

基于网络药理学探究血尿胶囊治疗急性肾盂肾炎的作用机制

花卉¹, 刘聪¹, 何宇霞¹, 林建翠², 吴琼², 郝旭亮^{3*}

(1. 山西省中医药研究院方剂研究所, 太原 030012;
2. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 太原 030012;
3. 山西省中医药大学附属医院, 太原 030012)

[摘要] 目的:采用网络药理学和实验验证的方法探究血尿胶囊治疗急性肾盂肾炎(APN)的作用机制。方法:通过APN大鼠模型研究血尿胶囊对APN的作用效果。使用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP),化学专业数据库,中医证候关联(SymMap)数据库检索菝葜、薏苡仁、棕榈子的化学成分,PharmMapper与SwissTargetPrediction数据库收集成分的靶点信息,使用治疗靶标数据库(TTD),DrugBank数据库,疾病相关的基因与突变位点数据库(DisGeNET),GeneCards数据库,在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)收集疾病靶点信息。使用基因注释工具(Metascap)对血尿胶囊治疗APN的关键基因进行基因本体(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。使用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)与蛋白免疫印迹法对预测结果进行验证。结果:与空白组和假手术组比较,模型组左右肾比值升高,脏器指数升高($P < 0.05, P < 0.01$),白细胞(WBC),中性粒细胞(NEUT),单核细胞(MONO),淋巴细胞(LY)水平明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),核转录因子- κ B(NF- κ B),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,诺氟沙星组左右肾比值降低,脏器指数降低($P < 0.05, P < 0.01$),WBC,NEUT,MONO,LY水平降低($P < 0.05, P < 0.01$),NF- κ B,IL-6,TNF- α 水平降低($P < 0.05, P < 0.01$);血尿胶囊低剂量组左右肾比值降低,脏器指数降低($P < 0.05, P < 0.01$),WBC,NEUT,MONO,LY水平降低($P < 0.05, P < 0.01$),NF- κ B,IL-6,TNF- α 水平降低($P < 0.05, P < 0.01$);血尿胶囊中剂量组左右肾比值降低,脏器指数降低($P < 0.05, P < 0.01$),WBC,NEUT,MONO,LY水平降低($P < 0.05, P < 0.01$),IL-6,TNF- α 水平降低($P < 0.05, P < 0.01$);血尿胶囊高剂量组左右肾比值降低,脏器指数降低($P < 0.05, P < 0.01$),WBC,NEUT,MONO,LY水平降低($P < 0.05, P < 0.01$),NF- κ B,IL-6,TNF- α 水平降低($P < 0.05, P < 0.01$)。网络药理学分析得到菝葜活性化合物17种,薏苡仁活性化合物18种,棕榈子活性化合物6种,血尿胶囊治疗APN关键基因39个,GO分析富集704生物学过程,22个细胞组成,59个分子功能,KEGG信号通路共富集62条通路。实验验证结果表明与空白组比较,模型组的前列腺素-过氧化物合成酶2(PTGS2),丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1),磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),蛋白激酶B2(Akt2),Janus激酶2(JAK2),信号转导和转录激活因子3(STAT3)mRNA的表达量和PI3K,Akt2,JAK2,STAT3蛋白表达量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,血尿胶囊低剂量组MAPK1,PI3K,JAK2,STAT3 mRNA表达量和PI3K,JAK2,STAT3蛋白表达量显著降低($P < 0.01$);中剂量组MAPK1,PTGS2,PI3K,JAK2,STAT3 mRNA表达量和PI3K,JAK2,STAT3蛋白降低($P < 0.05, P < 0.01$);高剂量组PTGS2,MAPK1,PI3K,Akt2,JAK2,STAT3 mRNA表达量和PI3K,Akt2,JAK2,STAT3蛋白表达量降低($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:血尿胶囊对APN具有一定的疗效,血尿胶囊发挥作用为多靶点,多途径的,其机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路和JAK2/STAT3信号通路活性表达有关。

[关键词] 血尿胶囊;网络药理学;磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路;Janus激酶2(JAK2)/信号转导和转录激活因子3(STAT3)信号通路;急性肾盂肾炎(APN)

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0208-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220113 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211112.1418.003.html>

[网络出版日期] 2021-11-12 17:28

Mechanism of Xueniao Capsule in Treatment of Acute Pyelonephritis Based on Network Pharmacology

HUA Hui¹, LIU Cong¹, HE Yu-xia¹, LIN Jian-cui², WU Qiong², HAO Xu-liang^{3*}

[收稿日期] 20210903(023)

[基金项目] 山西省科技攻关项目(2014ZD0203)

[第一作者] 花卉,硕士,从事中药新药研发,E-mail:2832203184@qq.com

[通信作者] * 郝旭亮,博士,主任药师,从事中药新药研发与中药药理研究,E-mail:hxliang-01@163.com

- (1. *Formula Research Institute, Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine (TCM), Taiyuan 030012, China;*
2. *College of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030012, China;*
3. *Affiliated Hospital of Shanxi University of TCM, Taiyuan 030012, China)*

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Xueniao capsule in the treatment of acute pyelonephritis (APN) by network pharmacology and experimental verification. **Method:** The effect of Xueniao capsule on APN was investigated based on the APN model in rats. The Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Chemistryl Database, and SymMap were searched for the chemical components of *Smilacis Chinae Rhizoma*, *Coicis Semen*, and *Trachycarpi Petiolus*. The target information of the components was collected from PharmMapper and SwissTargetPrediction, and disease target information from Therapeutic Target Database (TTD), DrugBank, DisGeNET, GeneCards, and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). The key genes of Xueniao capsule for APN underwent Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses by Metascap. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) and Western blot were employed to verify the prediction results. **Result:** Compared with the blank group and the sham operation group, the model group showed an increased ratio of the left kidney to the right kidney and organ index ($P < 0.05$, $P < 0.01$), up-regulated white blood cells (WBC), neutrophils (NEUT), monocytes (MONO), and lymphocytes (LY) ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and elevated levels of nuclear factor- κ B (NF- κ B), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the norfloxacin group, the low- and high-dose Xueniao capsule groups showed a decreased ratio of the left kidney to the right kidney and organ index ($P < 0.05$, $P < 0.01$), dwindled levels of WBC, NEUT, MONO, and LY ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reduced levels of NF- κ B, IL-6, and TNF- α ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The medium-dose Xueniao capsule group showed a decreased ratio of the left kidney to the right kidney and organ index ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduced levels of WBC, NEUT, MONO, and LY ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and dwindled levels of IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Network pharmacological analysis revealed 17 active compounds from *Smilacis Chinae Rhizoma*, 18 active compounds from *Coicis Semen*, six active compounds from *Trachycarpi Petiolus*, and 39 key genes for the treatment of APN in Xueniao capsule. GO enrichment analysis demonstrated 704 biological processes, 22 cellular components, and 59 molecular functions. Sixty-two pathways were enriched in KEGG enrichment analysis. The experimental verification results showed that compared with the blank group, the model group showed increased mRNA expression of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1)/extracellular signal-regulated protein kinase 2 (ERK2), phosphoinositide 3 kinase (PI3K), protein kinase B2 (Akt2), Janus kinase 2 (JAK2), and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and protein expression of PI3K, Akt2, JAK2, and STAT3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the low-dose Xueniao capsule group showed decreased mRNA expression of MAPK1, PI3K, JAK2, and STAT3 and protein expression of PI3K, JAK2, and STAT3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The medium-dose Xueniao capsule group showed decreased mRNA expression of MAPK1, PTGS2, PI3K, JAK2, and STAT3, and protein expression of PI3K, JAK2, and STAT3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The high-dose Xueniao capsule group showed reduced mRNA expression of PTGS2, MAPK1, PI3K, Akt2, JAK2, and STAT3 and protein expression of PI3K, Akt2, JAK2, and STAT3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Xueniao capsule has a certain curative effect on APN via multiple targets and multiple pathways. The mechanism may be related to the inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway and the JAK2/STAT3 signaling pathway.

