

·方与药·

基于网络药理学和动物实验探讨茯苓酸改善糖尿病肾病的作用机制

林雪茹¹, 黄本昌², 林文东², 林甲晃¹, 林冰莹¹, 王 鹤^{1*}

(1. 福建中医药大学中西医结合学院 中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

2. 福建中医药大学附属人民医院, 福建 福州 350004)

摘要: 目的 基于网络药理学探讨茯苓酸(PA)调控糖尿病肾病(DKD)的作用机制, 并进行动物实验验证。方法 利用 SwissTargetPrediction、CTD、GeneCards 和 SEA 数据库筛选 PA 作用靶点; 利用 GeneCards、OMIM 和 CTD 数据库筛选 DKD 相关靶点, 将 PA 作用靶点与 DKD 相关靶点取交集, 筛选 PA 治疗 DKD 潜在作用靶点; 利用 STRING 数据库构建交集靶点的蛋白质相互作用网络(PPI), 并利用 Cytoscape 3.7.1 软件筛选核心靶点; 借助 Metascape 平台进行基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。实验验证 PA 治疗 DKD 的作用机制, 该研究采用随机对照设计, 以 12 只符合自发性成模标准[空腹血糖(FPG) > 11.1 mmol/L]的 db/db 小鼠作为研究对象, 采用随机数字表法分为模型组和 PA 组, 每组 6 只, 并将 6 只 db/m 小鼠作为正常组。其中, PA 组按照 PA 5 mg/(kg·d)的剂量给予 PA 橄榄油溶液灌胃; 模型组与正常组小鼠则于每日同一时间按照与 PA 组等体积的标准给予空白橄榄油溶液灌胃, 持续干预 4 周。干预过程中, 每周同一时间点记录小鼠精神状态、活动情况及摄食饮水等一般情况、体质量及 FPG 水平。4 周后采用全自动生化分析仪检测血清肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)含量, 采用尿总蛋白定量试剂盒检测 24 h 尿总蛋白排泄量(24hUTP), 苏木素-伊红(HE)染色、Masson 染色及光学显微镜(×400)观察肾脏组织病理形态, 采用逆转录-定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测肾脏组织中转化生长因子(TGF)-β、丝裂原活化蛋白激酶 8(MAPK8)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3) mRNA 相对表达水平。结果 网络药理学筛选获得 PA 作用靶点 228 个, DKD 相关靶点 4 900 个, PA 治疗 DKD 潜在作用靶点 150 个; PPI 网络显示, MAPK8、TGF-β1、NLRP3 等为核心靶点; GO 功能分析分别获得生物学过程(BP)、细胞组分(CC)及分子功能(MF)条目 566、78 和 124 个; KEGG 信号通路富集分析获得 155 条通路, 主要涉及晚期糖基化终末产物(AGE)-晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、C 型凝集素受体(CLR)和肿瘤坏死因子(TNF)等信号通路。动物实验结果显示, 给药第 1~4 周, 正常组体质量平稳增长, 与正常组比较, 模型组和 PA 组体质量和 FPG 均显著升高($P < 0.05$); 给药第 3~4 周, 与模型组比较, PA 组 FPG 显著降低($P < 0.05$)。药物干预 4 周后, 与正常组比较, 模型组 Scr、BUN 和 24hUTP 含量均显著升高($P < 0.05$), 肾小球基底膜明显增厚, 肾间质可见大量胶原纤维增生及炎症细胞浸润, 模型组肾脏组织中 TGF-β、NLRP3、MAPK8 mRNA 相对表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较, PA 组 Scr、BUN 和 24hUTP 水平均显著降低($P < 0.05$), 肾小球形态得以恢复, 间质胶原纤维增生及炎症浸润现象显著改善, PA 组肾脏组织中 TGF-β、MAPK8、NLRP3 mRNA 相对表达水平均显著下降($P < 0.05$)。结论 PA 能有效降低 db/db 小鼠血糖水平, 改善肾功能并减轻肾脏组织病理损伤, 其改善肾损伤与纤维化的机制可能与多靶点协同及抑制 TGF-β/MAPK8/NLRP3 信号通路有关。

