

芪黄健脾滋肾颗粒通过调控巨噬细胞免疫代谢重编程改善系统性红斑狼疮患者的肾脏损伤

钱 爱¹, 黄传兵^{1,2}, 朱雅文¹, 胡可心¹, 宋昕冉¹, 许宇翔¹

¹安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031; ²新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230038

摘要:目的 基于网络药理学、分子对接技术,通过临床验证,探讨芪黄健脾滋肾颗粒(QJZG)对系统性红斑狼疮(SLE)肾损害患者巨噬细胞极化的影响。方法 运用TCMSP、GeneCards、DrugBank、OMIM、TTD数据库获取QJZG及SLE、肾损害相关靶点;取三者交集得到潜在作用靶点;使用Cytoscape软件版本3.10.3,构建活性化合物与潜在靶标之间的相互作用网络及蛋白质相互作用关系网络。基于网络拓扑分析筛选出核心化合物成分与关键靶点,进而开展分子对接模拟验证。临床纳入62例SLE患者和30例健康人,将SLE患者分为观察组和对照组($n=31$);运用Western blotting技术检测巨噬细胞极化相关蛋白(iNOS、Arg-1)的表达,RT-qPCR技术检测AMPK/ULK1信号通路(AMPK、mTOR、HIF-1 α 、ULK1)mRNA表达;并观察经QJZG干预后对SLE患者中医证候积分、肾功能(CREA、BUN、eGFR)及免疫功能指标(CD4⁺T cell、CD8⁺T cell、CD4⁺T cell/CD8⁺T cell)表达的影响。结果 经筛选得到QJZG作用于SLE肾损害的关键活性成分3种,核心靶点基因9个;富集分析显示可能涉及TNF、HIF-1、mTOR、cAMP等信号通路;分子对接模拟分析表明,所选核心活性成分与潜在关键靶点之间展现出良好的结合能力,呈现出类似的结合活性特征,其中HIF-1 α 、mTOR是结合活性较好的靶蛋白。临床试验证实QJZG能够显著降低血清中CREA、BUN、iNOS蛋白、mTOR mRNA、HIF-1 α mRNA、CD8⁺T cell表达水平($P<0.01$),升高血清中eGFR、Arg-1蛋白、AMPK mRNA、ULK1 mRNA、CD4⁺T cell、CD4⁺T cell/CD8⁺T cell水平($P<0.01$),降低中医证候积分($P<0.01$)。结论 揭示了QJZG通过多成分、多靶点协同调控SLE肾损伤的作用特征。复方中所含的槲皮素、山奈酚及7-O-甲基异微凸剑叶莎醇等代表性组份,可能通过与HIF-1 α 、mTOR等靶点结合,激活AMPK/ULK1信号通路,进而调控巨噬细胞极化,体现了中药复方“整体调控、多途径干预”的独特优势。

关键词:芪黄健脾滋肾颗粒;系统性红斑狼疮;巨噬细胞M1/M2极化;AMPK/ULK1信号通路;网络药理学

Qihuang Jianpi Zishen Granule ameliorates renal injury in patients with systemic lupus erythematosus by regulating immunometabolic reprogramming of macrophages

QIAN Ai¹, HUANG Chuanbing^{1,2}, ZHU Yawen¹, HU Kexin¹, SONG Xinran¹, XU Yuxiang¹

¹First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; ²Ministry of Education Key Laboratory of Xin'an Medicine, Hefei 230038, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Qihuang Jianpi Zishen Granule (QJZG) for regulating macrophage polarization in renal damage in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** Public databases were used to screen the targets of QJZG, SLE and renal damage. An active ingredient-target network and a protein-protein interaction network were constructed followed by molecular docking. Sixty-two SLE patients were randomized into QJZG treatment group and control group ($n=31$), with 30 healthy individuals as the normal control group. Macrophage polarization markers (iNOS and Arg-1) and AMPK/ULK1 pathway molecules were detected using Western blotting and RT-qPCR, and the changes in renal function, immune indicators, and TCM syndrome scores of the participants were evaluated. **Results** Three key active ingredients of QJZG (quercetin, kaempferol, and 7-O-methylisoflavanone) and 9 core targets were identified, and the target genes were enriched in the TNF, HIF-1, and mTOR pathways. Molecular docking showed strong binding of the active compounds of QJZG with HIF-1 α and mTOR. In SLE patients, QJZG treatment significantly improved their renal function, regulated the immune function (increasing CD4⁺/CD8⁺ ratio and reducing CD8⁺ T cells), and reduced TCM syndrome scores. QJZG treatment also significantly downregulated iNOS, mTOR, and HIF-1 α expressions and upregulated Arg-1, AMPK, and ULK1 expression in SLE patients. **Conclusion** QJZG alleviated renal damage in SLE patients through a mechanism involving multiple components and targets. The active ingredients of QJZG regulate macrophage polarization possibly by activating the AMPK/ULK1 pathway via binding to their targets including HIF-1 α and mTOR.

Keywords: Qihuang Jianpi Zishen Granules; systemic lupus erythematosus; M1/M2 polarization of macrophages; AMPK/ULK1 signaling pathway; network pharmacology

收稿日期:2026-02-02

基金项目:国家自然科学基金(82574970);国家中医药管理局-重大疑难疾病中西医临床协作项目(ZDYN-2024-A-146);安徽省中医优势专科(皖中医药服务秘[2022]34号);安徽省临床医学研究转化专项项目(202304295107020114);大健康研究院新安医学与中医药现代化研究所专项(2023CXMMTCM004)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82574970).