[Keywords] Xueniao capsule; network pharmacology; phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway; Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway; acute pyelonephritis (APN)

急性肾盂肾炎(APN)是由病原体直接侵袭肾盂、肾盏黏膜及肾小管、肾间质引起的急性感染性炎症,具有发展成永久性肾脏损伤的风险,包括肾实质损伤,终末期肾病。现代医学研究认为其发病原因为多种细菌经尿道上行蔓延至肾脏,细菌侵袭肾脏后,介导相关核转录因子调控炎症因子转录,进而引发肾脏炎性损伤^[1-2]。西医常使用对细菌比较敏感的抗生素药物如喹诺酮类,头孢菌素类、氨基苄西林类等进行治疗,但随着抗生素使用量和使用周期的增长,其耐药性和副作用也随之增加,给临床用药带来了一定的挑战^[3]。

中医理论认为APN其归属于淋证、腰痛范畴,临床上常根据不同证型使用清热解毒、利湿通淋、补益肝肾、活血化瘀等组方治疗^[4]。血尿胶囊是由薏苡仁、菝葜、棕榈子组成的中成药,遵循中药配伍原理,组方中薏苡仁清热排脓、健脾、渗湿,菝葜利湿祛浊、解毒散瘀,棕榈子收敛,止血,涩肠,固精,3味中药合理配伍,共奏清热解毒,利湿、凉血止血之功效^[5-8]。作为国药准字上市药品临床用于治疗急、慢性肾盂肾炎,肾小球肾炎等其他原因引起的血尿,也可辅助治疗肾脏肿瘤,临床研究表明其在治疗APN方面可以提高临床疗效,有助于患者恢复^[8-11]。前期研究发现血尿胶囊可以降低APN模型大鼠的炎症因子白细胞介素(IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10与趋化因子2的表达水平,增强肾脏对细菌的抵抗能力,改善大鼠肾脏组织炎性浸润程度,降低肾脏损伤程度,具有明显治疗APN效果^[12-13]。血尿胶囊已应用于临床治疗多年且效果良好,但其研究多集中于临床疗效,作用机制尚有待研究。因此本课题在前期药效研究的基础上,采用网络药理学方法预测其作用机制再结合体内实验探讨血尿胶囊治疗APN的分子作用机制,以期研究血尿胶囊治疗APN的机制奠定理论基础,也能为临床合理用药提供理论依据。

1 材料

SPF级SD雄性大鼠,体质量(180 \pm 20)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物合格证编号SCXK(京)2014-0004,批号11401300043335,实验经山西省中医药研究院医学伦理委员会审查通过(编号SZYLY2014KY-0601)。

血尿胶囊(山西振动开元制药有限公司,国药准字Z20093146,批号20181203);诺氟沙星(白云山汤明东泰药业有限公司,国药准字H41020543,批号190318),大肠埃希氏菌ATCC225922(北钠联创生

物技术有限公司,批号70027805);IL-6,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,山羊抗兔二抗,山羊抗鼠二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为2231696905,2401680925, BST15D07AF54, BST14J10A50);核转录因子(NF)- κ B p65 ELISA试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,批号202009);RNA提取试剂盒,QuantiNova SYBR Green 聚合酶链式反应(PCR) Kit (500)(QIAGEN/Gmb公司,批号分别为163048069, 163039888); Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche公司,批号43112721);磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)一抗,Janus激酶2(JAK2)一抗,信号转导和转录激活因子3(STAT3)一抗, β -肌动蛋白(β -actin)一抗(Cell Signaling Technology公司,批号分别为#4257, #3230, #9139, #3700);蛋白激酶B2(Akt2)一抗(Bioworld Technology公司,批号BS4270)。

754型紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);IXA T25型数显高速匀浆机(德国IKA公司);Thermo 1300系列II级A2型生物安全柜,ABI Veriti 96 PCR仪,ABI 7500型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];KDC-2046型低速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);HEMAVET950 FS型全自动血液分析仪(美国DREW公司);Protein Simple型凝胶成像分析系统(美国Protein Simple公司)。

2 方法

2.1 动物模型复制与分组给药 大鼠适应性喂养1周后,禁食12 h,3%戊巴比妥钠按照40 mg \cdot kg⁻¹剂量,腹腔麻醉后,在大鼠下腹正中切开长约2 cm,在左侧后腹壁辨识左侧输尿管后,采用4号缝合丝线从左侧输尿管中段两旁分别向腹后壁外侧穿针并引出缝合线,用动脉夹夹闭阴茎,采用TB针向膀胱内缓慢注入吸光度 $A_{600\text{nm}}=0.36$ 的大肠埃希氏菌菌液0.5 mL,然后拉紧腹壁外面的缝合线两端,使输尿管收缩至1/3,将缝合线拉至大鼠背部打结,逐层缝合腹壁切口,恢复饮水和供食,手术后24 h,拆去腹壁外面输尿管结扎线,使输尿管重新开放^[14]。将制备成功的模型随机分为模型组、诺氟沙星组(0.1 g \cdot kg⁻¹,临床剂量7.5倍),血尿胶囊低、中、高剂量组(0.32, 0.64, 1.28 g \cdot kg⁻¹),分别相当于人临床用药量的3.25, 7.5和15倍,取大鼠腹壁切开并膀胱注射生理盐水0.5 mL然后缝合制备10只假手术组大

鼠;另取10只正常大鼠为空白组。

2.2 动物药效指标检测 给药11 d,末次给药前禁食12 h,末次灌胃给药1 h后称定大鼠质量,水合氯醛(10%水合氯醛,0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,取完整肾脏,称湿重,计算脏器比值。

2.3 血尿囊活性成分及潜在靶点的预测 通过检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmospw.com/tcmosp.php>),化学专业数据库(<http://www.organchem.csdb.cn/scdb/default.asp>),中医药证候关联数据库(SymMap, <https://www.symmap.org/>),PharmMapper(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)数据库和文章分别检索菝葜、薏苡仁、棕榈子的化学成分信息。①通过TCMSP数据库以口服利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18的2个吸收、分布、代谢属性值为筛选条件^[15];②使用化学专业数据库,SymMap数据库,PharmMapper数据库进行活性成分初步筛选,再将筛选得到的化合物通过SwissADME(<http://www.swissadme.ch/>)的检验最终确定为候选化合物;③结合药物相关文献,对报道有生物活性和药理作用,但在数据库中并未筛选得到或者未符合筛选标准的成分,也纳入为候选活性成分中。借助有机小分子生物活性数据库(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取化学成分的简化分子线性输入规范(SMILES)信息及2D或者3D的结构信息用于化合物的靶点预测。将候选化合物的结构信息导入SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库中进行预测,物种选“Homo sapiens”,收集并整理出Probability>0的潜在靶点数据库。