关键词: 糖尿病肾病; 茯苓酸; TGF-β/MAPK8/NLRP3 信号通路

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是导致终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的主要原因, 当前针对 DKD 的临床干预措施普遍存在靶点单一、不良反应显著及疗效局限等问题, 无法有效延缓 DKD 向 ESRD 的进程。相较之下, 中医药防治 DKD 具有多组分协同、多靶点调控的特征, 在改善肾脏微环境方面展现出独特优势, 但其核心物质基础与靶向机制的模糊性限制了临床转化与推广^[1]。茯苓作为具有“淡渗利湿”作用的代表性中药, 在 DKD 的长期治疗中疗效确切且安全性高^[2]。药理学证实, 茯苓酸(pachymic acid, PA)作为茯苓主要的三萜类活性单体^[3], 具有显著的抗氧化应激、抗炎及抗肿瘤等多重生物活性^[4], 这恰与 DKD 进程

中炎症浸润、肾组织损伤、细胞外基质(ECM)沉积和上皮细胞间充质转化产生瘢痕等病理特征高度契合。然而, PA 对 DKD 的作用机制目前尚缺乏系统的实验验证。因此, 本研究依托网络药理学分析与动物实验验证, 旨在明确 PA 对 DKD 肾损伤的保护作用并探究其分子机制, 为开发基于天然产物单体的 DKD 靶向治疗策略提供坚实的科学依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF 级 8 周龄健康雄性 db/db 小鼠 14 只, 体质量(39.4±2.1)g, SPF 级同周龄健康雄性 db/m 小鼠 6 只, 体质量(22.0±0.8)g, 所有实验动物均购自常州卡文斯实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2016-0010, 实验动物使用许可证号: SYXK(闽)2019-0007, 饲养于福建中医药大学动物实验中心。饲养环境维持屏障系统标准条件: 室温恒定于 22~25℃, 相对湿度 50%, 12 h/12 h 昼夜明暗交替光照。实验期间小鼠均给

收稿日期: 2025-07-02; 接受日期: 2026-02-07

基金项目: 国家级大学生创新创业训练项目(202310393002); 福建省大学生创新创业训练项目(S202310393007)

通信作者: 王鹤, E-mail: wh4401@hotmail.com

DOI: 10.13260/j.cnki.fjtc.2026.09011

予分笼饲养,其中,db/m小鼠与db/db小鼠均给予SPF级辐照灭菌标准小鼠饲料,自由摄食和饮水。本动物实验方案经福建中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(批件号:FJTCMIACUC2021078)。

1.2 实验药物与试剂 PA(成都普思生物科技股份有限公司,货号:PS010073,纯度 $\geq 98.0\%$);罗氏活力型肌酐(Cr)测定试剂盒(货号:C011-2-1)、尿素氮(BUN)测试盒(货号:C013-1-1)、尿总蛋白定量(UTP)测试盒(货号:C035-2-1)均购自南京建成生物工程研究所;Takara反转录试剂盒(货号:RR047A)、Takara定量PCR试剂盒(货号:RR420A)均购自宝日医生物技术(北京)有限公司;TRIzol总RNA抽提试剂(货号:R0016)、Masson三色染色试剂盒(货号:C0189S)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验仪器 电子天平(上海精科天平公司,型号:JA3003);组织研磨仪(常州市凯航仪器公司,型号:JJ-2);高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司,型号:5417R);光学显微镜(日本Nikon公司,型号:ECLIPSE511);石蜡切片机(德国Leica公司,型号:RM2235);化学发光成像仪(型号:Universal Hood II)、荧光定量PCR仪(型号:CFX96)均购自美国Bio-Rad公司;石蜡包埋机(孝感市亚光医用电子技术公司,型号:YB-7LF)。