作者简介:钱 爱,在读博士研究生,E-mail: 1838929252@qq.com

通信作者:黄传兵,主任医师,博士生导师,E-mail: chuanbinh@163.com

系统性红斑狼疮是一种慢性、全身性自身免疫性疾病,主要表现为多系统受累及血清中多种自身抗体的出现,属于弥漫性结缔组织病的范畴。该病多发于育龄期女性,我国患者的平均发病年龄约为29岁,男女患病比例约为1:10^[1]。SLE的肾脏损害主要损伤肾小球、肾小管间质和肾血管,其具体病因尚未完全阐明,目前普遍认为与环境暴露、免疫系统异常、遗传背景及肾脏凝血

功能紊乱等因素存在关联^[2]。狼疮性肾炎(LN)以蛋白尿、镜下血尿、管型尿和进行性肾功能障碍为特征,超过50%的SLE患者会出现临床显著的肾脏受累,且几乎所有患者通过肾活检均可检测到不同程度的肾脏病理学改变^[3]。SLE病因和发病机制十分复杂,目前关于SLE肾脏损害的具体机制尚未清楚,亟需寻找新的治疗靶点与方法。前期研究表明,芪黄健脾滋肾颗粒(QJZG)具有降低多种炎症相关细胞因子水平的作用,改善免疫系统失衡状态,发挥治疗SLE肾脏损害的作用,是临床治疗SLE肾脏损害的经验效方^[4-6]。

巨噬细胞作为免疫反应中关键的吞噬细胞以及炎症反应中最重要的调节细胞,其在不同微环境刺激下可发生显著的代谢模式转变,这在SLE肾脏损害中发挥着重要作用^[7,8]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/UNC-51样自噬激活激酶1(ULK1)信号通路可以通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)信号轴,抑制糖酵解途径关键酶,从而抑制巨噬细胞M1极化过程^[9,10]。QJZG是否可以通过调控该信号通路所介导的巨噬细胞M1/M2表型转换来改善系统性红斑狼疮的肾脏病变,目前尚未明确。因此,本研究拟整合网络药理学方法与分子对接技术,初步预测QJZG潜在的活性成分及其相关作用机制。随后,通过系统性临床试验验证QJZG对SLE肾损伤的治疗效果,并阐明其具体作用途径及可能的作用靶点,为后续临床应用与推广提供理论支持与实践依据。

1 资料和方法

1.1 网络药理学与分子对接技术

1.1.1 QJZG活性成分与相关靶点的筛选 采用中药系统药理学数据库(TCMSP,访问地址:<https://tcmspw.com/tcmsp.php>)并结合文献检索,对方剂中所含黄芪、菟丝子、熟地黄、山药、白术、茯苓、覆盆子及金樱子等药材的有效成分及其对应靶点进行筛选。设定口服生物利用度(OB)不低于30%及类药性指数(DL)不低于0.18作为筛选阈值,从而筛选出具有良好药理活性的化合物。进一步通过UniProt数据库(网址:<https://www.uniprot.org/>)将获取的蛋白质靶点转换为对应的标准基因名称。

1.1.2 SLE肾损害相关靶点的获取 在GeneCards(<https://www.genecards.org>)、DrugBank(<https://www.drugbank.ca>)、OMIM(<https://omim.org>)及TTD(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd>)数据库中,以“Systemic lupus erythematosus”及“Renal damage”为关键词进行检索。将获取的所有靶点数据进行合并,并利用R语言的“Venn”软件包完成去重处理并绘制韦恩图,最终获得系统性红斑狼疮肾损伤相关的靶点集合。

1.1.3 QJZG与SLE肾损害共同靶点的筛选 运用R语言中的“Venn”工具包,将前述步骤得到的QJZG活性成分对应靶点集合与SLE肾损伤相关靶点集合进行交集分析,通过绘制韦恩图直观展示并提取出二者共有的靶点集合。

1.1.4 活性成分-靶点网络的构建与分析 将1.1.1章节筛选的QJZG活性成分与其对应靶点数据,连同1.1.3章节中获取的药物与疾病共同靶点集合,一并导入Cytoscape 3.10.3平台,构建活性成分-靶标相互作用网络图谱。

1.1.5 蛋白质互作网络的构建及分析 将1.1.3环节获取的药物-疾病共有靶点集合提交至STRING数据库,设定研究对象为“Homo sapiens”,并将交互置信度阈值调整为中等水平(0.4),隐藏无连接蛋白节点,其余参数按默认设置执行,从而获得蛋白质互作网络数据。随后将该PPI网络导入Cytoscape 3.10.3软件,通过拓扑结构分析筛选核心作用靶点。

1.1.6 基因功能注释与通路富集分析 通过DAVID在线平台(<http://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)对共有靶点进行GO功能与KEGG通路富集分析,设定 $P<0.05$ 为显著性阈值,分别得到GO生物过程、细胞组分、分子功能3方面的注释结果以及KEGG通路富集结果。进一步将分析数据导入微生信在线绘图平台(<http://www.bioinformatics.com.cn>)完成可视化展示。

1.1.7 分子对接验证 从PubChem数据库获取关键活性成分的二维结构信息,并运用ChemOffice软件转换为三维结构模型。使用UniProt数据库查询关键靶点对应的蛋白标识符,随后在PDB数据库获取该蛋白的三维晶体结构文件。借助PyMOL软件对蛋白结构进行前处理,包括去除水分子和已结合的配体。接着通过AutoDockTools软件为蛋白添加氢原子并识别其活性位点,再调用AutoDock Vina程序模拟计算受体与配体的结合自由能。最后利用PyMOL软件将分子对接结果以三维图像形式呈现。

1.2 临床资料与方法

1.2.1 一般资料 本研究为回顾性研究,共纳入62例符合SLE诊断标准的患者,均由安徽中医药大学第一附属医院风湿免疫科收治,年龄18~60岁,就诊时间为2022年10月~2024年2月,经纳入标准筛选后纳入本研究,其中女性患者60例,男性患者2例。同期从同院体检中心就诊的健康女性中选取30例,组成健康对照组。健康组年龄20~58(36.50 $\pm$ 9.80)岁。SLE观察组年龄37.45 $\pm$ 12.10岁,病程100.84 $\pm$ 56.05月;SLE对照组年龄39.13 $\pm$ 11.52岁,病程97.65 $\pm$ 43.67月。两组患者的一般临床资料(如年龄、病程等)差异无统计学意义($P>0.05$),

表明基线特征具有可比性。本研究方案已通过安徽中医药大学第一附属医院伦理委员会的审查批准(伦理批号:2022AH-07)。

1.2.2 诊断及纳入、排除标准 诊断标准:西医诊断标准依据2019年欧洲抗风湿病联盟/美国风湿病学会修订的SLE分类标准制定^[11];中医脾肾两虚证辨证依据《实用中医风湿病学》^[12]和《中医病证诊断疗效标准》^[13]。纳入标准:符合上述SLE诊断标准;临床确诊出现肾损害(持续性蛋白尿>0.5 g/24 h或>3+,或出现管型尿);年龄围18~60周岁;病情处于轻、中度活动期(SLE疾病活动指数评分>4且<15);受试者自愿参与研究并已签署知情同意书。排除标准:对本研究使用药物存在过敏史;SLE疾病活动指数评分≥15的重度活动期患者;处于妊娠或哺乳阶段的女性;合并严重脏器功能障碍;伴有眼部相关并发症;以及无法配合完成治疗方案的患者。

