基于网络药理学和分子对接探究防己茯苓汤治疗缺血再灌注急性肾损伤的作用机制

黄俊鑫[1]，王碧霞[1]，邹汉斌[1]，吴秋欣[2]，尹欣[3]，黄淑颖[4]，
谢俊彬[1]，杨清琪[1]，高志岩[5]，张征宇[5*]
（1.广州医科大学 第二临床学院，广州 511436；
2. 广州医科大学 金域检验学院，广州 511436；
3. 广州医科大学 儿科学院，广州 511436；
4. 广州医科大学 第三临床学院，广州 511436；
5. 广州医科大学 基础医学院，广州 511436）

［摘要］ **目的：**基于网络药理学和实验验证探究防己茯苓汤治疗缺血再灌注急性肾损伤（AKI）的作用机制。**方法：**通过中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP）数据库和文献挖掘收集防己茯苓汤活性成分，利用SwissTargetPrediction预测活性成分作用靶点；借助GeneCards、在线人类孟德尔遗传数据库（OMIM）、疾病相关的基因与突变位点数据库（DisGeNET）、治疗靶标数据库（TTD）收集AKI靶点；利用STRING平台构建蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）网络；采用Metascape平台对核心靶点进行基因本体（GO）富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路分析；利用Cytoscape软件构建药物-活性成分-作用靶点-疾病网络图和活性成分-作用靶点-信号通路网络图；使用AutoDock进行分子对接；最后采用动物实验验证分析结果。**结果：**筛选出防己茯苓汤活性成分137种及药物靶点858个，AKI疾病靶点1 294个，防己茯苓汤治疗AKI作用靶点267个，其中磷脂酰肌醇3-激酶调节亚基1（PIK3R1）、磷脂酰肌醇3-激酶催化亚单位α（PIK3CA）、原癌基因酪氨酸蛋白激酶（SRC）、蛋白激酶B1（Akt1）、促分裂原活化的蛋白激酶3（MAPK3）为防己茯苓汤治疗AKI的关键靶点，GO富集分析得到1 609个结果，主要涉及细胞对脂质的反应、膜筏、蛋白激酶活性等，KEGG通路分析则与PI3K/Akt信号通路、趋化因子信号通路、Toll样受体（TLR）信号通路等140条通路有关，分子对接则发现核心活性成分和关键靶点均有良好的结合能力，苏木精-伊红（HE）染色结果表明防己茯苓汤能明显改善AKI的病理学状态，血清学结果则显示血清肌酐（SCr）、尿素氮（BUN）水平明显下降。**结论：**该研究初步探讨了防己茯苓汤治疗AKI的作用机制，发现防己茯苓汤治疗AKI具有多成分、多靶点、多通路的作用特点，为后续进一步深入研究具体作用机制奠定基础。

［关键词］ 防己茯苓汤；急性肾损伤；网络药理学；分子对接
［中图分类号］ R285；R289；R22；R2-031；R33 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903（2022）08-0175-08
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.20220515 ［增强出版附件］ 内容详见http://www.syfjxzz.com或http://cnki.net
［网络出版地址］ https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220218.1419.003.html
［网络出版日期］ 2022-02-21 10:10

Mechanism of Fangji Fulingtang for Treating Acute Kidney Injury Induced by Ischemia-reperfusion Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Verification

HUANG Jun-xin[1], WANG Bi-xia[1], ZOU Han-bin[1], WU Qiu-xin[2], YIN Xin[3], HUANG Shu-ying[4],
XIE Jun-bin[1], YANG Qing-qi[1], GAO Zhi-yan[5], ZHANG Zheng-yu[5*]
(*1. The Second Clinical School, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China*;
2. KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;
3. School of Pediatrics, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

［收稿日期］ 2021-07-13
［基金项目］ 国家自然科学基金青年科学基金项目（31401240）；广东省大学生创新创业训练计划项目（S202010570010）
［第一作者］ 黄俊鑫，从事急性肾损伤的治疗与修复研究，E-mail：1360383960@qq.com
［通信作者］ *张征宇，博士，副教授，从事心血管重塑机制的研究，E-mail：zhengyuceo@163.com