2 实验方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 PA作用靶点的筛选 利用SwissTargetPrediction数据库(<https://swisstargetprediction.ch/>)、CTD数据库(<https://ctdbase.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)和SEA数据库(<https://sea.bkslab.org/>)进行PA作用靶点筛选。将获取的靶点蛋白导入UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>),限定物种来源为“Homo Sapiens”,对PA作用靶点名称进行标准化处理,并验证各作用靶点的完整性。经合并去重处理后,最终构建PA作用靶点数据库。

2.1.2 DKD相关靶点的筛选 利用GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM数据库(<https://www.omim.org/>)和CTD数据库(<https://ctdbase.org/>),以“kidney disease”(肾病)和“diabetic”(糖尿病)作为DKD相关靶点的关键词进行检索。经交集去重处理后,最终构建DKD相关靶点数据库。

2.1.3 PA和DKD相关交集靶点的筛选 在生物信息学和进化基因组学分析平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)中,将PA作用靶点和DKD相关靶点进行映射,绘制PA-DKD韦恩图,提取二者交集靶点,构建PA治疗DKD潜在作用靶点数据库。

2.1.4 PPI网络构建及核心靶点筛选 将交集靶点

导入STRING 12.0数据库(<https://cn.string-db.org/>),限定物种来源为“Homo Sapiens”,设定最低相互作用阈值为“高”(Confidence score ≥ 0.9),构建蛋白质相互作用(PPI)网络。为量化网络拓扑特征,将PPI网络文件导入Cytoscape 3.7.1软件进行可视化处理,并运用其拓扑分析插件NetworkAnalyzer计算网络中各节点度值(Degree)、介数中心性及接近中心性等关键拓扑学参数。以节点度值作为筛选阈值进行网络拓扑特征量化,最终确认PA治疗DKD的核心靶点。

2.1.5 GO功能和KEGG通路富集分析 将交集靶点导入Metascape数据库(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>),开展基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。其中,GO功能分析涵盖生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3个核心维度。以 $P < 0.05$ 为统计学显著性阈值,并按 $-\log_{10}(P\text{值})$ 降序排列,以评估各项条目的生物学重要性,分别筛选出GO功能3大分类中排名前10的功能条目,以及KEGG信号通路富集分析中排名前20的信号通路。导出分析结果后,利用微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化处理。

2.2 动物实验

2.2.1 分组、模型鉴定与给药 经1周适应性饲养后,根据小鼠遗传背景进行初始定性分组:将6只db/m小鼠设为正常组,14只db/db小鼠设为成模预备组。其间,成模预备组中2只小鼠因发育过程中的自然原因死亡,予以剔除。待成模预备组自然发育至12周龄后,禁食不禁水12 h,经尾静脉检测空腹血糖(FPG),并以 $FPG > 11.1\text{ mmol/L}$ 作为模型鉴定成功标准。结果显示,与正常组比较,成模预备组FPG显著升高($P < 0.05$),提示糖尿病模型自然发病并鉴定成功,见表1。模型鉴定成功后,将符合标准的12只db/db小鼠依据FPG水平,采用随机数字表法分为2组:模型组($n=6$)和PA组($n=6$)。正常组($n=6$)作为空白对照继续同条件饲养,PA组按照PA $5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的剂量给予PA橄榄油溶液灌胃;模型组与正常组小鼠则于每日同一时间按照与PA组等体积的标准给予空白橄榄油溶液灌胃。各组小鼠每日同一时间干预1次,连续给药4周,并于每周固定时间禁食不禁水12 h后经尾静脉检测FPG水平。

表 1 2组自发成模后FPG水平比较($\bar{x}\pm s$) mmol/L

组别	n	FPG
正常组	6	7.55 $\pm$ 0.75
成模预备组	12	19.48 $\pm$ 6.25 ¹⁾

注:与正常组比较,1) $P < 0.05$ 。

2.2.2 取材 给药 4 周后,将 3 组小鼠单只置于代谢笼中,收集终点 24 h 尿液,记录总尿量,室温、3 000 r/min 离心 10 min 后获取上清液,并置于-80 ℃冰箱冻存,以待测 24 h 尿总蛋白排泄量(24hUTP)。尿液收集完毕后,常规麻醉小鼠,经眼眶静脉丛采血。全血样本室温静置后,4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min,分离获取上层血清,于-80 ℃环境保存以备肾功能检测。采血完毕后,立即于冰上快速剥离小鼠双侧肾脏,生理盐水冲洗干净并用吸水纸吸干。将肾脏沿冠状面纵切为 2 部分:一部分置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,用于后续的病理形态学检查;另一部分置于冻存管中,于液氮中速冻 1 h 后,转入-80 ℃超低温冰箱保存,用于基因表达检测。