1.2.3 干预方案

1.2.3.1 对照组治疗方案 口服醋酸泼尼松片(天津天药药业股份有限公司,规格5 mg/片,国药准字H12020689),10 mg/次,1次/d;口服吗替麦考酚酯(无锡福祈制药有限公司,规格0.25 g/片,国药准字H20080642),0.5 g/次,2次/d;口服硫酸羟氯喹片(上海上药中西制药有限公司,规格0.1 g/片,国药准字H19990263),0.1 g/次,3次/d。上述药物剂量可根据患者具体病情进行适当调整,连续给药12周。

1.2.3.2 观察组处理方案 观察组在对照组常规用药基础上,加用芪黄健脾滋肾颗粒(由安徽中医药大学第一附属医院制剂中心提供,规格10 g/袋,批号20200511),

口服10 g/次,2次/d,持续治疗12周。

1.2.4 检测指标及方法

1.2.4.1 中医证候积分 依据《实用中医风湿免疫病学》^[14]将关节疼痛、气短乏力、腰膝酸软、脱发、浮肿5项脾肾两虚证临床症状按无、轻度、中度、重度分别计0、2、4、6分。

1.2.4.2 肾功能指标 采用全自动生化分析仪检测血清肌酐(CREA)、尿素氮(BUN)、肾小球滤过率估值(eGFR)。

1.2.4.3 巨噬细胞标志蛋白的表达 采用Western blotting检测M1型标志物iNOS及M2型标志物ARG-1的表达。提取细胞总蛋白后,经SDS-PAGE电泳、转膜,以5%脱脂牛奶封闭,先后用一抗(iNOS 1:1000、ARG-1 1:5000、GAPDH 1:2000)4℃过夜孵育及HRP标记二抗室温孵育。ECL显影后,通过Image J分析灰度值,以GAPDH为内参计算iNOS与ARG-1相对表达量,并以iNOS/ARG-1比值作为极化状态评价指标。

1.2.4.4 AMPK/ULK1信号通路关键基因的mRNA表达 采用实时荧光定量PCR检测AMPK/ULK1信号轴及下游关键基因mRNA表达。以TRIzol法提取总RNA并逆转录为cDNA。PCR反应体系含SYBR Green Mix、引物及cDNA模板。以β-actin为内参,检测AMPK、mTOR、HIF-1α及ULK1表达水平,采用2^{-ΔΔCt}进行定量分析,检测内容涵盖扩增曲线、溶解曲线及基因相对表达量。所用引物由安徽中抗生物技术有限公司设计与合成(表1)。

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Amplicon size (bp)	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
β-actin	96	CCCTGGAGAAGAGCTACGAG	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT
AMPK	99	CTTCGGCAAAGTGAAGATTG	CCAACAACATCTAAACTGCG
mTOR	178	GGCCAATGACCCAACATCTC	CATGATGCGATGCTCGATGT
HIF-1α	168	TAAGAAACCACCTATGACCTGC	TCTGGCTCATATCCCATCAA
ULK1	88	CTTTTGTTTCTCCGTTGGGG	GGGCTGCTAATCCGAATCC

1.2.4.5 免疫功能指标检测 使用流式细胞仪(BECKMAN)对外周血中CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞的百分比进行测定,并计算CD4⁺/CD8⁺T细胞比值。

1.2.5 统计学分析 数据处理与统计分析使用SPSS 26.0软件完成,图表绘制及图像处理分别借助GraphPad Prism和ImageJ软件实现。计量数据以均数±标准差表示。两组间差异比较使用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05认为差异具

有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 QJZG活性成分与相关靶点筛选 基于TCMSP数据库,以口服生物利用度不低于30%、类药性不低于0.18作为筛选标准,共获取52种QJZG的活性成分,这些成分对应的潜在作用靶点共计207个。

2.1.2 SLE 肾损害相关靶点的获取 在 GeneCards、DrugBank、OMIM、TTD 数据库中分别获取 SLE 肾损害相关靶点 8489、37、27、59 个,去重后取并集,剩余 8515 个。

2.1.3 QJZG 与 SLE 肾损害的交集靶点筛选 将 QJZG 活性成分靶点与 SLE 肾损害相关靶点取交集,最终获得 QJZG 作用于 SLE 肾损害的潜在靶点 170 个,活性成分 43 个(图 1)。

2.1.4 活性成分-靶点网络 将 QJZG 筛选得到的 43 种活性成分及其与药物-疾病共有的 170 个作用靶点导入 Cytoscape 3.10.3 软件,构建“活性成分-靶点”相互作用网络图(图 2)。经拓扑参数分析,得到连接度(degree)最高的前 3 位活性成分依次为: MOL000098 槲皮素(quercetin)、MOL000422 山奈酚(kaempferol)、MOL000378 7-O-甲基异微凸剑叶莎醇(7-O-methylisomucronulatol)。

2.1.5 蛋白质互作网络构建与核心靶点筛选 将前述获得的 170 个药物-疾病共同靶点导入 STRING 数据库,设置置信度阈值为 0.400,隐藏游离节点,获得包含 145 个节点及 930 条相互作用边的蛋白质互作网络(图 3)。将上述网络数据导入 Cytoscape 3.10.3 软件中,借助 CytoNCA 插件完成拓扑学分析与可视化处理,最终确定 9 个核心靶点,包括:肿瘤抑制蛋白 P53(TP53)、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)、蛋白激酶 B1(AKT1)、热休克蛋白 90 α 成员 1(HSP90AA1)、白细胞介素-6