4. The Third Clinical School, *Guangzhou Medical University*, *Guangzhou 511436*, *China*;
5. School of Basic Medical Sciences, *Guangzhou Medical University*, *Guangzhou 511436*, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the mechanism of Fangji Fulingtang in the treatment of acute kidney injury (AKI) induced by ischemia-reperfusion based on network pharmacology and experimental verification. **Method**: Active components of Fangji Fulingtang were retrieved from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and previous report and targets of these components were predicted by SwissTargetPrediction. The targets of AKI were searched from GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), the database of gene-disease associations (DisGeNET), and Therapeutic Target Database (TTD). Protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING. Metascape was used for Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment of core targets. Cytoscape was employed to construct the "medicinal-active component-target-disease" network and "active component-target-pathway" network. AutoDock was applied for molecular docking. Finally, animal experiment was carried out to validate the mechanism of Fangji Fulingtang in treatment of AKI. **Result**: A total of 137 active components and 858 targets of Fangji Fulingtang, 1 294 targets of AKI, and 267 targets of Fangji Fulingtang in the treatment of AKI were screened out. Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1), phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), proto-oncogene tyrosine protein kinase (SRC), protein kinase B1 (Akt1), and mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3) were the key anti-AKI targets of Fangji Fulingtang, which were involved in 1 609 GO terms, particularly cell response to lipids, membrane rafts, and protein kinase activity, and 140 KEGG pathways such as PI3K/Akt signaling pathway, chemokine signaling pathway, and Toll-like receptor signaling pathway. Molecular docking showed that the core active components had strong binding affinity to the key targets. The hematoxylin and eosin (HE) staining results indicated that Fangji Fulingtang can significantly improve the pathological state and the serological results suggested that the levels of serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) were significantly reduced. **Conclusion**: This study clarified the mechanism of Fangji Fulingtang in the treatment of AKI and found that Fangji Fulingtang had the multi-component, multi-target, and multi-pathway characteristics in the treatment of AKI. The result lays a foundation for further study of its specific mechanism.

[**Keywords**] Fangji Fulingtang; acute kidney injury; network pharmacology; molecular docking

急性肾损伤(AKI)是种以肾小球滤过率突然下降,血清肌酐(SCr)迅速升高和(或)尿量减少为特征的临床综合征,具有很高的发病率和死亡率。10%~15%的住院患者会发生AKI,其中10%需要肾脏替代治疗;在重症监护病房,其发病率可超过50%[1-2]。AKI的平均死亡率为14%~60%,危重症患者中AKI的死亡率高达50%~80%[3]。不仅如此,存活下来的AKI患者进展为慢性肾脏病和终末期肾脏病的风险也明显增加,造成巨大的经济和社会负担[4-5]。由于高发病率、高死亡率和高医疗成本,AKI已成为全球公共卫生问题[6],深入研究AKI发病机制及治疗方法是国内外研究的热点,具有重要临床及社会意义。

防己茯苓汤源于东汉张仲景《金匮要略》曰:"皮水为病,四肢肿,水气在皮肤中,四肢聂聂动者,防已茯苓汤主之",其由防己、黄芪、桂枝、茯苓、甘草5味药组成,有益气健脾、温阳利水之功。在临床治疗中,可显著改善AKI患者的临床症状,降低AKI患者血清SCr、尿素氮(BUN),β_2-微球蛋白和胱抑素C水平,促使肾功能恢复,降低病死率[7-9]。然而,由于中药成分和治疗靶点的复杂性,目前有关防己茯苓汤治疗AKI的确切机制仍不明确。

网络药理学是在系统生物学和计算机技术基础上发展起来的新兴学科,是一种基于疾病-靶点-药物相互作用网络,研究药物、蛋白质靶标及其药理活性的方法学。这种研究方法符合中医从整体角度看待疾病的诊断和治疗,以及中药与其化合物之间的协同作用[10]。因此,笔者采用网络药理学方

法，探究防己茯苓汤治疗AKI的活性成分和作用靶标，结合动物实验，明确防己茯苓汤治疗AKI的机制。

1 材料

1.1 防己茯苓汤活性成分的筛选 在中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP，http://tcmspw.com/tcmsp.php）[11]中以防己、茯苓、黄芪、桂枝及甘草为关键词查询化学成分。使用ADME参数筛选出可能的活性成分，设定口服生物利用度（OB）≥30%、药物类药性（DL）≥0.18[11]，其他参数为默认值，进行药物成分筛选。

1.2 防己茯苓汤活性成分作用靶点的预测 将活性成分的Smiles结构序列导入SwissTargetPrediction（http://www.swisstargetprediction.ch）[12]预测靶点，物种参数设置为Homo sapiens，以置信度阈值（Probability）评估预测结果的可靠性。

