTB	薯蓣皂苷元	99474	9.8
IL-6	1N26	槲皮素	5280343	8.9
TNF- α	7JRA	槲皮素	5280343	8.6
IL-1 β	5R7W	三角叶皂苷	441884	8.2
p38 MAPK	1AU9	杨梅酮	161748	7.4

响 空白组大鼠肾间质几乎无蓝染，仅有少量胶原纤维条

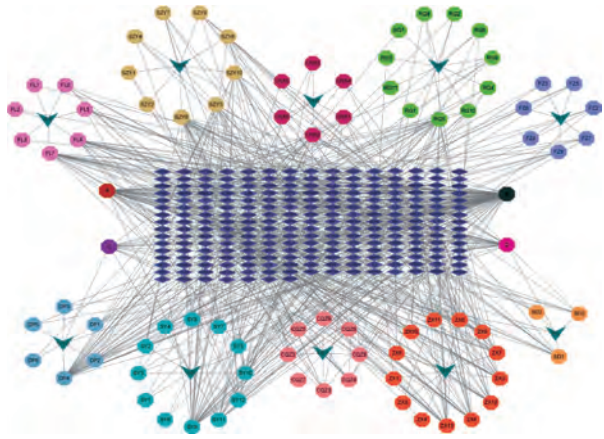


图 4 “药物-成分-靶点”网络

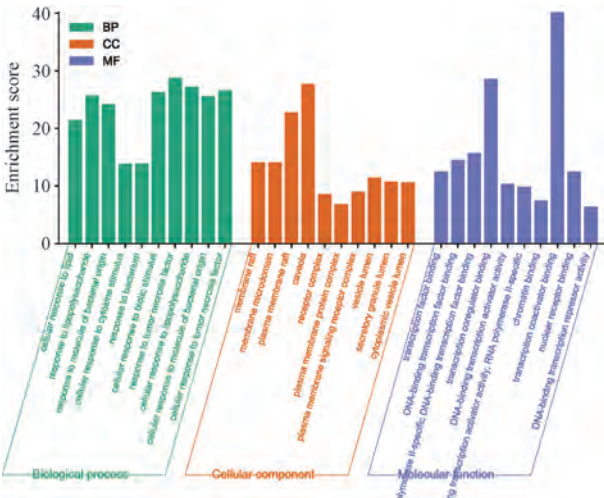


图 5 济生肾气丸治疗 CKD 的 GO 分析

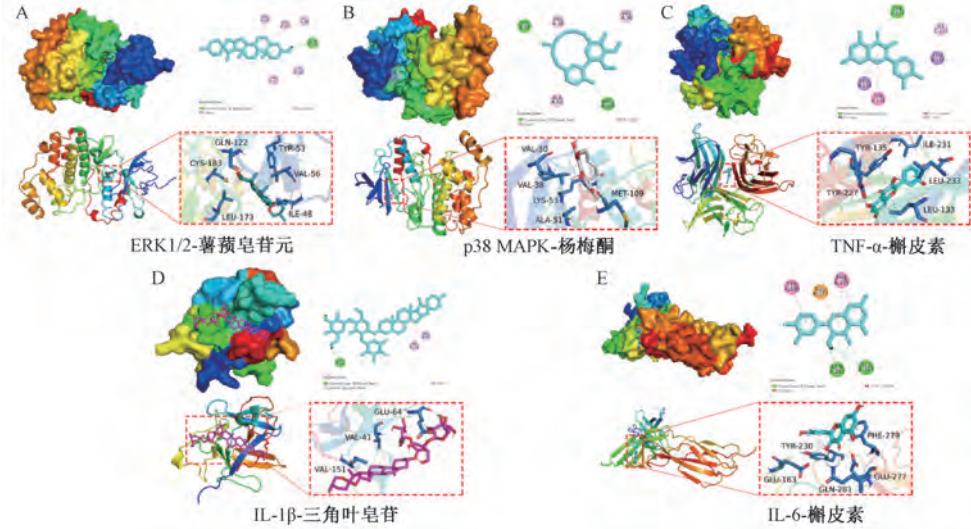


图 7 济生肾气丸主要活性成分与核心靶点对接示意图

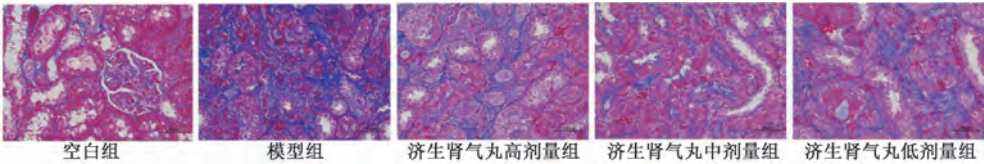


图 8 济生肾气丸对 CKD 大鼠肾组织病理形态学的影响 (Masson, ×400)