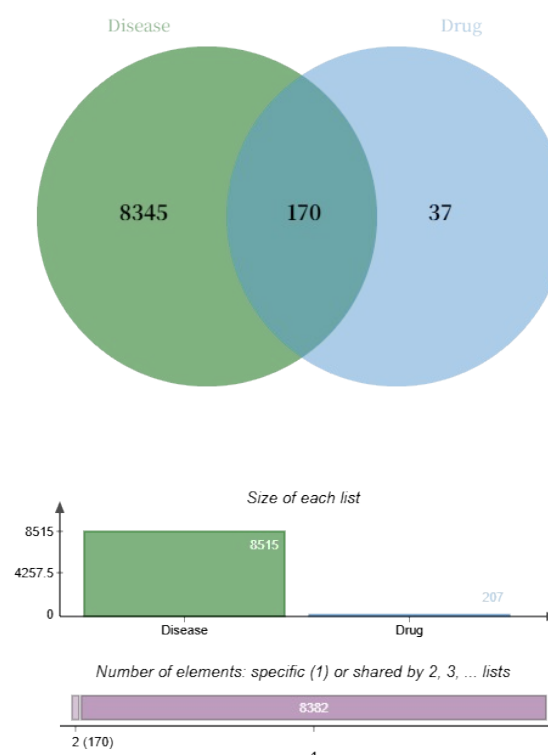


图 1 活性成分靶点与疾病相关靶点交集的韦恩图

Fig.1 Venn diagram showing intersection between the targets of active ingredients of Qihuang Jianpi Zishen Granule (QJZG) and the disease.

(IL-6)、雌激素受体 α (ESR1)、肿瘤坏死因子(TNF)、B 细胞淋巴瘤-2 基因(BCL2)以及 FBJ 骨肉瘤病毒癌基因同源蛋白(FOS)。核心靶点按 degree 降序排列(表 2)。

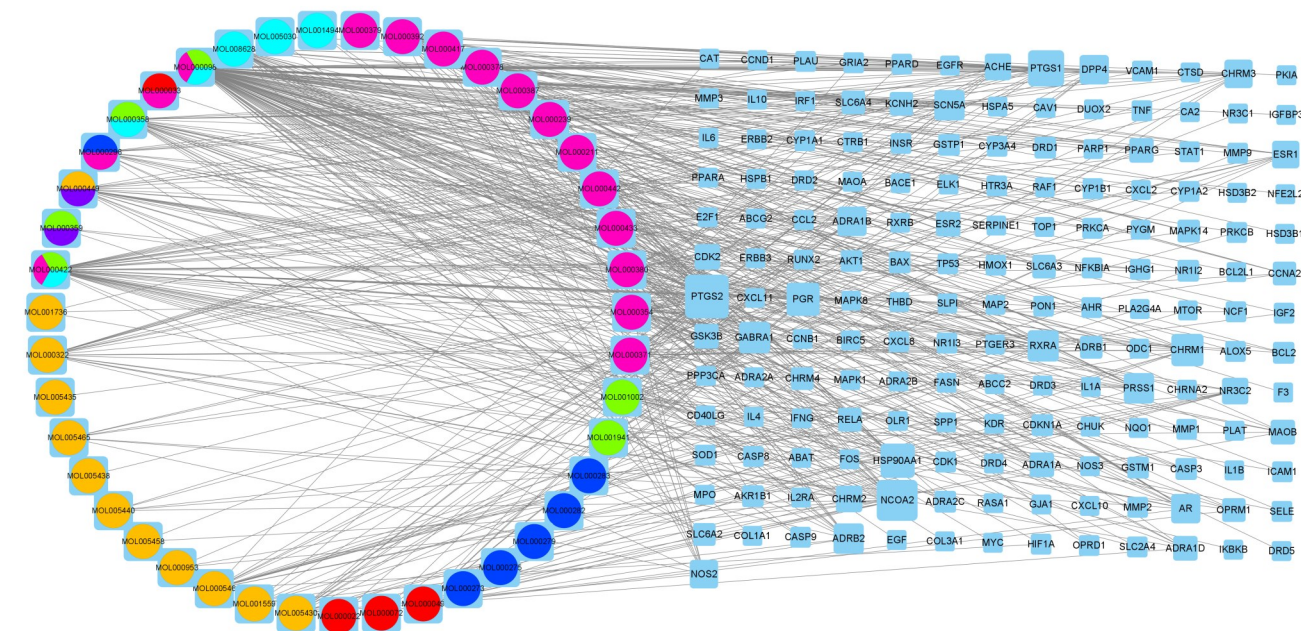


图 2 主要活性成分-靶点网络

Fig.2 Component-target network.



图3 PPI网络

Fig.3 Protein-protein interaction network.

表2 核心靶点信息

Tab.2 Core target information

Ggene name	Protein name	Degree	Protein number
TP53	Tumor protein p53	40	Q12888
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	30	O94737
AKT1	AKT Serine/Threonine Kinase 1	32	Q38998
HSP90AA1	Heat shock protein90alpha family class A member1	24	O94826
IL-6	Interleukin 6	30	P05231
ESR1	Estrogen receptor 1	26	P03372
TNF	Tumor necrosis factor	30	Q9UNG2
BCL2	Apoptosis regulator Bcl-2	22	Q9JJV8
FOS	Protein c-Fos	24	O77628

2.1.6 GO功能与KEGG通路富集分析 基于DAVID数据库对共有靶基因进行富集分析,GO功能分析结果表明,相关基因主要参与微小RNA转录调控、蛋白质磷酸化修饰、泛素化过程等生物过程(图4);KEGG通路富集分析显示,TNF信号通路、HIF-1信号通路、mTOR信号通路及cAMP信号通路等在与肾损伤调节密切相关的

通路中显著富集(图5)。

2.2 分子对接

结合^[15, 16]及课题组前期研究结果,选择与SLE肾损害高度相关通路中的靶点(HIF-1α、mTOR),采用分子对接技术与QJZG关键成分(槲皮素、山奈酚、7-O-甲基异微凸剑叶莎醇)的结合情况进行验证。从PDB数据库获取相关通路中核心靶点HIF-1α(PDB ID: 8HE0)和mTOR(PDB ID: 2GAQ)的蛋白晶体结构文件。分子对接结果表明,所有配体-受体复合物的结合自由能均不高于-6.0 kcal/mol,显示出较强的结合活性与稳定的对接构象(表3、图6)。

2.3 临床研究

2.3.1 两组患者中医证候积分比较 治疗后两组患者中医证候积分均较治疗前降低($P<0.01$),且观察组变化相较于对照组更为明显($P<0.01$,表4)。

2.3.2 两组患者肾功能指标比较 治疗前,两组患者的CREA、BUN、eGFR水平差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后,两组患者的CREA、BUN水平降低,eGFR水平升高($P<0.01$);且观察组改善效果较对照组更为明显($P<0.01$,表5)。