1.3 急性肾损伤疾病靶点的收集 利用GeneCards（https://www.genecards.org）[13]、在线人类孟德尔遗传数据库（OMIM，http://www.omim.org）[14]、疾病相关的基因与突变位点数据库（DisGeNET，https://www.disgenet.org）[15]和治疗靶标数据库（TTD，http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd）[16]，以“acute kidney injury”为关键词筛选疾病靶点。通过Jvenn工具[17]将药物靶点与疾病靶点取交集，得到防己茯苓汤治疗急性肾损伤的作用靶点。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）网络图的构建和核心靶点的筛选 将**1.3**项得到的防己茯苓汤治疗急性肾损伤的作用靶点导入STRING（https://string-db.org）[18]，设置物种为“Homo sapiens”，选取置信度>0.9的数据，构建PPI网络。利用Cytoscape 3.7.2的网络拓扑分析插件CytoNCA[19]对网络图进一步分析，根据度中心性（DC）、中介中心性（BC）、接近中心性（CC）和特征向量中心性（EC）的参数值来评价该网络的核心节点。根据网络药理学筛选方法，DC值>2倍中位数值和BC、CC、EC均大于中位数[20-21]，筛选出该网络核心节点。把核心节点导入STRING，选取置信度>0.9的数据，构建核心节点PPI网络，并利用Cytoscape 3.7.2进行美化。

1.5 基因本体（GO）富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路分析 通过Metascape平台（http://metascape.org）[22]对核心靶点进行GO富集分析及KEGG通路分析。根据P<0.05作为筛选条件，得到GO富集分析结果和KEGG通路分析结果。用R语言绘制气泡图。

1.6 网络构建 采用Cytoscape 3.6.1软件构建网络图，①药物-活性成分-作用靶点-疾病网络图；②活性成分-作用靶点-信号通路网络图。

1.7 分子对接 在“药物-活性成分-作用靶点-疾病”网络图中，根据拓扑学参数Degree值计算得出排名前3的核心活性成分，通过检索TCMSP数据库获得核心活性成分mol2格式化学结构，在ChemOffice软件使其能量最小化。在RCSB PDB数据库（http://www.rcsb.org）[23]检索防己茯苓汤治疗AKI的关键靶点获得蛋白晶体结构，利用PyMOL软件进行去水、清除配体等操作后保存为PDB格式，应用Autodock对蛋白进行加氢、计算电荷后保存，根据蛋白原配体位置设置Grid Box，设置Lamarckiam GA（4.2）算法进行Autodock分子对接，通过结合能的值评价活性成分和关键靶点之间的对接效果，最后利用PyMOL软件对分子对接结果进行可视化分析。

1.8 动物实验验证

1.8.1 实验动物 成年SPF级雄性SD大鼠，体质量150~180 g，购自南方医科大学实验动物中心，动物合格证号SCXK（粤）2016-0041。在标准实验条件下适应性饲养1周。本研究获广州医科大学附属第二医院动物伦理委员会批准（A2020-031）。

1.8.2 试剂与仪器 防己茯苓汤由防己9 g、黄芪9 g、桂枝9 g、茯苓18 g、甘草6 g组成，购自广州医科大学附属第二医院，经广州微谱检测技术有限公司工程师郭雪萍鉴定，均符合2020年版《中华人民共和国药典》项下饮片的要求。将上述饮片水煎2次，合并滤液，浓缩成2 g·mL^{-1}生药，−20 ℃冰箱保存。SCr测定试剂盒、BUN测定试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号C011-2-1、C013-2-1）。Multiskan FC型酶标仪（美国Thermo公司），曙红Y（上海展云化工有限公司，批号1205227）。苏木精（广州市齐云生物技术有限公司，批号2010905）。十二水合硫酸铝钾、无水乙醇（广州化学试剂厂，批号20150301-1、20191201-26）。碘酸钠（武汉卡诺斯科技有限公司，批号190104-1）。

1.8.3 大鼠缺血再灌注急性肾损伤模型的构建 24只SPF级SD大鼠随机分为假手术组、模型组、治疗组，每组8只。治疗组给予防己茯苓汤灌胃剂量20 g·kg^{-1}[24]，每天1次，连续7 d。假手术组与模型组给予同等体积生理盐水灌胃。末次给药12 h后用2%戊巴比妥钠40 mg·kg^{-1}腹腔注射麻醉大鼠，

麻醉后仰卧固定于鼠板上，消毒并沿腹中线切开腹腔。所有大鼠小心游离右侧肾蒂，结扎后切除右肾；假手术组左肾仅分离动、静脉，不用动脉夹阻断血流。模型组、治疗组暴露左肾，小心分离出肾动、静脉，保护输尿管，以无损伤动脉夹夹闭左肾动脉；夹闭左肾动脉45 min后松开动脉夹，逐层关闭腹腔并消毒，伤口以湿润无菌纱布覆盖，采用暖光照射保持实验动物体温[25-26]。

1.8.4 标本采集与处理 恢复左肾血液灌注24 h后，打开腹腔，腹主动脉取血，室温下离心分离血清并置于−20 ℃冰箱冻存待测。取出左肾，分离结缔组织，用0.9%氯化钠溶液冲洗表面，滤纸吸干表面水分，迅速用4%多聚甲醛固定。