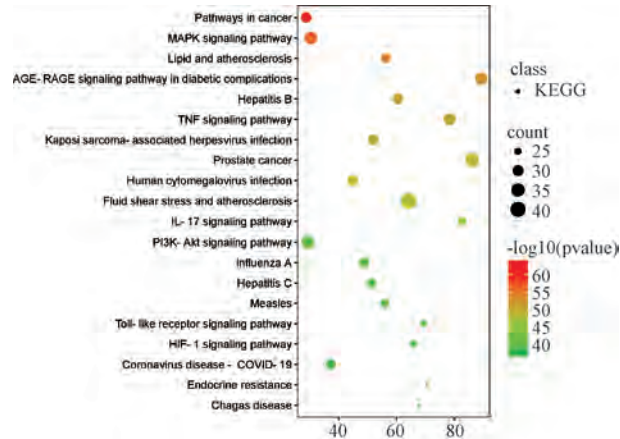


图 6 济生肾气丸治疗 CKD 的 KEGG 通路分析气泡图

索状分布；与空白组比较，模型组大鼠表现为带状间质纤维化和胶原纤维增生，肾间质纤维化评分升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，济生肾气丸各剂量组大鼠间质蓝染减轻，肾纤维化得到改善，肾纤维化评分降低 ($P<0.01$)，见图 8、表 3。

表 3 济生肾气丸对 CKD 大鼠肾组织纤维化评分的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	纤维化评分/分
空白组	—	0.81±1.16
模型组	—	2.80±0.70**
济生肾气丸高剂量组	43.2	1.54±0.68##
济生肾气丸中剂量组	21.6	1.63±0.81##
济生肾气丸低剂量组	10.8	1.81±0.40##

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

2.2.2 济生肾气丸对 CKD 大鼠 24 h 尿蛋白及 SCr、BUN 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠 24 h 尿蛋白及血清 SCr、BUN 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,济生肾气丸各剂量组大鼠 24 h 尿蛋白及血清 SCr、BUN 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表 4。

表 4 济生肾气丸对 CKD 大鼠 24 h 尿蛋白、血清 SCr、BUN 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	24 h 尿蛋白/mg	SCr/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
空白组	—	30.3±2.26	49.08±11.12	7.74±1.35
模型组	—	211.30±26.43**	126.64±14.47**	21.78±2.29**
济生肾气丸高剂量组	43.2	109.15±6.49##	60.03±6.35##	15.71±2.64##
济生肾气丸中剂量组	21.6	124.65±4.43##	68.28±10.77##	16.91±2.49##
济生肾气丸低剂量组	10.8	138.30±9.18##	74.95±12.01#	18.64±2.01##

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

2.2.3 济生肾气丸对 CKD 大鼠 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠肾组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,济生肾气丸各剂量组大鼠肾组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平均降低 ($P<0.01$),见表 5。

表 5 济生肾气丸对 CKD 大鼠肾组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
空白组	—	50.86±6.18	19.37±3.31	89.85±12.65
模型组	—	94.40±11.40**	44.88±4.07**	153.75±13.69**
济生肾气丸高剂量组	43.2	61.11±7.01##	21.35±3.77##	117.39±9.43##
济生肾气丸中剂量组	21.6	63.96±7.19##	22.46±6.21##	119.23±13.09##
济生肾气丸低剂量组	10.8	69.72±4.22##	24.28±5.75##	123.51±12.85##

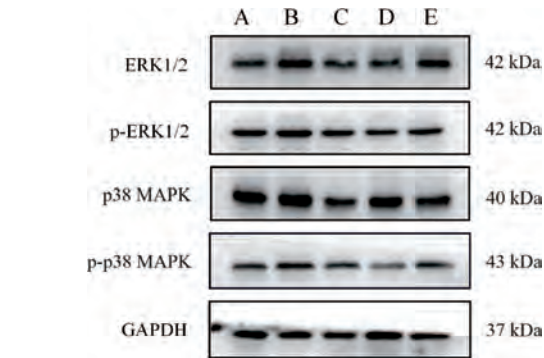
注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