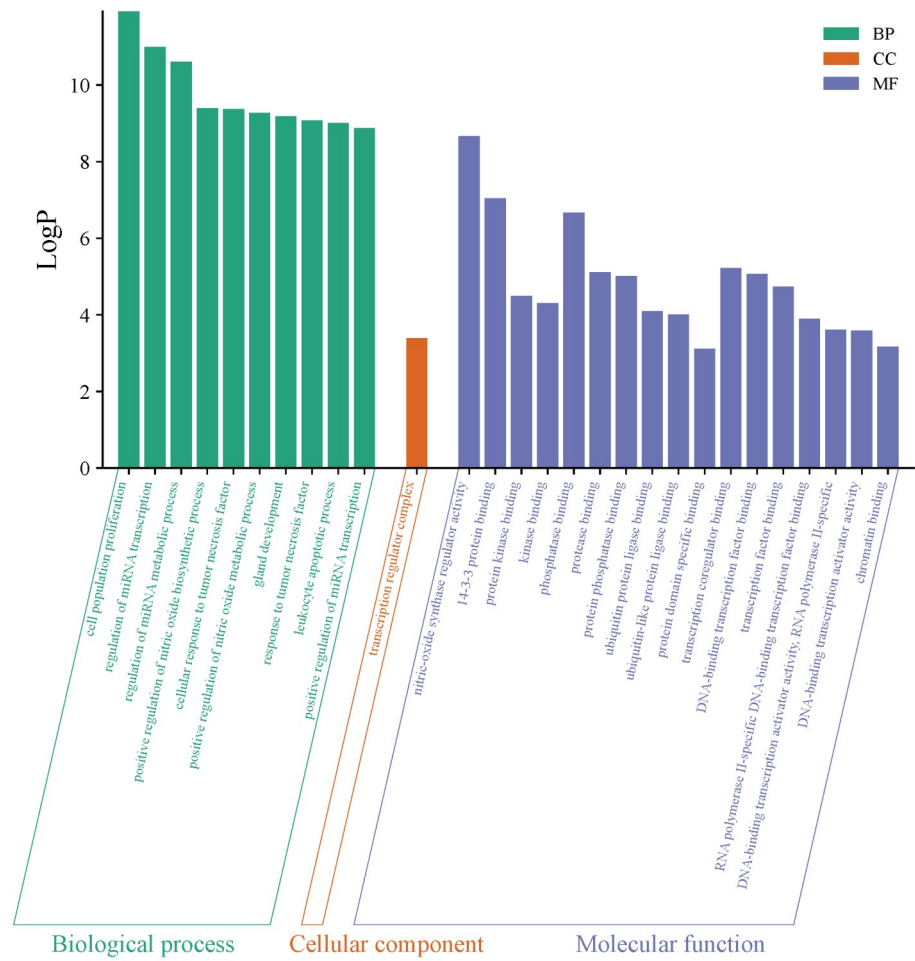


图4 GO功能富集分析结果图

Fig.4 Results of GO functional enrichment analysis.

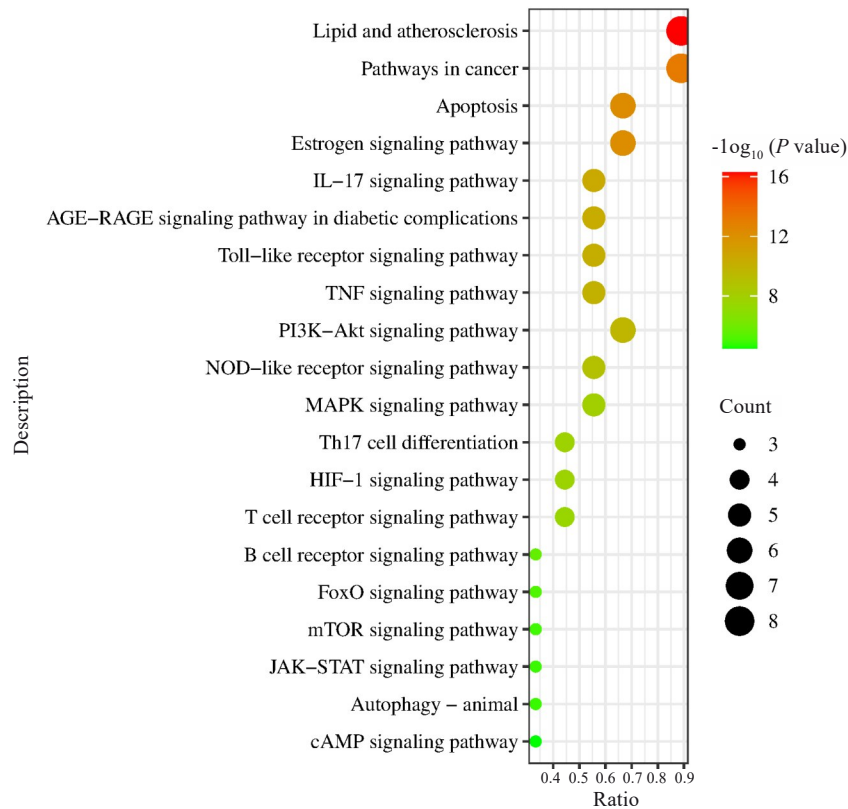


图5 KEGG通路富集分析图

Fig.5 KEGG pathway enrichment analysis.