1.8.5 血清学检测 取血清，SCr检测采用肌氨酸氧化酶法，BUN检测采用脲酶法，按照测试盒说明书操作，检测SCr、BUN含量。

1.8.6 肾形态学观察 取4%多聚甲醛固定的肾脏，常规乙醇脱水、包埋，切取5 μm厚的组织切片行HE染色，中性树胶封固，光学显微镜下观察。

1.8.7 统计学分析 应用SPSS 20.0统计软件进行统计分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用独立样本t检验分析，P<0.05为差异有统计学意义。

2 方法

2.1 防己茯苓汤活性成分的筛选 在TCMSP中以OB≥30%、DL≥0.18筛选，得到137个活性成分，其中防己3个、茯苓15个、黄芪20个、桂枝7个、甘草92个，去除重复值共得到132个活性成分。另外补充部分不符合ADME参数但文献报道有良好生物学活性的药物成分[27-31]，最终共收集137个活性成分。通过TCMSP数据库对所有活性成分的名称进行整理，在PubChem收集活性成分Smiles结构序列。

2.2 防己茯苓汤治疗AKI的作用靶点 将活性成分的Smiles结构序列导入SwissTargetPrediction预测靶点，去除重复值得到858个作用靶点。利用GeneCards、OMIM、DisGeNET和TTD数据库筛选疾病靶点，汇总并去除重复值，共获得1 294个疾病靶点。通过Jvenn工具将药物靶点与疾病靶点取交集，得到267个防己茯苓汤治疗急性肾损伤的作用靶点。见增强出版附加材料。

2.3 PPI网络图 将267个作用靶点导入STRING，构建PPI网络。利用CytoNCA分析，得到该网络中DC中位数为9，BC中位数为74.259 36，CC中位数为0.068 361，EC中位数为0.029 355。根据网络药理学筛选方法，DC值>2倍中位数值和BC、CC、EC均大于中位数，即DC>18、BC>74.259 36、CC>0.068 361、EC>0.029 355，筛选出该网络核心节点52个。把52个核心节点导入STRING，构建核心节点PPI网络，利用Cytoscape 3.7.2进行美化。面积越大、颜色越接近橙色，代表Degree值越高，而Degree越高，该靶点与其他靶点的相关性越明显，在网络中越重要[11]。经排序，Degree前5的核心蛋白分别为磷脂酰肌醇3-激酶调节亚基1（PIK3R1）、磷酸肌醇3-激酶催化亚单位α（PIK3CA）、原癌基因酪氨酸蛋白激酶（SRC）、蛋白激酶B1（Akt1）、丝裂原激活的蛋白激酶3（MAPK3），这5个蛋白在网络中与作用靶点关联密切，与其他靶点的相关性明显，在整个调节网络中起到枢纽作用，可能是防己茯苓汤治疗AKI的关键靶点。见增强出版附加材料。

2.4 GO富集分析 通过Metascape平台对52个核心靶点进行GO富集分析。GO富集分析包括生物过程、细胞组分和分子功能，结果显示，共有1 447个生物过程、72个细胞组分、90个分子功能显示富集。据P值排序，选择GO富集分析的前10个结果，见增强出版附加材料。GO富集分析主要涉及在细胞对脂质的反应、肽基酪氨酸磷酸化、肽基酪氨酸修饰、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路等生物过程，膜筏、膜微区、膜区、黏着斑等细胞组分，蛋白激酶活性、激酶结合、蛋白激酶结合等分子功能。

2.5 KEGG通路分析 通过Metascape平台对52个核心靶点进行KEGG通路分析，共富集到140条信号通路，选择KEGG通路富集分析中与AKI密切相关的前20条用R语言绘制气泡图。前20条富集通路主要是PI3K/Akt信号通路、趋化因子信号通路、Toll样受体（TLR）信号通路等，其中PI3K/Akt信号通路是基因富集数目最多，显著性最明显的KEGG通路。对PI3K/Akt信号通路进行可视化分析。分析结果表明，防己茯苓汤通过作用在多个蛋白调控PI3K/Akt信号通路。见增强出版附加材料。

2.6 药物-活性成分-作用靶点-疾病网络图和活性成分-作用靶点-信号通路网络图 利用Cytoscape软件构建药物-活性成分-作用靶点-疾病网络图和活性成分-作用靶点-信号通路网络图。见增强出版附加材料。

2.7 分子对接结果 结合能<0表明配体分子可以与受体分子自发结合，结合能<−5 kcal·mol^{-1}（1 cal≈4.186 J）则表示具有较好的结合能力[32]。由表1可