2.2.4 济生肾气丸对 CKD 大鼠 p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠肾组织 p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,济生肾气丸各剂量组大鼠肾组织 p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表 6、图 9。

表 6 济生肾气丸对 CKD 大鼠肾组织 ERK1/2、p38MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ERK1/2/ GAPDH	p-ERK1/2/ GAPDH	p38 MAPK/ GAPDH	p-p38 MAPK/ GAPDH
空白组	—	0.70±0.17	1.17±0.15	1.05±0.08	0.41±0.12
模型组	—	1.28±0.29**	1.66±0.22**	1.35±0.25**	0.65±0.09**
济生肾气丸高剂量组	43.2	0.81±0.17##	1.39±0.10#	0.87±0.12##	0.50±0.10#
济生肾气丸中剂量组	21.6	0.09±0.20##	1.21±0.18##	0.94±0.12##	0.45±0.12##
济生肾气丸低剂量组	10.8	1.02±0.11#	1.27±0.20#	1.06±0.27#	0.52±0.09#

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



注: A 为空白组, B 为模型组, C~E 分别为济生肾气丸高、中、低剂量组。

图 9 各组大鼠肾组织 ERK1/2、p38 MAPK 蛋白电泳图

3 讨论

慢性肾脏病已成为 21 世纪全球健康所面临的重大挑

战^[11]。延缓 CKD 向终末期肾病进展仍是目前治疗的主要目标^[12-13]。中医将其归属于“肾风”“水肿”“虚劳”等范畴。CKD 主要病机为本虚标实^[14],其本虚乃脾肾阳虚,脾虚则土不能制水而洋溢,肾虚则水不安其位而妄行;标实乃水湿、痰饮等浊毒壅塞^[15],治疗当补利兼施,补命门之火,温阳利水。济生肾气丸由炮附子、熟地黄、肉桂、炒山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮、车前子、川牛膝组成,该方药物含有多种生物活性物质和作用靶点,在临床上用于治疗肾脏相关疾病具有良好效果且不良反应少^[16-17],所以研究济生肾气丸防治 CKD 具有重要意义。

本研究结果显示,济生肾气丸主要通过槲皮素、杨梅酮、薯蓣皂苷元等关键成分发挥药理作用。其中,槲皮素作为天然类黄酮,可以减少巨噬细胞积累,降低炎症细胞因子水平,从而发挥抗肾脏纤维化作用^[18]。杨梅酮属于类黄酮化合物,具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒等活性^[19],还能

调控 p38 MAPK 和 ERK1/2 磷酸化,降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子水平^[20-21]。薯蓣皂苷元存在于豆科和薯蓣科的植物中,具有抗氧化、抗炎、抗细胞增殖等多种生物活性,对肾组织损伤具有保护作用^[22]。此外,大量研究报道 CKD 与炎症损伤密切相关,炎症因子可通过诱导肾组织慢性炎症损伤、氧化应激等导致肾功能恶化和组织纤维化^[23]。上述研究提示,济生肾气丸防治 CKD 的机制可能是通过减少炎症因子释放和抗氧化应激反应。

本研究发现,p38 MAPK、ERK1/2、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 可能是济生肾气丸发挥抗 CKD 的关键靶点。通过分子对接发现槲皮素、杨梅酮和薯蓣皂苷元与上述关键靶点有较强亲和力,p38 MAPK 和 ERK1/2 信号通路具有调节氧化应激反应、抗炎、调节免疫反应、控制细胞凋亡和增殖等功能,可调控巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等多种炎症因子并诱导肾脏纤维化^[24-26]。研究表明,p38 MAPK 和 ERK1/2 信号通路的激活对于肾小球系膜区 IL-6 的产生至关重要^[27],在炎症的早期阶段,局部分泌的 IL-6 与中性粒细胞浸润的累积有关,体外研究表明 IL-6 在肾脏足细胞损伤中发挥重要作用^[28]。TNF- α 由多种细胞谱系产生,能够损伤肾小管内皮细胞,刺激成纤维细胞增殖,抑制 TNF- α 分泌可改善大鼠肾小球炎症和纤维化形成^[29-30]。IL-1 β 是一种关键的炎症介质并调节多种下游炎症因子,IL-1 β 信号传导会激活炎症反应并加剧肾损伤^[31]。因此,p38 MAPK、ERK1/2、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 与 CKD 肾组织炎症的产生、细胞凋亡及纤维化等病理过程密切相关。本研究发现,济生肾气丸可降低 CKD 大鼠肾组织中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