表3 活性成分与核心模块靶点的分子对接结果
Tab.3 Molecular docking results of the active components against the core module targets

Key ingtedients	Target	Affinity (kcal/mol)
Quercetin	HIF-1α	-7.0
	mTOR	-7.0
Kaempferol	HIF-1α	-7.0
	mTOR	-6.7
7-O-methylisomucronulatol	HIF-1α	-6.7
	mTOR	-6.0

2.3.3 两组患者巨噬细胞标志蛋白表达比较 经治疗后,两组患者的iNOS蛋白表达量下降,而Arg-1蛋白表达量上升($P<0.01$)。与对照组相比,观察组iNOS的表达下调更为显著,Arg-1的表达上调也更为明显($P<0.01$,表6,图7)。

2.3.4 各组mRNA表达量的比较 与健康组比较,SLE

表4 两组患者中医证候积分的比较
Tab.4 Comparison of TCM syndrome scores between the two groups of SLE patients ($n=31$, $Mean\pm SD$)

Group	TCM syndrome scores	
	Pre-treatment	Post-treatment
Control	22.29±2.27	16.87±1.77**
Observation	21.32±2.21	12.68±1.49**△△

** $P<0.01$ vs pre-treatment. △△ $P<0.01$ vs control group.

组 AMPK mRNA、ULK1 mRNA 表达水平降低($P<0.01$),mTOR mRNA、HIF-1α mRNA 表达水平升高($P<0.01$)。经治疗后,两组患者的 AMPK mRNA 及 ULK1 mRNA 表达均明显提高,而 mTOR mRNA 与 HIF-1α mRNA 的表达降低($P<0.01$)。相较于对照组,观察组在 AMPK mRNA 与 ULK1 mRNA 表达提升方面更为突出,同时 mTOR mRNA 及 HIF-1α mRNA 的降低幅度也更加显著($P<0.01$,表7)。

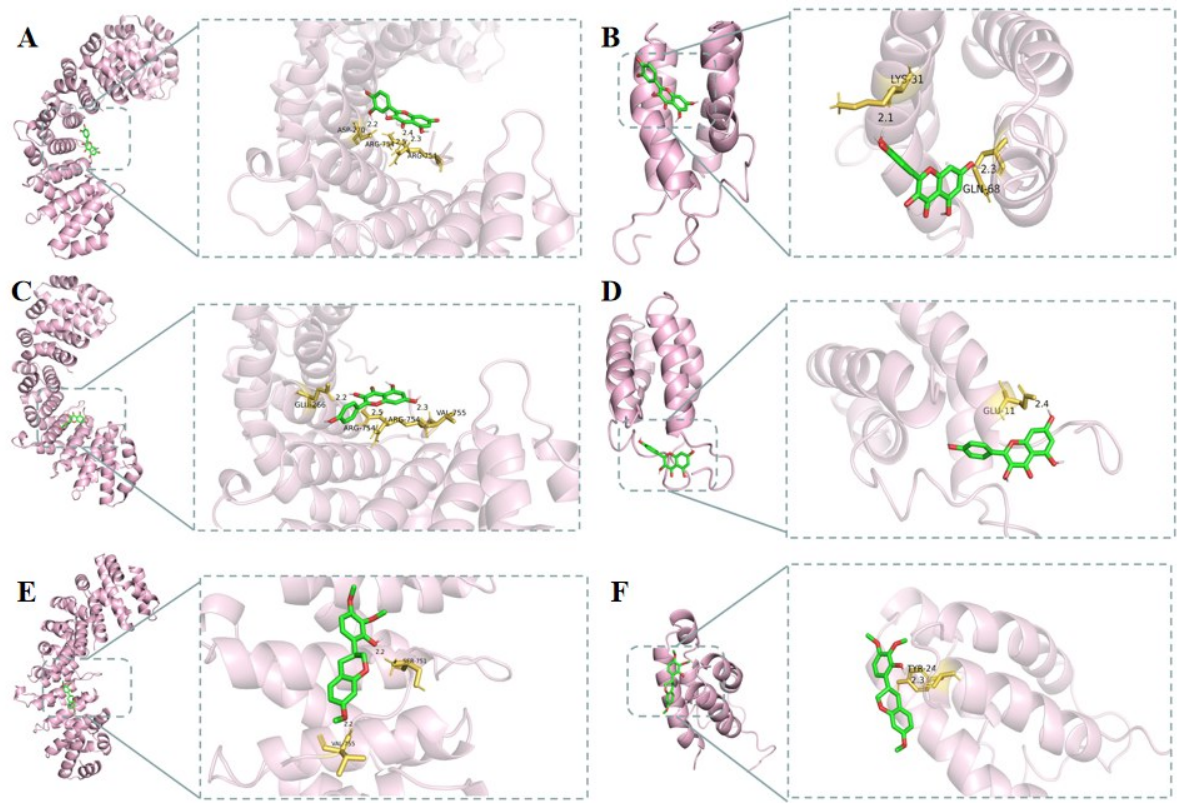


图6 高活性组分与核心模块靶点的分子对接模式图
Fig.6 Molecular docking patterns between highly active components and the core module targets. A: HIF-1α+quercetin. B: mTOR+quercetin. C: HIF-1α+kaempferol. D: mTOR+kaempferol. E: HIF-1α+7-O-methylisomucronulatol. F: mTOR+7-O-methylisomucronulatol.

2.3.5 两组患者免疫功能指标比较 经治疗后,两组患者的CD4⁺T细胞比例及CD4⁺/CD8⁺比值均升高,而CD8⁺T细胞比例降低($P<0.01$)。与对照组治疗后相比,观察组的CD4⁺T细胞比例及CD4⁺/CD8⁺比值升高程度更为明显,同时CD8⁺T细胞比例的下降幅度也更

大($P<0.01$,表8)。

3 讨论

芪黄健脾滋肾颗粒是临床治疗SLE肾损害的经验效方,其立方依据源于中医“脾肾两虚”的核心病机,体

表5 两组患者CREA、BUN、eGFR的比较

Tab.5 Comparison of CREA, BUN, eGFR between the two groups of SLE patients ($n=31$, $Mean\pm SD$)

Index	Control		Observation	
	Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment
CREA	76.55 $\pm$ 14.22	70.01 $\pm$ 10.55**	77.50 $\pm$ 14.84	64.15 $\pm$ 8.85** $\Delta\Delta$
BUN	13.95 $\pm$ 3.85	8.45 $\pm$ 1.45**	13.03 $\pm$ 3.35	6.50 $\pm$ 1.45** $\Delta\Delta$
eGFR	93.36 $\pm$ 15.30	109.78 $\pm$ 17.02**	93.60 $\pm$ 20.46	124.50 $\pm$ 30.50** $\Delta\Delta$

** $P<0.01$ vs pre-treatment; $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group.

表6 两组患者iNOS、Arg-1的比较

Tab.6 Comparison of iNOS and Arg-1 between the two groups of SLE patients ($n=31$, $Mean\pm SD$)