知，所有核心活性成分与关键靶点对接的结合能均<−5 kcal·mol^{-1}，表明核心活性成分与关键靶点之间均有良好的结合力。利用 PyMOL 对各核心靶点的最低结合能对接结果进行可视化分析，见增强出版附加材料。

表 1　活性成分与关键靶点对接结果

Table 1　Docking result of active ingredients with key targets

靶点成分	结合能/kcal·mol^{-1}				
	PIK3CA	PIK3R1	SRC	Akt1	MAPK3
MOL000239	−7.66	−6.45	−7.29	−6.93	−7.43
MOL000354	−8.13	−6.70	−7.62	−6.49	−7.75
MOL000098	−7.85	−6.53	−7.23	−6.63	−7.70

2.8　实验结果

2.8.1　肾功能检测结果　由表 2 可知，模型组与假手术组相比血清 BUN 和 SCr 显著升高（P<0.01），治疗组与模型组相比血清 BUN 和 SCr 明显降低（P<0.05），提示防己茯苓汤给药后显著改善肾功能。

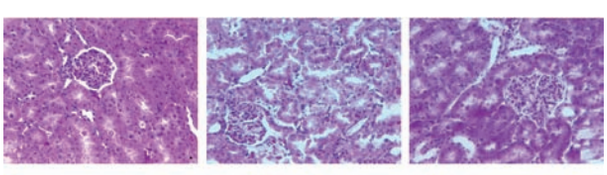
表 2　防己茯苓汤对缺血再灌注急性肾损伤大鼠的肾功能影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 2　Effect of Fangji Fulingtang on renal function of rats with AKI induced by ischemia-reperfusion（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	BUN/mmol·L^{-1}	SCr/μmol·L^{-1}
假手术组	8	4.82±1.87	155.05±30.86
模型组	7	26.22±6.41[1)]	331.38±44.30[1)]
给药组	7	13.26±3.23[2)]	234.32±14.09[2)]

注：与假手术组比较 [1)] P<0.01，与模型组比较 [2)] P<0.05

2.8.2　对大鼠病理形态的影响　假手术组肾小管结构完整，未见明显异常；模型组肾小管结构松散紊乱，管腔扩张、刷状缘丢失，上皮细胞肿胀、空泡化，溶解坏死，组织间隙扩张水肿。给药组则明显改善，肾小管结构较为完整，仅见部分管腔刷状缘丢失，少数上皮细胞肿胀。见图 1。



注：A. 假手术组；B. 模型组；C. 给药组

图 1　防己茯苓汤对缺血再灌注急性肾损伤大鼠的形态学影响（HE，×400）

Fig. 1　Effect of Fangji Fulingtang on morphology of rats with AKI induced by by ischemia-reperfusion（HE，×400）

3　讨论

AKI 可由多种病因造成，包括缺血再灌注损伤（IRI）、脓毒血症、肾毒性药物等，其中 IRI 是临床上引起 AKI 的最常见原因[33]，占所有病因的 60%，也是国内医院引起获得性 AKI 的首要病因[34]。IRI 引起 AKI 的机制非常复杂，尚未完全明确，当前研究表明可能与炎症反应、氧化应激、细胞凋亡、细胞坏死等多种因素有关[6,35-36]。防己茯苓汤在肾病治疗中可显著改善 AKI 患者的临床症状，促使肾功能恢复，降低病死率。动物实验证实，防己茯苓汤可以抑制肾组织肾损伤分子-1（KIM-1）、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白（NGAL）及其 mRNA 表达，减弱大鼠 AKI[24,37]。然而，防己茯苓汤治疗 AKI 的具体机制仍待明确。