2.4 “单味药-活性成分-作用靶点”网络的构建 将在血尿囊中筛选出的活性成分和相关作用靶点导入Cytoscape 3.7.0软件中,构建“单味药-活性成分-作用靶点”网络。

2.5 APN相关靶点筛选 以“Acute pyelonephritis”“pyelonephritis”“nephropylitis”为关键词在治疗靶标数据库(TTD, <https://db.idrblab.org/ttd/>),药物数据库(DrugBank, <https://www.drugbank.ca/>),疾病相关的基因与突变位点数据库(DisGeNET, <https://www.disgenet.org/>),人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>),在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>),合并5个数据库与疾病相关的基因与蛋白质信息,删去重复值,作为疾病靶点的数据^[16]。

2.6 血尿囊治疗APN共同靶点的筛选 将血尿囊的作用靶点,APN疾病相关靶点利用在线韦恩分析工具(<http://www.ehbio.com/ImageGP/index.php/Home/Index/VennDiagram.html>)获取化合物治疗APN的共同靶点。

2.7 血尿囊活性成分-APN靶点蛋白质互作网络的构建 将2.6项下得到的交集靶点导入STRING 11.0b(<https://string-db.org/>)蛋白质分析平台,蛋白种类设置为“Homo sapiens”,最小互作用阈值设定为“highest confidence”(>0.7),其余设置均为默认设置,得到蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图,将信息导入Cytoscape 3.7.0软件中绘制PPI网络,利用“Tools”中的“Network Analysis”功能进行网络拓扑结构分析,以节点度的度值(Degree),接近中心性(CC),介数中心性(BC)为标准,筛选出节点度高于平均值的节点。

2.8 血尿囊活性成分-APN靶点功能与通路的富集分析 将筛选出的血尿囊调治APN的关键靶点录入基因注释工具(Metascape, <http://metascape.org/>)平台,设置 $P < 0.01$,对关键靶点进行基因本体(GO)富集分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,根据 P 值列举前20的GO富集分析和KEGG通路,上传至易生信(<http://www.ehbio.com/>)分析平台,进行数据可视化处理,其中气泡的大小代表该通路的基因数量,颜色代表富集显著性。

2.9 Real-time PCR检测肾脏组织基因表达 收集各组肾脏组织,根据试剂盒说明书进行RNA提取、反转录和扩增,反应结束后,观察扩增曲线、溶解曲线及 C_t 值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 数据分析法对各基因表达进行相对定量计算,再将结果用于统计分析。

2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾脏组织蛋白表达 收集各组肾脏组织提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,凝胶电泳转膜封闭,孵育相应一抗和二抗,显影后采用Image J 1.53a软件分析各条带灰度值,与内参 β -actin的灰度值比值用于统计分析。

2.11 统计学分析 数据结果导入SPSS 13.0.0软件,采用单因素ANOVA分析处理, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血尿囊治疗APN的效果

3.1.1 大鼠肾脏比值与脏器指数 与空白组和假手术比较,模型组左右肾比值和脏器指数均升高

($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,各给药组左右肾比值和脏器指数均不同程度的降低($P<0.05, P<0.01$),见表1。结合解剖观察表明各给药组与模型组比较,造模侧肾脏减小,空腔程度减轻,脓液减少,说明诺氟沙星和血尿胶囊可以改善造模肾脏的损伤。

3.1.2 大鼠血常规检测 与空白组和假手术组比较,模型组白细胞(WBC),中性粒细胞(NEUT),单核细胞(MONO),淋巴细胞(LY)均升高($P<0.05, P<0.01$),与模型组比较,各给药组 WBC, NEUT, MONO, LY 均有降低($P<0.05, P<0.01$),见表2。说明诺氟沙星和血尿胶囊可以调整大鼠 WBC, NEUT, MONO, LY 表达趋近正常,可以调节大鼠的免疫功能。

3.1.3 血清炎性因子检测 与空白组和假手术组比较,模型组 TNF- α , IL-6, NF- κ B 水平升高($P<0.05, P<0.01$),与模型组比较,各给药组 TNF- α ,

表1 血尿胶囊对 APN 大鼠脏器指数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of Xueniao capsule on viscera index in APN rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	数量/只	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	左右肾比值/%	脏器指数/ $g\cdot kg^{-1}$
空白	10		0.98 \pm 0.05	0.41 \pm 0.03
假手术	10		1.14 \pm 0.10	2.74 \pm 0.98
模型	8		1.51 \pm 0.16 ^{1,3)}	3.82 \pm 0.86 ^{1,2)}
诺氟沙星	10	0.1	1.05 \pm 0.09 ⁵⁾	0.60 \pm 0.14 ⁵⁾
血尿胶囊	9	0.32	1.33 \pm 0.16 ⁵⁾	2.89 \pm 0.87 ⁴⁾
	10	0.64	1.16 \pm 0.11 ⁵⁾	2.61 \pm 0.82 ⁵⁾
	10	1.28	1.09 \pm 0.09 ⁵⁾	2.40 \pm 1.18 ⁵⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与假手术组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与模型组比较⁴⁾ $P<0.05$,⁵⁾ $P<0.01$ (表2,3同)。

IL-6, NF- κ B 水平均有降低($P<0.05, P<0.01$),见表3。说明诺氟沙星和血尿胶囊可以降低血清炎性因子。

表2 血尿胶囊对 APN 大鼠血常规的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of Xueniao capsule on blood routine in APN rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	数量/只	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	WBC	NEUT	MONO	LY
空白	10		4.19 \pm 1.22	1.25 \pm 0.34	0.28 \pm 0.08	2.22 \pm 0.82
假手术	10		6.13 \pm 2.46	2.65 \pm 1.40	0.49 \pm 0.12	3.02 \pm 0.88
模型	8		11.22 \pm 2.60 ^{1,3)}	6.68 \pm 1.22 ^{1,2)}	0.68 \pm 0.17 ^{1,3)}	3.88 \pm 1.03 ^{1,2)}
诺氟沙星	10	0.1	4.22 \pm 1.69 ⁵⁾	1.91 \pm 0.70 ⁵⁾	0.29 \pm 0.13 ⁵⁾	2.07 \pm 0.65 ⁵⁾
血尿胶囊	9	0.32	6.59 \pm 1.95 ⁵⁾	3.53 \pm 0.87 ⁴⁾	0.43 \pm 0.17 ⁵⁾	2.96 \pm 1.06 ⁴⁾
	9	0.64	5.56 \pm 1.26 ⁵⁾	2.53 \pm 1.20 ⁵⁾	0.41 \pm 0.16 ⁵⁾	2.82 \pm 0.95 ⁴⁾
	9	1.28	4.92 \pm 2.05 ⁵⁾	2.22 \pm 0.85 ⁵⁾	0.34 \pm 0.11 ⁵⁾	2.58 \pm 0.95 ⁴⁾