Index	Control		Observation	
	Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment
iNOS	1.07 $\pm$ 0.08	0.83 $\pm$ 0.05**	1.08 $\pm$ 0.08	0.52 $\pm$ 0.07** $\Delta\Delta$
Arg-1	0.59 $\pm$ 0.09	0.82 $\pm$ 0.04**	0.60 $\pm$ 0.08	1.15 $\pm$ 0.06** $\Delta\Delta$

** $P<0.01$ vs pre-treatment; $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group.

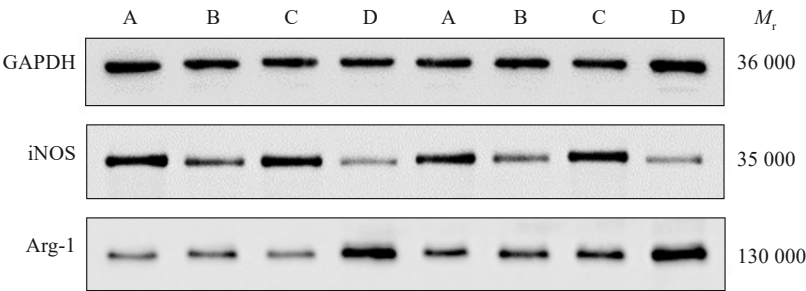


图7 两组患者巨噬细胞标志蛋白表达的比较

Fig. 7 Macrophage marker protein expression in the two groups of SLE patients. A: Control group (before treatment). B: Control group (after treatment). C: QJZG treatment group (before treatment). D: QJZG treatment group (after treatment).

表7 各组AMPK、mTOR、HIF-1 α 、ULK1的比较

Tab.7 Comparison of AMPK, mTOR, HIF-1 α , and ULK1 among the 3 groups of participants ($Mean\pm SD$)

Index	Normal ($n=30$)		Control ($n=31$)		Observation ($n=31$)	
	Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment
AMPK	1.65 $\pm$ 0.61	-	0.86 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	1.26 $\pm$ 0.55**	0.93 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	1.50 $\pm$ 0.24** $\Delta\Delta$
mTOR	0.73 $\pm$ 0.27	-	1.17 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta$	1.00 $\pm$ 0.07**	1.24 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta$	0.85 $\pm$ 0.13** $\Delta\Delta$
HIF-1 α	0.45 $\pm$ 0.10	-	0.77 $\pm$ 0.17 $\Delta\Delta$	0.65 $\pm$ 0.15**	0.80 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$	0.48 $\pm$ 0.12** $\Delta\Delta$
ULK1	2.45 $\pm$ 0.83	-	1.18 $\pm$ 0.53 $\Delta\Delta$	1.63 $\pm$ 0.82**	1.13 $\pm$ 0.37 $\Delta\Delta$	2.11 $\pm$ 0.79** $\Delta\Delta$

** $P<0.01$ vs pre-treatment; $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P<0.05$ vs Normal group.

表8 两组患者免疫功能指标的比较

Tab.8 Comparison of immune function related indicators between the two groups of SLE patients ($n=31$, $Mean\pm SD$)

Index	Control		Observation	
	Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment
CD4 ⁺ (%)	26.05 $\pm$ 5.77	44.54 $\pm$ 5.66**	25.67 $\pm$ 5.31	57.12 $\pm$ 5.41** $\Delta\Delta$
CD8 ⁺ (%)	46.45 $\pm$ 9.87	30.32 $\pm$ 3.87**	44.66 $\pm$ 9.38	24.04 $\pm$ 2.27** $\Delta\Delta$
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.56 $\pm$ 0.03	1.47 $\pm$ 0.04**	0.58 $\pm$ 0.04	2.38 $\pm$ 0.02** $\Delta\Delta$

** $P<0.01$ vs pre-treatment; $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group.

现了“扶正以祛邪”的治疗思想。现代研究表明,中医“脾”的功能与机体能量代谢、免疫稳态维持密切相关。因此,从免疫代谢角度阐释“健脾滋肾”治法的科学内涵,是揭示该复方作用机制的关键切入点。通过构建并解析QJZG干预SLE的“成分-疾病-靶点”网络模型,本研究识别出槲皮素、山奈酚及7-O-甲基异微凸剑叶莎醇为关键活性组分。早期研究^[17]通过UPLC-Q-TOF-MS^E技术结合UNIFI软件,通过对照品及相关文献比对,对该复方颗粒的化学成分进行了定性分析,为上述活性组分的鉴定提供了依据。Chen等^[18]观察到槲皮素通过改善IL-33诱导的HK-2细胞中纤维化和炎症相关蛋白的积累,在体外和体内改善狼疮性肾炎的肾损伤和焦亡。山奈酚、7-O-甲基异微凸剑叶莎醇可以通过抑制FOXP3磷酸化来增强Treg细胞的抑制功能,因此可能对SLE等炎症性疾病的预防和治疗有效^[19,20]。根据KEGG通路富集分析结果,TNF、HIF-1、mTOR以及cAMP等信号通路在肾损伤调控过程中发挥关键作用。分子对接模拟进一步表明,核心活性成分与主要靶点蛋白间具有较好的结合亲和力。本研究围绕系统性红斑狼疮肾损伤的病理机制展开探讨,提示中药复方通过多成分、多靶点的协同作用,可能为该疾病的治疗提供新的潜在策略。

AMPK/ULK1信号通路是细胞能量代谢的关键调控通路^[21,22]。AMPK作为细胞内的关键能量感受蛋白,能够监测细胞内ATP浓度的波动,并通过磷酸化修饰其下游靶蛋白,进而调控多种代谢途径。ULK1直接参与细胞代谢的调控,激活的ULK1可以磷酸化多个糖代谢相关的酶,如糖酵解过程中的关键酶包括己糖激酶、磷酸果糖激酶1和烯醇化酶1,而在糖异生途径中,发挥重要作用果糖-1,6-二磷酸酶也可被ULK1所影响^[23]。在细胞面临能量应激时,AMPK被活化,并通过磷酸化ULK1的方式,解除mTOR对ULK1活性的抑制作用。HIF-1 α 是细胞在缺氧条件下的关键调控因子,能够调控多种代谢基因的表达,促进细胞从氧化磷酸化向糖酵解代谢重编程^[24]。mTOR的活化可增强HIF-1 α 的转录与翻译过程,进而调控糖酵解相关酶的表达,以维持细胞能量供应。AMPK/ULK1通路通过抑制mTOR活性,间接影响HIF-1 α 的稳定性,进而调节代谢重编程^[25]。综上,AMPK/ULK1信号通路在能量代谢调节中通过调控代谢重编程过程,并与mTOR/HIF-1 α 通路形成交互影响,对维持细胞能量平衡与氧化还原稳态具有关键作用。