本实验通过网络药理学方法，收集到 137 个防己茯苓汤的活性成分，预测到 858 个作用靶点，与 AKI 的疾病靶点取交集得到防己茯苓汤治疗急性肾损伤作用靶点 267 个，经 PPI 网络图筛选后，得到 52 个核心靶点。其中 PIK3R1、PIK3CA、SRC、Akt1、MAPK1 为 Degree 值最高的核心靶点，这 5 个靶点与其他靶点相关性明显，在整个 PPI 网络中起到枢纽作用，可能是防己茯苓汤治疗 AKI 的关键靶点。在“药物-活性成分-作用靶点-疾病”网络分析中，活性成分 Degree 值排名前 3 的活性成分为华良姜素、异鼠李素和槲皮素，其与疾病靶点关联密切，可能是防己茯苓汤治疗 AKI 的核心活性成分。研究发现，异鼠李素作为一种黄酮类化合物，能抑制核转录因子-κB（NF-κB）信号通路的过度活化及氧化应激，上调内皮型一氧化氮合酶（eNOS），发挥抗炎作用；也能减弱肿瘤坏死因子-α（TNF-α）诱导的内皮细胞凋亡，下调 SCr、胱抑素 C 及尿 KIM-1 水平，降低肾小管 Paller 评分，明显改善大鼠 IRI 导致的 AKI[38-39]。槲皮素则是一种多酚类化学物质，可抑制 TLR4/NF-κB 信号通路，降低肿瘤坏死因子（TNF）-α、白细胞介素（IL）-1β、IL-6 等炎症因子和 SCr、BUN 水平，减弱小鼠急性肾损伤[40-41]，槲皮素还能抑制巨噬细胞诱导型 C 型凝集素受体（Mincle）及其下游信号分子的表达和活化，平衡巨噬细胞极性，下调巨噬细胞炎症响应，减弱 AKI[42]。除华良姜素未见文献报道外，异鼠李素和槲皮素均有多篇文献支持减弱 AKI 保护肾功能的作用，这提示本文网络药理学分析结果与文献报道基本相符。而分子对接结果显示，华良姜素、异鼠李素和槲皮素与 PIK3R1、PIK3CA、SRC、Akt1、MAPK3 的结合能均<−5 kcal·mol^{-1}，表明核心活性成分与关键靶点之间均有良好的结合力。由此可知，防己茯苓汤治疗 AKI 具有多成分、多靶

点的特点，核心活性成分与关键疾病靶点的结合可能起着重要作用。

GO 富集分析主要涉及在细胞对脂质的反应、肽基酪氨酸磷酸化、肽基酪氨酸修饰、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路等生物过程，膜筏、膜微区、膜区、黏着斑等细胞组分，蛋白激酶活性、激酶结合、蛋白激酶结合等分子功能，提示防己茯苓汤可能通过上述富集结果发挥作用。KEGG 分析则主要涉及 PI3K/Akt 信号通路、趋化因子信号通路、结合能信号通路等，其中 PI3K/Akt 信号通路是基因富集数目最多，显著性最明显的 KEGG 通路，提示 PI3K/Akt 信号通路可能起着重要作用，防己茯苓汤的保护作用与之关系密切。PI3K 家族是一组保守的信号转导分子，可以激活下游信号 Akt，调控细胞生长和凋亡。研究表明，该通路在 AKI 中被激活，在 AKI 保护中发挥重要作用，当细胞缺血缺氧时，PI3K/Akt 信号通路被激活，进而调控下游蛋白哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR）调节自噬相关蛋白（Beclin1）、微管相关蛋白轻链 3（LC3）等表达，参与自噬调节[43-44]。活化的 Akt 还能磷酸化 B 细胞淋巴瘤-2（Bcl-2）关联死亡启动子（Bad）的 Ser136/Ser112 残基，阻断 Bad 与 Bcl-2 或 B 细胞淋巴瘤-xl（Bcl-xL）形成二聚体，抑制细胞色素 C 释放，减弱细胞凋亡[45]。此外，PI3K/Akt 通路可抑制结合能激活的 NF-κB 及其下游促炎细胞因子的释放，减轻炎症反应，对缺血再灌注损伤起保护作用[46]。趋化因子信号通路是介导免疫细胞到达浸润炎症部位，参与免疫应答的信号通路。趋化因子广泛存在于炎症反应组织中，根据氨基端半胱氨酸的结构差异分为 4 个家族 CC、CXC、CX3C 和 XC[47]，在缺血再灌注所致的急性肾损伤中，CXC 家族通过上调肾小管上皮细胞细胞间黏附分子-1（ICAM-1）和其同源受体 CXCR-1 激活 p38 MAPK 信号通路，募集中性粒细胞[48]，MCP-1/CCL2、RANTES/CCL5、MIP-1α/CCL3 和 MIP-1β/CCL4 则是募集单核细胞/巨噬细胞[49]，浸润的中性粒细胞和单核细胞/巨噬细胞释放炎症因子，进一步放大局部炎症反应，加剧肾小管上皮细胞损伤，恶化肾功能，促进 AKI 的发生发展。结合能信号通路在免疫应答及炎症反应中扮演重要角色，TLR 作为介导天然免疫的模式识别受体家族，在 AKI 中被激活后，其调控下游蛋白 NF-κB 磷酸化激活入核，同时促进肾小管上皮细胞 IL-6 和 TNF-α 表达，加剧炎症反应导致 AKI[50-51]。因此，以上分析提示防己茯苓汤的作用靶点与多条通路有关，防己茯苓汤治疗 AKI 可能通过作用在 PI3K/Akt 信号通路等多条关键通路发挥抗炎抗凋亡作用。