2.2.3 观察指标

2.2.3.1 一般情况 自给药第 1 周起,每周定时观察小鼠的精神状态、活动情况及摄食饮水等一般情况,每周固定时间称量 1 次小鼠体质量。

2.2.3.2 血糖检测 自给药第 1 周起,每周同一时间禁食不禁水 12 h 后,经尾静脉采血测定 FPG。

2.2.3.3 肾功能与 24hUTP 检测 取上述冻存的小鼠血清样本,在冰上融化后,严格按照试剂盒说明书操作,采用全自动生化分析仪检测血清肌酐(Scr)和 BUN 含量。取上述冻存的终点 24 h 尿液样本,室温融化后,采用 UTP 测试盒测定尿蛋白浓度,并结合总尿量计算 24hUTP。

2.2.3.4 肾脏组织病理形态学检查 取固定于 4% 多聚甲醛溶液中的小鼠肾脏组织,石蜡包埋。使用

切片机切成厚度约为 5 μm 连续切片,脱蜡至水后进行染色。① 苏木素-伊红(HE)染色:切片经 PBS 溶液洗涤 2 次,浸泡于苏木素染液中;采用 0.1% 盐酸乙醇分化,冲洗后经伊红染液复染。② Masson 染色:切片脱蜡至水后依次经 5% 硫代硫酸钠反应、Weiger 铁苏木精浸染、1% 盐酸乙醇分化,随后行丽春红酸性品红染色液染色及苯胺蓝染色液复染,并以 1% 冰醋酸处理分化。置于光学显微镜下观察肾脏组织结构的病理学改变。

2.2.3.5 RT-qPCR 法检测肾脏组织中 TGF-β、MAPK8、NLRP3 mRNA 相对表达水平 取 50 mg 保存于-80 ℃的小鼠肾脏组织,在-40 ℃下采用组织研磨仪充分均质化。采用 TRIzol 法提取肾脏组织总 RNA,并测定其纯度与浓度。配制逆转录反应液,以随机引物逆转录合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,β-actin 为内参,采用 SYBR Green 染液为标记,对转化生长因子(TGF)-β、丝裂原活化蛋白激酶 8(MAPK8)和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)进行实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)扩增。扩增反应体系为 20 μL,其中,SYBR qPCR 试剂盒预混液 10 μL,前引物 0.5 μL,后引物 0.5 μL,cDNA 1 μL,超纯水 8 μL。反应条件如下:93 ℃预变性 3 min;93 ℃变性 10 s;60 ℃退火 20 s;70 ℃延伸 40 s,共进行 40 个循环;最后 72 ℃稳定延伸 10 min。相关基因引物序列由福州博涵生物科技有限公司设计制作,见表 2。以 β-actin 作为内源性参照,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各目的基因的 mRNA 相对表达量。

表 2 相关基因引物序列

基因名称	引物序列	产物长度/bp
β-actin	Forward:5'-CACTGTCGAGTCGGCGTCC-3'	89
	Reverse:5'-TCATCCATGGCGAACTGGTG-3'	
TGF-β	Forward:5'-AGGCGGTGCTCGCTTTGT-3'	418
	Reverse:5'-ATTCCGTCTCCTTGGTTC-3'	
MAPK8	Forward:5'-AGAAACTACAACCAACAGTAAGGA-3'	104
	Reverse:5'-TGAGTCAGCTGGGAAAAGCACATC-3'	
NLRP3	Forward:5'-ATTACCCGCCCGAGAAAGG-3'	141
	Reverse:5'-TCGCAGCAAAGATCCACACAG-3'	