表3 血尿胶囊对 APN 大鼠血清炎性因子的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of Xueniao capsule on serum inflammatory factors in APN rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	数量/只	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	TNF- α	IL-6	NF- κ B
空白	10		50.79 \pm 15.25	41.63 \pm 14.07	150.57 \pm 25.59
假手术	10		85.44 \pm 23.23	62.80 \pm 12.54	193.93 \pm 31.46
模型	8		168.96 \pm 19.59 ^{1,2)}	101.69 \pm 27.32 ^{1,3)}	225.13 \pm 49.05 ^{1,2)}
诺氟沙星	10	0.1	73.61 \pm 15.03 ⁵⁾	61.36 \pm 13.52 ⁵⁾	178.10 \pm 26.68 ⁵⁾
血尿胶囊低剂量	9	0.32	117.77 \pm 38.51 ⁵⁾	77.46 \pm 13.94 ⁵⁾	181.89 \pm 30.29 ⁵⁾
血尿胶囊中剂量	9	0.64	90.21 \pm 14.94 ⁵⁾	71.21 \pm 11.59 ⁵⁾	165.74 \pm 38.41 ⁵⁾
血尿胶囊高剂量	9	1.28	79.28 \pm 10.67 ⁵⁾	65.49 \pm 12.55 ⁵⁾	167.93 \pm 20.36 ⁵⁾

3.2 血尿胶囊活性成分及潜在靶点预测 通过数据库和文献共筛选到血尿胶囊候选活性成分41个,其中薏苡仁18个,菝葜17个,棕榈子6个。将候选化合物结构信息导入 SwissTargetPrediction 数据库中,获得820个化合物预测靶点,其中菝葜靶点306个,薏苡仁靶点420个,棕榈子靶点94个,见表4。

3.3 血尿胶囊治疗 APN 共有靶点的筛选 通过数据库筛选并删去重复值最终得到与 APN 相关的疾病靶点412个。将41个活性化合物靶点基因与 APN 靶点经过韦恩分析后,得到交集的潜在靶点39个,分别为 Pim-1 原癌基因(PIM1),黄嘌呤脱氢酶(XDH),溶质载体家族5成员2(SLC5A2),二肽

表4 血尿胶囊主要活性化学成分

Table 4 Main active ingredient of Xueniao capsule

药物	标记	主要活性成分	药物	标记	主要活性成分
菝葜	A1	棕榈酸	YXR5		油酸
	BQ2	顺式白藜芦醇	YXR6		异甘草素
	BQ3	白藜芦醇	YXR7		亚油酸
	BQ4	5-[(Z)-2-(3,4-二羟基苯基)乙烯基]间苯二酚	YXR8		豆甾醇
	BQ5	薯蓣皂甙元	YXR9		亚麻酸
	BQ6	落新妇苷	YXR10		黄豆苷元
	C1	β -谷固醇	YXR11		亚油酸甲酯
	BQ8	山柰酚	YXR12		胆固醇
	BQ9	黄杞苷	YXR13		十二碳二烯
	BQ10	伪原薯蓣皂甙	YXR14		α -单油酸甘油酯
	BQ11	异黄杞苷	YXR15		十八烯酸单甘油酯
	BQ12	二氢榭皮素	YXR16		谷固醇 α 1
	BQ13	顺二氢榭皮素	C1		β -谷固醇
	BQ14	(2R,3S)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol	A2		没食子酸
	BQ15	谷甾醇	棕榈子	ZLZ1	对羟基苯甲酸
	A2	没食子酸	A2		没食子酸
	BQ17	原儿茶酸	B1		原儿茶酸
薏苡仁	YXR1	柚皮素	ZLZ4		原儿茶酸
	A1	棕榈酸	ZLZ5		花青素-3-葡萄糖苷
	YXR3	肉豆蔻酸	ZLZ6		没食子酸表儿茶精酯
	YXR4	秋水仙碱			

酶1(DPEP1),GLI系列锌指2(GLI2),Serpine家族E成员1(SERPINE1),基质金属蛋白酶9(MMP-9),雄激素受体(AR),IL-6,白蛋白(ALB),溶质载体家族22成员6(SLC22A6),DNA拓扑异构酶II alpha(TOP2A),细胞色素P450家族1亚家族A成员2(CYP1A2),细胞色素P450家族3亚家族A成员4(CYP3A4),细胞色素P450家族1亚家族A成员1(CYP1A1),TNF,血管内皮生长因子A(VEGFA),凝血因子II(F2),趋化因子受体1(CXCR1),肾素(REN),细胞间黏附分子1(ICAM1),IL-2,RET原癌基因,热激蛋白90 Alpha家族A类成员1(HSP90AA1),胎盘生长因子(PGF),前列腺素-内过氧化物合酶2(PTGS2),MAPK1(丝裂原激活的蛋白激酶1),溶质载体家族22成员12(SLC22A12),MMP-3,凝血因子X(F10),1型血管紧张素II受体(AGTR1),维生素D受体(VDR),STAT3,维甲酸受体 α (RARA),受体酪氨酸激酶(KIT),端粒酶逆转录酶(TERT),JAK2,醛脱氢酶2家庭成员(ALDH2),Fms相关受体酪氨酸激酶3(FLT3),这

39个靶点即为血尿胶囊治疗APN的共有靶点即得到血尿胶囊治疗APN的共有靶点,见增强出版内容。

3.4 血尿胶囊活性成分靶点-APN靶点PPI网络的构建 将上述39个潜在靶点导入STRING数据库,获得蛋白相互作用信息,剔除2个游离点后构建PPI网络,再运用Cytoscape 3.7.0软件绘制PPI网络图,该网络共有228条边,37个节点,见增强出版内容。

3.5 靶点功能与通路的富集 将筛选得到的39个相关靶点导入Metascape平台进行GO富集分析及KEGG信号通路分析。

3.5.1 GO富集 GO富集分析了关键靶点的功能分布,根据P值降序选取前20个GO分析条目,GO共富集了704个生物过程,22个细胞组分,59个分子功能,见表5~7。

3.5.2 KEGG通路分析 由KEGG信号通路分析结果显示,关键靶点主要涉及到癌症通路、糖尿病并发症中的AGE/RAGE信号通路,IL-17信号通路,Th17细胞分化,TNF信号通路,PI3K/Akt信号通路,

表 5 血尿胶囊治疗 APN 的 GO 生物过程关键靶点

Table 5 GO biological process in treatment of APN with Xueniao capsule

GO	功能	lgP	基因数/个
GO:0030335	positive regulation of cell migration	-14.90	15
GO:2000147	positive regulation of cell motility	-14.63	15
GO:0051272	positive regulation of cellular component movement	-14.45	15
GO:0040017	positive regulation of locomotion	-14.33	15
GO:0072593	reactive oxygen species metabolic process	-14.12	12
GO:0046425	regulation of JAK-STAT cascade	-14.04	10
GO:0046427	positive regulation of JAK-STAT cascade	-13.93	9
GO:1904894	positive regulation of STAT cascade	-13.80	9
GO:1904892	regulation of STAT cascade	-13.76	10
GO:0007259	JAK-STAT cascade	-13.48	10
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	-13.25	12
GO:0097696	STAT cascade	-13.21	10
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	-12.96	12
GO:0042531	positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	-12.81	8
GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	-12.67	15
GO:2000377	regulation of reactive oxygen species metabolic process	-12.57	10
GO:0042509	regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	-12.26	8
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	-12.20	13
GO:0007260	tyrosine phosphorylation of STAT protein	-12.13	8
GO:2000379	positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	-11.57	8