网络药理学研究结果提示,MAPK 信号通路相关亚型可能是济生肾气丸防治 CKD 的潜在通路。MAPK 广泛存在于哺乳动物细胞内,主要由 ERK1/2、p38 MAPK、JNK 等亚型组成。大量研究报道,MAPK 信号通路相关亚型能够调节 CKD 的纤维化^[32-33],其中,p38 MAPK 的过量产生会导致促炎和促纤维化细胞因子的积累,抑制 p38 MAPK 可缓解蛋白尿、炎症、肾小球硬化和间质纤维化^[34]。此外,有研究发现阻断 ERK1/2 的磷酸化可抑制肌成纤维细胞和巨噬细胞的扩张,减少炎症因子释放从而延缓肾脏纤维化^[35]。本研究发现,济生肾气丸可抑制 MAPK 信号通路中 ERK1/2 和 p38 MAPK 亚型的磷酸化,降低 p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达,提示济生肾气丸可能通过抑制 MAPK 信号通路相关亚型改善 CKD。

综上所述,本研究采用网络药理学预测济生肾气丸防治 CKD 的可能关键作用靶点和信号通路,结合动物实验进行验证,证实济生肾气丸可通过抑制 p38 MAPK 和 ERK1/2 信号通路活化改善炎症反应,降低肾组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分泌和血清 SCr、BUN 和 24 h 尿蛋白水平发挥改善肾功能作用。本研究为进一步探索济生肾气丸防治 CKD 的机制提供了一定的参考思路和方向,同时为该方临床推广运用提供了实验基础。

参考文献:

[1] Wang L M, Xu X, Zhang M, *et al.* Prevalence of chronic kidney disease in China: results from the sixth China chronic disease and risk factor surveillance[J]. *JAMA Intern Med*, 2023, 183(4): 298-310.

[2] Ann F. The global burden of chronic kidney disease[J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 662-664.

[3] Bharati J, Jha V. Global Kidney Health Atlas: a spotlight on the Asia-Pacific sector[J]. *Kidney Res Clin Pract*, 2022, 41(1): 22-30.

[4] 李旭萍, 马鸿斌, 马海兰. 中医药抗肾脏纤维化的研究进展[J]. *中成药*, 2023, 45(12): 4036-4041.

[5] 李 冀, 左铮云. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 138-139.

[6] 黄积仓, 毛亚兰, 裴强强, 等. 艾灸神阙穴 (CV8)、济生肾气丸联合西药对慢性肾脏病 3-4 期疗效及免疫功能的影响[J]. *天津中医药*, 2021, 38(8): 1041-1045.

[7] 宿家铭, 彭 景, 王 琳, 等. 基于网络药理学的济生肾气丸治疗糖尿病肾病的机制研究[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2023, 24(12): 1094-1096; 1143.

[8] Sayanthooran S, Gunerathne L, Abeysekera T D J, *et al.* Transcriptome analysis supports viral infection and fluoride toxicity as contributors to chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu) in Sri Lanka[J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50(9): 1667-1677.

[9] 彭怀仁, 王旭东, 吴承艳, 等. 中医方剂大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 2100.

[10] 李鹏飞, 李思汉, 陈扬荣, 等. 慢性肾衰竭病证结合动物模型的研究与思考[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(8): 1073-1075; 1129.

[11] Darlington O, Dickerson C, Evans M, *et al.* Costs and healthcare resource use associated with risk of cardiovascular morbidity in patients with chronic kidney disease: evidence from a systematic literature review[J]. *Adv Ther*, 2021, 38(2): 994-1010.

[12] Pasternak M, Liu P, Quinn R, *et al.* Association of albuminuria and regression of chronic kidney disease in adults with newly diagnosed moderate to severe chronic kidney disease[J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(8): e2225821.