2.2.4 统计学方法 数据统计采用 SPSS 25.0 软件进行。符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)进行描述。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐采用 LSD-*t* 法,方差不齐采用 Games-Howell 法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 PA 作用靶点、DKD 相关靶点及交集靶点筛选 经筛选、去重后共获得 228 个 PA 作用靶点,4 900 个 DKD 相关靶点,取交集后共获得 150 个 PA 治疗 DKD 潜在作用靶点。见图 1。

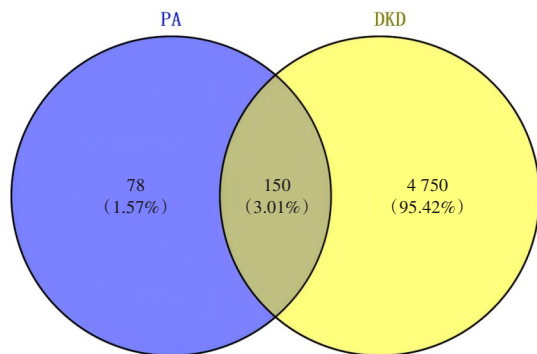
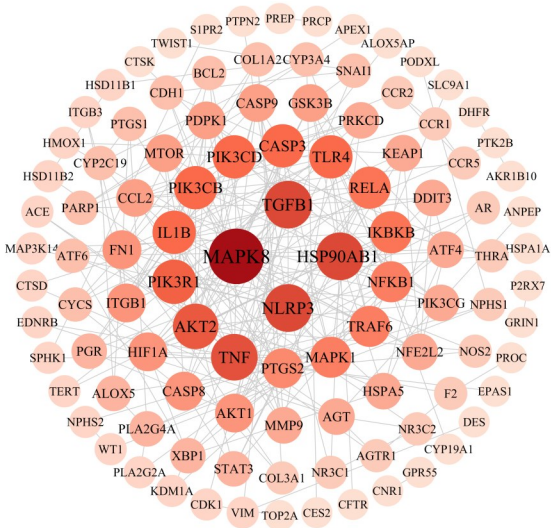


图 1 PA-DKD 韦恩图

3.2 PPI网络图的构建与核心靶点分析 PPI网络共包含 106 个节点和 261 条边,见图 2。节点度值前 10 的蛋白相关拓扑学参数,见表 3。其中,MAPK8、

TGF- β 1 和 NLRP3 位于网络中心,推测其为治疗 DKD 的核心靶点。



注:节点为交集靶点,边代表靶点间的相互关联,线条越多代表关联度越大。

图 2 PA 治疗 DKD 的 PPI 网络图

表 3 核心靶点的拓扑学参数

蛋白	中文名称	介数中心性	接近中心性	节点度值
MAPK8	丝裂原活化蛋白激酶 8	0.17	0.44	23.00
TGF- β 1	转化生长因子 β 1	0.20	0.43	16.00
HSP90 β	热休克蛋白 90 α 家族 B 类成员 1	0.10	0.38	16.00
NLRP3	NLR 家族含吡啶结构域蛋白 3	0.23	0.41	16.00
TNF	肿瘤坏死因子	0.11	0.40	15.00
AKT2	蛋白激酶 B2	0.05	0.39	14.00
PIK3 p85 α	磷酸肌醇-3-激酶调节亚基 α	0.03	0.36	13.00
IL-1 β	白细胞介素-1 β	0.08	0.39	12.00
PIK3 p110 δ	磷酸肌醇-3-激酶催化亚基 δ	0.02	0.34	12.00
PIK3 p110 β	磷酸肌醇-3-激酶催化亚基 β	0.02	0.34	12.00