JAK/STAT 信号通路等,见增强出版内容,靶点通路富集结果见表 8。这些都表明血尿胶囊是通过调节多个生物过程及多个通路的协调发挥治疗 APN 的作用。

利用 Cytoscape 3.7.0 软件构建血尿胶囊活性成分-交集靶点-通路网络,见增强出版内容。通过 Cytoscape 3.7.0 内置的功能分析血尿胶囊治疗 APN 网络拓扑学参数,得到核心成分及核心作用靶点。以度值为标准,筛选出节点度值大于等于中位数化合物,表明山柰酚连接度为 11,预测山柰酚为血尿胶囊治疗 APN 的主要成分,其次为秋水仙碱连接度

表 6 血尿胶囊治疗 APN 的 GO 细胞组成

Table 6 GO cell composition in treatment of APN with Xueniao capsule

GO	功能	lgP	基因数/个
GO:0005788	endoplasmic reticulum lumen	-5.19	6
GO:0045121	membrane raft	-5.04	6
GO:0098857	membrane microdomain	-5.03	6
GO:0098589	membrane region	-4.94	6
GO:0009897	external side of plasma membrane	-4.54	6
GO:0034774	secretory granule lumen	-3.93	5
GO:0031012	extracellular matrix	-3.85	6
GO:0031093	platelet alpha granule lumen	-3.84	3
GO:0060205	cytoplasmic vesicle lumen	-3.82	5
GO:0031983	vesicle lumen	-3.82	5
GO:0098552	side of membrane	-3.59	6
GO:0005901	caveola	-3.57	3
GO:0031091	platelet alpha granule	-3.45	3
GO:0044853	plasma membrane raft	-3.19	3
GO:1904813	ficolin-1-rich granule lumen	-3.06	3
GO:0043235	receptor complex	-2.97	5
GO:0090575	RNA polymerase II transcription factor complex	-2.72	3
GO:0101002	ficolin-1-rich granule	-2.56	3
GO:0062023	collagen-containing extracellular matrix	-2.48	4
GO:0044798	nuclear transcription factor complex	-2.46	3

为 9,柚皮素连接度为 8,见表 9。这些候选化合物可能在血尿胶囊治疗 APN 中起着重要作用。PTGS2 在网络中的连接度为 22,预测 PTGS2 为血尿胶囊治疗 APN 最主要的靶点,MAPK1,雄激素受体(AR),IL-6,TERT TNF- α ,MMP-9,VEGFA,STAT3,IL-2 也是相对重要的靶点,见表 10。由网络图可知存在 1 个化合物与多个靶点之间的相互作用,同时也可能存在不同化合物共同作用于同 1 个靶点的现象,这充分体现了中药多成分与多靶点之间共同作用的机制。

3.6 实验验证

3.6.1 血尿胶囊对 PTGS2, MAPK1, PI3K, Akt2, JAK2, STAT3 mRNA 表达的影响 对网络药理学预测的结果进行分析后,进行了 PTGS2,MAPK1,PI3K, Akt2, JAK2, STAT3 mRNA 表达水平的检测。mRNA 结果显示,与空白组比较,模型组的 PTGS2, MAPK1, PI3K, Akt2, JAK2, STAT3 mRNA 的表达量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,血尿胶囊低剂量

表7 血尿胶囊治疗APN的GO分子功能

Table 7 GO molecular functions in treatment of APN with Xueniao capsule

GO	功能	lgP	基因数/个
GO:0101021	estrogen 2-hydroxylase activity	-7.49	3
GO:0101020	estrogen 16-alpha-hydroxylase activity	-6.75	3
GO:0016725	oxidoreductase activity, acting on CH or CH2 groups	-6.42	3
GO:0048037	cofactor binding	-6.11	8
GO:0020037	heme binding	-5.74	5
GO:0046906	tetrapyrrole binding	-5.58	5
GO:0070330	aromatase activity	-5.14	3
GO:0016712	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxyge	-4.69	3
GO:0019825	oxygen binding	-4.65	3
GO:0008395	steroid hydroxylase activity	-4.58	3
GO:0005506	iron ion binding	-4.09	4
GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxyge	-3.99	4
GO:0004497	monooxygenase activity	-3.31	3
GO:0016491	oxidoreductase activity	-3.07	6
GO:0005126	cytokine receptor binding	-6.92	7
GO:0070851	growth factor receptor binding	-5.75	5
GO:0008083	growth factor activity	-5.35	5
GO:0048018	receptor ligand activity	-4.11	6
GO:0030545	receptor regulator activity	-3.87	6
GO:0005125	cytokine activity	-3.48	4

组 MAPK1, PI3K, JAK2, STAT3 表达量显著降低 ($P<0.01$); 中剂量组 MAPK1, PTGS2, PI3K, JAK2, STAT3 表达量降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 高剂量组 PTGS2, MAPK1, PI3K, Akt2, JAK2, STAT3 表达量降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 11, 12。

3.6.2 血尿胶囊对 PI3K, Akt2, JAK2, STAT3 蛋白表达的影响 Western blot 结果表明, 与空白组比较, 模型组的 PI3K, Akt2, JAK2, STAT3 的蛋白表达量均升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 低剂量组 PI3K, JAK2, STAT3 的蛋白表达量均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 中剂量组 PI3K, JAK2, STAT3 的蛋白表达量降低 ($P<0.01$); 高剂量组 PI3K, JAK2, STAT3 的蛋白表达量降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 13, 图 1。

4 讨论

本研究首先对血尿胶囊治疗 APN 的药效进行

了实验, 结果表明, 给药组造模侧肾脏与模型组比较均有不同程度的减小且脓液量与空腔程度也比模型组减少, 血常规结果说明给药各组的炎症程度有所减缓, 血清因子的检测结果表明血尿胶囊可以下调炎症因子的表达, 综合以上结果可以血尿胶囊对于 APN 具有一定的药物疗效。

然后使用网络药理学的思路与方法, 通过分析预测出山柰酚, 秋水仙碱, 柚皮素可能为血尿胶囊治疗 APN 的主要成分, PTGS2, MAPK1, IL-6, TNF- α , VEGFA, IL-2 可能为血尿胶囊治疗 APN 的关键靶点, 由 KEGG 通路富集分析结果可知, 血尿胶囊治疗急性肾炎涉及到的通路为 IL-17 信号通路, Th17 信号通路, TNF 信号通路、PI3K/Akt 信号通路, JAK/STAT 信号通路等通路。以上的预测的结果为血尿胶囊治疗 APN 的进一步研究提供思路与参考资料。