HE 染色的结果显示，假手术组肾小管结构完整，未见明显异常；模型组肾小管结构松散紊乱，管腔刷状缘丢失，上皮细胞肿胀、空泡化，溶解坏死，组织间隙扩张水肿。给药组则明显改善，肾小管结构较为完整，仅见部分管腔刷状缘丢失，少数上皮细胞肿胀。这些结果均表明防己茯苓汤可明显改善肾脏病理学状态，发挥保护作用。BUN 主要经肾小球滤过，从尿中排出体外，当肾小球受到损伤时，滤过率降低，BUN 升高。BUN 可在一定程度上反映出肾小球的滤过功能，是临床上常用的肾功能指标。SCr 基本上不受饮食、高分解代谢等肾外因素影响，在外源性 Cr 摄入量稳定，体内生成量恒定的情况下，SCr 浓度主要取决于肾小球滤过功能。由血清学结果可知，防己茯苓汤组的血清 BUN、SCr 水平明显降低，提示防己茯苓汤组的肾小球滤过率较好，肾功能明显改善。这与文献报道的防己茯苓汤可以降低血清 BUN、SCr 等肾功能指标，显著减弱大鼠 AKI[24,37] 相符，也进一步证实了防己茯苓汤的确切疗效。

综上所述，本研究通过网络药理学和分子对接探讨了防己茯苓汤治疗 AKI 的作用机制，发现防己茯苓汤可能通过华良姜素、异鼠李素和槲皮素等多种活性成分，作用在 PIK3CA、PIK3R1、SRC、Akt1、MAPK3 等多个疾病靶点，调控 PI3K/Akt 信号通路促进细胞的增殖和生长，同时调节趋化因子信号通路、TLR 信号通路等炎症通路减轻整体炎症反应，从而明显改善肾的病理学状态，下降 Scr、BUN 水平，发挥保护作用。本研究发现防己茯苓汤治疗 AKI 具有多成分、多靶点、多通路的作用特点，为后续进一步深入研究其具体作用机制奠定基础。

［利益冲突］ 本文不存在任何利益冲突。

［参考文献］

［1］ RONCO C, BELLOMO R, KELLUM J A. Acute kidney injury［J］. The Lancet, 2019, 394（10212）: 1949-1964.

［2］ LEVEY A S, JAMES M T. Acute kidney injury［J］. Ann Intern Med, 2017, 167（9）: ITC66-ITC80.

［3］ 董杨. 缺血再灌注所致急性肾损伤及其预后的评估和影响因素研究［D］. 上海：上海交通大学，2019.

［4］ CHAWLA L S, EGGERS P W, STAR R A, et al. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes［J］. N Engl J Med, 2014, 371

(1):58-66.

[5] LEUNG K C, TONELLI M, JAMES M T. Chronic kidney disease following acute kidney injury-risk and outcomes[J]. Nat Rev Nephrol, 2013, 9(2):77-85.

[6] ZUK A, BONVENTRE J V. Acute kidney injury[J]. Annu Rev Med, 2016, 67:293-307.

[7] 孙蕾. 防己茯苓汤对急性肾损伤患者肾组织蛋白表达的影响[J]. 中医学报, 2016, 31(5):715-717.

[8] 杜晓敏. 加味防己茯苓汤联合CRRT疗法对脓毒症急性肾损伤患者肾功能及血清APN、PCT、Lac水平变化的影响[J]. 中国医药导刊, 2019, 21(3):152-156.

[9] 应勤丽, 余雪飞, 王洪白, 等. 隔药饼灸联合防己茯苓汤治疗重症感染所致急性肾损伤的疗效观察[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(11):1772-1776.

[10] JING C, SUN Z, XIE X, et al. Network pharmacology-based identification of the key mechanism of Qinghuo Rougan formula acting on uveitis [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120:109381.

[11] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6:13.

[12] GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Web Server issue):W32-W38.

[13] SAFRAN M, CHALIFA-CASPI V, SHMUELI O, et al. Human gene-centric databases at the weizmann institute of science: GeneCards, UDB, CroW 21 and HORDE [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(1):142-146.

[14] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCHIETTECATTE F, et al. OMIM. org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue):D789-D798.

[15] PIÑERO J, RAMÍREZ-ANGUITA J M, SAÜCH-PITARCH J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1):D845-D855.

[16] WANG Y, ZHANG S, LI F, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1):D1031-D1041.

[17] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, et al. jvenn: an interactive Venn diagram viewer [J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1):293.

[18] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1):D607-D613.

[19] TANG Y, LI M, WANG J, et al. CytoNCA: A cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks[J]. Biosystems, 2015, 127:67-72.

[20] 毕艺鸣, 殷贝, 夏亚情, 等. 基于网络药理学探讨四逆散治疗2型糖尿病的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(24):169-177.