3.3 GO 功能富集分析 GO 功能富集分析共获得 566 个 BP、78 个 CC 和 124 个 MF 显著富集条目。见图 3。

3.4 KEGG 信号通路富集分析 KEGG 信号通路富集分析共筛选获得 155 条信号通路,按照显著性水平降序排列,筛选排名前 20 位的信号通路,主要信号通路涉及晚期糖基化终末产物(AGE)-晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、C 型凝集素受体(CLR)和 TNF 等关键信号通路。见图 4。

3.5 3 组一般情况比较 给药第 1~4 周,正常组体质量平稳增长,与正常组比较,模型组和 PA 组体质量显著升高($P<0.05$)。见表 4。给药期间,正常组小鼠状态活跃,对外界刺激反应敏捷,且被毛浓密光洁;与正常组比较,模型组小鼠表现出精神萎靡、反应迟钝、被毛粗糙甚至局部脱落等体征,并伴有显著的多饮、多食及多尿现象;与模型组比较,PA 组小鼠精神状态明显好转,自主活动量增加,被毛逐渐恢复平顺与光泽,且多饮、多食、多尿等症状均呈不同程度减轻。

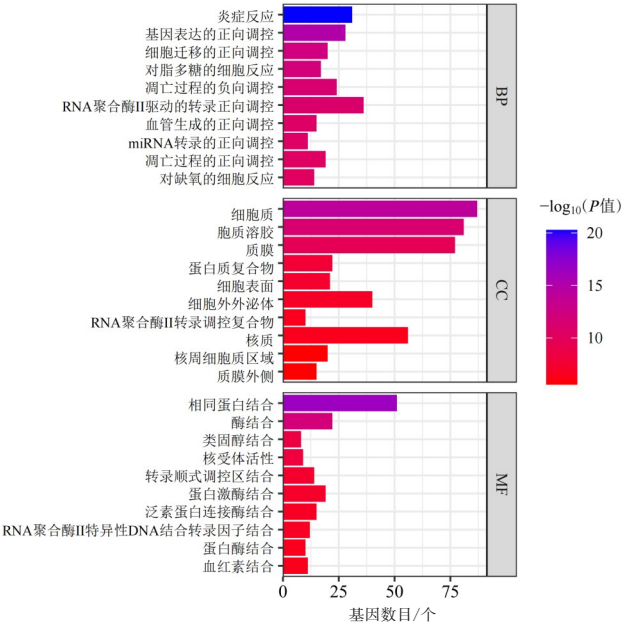


图 3 GO 功能富集分析

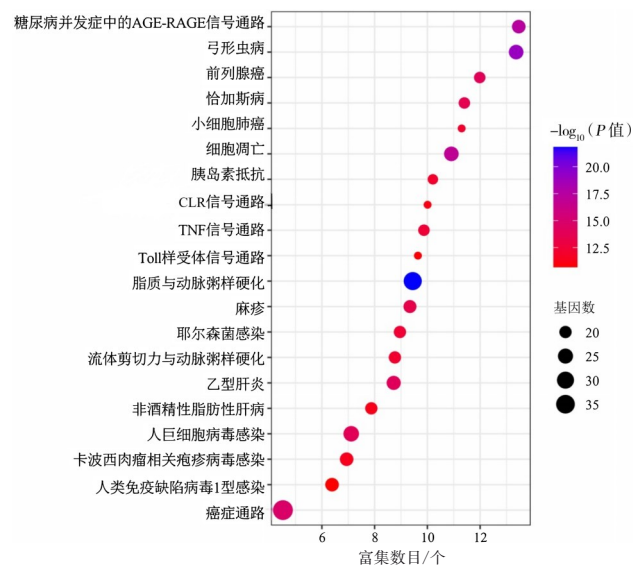


图 4 KEGG 信号通路富集分析

表 4 3 组体质量水平比较 ($\bar{x}\pm s$)g

组别	<i>n</i>	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
正常组	6	24.17±2.12	24.83±1.41	25.83±0.71	26.17±1.41
模型组	6	44.67±0.71 ¹⁾	46.00±0.50 ¹⁾	48.00±2.12 ¹⁾	48.30±3.54 ¹⁾
PA 组	6	44.67±0.44 ¹⁾	47.83±1.41 ¹⁾	50.33±2.12 ¹⁾	51.83±2.12 ¹⁾