PTGS2 又称环氧合酶 2 (COX-2), 在炎症反应中具有特殊作用。COX 在特殊条件下将花生四烯酸酯转化为前列腺素 G2 (PGG2) 然后过氧化物酶将 PGG2 还原为前列腺素 H2 (PGH2), PGH2 会进一步衍生出其他前列腺素和血栓素等致炎物质^[17]。研究表明选择性的抑制 COX-2 可以发挥抗炎、镇痛、解热的作用如阿司匹林和布洛芬等非甾体抗炎药^[18]。MAPK1, 丝裂原活化蛋白激酶是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 细胞外信号调节激酶 (ERK) 是 MAPKs 的 4 个亚族之一, 其的活化与核移位经常被看作是细胞对脂多糖的刺激有反应的标志, 脂多糖诱导 ERK 的活化可导致细胞分泌大量的 TNF- α , IL-6^[19-20]。IL-6 是多效性炎性细胞因子, 由单核细胞以及巨噬细胞产生, 是炎症介质网络的关键成份, 参与炎症反应及炎症损伤过程。IL-6 不仅对血管内皮细胞及炎症细胞具有直接的激活和毒性作用外, 还会诱导急性期蛋白的合成, 催化和放大炎症反应和毒性作用, 造成组织细胞损害^[21]。IL-6 可以促进巨噬细胞和淋巴细胞分泌炎性因子, 导致炎症瀑布级联, 研究表明 IL-6 的血清浓度可以反映炎症的程度, 是反应机体炎症程度与组织损伤的重要指标^[22]。TNF- α 主要由活化的单核/巨噬细胞产生, 具有广泛的生物学活性, 在炎症反应与免疫应答等过程中起重要作用。其自身为一种重要的炎性因子, 又可进一步促进 IL-6, IL-8, IL-10 等细胞因子的产生, 进一步加重炎症反应^[23]。TNF- α 可与 1 型 TNF 受体 (TNFR1) 结合, 激活 NF- κ B 途径, 调控下游的炎症反应, 促进 COX-2, IL-1 β , IL-6 等炎

表 8 血尿酸治疗 APN 关键靶点通路富集

Table 8 Enrichment results of key target pathways in treatment of APN with Xueniao capsule

GO	通路	lgP	基因数 /个	基因种类
hsa05200	pathways in cancer	-17.15	15	AGTR1, AR, FLT3, GLI2, HSP90AA1, IL-6, KITMMP-9, PGF, MAPK1, PTGS2, RARA, RET, STAT3, VEGFA
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	-15.61	10	AGTR1, ICAM1, IL-6, JAK2, SERPINE1, PIM1, MAPK1, STAT3, TNF, VEGFA
hsa04657	IL-17 signaling pathway	-10.06	7	HSP90AA1, IL-6, MMP-3, MMP-9, MAPK1, PTGS2, TNF
hsa05221	acute myeloid leukemia	-9.66	6	FLT3, KIT, PIM1, MAPK1, RARA, STAT3
hsa04659	Th17 cell differentiation	-9.63	7	HSP90AA1, IL-2, IL-6, JAK2, MAPK1, RARA, STAT3
hsa04668	TNF signaling pathway	-9.60	7	ICAM1, IL-6, MMP-3, MMP-9, MAPK1, PTGS2, TNF
hsa04151	PI3K/Akt signaling pathway	-7.43	8	HSP90AA1, IL-2, IL-6, JAK2, KIT, PGF, MAPK1, VEGFA
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	-6.90	5	IL-6, JAK2, MAPK1, STAT3, VEGFA
hsa04060	cytokine-cytokine receptor interaction	-6.84	7	FLT3, IL-2, IL-6, CXCR1, KIT, TNF, VEGFA
hsa05323	rheumatoid arthritis	-6.62	5	ICAM1, IL-6, MMP-3, TNF, VEGFA
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	-6.36	5	IL-6, SERPINE1, MAPK1, STAT3, VEGFA
hsa05142	Chagas disease(American trypanosomiasis)	-6.34	5	IL-2, IL-6, SERPINE1, MAPK1, TNF
hsa05418	fluid shear stress and atherosclerosis	-5.63	5	HSP90AA1, ICAM1, MMP-9, TNF, VEGFA
hsa05161	hepatitis B	-5.60	5	IL-6, MMP-9, MAPK1, STAT3, TNF
hsa05321	inflammatory bowel disease (IBD)	-5.55	4	IL-2, IL-6, STAT3, TNF
hsa05230	central carbon metabolism in cancer	-5.55	4	FLT3, KIT, MAPK1, RET
hsa04630	JAK/STAT signaling pathway	-5.43	5	IL-2, IL-6, JAK2, PIM1, STAT3
hsa05140	leishmaniasis	-5.34	4	JAK2, MAPK1, PTGS2, TNF
hsa05206	microRNAs in cancer	-5.26	6	MMP-9, PIM1, MAPK1, PTGS2, STAT3, VEGFA
hsa05164	influenza A	-5.21	5	ICAM1, IL-6, JAK, 2MAPK1, TNF

表 9 血尿酸主要活性成分网络节点特征参数

Table 9 Network node characteristic parameters of main active ingredients of Xueniao capsule

成分	连接度	介度	紧密度
山柰酚	11	0.087 1	0.407 7
秋水仙碱	9	0.046 2	0.369 6
柚皮素	8	0.034 3	0.333 3
亚麻酸	7	0.035 5	0.418 5
顺式白藜芦醇	7	0.029 1	0.369 6
亚油酸	6	0.028 5	0.411 3
肉豆蔻酸	6	0.027 1	0.348 0
白藜芦醇	6	0.024 7	0.381 5
5-[(Z)-2-(3,4-二羟基苯基)乙烯基]间苯二酚	6	0.022 8	0.353 2
没食子酸表儿茶精酯	6	0.009 1	0.345 5

表 10 血尿酸主要活性成分靶点网络节点特征参数

Table 10 Feature parameters of target network nodes for the main active ingredients of Xueniao capsule

基因	连接度	介度	紧密度
PTGS2	22	0.222 0	0.437 8
MAPK1	20	0.118 4	0.414 8
AR	19	0.152 3	0.400 8
IL-6	17	0.065 7	0.394 2
TERT	15	0.112 7	0.397 5
TNF-α	13	0.032 7	0.353 2
MMP-9	13	0.058 5	0.394 2
VEGFA	11	0.032 9	0.378 5
STAT3	11	0.024 8	0.366 8
IL-2	10	0.045 3	0.350 6

症因子的分泌^[24]。VEGFA 在血管生成和内皮细胞生长中具有活性,诱导内皮细胞增殖,促进细胞迁移,抑制细胞凋亡并诱导增加血管通透性。研究表

明血管内皮生长因子可以通过自身的磷酸化激活 PI3K,与一些炎性疾病有关^[25]。IL-2 主要由活化的 T 细胞产生,具有促进淋巴细胞生长、增殖、分化的作用,对机体的免疫应答和抗病毒感染等有重要作

表11 血尿胶囊对APN大鼠左肾组织Akt2,PI3K,JAK2 mRNA表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 11 Effect of Xueniao capsule on Akt2,PI3K,JAK2 mRNA expression in left kidney tissue of APN rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	数量/只	剂量/g·kg ⁻¹	Akt2	PI3K	JAK2
空白	10		0.221 6±0.003 5	0.231 3±0.113 7	0.404 8±0.030 6
模型	8		1.166 1±0.056 1 ¹⁾	1.115 4±0.557 0 ¹⁾	1.001 3±0.073 1 ¹⁾
血尿胶囊	9	0.32	0.847 9±0.156 3	0.558 7±0.146 0 ³⁾	0.705 3±0.065 4 ³⁾
	9	0.64	0.772 7±0.119 1	0.295 1±0.110 6 ³⁾	0.678 7±0.014 1 ³⁾
	9	1.28	0.400 4±0.020 7 ²⁾	0.232 2±0.098 5 ³⁾	0.515 5±0.035 5 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表12同)。

表12 血尿胶囊对APN大鼠左肾组织STAT3,PTGS2,MAPK1 mRNA表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 12 Effect of Xueniao capsule on STAT3,PTGS2 and MAPK1 mRNA expression in left kidney tissue of APN rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