[21] 郭丛丛, 姚金铭, 孙洁, 等. 赤芍治疗糖尿病肾病的网络药理学研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(10):2420-2423.

[22] ZHOU Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):1523.

[23] BURLEY S K, BERMAN H M, BHIKADIYA C, et al. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D464-D474.

[24] 徐静琳, 郑寿涛. 防己茯苓汤对急性肾损伤大鼠肾功能的影响[J]. 中国中医急症, 2015, 24(12):2090-2092.

[25] 陈兴宇, 孙乐, 黄凯玲, 等. 三七总皂苷预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤肾组织AP-1、TGF-β_1表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(6):73-78.

[26] YANG H, LI R, ZHANG L, et al. p53-cyclophilin D mediates renal tubular cell apoptosis in ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 317(5):F1311-F1317.

[27] 许源, 宿树兰, 王团结, 等. 桂枝的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(4):674-678.

[28] 韩瑶聃, 王彬, 王政雨, 等. 甘草酸药理作用的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(21):2499-2505.

[29] 邢志博, 王凤梅, 王翠平, 等. 粉防己有效成分的药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9):241-246.

[30] 何文涓, 袁志坚, 何晓升. 黄芪多糖的药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5):692-694.

[31] 蒋微, 蒋式骊, 刘平. 黄芪甲苷的药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9):2121-2124.

[32] PINZI L, RASTELLI G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery[J]. Int J Mol Sci, 2019,

20(18):4332.

[33] BAI T, YANG K, QIN C, et al. Cryptotanshinone ameliorates renal ischaemia-reperfusion injury by inhibiting apoptosis and inflammatory response[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019, 125(5):420-429.

[34] 杨欢. p53-CypD在缺血再灌注介导的急性肾损伤中的机制研究[D]. 广州:华南理工大学, 2019.

[35] 杨成, 任星峰, 彭隽. 普罗布考对肾脏缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及机制[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2017, 46(6):660-664.

[36] CHATTERJEE P K, PATEL N S, KVALE E O, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury [J]. Kidney Int, 2002, 61(3):862-871.

[37] 苏中昊, 叶进, 张占刚. 防己茯苓汤对急性肾损伤大鼠肾组织KIM-1和NGAL表达的影响[J]. 中医杂志, 2014, 55(6):500-503.

[38] CHEN T L, ZHU G L, WANG J A, et al. Protective effects of isorhamnetin on apoptosis and inflammation in TNF-α-induced HUVECs injury[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3):2311-2320.

[39] 邱书娟, 张云霞, 李香玲, 等. 异鼠李素对大鼠缺血再灌注急性肾损伤的免疫保护作用[J]. 现代免疫学, 2017, 37(6):461-466, 472.

[40] SHARMA A, KASHYAP D, SAK K, et al. Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents[J]. Pharm Pat Anal, 2018, 7(1):15-32.

[41] TAN J, HE J, QIN W, et al. Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in mice by suppressing TLR4/NF-κB pathway[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2019, 39(5):598-602.

[42] TAN R Z, WANG C, DENG C, et al. Quercetin protects against cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting Mincle/Syk/NF-κB signaling maintained macrophage inflammation[J]. Phytother Res, 2020, 34(1):139-152.

[43] LIU L J, YU J J, XU X L. Kappa-opioid receptor agonist U50448H protects against renal ischemia-reperfusion injury in rats via activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(1):97-106.

[44] KIM Y C, GUAN K L. mTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1):25-32.

[45] TRAN H Y, SHIN E J, SAITO K, et al. Protective potential of IL-6 against trimethyltin-induced neurotoxicity in vivo[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(7):1159-1174.

[46] HUANG J, YUE S, KE B, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 regulates toll-like receptor 4 innate responses in mouse liver ischemia-reperfusion injury through Akt-forkhead box protein O1 signaling network[J]. Transplantation, 2014, 98(7):721-728.

[47] CHARO I F, RANSOHOFF R M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation [J]. N Engl J Med, 2006, 354(6):610-621.

[48] LI H, NORD E P. IL-8 amplifies CD40/CD154-mediated ICAM-1 production via the CXCR-1 receptor and p38-MAPK pathway in human renal proximal tubule cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(2):F438-445.

[49] CHUNG A C, LAN H Y. Chemokines in renal injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(5):802-809.

[50] RUSAI K, SOLLINGER D, BAUMANN M, et al. Toll-like receptors 2 and 4 in renal ischemia/reperfusion injury[J]. Pediatr Nephrol, 2010, 25(5):853-860.

[51] WU H, MA J, WANG P, et al. HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(11):1878-1890.

[责任编辑　顾雪竹]