注：与正常组比较,1) $P<0.05$ 。

3.6 3 组 FPG 水平比较 见表 5。

3.7 3 组肾功能和 24hUTP 水平比较 见表 6。

3.8 3 组肾脏组织病理形态学比较 HE 染色结果显示,正常组肾小球结构形态正常,基底膜光滑,肾小球形态规则,肾小管排列整齐;与正常组比较,模型组肾小球体积增大且呈分叶状,基底膜增厚,肾小管排列结构紊乱;与模型组比较,PA 组肾小球体积明显减小,基底膜厚度降低,炎症细胞的浸润减

少。Masson 染色结果显示:正常组肾小球和肾小管排列形态均正常,无大量胶原纤维增生;与正常组比较,模型组肾间质组织中可见大量胶原纤维增生;与模型组比较,PA 组肾小管排列较规则,肾间质胶原纤维增生减少。见图 5。

3.9 3 组肾脏组织中 TGF-β、MAPK8、NLRP3 mRNA 相对表达水平比较 见表 7。

表 5 3 组 FPG 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)mmol/L

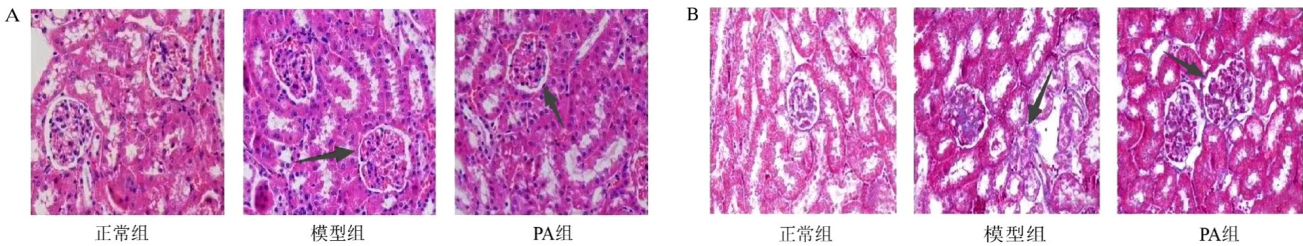
组别	<i>n</i>	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
正常组	6	7.80±0.90	6.52±0.05	6.90±0.05	6.97±1.25
模型组	6	20.63±7.25 ¹⁾	22.07±6.26 ¹⁾	24.58±2.79 ¹⁾	27.42±2.95 ¹⁾
PA 组	6	18.32±4.42 ¹⁾	21.25±3.78 ¹⁾	15.93±5.57 ¹⁾²⁾	12.27±2.44 ¹⁾²⁾

注：与正常组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。

表 6 3 组肾功能和 24hUTP 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Scr/(μmol/L)	BUN/(mmol/L)	24 h UTP/(mg/24 h)
正常组	6	25.89±5.23	5.88±0.79	2.16±0.32
模型组	6	37.19±4.49 ¹⁾	14.40±3.51 ¹⁾	13.04±1.06 ¹⁾
PA 组	6	29.68±4.07 ²⁾	5.85±0.68 ²⁾	8.90±0.40 ¹⁾²⁾

注：与正常组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。



注:A HE 染色;B Masson 染色。
图5 3组肾脏组织病理形态学比较(×400)

表7 3组肾脏组织中TGF-β、MAPK8、NLRP3 mRNA相对表达水平比较(̄x±s)

组别	n	TGF-β/β-actin	NLRP3/β-actin	MAPK8/β-actin
正常组	6	1.00±0.18	1.00±0.26	1.00±0.08
模型组	6	5.85±0.29 ¹⁾	3.35±0.54 ¹⁾	3.63±0.32 ¹⁾
PA组	6	1.43±0.05 ²⁾	1.39±0.04 ²⁾	0.86±0.04 ²⁾