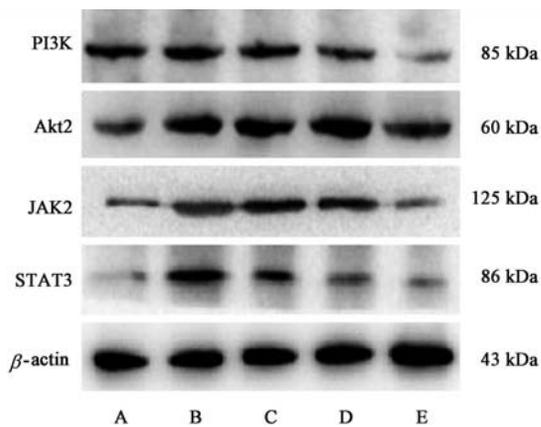
组别	数量/只	剂量/g·kg ⁻¹	STAT3	PTGS2	MAPK1
空白	10		0.158 9±0.005 4	0.242 3±0.017 5	0.402 9±0.006 7
模型	8		1.000 1±0.022 3 ¹⁾	1.005 6±0.150 2 ¹⁾	1.000 1±0.021 9 ¹⁾
血尿胶囊	9	0.32	0.533 8±0.016 8 ³⁾	0.900 7±0.046 4	0.668 7±0.079 9 ³⁾
	9	0.64	0.231 1±0.001 1 ³⁾	0.749 0±0.022 4 ²⁾	0.538 2±0.002 0 ³⁾
	9	1.28	0.210 8±0.069 3 ³⁾	0.441 4±0.107 0 ³⁾	0.452 0±0.024 5 ³⁾

表13 血尿胶囊对APN大鼠左肾组织PI3K,Akt2,JAK2,STAT3蛋白表达量的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 13 Effect of Xueniao capsule on the expression of PI3K,Akt2,JAK2, and STAT3 protein in left kidney tissue of APN rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	数量/只	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/ β -actin	Akt2/ β -actin	STAT3/ β -actin	JAK2/ β -actin
空白	10		0.51±0.18	0.87±0.07	0.24±0.07	0.51±0.24
模型	8		0.85±0.15 ²⁾	1.00±0.38 ¹⁾	0.93±0.57 ²⁾	1.54±0.30 ¹⁾
血尿胶囊	9	0.32	0.60±0.13 ³⁾	1.23±0.69 ³⁾	0.54±0.35 ⁴⁾	0.87±0.17 ⁴⁾
	9	0.64	0.31±0.06 ³⁾	2.07±1.57	0.63±0.47 ⁴⁾	0.07±0.01 ⁴⁾
	9	1.28	0.19±0.10 ⁴⁾	0.90±0.18	0.02±0.01 ⁴⁾	0.02±0.01 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01,²⁾P<0.05;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01。



A. 空白组;B. 模型组;C. 血尿胶囊低剂量组;D. 血尿胶囊中剂量组;E. 血尿胶囊高剂量组

图1 各组APN大鼠左肾组织PI3K,Akt2,JAK2,STAT3蛋白电泳
Fig. 1 Electrophoresis of PI3K,Akt2,JAK2, and STAT3 protein in the left kidney tissue APN rats in each group

用,能刺激已被特异性抗原或致丝裂因数启动的T细胞增殖^[26-27]。

通过体内动物实验结果可知,血尿胶囊可以下调PI3K,Akt2,JAK2,STAT3基因与蛋白的表达,初步确定血尿胶囊治疗APN可能通过PI3K/Akt通路与JAK/STAT通路共同发挥作用。JAK/STAT信号通路是很多细胞因子信号转导的共同途径,是应激的炎症信号通路,涉及自身免疫和炎症疾病发病机理的许多细胞因子都与JAK/STAT信号通路有关^[28]。这一通路涉及到IL-6(gp130)受体家族,IL-6激活受体后,受体激活与其结合的JAK蛋白,JAK蛋白活化后,JAK蛋白自身磷酸化以及受体磷酸化,然后带有SH2结构的STAT蛋白和其磷酸化位点进行结合,当STAT3磷酸化后STAT3向核内转移

并与靶基因结合从而调节基因的转录活性,机体通过这一过程激活炎症反应。研究表明在炎症反应过程中 γ 干扰素(IFN- γ)可通过JAK/STAT通路实现放大各种炎症细胞因子的效应,同时IL-10,IL-4也可通过JAK/STAT通路抑制炎症反应的扩大^[29]。PI3K/Akt信号通路是控制细胞生长,迁移,增殖和代谢的一条重要信号通路,在炎症、肿瘤、代谢和心血管疾病、肾脏疾病的发病机制中起重要作用^[30]。PI3K/Akt信号通路参与是许多信号传导过程的下游,当PI3K/Akt信号通路被激活,Akt转移到细胞质和细胞核,Akt通过自身磷酸化可以调节多种包括VEGF,MAPK,NF- κ B,p53(人体抑癌基因)在内的通路下游通路。NF- κ B是机体重要的炎症因子之一,同时调节其他炎性因子的表达,Akt激活NF- κ B的抑制蛋白(I κ B)激酶(I κ K α),导致NF- κ B的抑制剂I κ B的降解,从而使NF- κ B从细胞质中释放出来进行核转位,激活其靶基因而促进机体炎症反应进程。

本实验通过网络药理学的方法加上实验验证初步探讨出血尿胶囊治疗APN的途径是多方位的,多个靶点与多通路共同起作用。更具体的机制路线还需要更多的体内外实验来验证,本实验为血尿胶囊治疗APN这一研究方向提供了思路与一定的前期研究基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 李碧怡,彭嘉健,邝敏华,等. 八正散对急性肾盂肾炎模型大鼠炎症因子和局部免疫功能的影响[J]. 中国中医急症,2020,29(12):2133-2136.

[2] 刘敏,张艳秋,贾胜琴. 急性肾盂肾炎病因及发病机制的研究进展[J]. 实用医技杂志,2019,26(10):1292-1294.

[3] 李新建,徐绍林,贡联兵. 急性肾盂肾炎临床合理用药[J]. 人民军医,2020,63(8):810-813.

[4] 徐红艳,胡国华,龙丽帆. 急性肾盂肾炎中医治疗研究进展[J]. 实用中医药杂志,2019,35(6):759-760.

[5] 钱芳芳,张长林. 菝葜化学成分与药理作用的研究进展[J]. 药学研究,2013,32(4):229-231.

[6] 喻巧容,黄锁义. 薏苡化学成分与药理作用研究概况[J]. 中国医药导报,2019,16(15):21-24.

[7] 叶桦珍,周子君. 棕榈子高效液相色谱指纹图谱的构建[J]. 福建分析测试,2018,27(6):1-5.

[8] 任艳,邓燕君,马焱彬,等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战[J]. 中草药,2020,51(18):4789-4797.

[9] 姜廷新,刘艳. 血尿胶囊治疗急性肾盂肾炎活性部位作用临床探讨[J]. 黑龙江科学,2018,9(9):24-25.

[10] 胡剑卓. 血尿胶囊在急性肾炎患者中的疗效观察及对炎症因子的影响研究[J]. 中国处方药,2018,16(11):92-93.

[11] 冯静,赵白云,许颖川,等. 血尿胶囊治疗无症状性血尿39例疗效观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2012,13(4):345-346.

[12] 姚静,杨彦坤,杨柳,等. 基于细胞调控因子探讨血尿胶囊对急性肾盂肾炎模型大鼠的作用及机制[J]. 中成药,2017,39(8):1705-1709.