[13] Pereira-Céspedes A, Jiménez-Morales A, Palomares-Bayo M, *et al.* Medication review with follow-up for end-stage renal disease: drug-related problems and negative outcomes associated with medication—a systematic review[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(15): 5080.

[14] 吴 琪, 张新雪, 焦婷婷, 等. 慢性肾脏病肾阳虚证证候特征与临床生物学指标相关性危险因素[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(19): 204-213.

[15] 潘 静, 范高俊. 基于疾病归经理论的一半汤治疗慢性肾炎蛋白尿的临床观察[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(3): 1567-1570.

[16] Liu H, Zheng J, Li R H. Clinical efficacy of “Spleen-kidney-

care” Yiqi Huayu and Jiangzhuo traditional Chinese medicine for the treatment of patients with diabetic nephropathy[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(3): 1096-1102.

[17] 李百云, 彭 辉, 熊东林, 等. 肾衰宁颗粒联合替米沙坦片治疗糖尿病肾病的疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(2): 142-146.

[18] Chen Y Q, Chen H Y, Tang Q Q, *et al.* Protective effect of quercetin on kidney diseases: from chemistry to herbal medicines[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 968226.

[19] Song X M T, Tan L, Wang M, *et al.* Myricetin: a review of the most recent research[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 111017.

[20] Kan X C, Liu B R, Guo W J, *et al.* Myricetin relieves LPS-induced mastitis by inhibiting inflammatory response and repairing the bloodmilk barrier[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 16252-16262.

[21] 王 臻, 王 敏, 邓琪琪, 等. 保肾方调控 ERK/p38 MAPK 信号通路减轻 UUO 小鼠肾脏纤维化的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(21): 69-78.

[22] Zhong Y J, Jin C N, Han J H, *et al.* Diosgenin protects against kidney injury and mitochondrial apoptosis induced by 3-MCPD through the regulation of ER stress, Ca²⁺ homeostasis, and Bcl2 expression[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021, 65(15): e2001202.

[23] Zoccali C, Vanholder R, Massy Z A, *et al.* The systemic nature of CKD[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(6): 344-358.

[24] An J N, Yang S H, Kim Y C, *et al.* Periostin induces kidney fibrosis after acute kidney injury *via* the p38 MAPK pathway[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 316(3): F426-F437.

[25] Gao J, Wu L L, Wang Y, *et al.* Knockdown of Cxcl10 inhibits mesangial cell proliferation in murine habu nephritis *via* ERK signaling[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42 (5): 2118-2129.

[26] Sun H J, Cai W W, Wang X, *et al.* Vaccaria hypaphorine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation *via* inactivation of NF-κB and ERK pathways in Raw 264.7 cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 120.

[27] Leonard M, Ryan M P, Watson A J, *et al.* Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(4): 1366-1377.

[28] Feigerlová E, Battaglia-Hsu S F. IL-6 signaling in diabetic nephropathy: from pathophysiology to therapeutic perspectives[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 37: 57-65.

[29] Wen Y, Lu X H, Ren J F, *et al.* KLF4 in macrophages attenuates TNF-α-mediated kidney injury and fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(10): 1925-1938.

[30] Lousa I, Reis F, Santos-Silva A, *et al.* The signaling pathway of TNF receptors: linking animal models of renal disease to human CKD[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3284.

[31] McKnight Q, Jenkins S, Li X Q, *et al.* IL-1β drives production of FGF-23 at the onset of chronic kidney disease in mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(7): 1352-1362.

[32] Obata K, Katsura H, Mizushima T, *et al.* Roles of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain[J]. *J Neurochem*, 2007, 102(5): 1569-1584.

[33] Nageeb M M, Talaat A, Reda S M, *et al.* Infliximab abrogates adenine-induced chronic kidney disease *via* modulation of the MAPK/JNK/ASK signaling pathway in rats[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2023, 397(1): 207-219.

[34] Diao H Y, Zhu W, Liu J, *et al.* Salvianolic acid A improves rat kidney injury by regulating MAPKs and TGF-β1/Smads signaling pathways[J]. *Molecules*, 2023, 28(8): 3630.

[35] Andrikopoulos P, Kieswich J, Pacheco S, *et al.* The MEK inhibitor trametinib ameliorates kidney fibrosis by suppressing ERK1/2 and mTORC1 signaling[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(1): 33-49.