注:与正常组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。

4 讨论

流行病学研究显示,约20%~40%的糖尿病患者表现出不同程度的肾损伤,是导致ESRD的重要因素^[5]。DKD的核心病理机制涉及炎症-纤维化级联反应、代谢紊乱和细胞损伤等,其肾组织特征性改变包括肾小球基底膜增厚、足细胞损伤等^[6]。延缓乃至逆转DKD患者肾功能损伤是当前防治DKD的重要切入点。中医药在改善DKD肾脏微环境方面具有多组分、多靶点调控的独特优势。茯苓具有淡渗利湿、健脾宁心的功效,在临床治疗DKD中疗效确切。药理研究证明,茯苓能激活丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)活性来影响抗氧化作用,进而缓解DKD进展,其核心单体PA能够通过下调IL-1β和IL-6等炎症介质表达^[7],影响细胞炎症氧化应激反应,在肾间质纤维化的治疗中具有积极作用^[8],但其具体作用机制尚待进一步明确^[9]。本研究将网络药理学预测与动物实验相结合,深入探讨了PA对改善DKD小鼠肾损伤的具体作用机制。

为探究其药效,本研究选用db/db小鼠作为动物模型进行宏观药效评价。结果显示,经PA连续干预肾功能后,不仅小鼠的高血糖状态得到显著控制,其肾功能及24hUTP水平均较模型组显著下降,提示PA能有效改善DKD小鼠肾脏滤过功能,减少尿蛋白漏出。在此基础上,HE与Masson染色结果进一步提供了直接的组织病理学证据:模型组小鼠存在明显的肾小球体积增大、基底膜增厚、炎性细胞浸润及肾间质大量胶原纤维增生;而经PA干预后,肾小球形态得以恢复,基底膜厚度降低,且间质胶原纤维增生与炎性细胞浸润现象得到显著改善。这充分证实了PA在改善肾脏微观结构、延缓纤维化进程中的确切疗效。

在明确宏观药效的基础上,本研究进一步结

合网络药理学与分子生物学手段,深度挖掘了PA发挥药效的微观机制。经筛选共获得150个PA治疗DKD的潜在作用靶点。在PPI网络中,MAPK8、TGF-β1及NLRP3具有高拓扑特征值,被确认为PA发挥多靶点、多通路肾脏保护作用的核心靶点。进一步KEGG通路富集分析结果显示,AGE-RAGE等关键代谢与炎症通路被显著富集。结合既往研究,在长期高血糖状态下,DKD患者体内大量AGEs聚集,可诱导肾小球系膜细胞(GMCs)中的RAGE上调;该过程不仅通过激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶引发氧化应激和炎症发生,还能从蛋白表达及脱乙酰酶活性双重层面抑制沉默信息调节因子1(SIRT1)水平,最终导致TGF-β的过量分泌与肾脏实质纤维化^[10-11]。

基于上述网络预测与病理机制,TGF-β作为介导肾脏纤维化的核心因子,而MAPK8与NLRP3炎症小体作为介导肾脏局部炎症反应和细胞凋亡的关键节点,二者在调控网络中共同发挥着关键作用。进一步RT-qPCR实验证实,模型组肾脏组织中TGF-β、MAPK8、NLRP3 mRNA相对表达水平显著升高;而PA干预显著下调这3个关键基因的mRNA表达。该结果不仅与网络药理学核心靶点的预测结果高度吻合,也进一步从转录水平阐明了PA的抗炎与抗纤维化机制。有研究显示,DKD肾小管间质纤维化受到TGF-β轴调控^[12-14],且该轴与MAPK8信号通路间存在串扰机制^[15]。当机体细胞处于高糖环境时,TGF-β信号通路被激活,不仅直接促进ECM大量沉积,还可通过保守的三级酶促反应(MAPKKK→MAPKK→MAPK)诱发MAPK8通路的激活。活化的MAPK8信号激活下游促炎和促纤维化分子,不仅参与介导肾小管上皮细胞向间充质表型的去分化及细胞凋亡,加剧DKD肾脏纤维化^[16],还能作为上游信号触发NLRP3炎症小体的

(下转第61页)