[13] 姚静. 血尿胶囊治疗急性肾盂肾炎活性部位筛选及作用机制研究[D]. 太原:山西省中医药研究院,2017.

[14] 周栋,孙伟,何伟明,等. 急性肾盂肾炎大鼠模型的建立与观察[J]. 中国中医药信息杂志,2007,1(1):30-32.

[15] 许海玉,黄璐琦,卢鹏,等. 基于体内ADME过程和网络药理学的中药现代研究思路[J]. 中国中药杂志,2012,37(2):142-145.

[16] 李文静,肖帅,郑琴,等. 基于GC-MS技术和网络药理学探讨益智仁挥发油治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 中国中药杂志,2021,46(12):3052-3057.

[17] LEVIN G, DUFFIN K L, OBUKOWICZ M G, et al. Differential metabolism of dihomogamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E₁ and prostaglandin E₂ [J]. Endocr J, 2002,365(2):489-496.

[18] LUCIDO M J, ORLANDO B J, VECCHIOALEX J, et al. Crystal structure of aspirin-acetylated human cyclooxygenase-2: insight into the formation of products with reversed stereochemistry [J]. Biochem, 2016,55(8):1226-1238.

[19] HE C, LIN H Y, WANG C C, et al. Exopolysaccharide from Paecilomyces lilacinus modulates macrophage activities through the TLR4/NF- κ B/MAPK pathway [J]. Mol Med Rep, 2019,20(6):4943-4952.

[20] 王冰,吴燕红,杨志,等. MAPK/ERK信号转导通路的分子生物学特征及生物效应[J]. 第四军医大学学报,2005(S1):18-21.

[21] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014,6(10):a016295,.

[22] MA X J. Regulation of cytokine gene expression in immunity and diseases regulation of IL-6 in immunity and diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2016,5(4):79-88.

- [23] LI J, ZHANG H B, HUANG W L, et al. TNF- α inhibitors with anti-oxidative stress activity from natural products [J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12 (13):1408-1421.
- [24] CHATZANTONI K, MOUZAKI A. Anti-TNF- α antibody therapies in autoimmune diseases [J]. *Curr Top Med Chem*, 2006, 6(16):1707-1714.
- [25] PUNYTE V, VILKEVICIUTE A, GEDVILAITE GRETA, et al. Association of VEGFA, TIMP-3, and IL-6 gene polymorphisms with predisposition to optic neuritis and optic neuritis with multiple [J]. *Sclerosis Ophthalmic Genet*, 2020, 42(1):1-10.
- [26] MIZUI M. Natural and modified IL-2 for the treatment of cancer and autoimmune diseases [J]. *Clin Immunol*, 2018, 9(206):63-70.
- [27] ABBAS A K, TROTTA E R, SIMEONOV D, et al. Revisiting IL-2: biology and therapeutic prospects [J]. *Sci Immunol*, 2018, 3(25):1482.
- [28] BANERJEE S, BIEHL A, GADINAX M, et al. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects [J]. *Drugs*, 2017, 77(5):521-546.
- [29] GAO Q W, LIANG X W, SHAIKH A S, et al. JAK/STAT signal transduction: promising attractive targets for immune, inflammatory and hematopoietic diseases [J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19(5):487-500.
- [30] WANG D Z, JINX M Y, ZHAO X Y, et al. FGF1^{ΔHBS} ameliorates chronic kidney disease via PI3K/AKT mediated suppression of oxidative stress and inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6):464.

[责任编辑 顾雪竹]

·书讯·

宫颈环扎术治疗妊娠期宫颈机能不全 ——评《妇产科手术学》

妇产科学是现代医学的重要学科,对象以女性为主。妇产科紧随医学科学的发展,要求医生掌握内窥镜、显微外科、微创技术和介入疗法等新型手术材料的使用,确保手术后常见的并发症与基础病的治疗。

《妇产科手术学》,刘新民主编,由人民卫生出版社2005年5月出版。对各种各样的手术创设了“术前评估”和“手术探究”两个大栏目,收集近年国内、外妇产科手术方面的新理论、新知识等内容。该书开篇就着重讲述了手术的各项基本功、器械的使用方法、手术基本操作,种类繁多,手术的范围和复杂程度不同,从手术操作本身来说,其基本技术,如组织分割、止血、打结、缝合等是相同的,所以外科手术基本操作是一切手术的共性和基础。在外科临床中,手术能否顺利地、在一定程度上取决于对基本操作的熟练程度及其理论的掌握。手术者要成功地完成手术,就必须掌握手术的各项基本功,一例成功的手术,其手术理论与技巧都是很重要,因为成功的手术是建立在正确而明智的决策之上,即诊断正确、严格手术指征、手术式选择和手术范围设计的合理。明智的决策又是取决于其知识、思维、判断和设计等水平,因此要成为一名称职的妇产科医生,务必要从基本功开始。在第42章里会阴、宫颈切开缝合术,讨论宫颈机能不全导致流产和早产的对策,宫颈机能就是指宫颈的功能和状态,宫颈机能不全的话,就会严重影响怀孕,容易出现习惯性流产的先兆。宫颈机能不全是由于先天性宫颈发育异常或者某些宫腔操作手术损伤了宫颈,导致宫颈功能下降而引起的。这类的女性一旦怀孕后,宫颈的功能低下,无法承受增大的胎儿及胎盘所带来的压力而导致早产或流产,最常见于妊娠中晚期以后的女性。书中讲到诊断宫颈机能不全要依据两次或多次的中期自然流产病史。目前公认的诊断方法,是经阴道B超检查,在早期宫颈机能不全可以看到宫颈内口的缩短或者呈漏斗状,对于这种手术的策略,书中也很明确地给出了答案,采用手术缝合的方法也就是宫颈环扎术,加强薄弱的宫颈,最好在14周以内进行手术。有资料显示,患有宫颈机能不全的孕妇是可以尝试顺产的,并且大多数都能顺产成功。做过宫颈环扎术的孕妇,可以在怀孕九个月的时候去医院拆除环扎带,等待自然的分娩。在没有拆除环扎带的时候,出现早产的迹象或者是胎膜破裂,应该马上去医院检查,必要时拆除环扎术带来保胎。

书中第2章详细讲解了手术前准备与手术后处理,随着医学模式的转变和护理技术的发展,护理心理学作为一门应用学科普遍得到认可并广泛应用于临床。手术室护士与患者接触时间是短暂的,患者面对这样特殊的治疗存在很多不良心理反应,常导致患者产生强烈的生理及心理反应,干扰手术和麻醉的正常实施。但在手术室这种特殊的环境中,要求我们更要加强自身的心理修养,手术前后护理尤为重要,通过我们的护理,能够让医护人员与患者建立起人性化的亲密信任、依赖,解除患者对手术室的陌生感及紧张情绪,降低患者应激反应,避免因心理因素造成的生命体征不稳,可提高手术成功率,提高患者的满意度,也提高了手术室护士的专业素质,促进了心理素质和心理护理的发展。

《妇产科手术学》是国内广大妇产科工作者,尤其是年轻医师称自修必备、不可不读的参考书,能够给初步接触医学的人起到很好的指导作用,是一本不可多得的科普类书籍。

(作者李青霞,南昌新时代妇产医院,南昌 330029)