文献[8]指出,检测狼疮肾炎患者尿液中的巨噬细胞提示其可能参与肾小管间质损伤的发生;另有研究^[26]显示,在狼疮模型小鼠中,应用趋化因子抗体可下调肾脏组织中巨噬细胞标志物F4/80及其衍生因子的表达水平;在小鼠模型中进行的实验表明,肾脏被具有交替

激活的M2样的巨噬细胞浸润^[27];这些已被其他模型研究所证实的发现说明,巨噬细胞在SLE肾损害发病机制中发挥重要的作用^[28]。当线粒体ATP的产生被抑制,并通过改变细胞AMP/ATP比率,间接激活了AMPK/ULK1能量信号通路,促进巨噬细胞从M1型向M2型的转变,从而参与SLE肾脏损伤的发病机制^[29]。在本研究结果中,SLE肾损害患者体内M1型巨噬细胞标志蛋白iNOS升高,M2型巨噬细胞标志蛋白Arg-1呈降低趋势,反映出SLE肾损害中存在巨噬细胞向M1方向过度极化的现象。

临床研究结果表明,SLE患者体内AMPK mRNA、ULK1 mRNA表达量降低,HIF-1 α mRNA、mTOR mRNA表达升高,表明疾病状态下AMPK/ULK1通路处于抑制状态。经芪黄健脾滋肾颗粒干预后发现,QJZG能够上调AMPK/ULK1通路关键基因的表达量,降低下游HIF-1 α 与mTOR靶基因表达,上调M2型巨噬细胞Arg-1蛋白水平,下调M1型巨噬细胞iNOS蛋白表达水平。以上结果证实,QJZG减轻SLE肾损害的作用机制,与其激活AMPK/ULK1通路、进而纠正巨噬细胞M1/M2极化失衡密切相关。

本研究评价SLE患者免疫功能选取淋巴细胞CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁺/CD8⁺水平。T细胞介导的免疫功能紊乱是SLE发病的关键环节^[30]。CD4⁺T细胞作为反映机体免疫状态的重要指标,能够介导体液及细胞免疫反应;而CD8⁺T细胞则主要发挥免疫抑制作用。CD4⁺/CD8⁺T细胞比值的变化可直接反映SLE患者的免疫平衡状态。M1型巨噬细胞活化后大量产生IL-6、IL-12及IL-23等促炎因子。其中,IL-12可驱动初始CD4⁺T细胞向Th1方向分化,而IL-23则是维持与扩增Th17细胞群的关键因子。同时,IL-12也能激活CD8⁺T细胞,使其分化为细胞毒性T淋巴细胞并分泌IFN- γ 。由此增强的Th1、Th17反应以及活化的CD8⁺T细胞,共同分泌大量的IFN- γ 和IL-17等效应因子。这些细胞因子反过来又强烈驱动巨噬细胞向M1表型极化,从而形成一个由固有免疫与适应性免疫细胞共同参与、自我维持并不断放大的炎症正反馈环路,最终导致组织损伤持续加剧与疾病进展^[31,32]。经治疗后CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺显著升高,提示芪黄健脾滋肾颗粒有助于调节SLE患者免疫功能,这也与课题组前期研究结果相一致^[4,33]。

综上,本研究借助网络药理学方法,探讨了QJZG干预SLE的潜在活性成分、作用靶点及相关机制;并通过分子对接技术验证了核心活性物质与关键靶标模块之间的结合能力,结果显示槲皮素、山奈酚及7-O-甲基异微凸剑叶莎醇等成分具有较好的结合亲和力,可能构成其药效作用的重要物质基础。临床实验进一步证实,QJZG可通过调控AMPK/ULK1信号通路,抑制巨噬细

胞向 M1 表型极化,调节机体免疫状态,从而缓解 SLE 患者的肾脏损伤。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Durcan L, O'Dwyer T, Petri M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults[J]. *Lancet*, 2019, 393(10188): 2332-43.
- [2] Gasparotto M, Gatto M, Binda V, et al. Lupus nephritis: clinical presentations and outcomes in the 21st century[J]. *Rheumatology*, 2020, 59(Suppl5): v39-51.
- [3] Caster DJ, Powell DW. Utilization of biomarkers in lupus nephritis[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2019, 26(5): 351-9.
- [4] 李明,尚双双,李云飞,等. 芪黄健脾滋肾颗粒治疗脾肾亏虚型系统性红斑狼疮的临床疗效观察[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(2): 370-3.
- [5] 钱爱,程园园,朱雅文,等. 芪黄健脾滋肾颗粒治疗系统性红斑狼疮的疗效观察[J]. *安徽中医药大学学报*, 2023, 42(6): 7-12.
- [6] 李云飞,庞利君,束龙武,等. 芪黄健脾滋肾方在脾肾两虚型系统性红斑狼疮患者达标治疗中的临床疗效观察[J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(11): 62-6.
- [7] Cheng Q, Mou LJ, Su WJ, et al. Ferroptosis of CD163⁺ tissue-infiltrating macrophages and CD10⁺ PC(+) epithelial cells in lupus nephritis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1171318.
- [8] Cheng Y, Liu L, Ye Y, et al. Roles of macrophages in lupus nephritis. *Front Pharmacol*. 2024 Nov 14;15:1477708.
- [9] Hung CM, Lombardo PS, Malik N, et al. AMPK/ULK1-mediated phosphorylation of Parkin ACT domain mediates an early step in mitophagy[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(15): eabg4544.
- [10] Hu YQ, Chen H, Zhang LY, et al. The AMPK-MFN2 axis regulates MAM dynamics and autophagy induced by energy stresses[J]. *Autophagy*, 2021, 17(5): 1142-56.
- [11] Aringer M, Costenbader KH, Dörner T, et al. Response to: "2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus" by Aringer et al by Cui et al[J]. *Ann Rheum Dis*, 2022, 81(9): e166.
- [12] 路志正. 实用中医风湿病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 490-497.
- [13] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 20.
- [14] 姜泉. 实用中医风湿免疫病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2022.
- [15] Ding T, Yi TT, Li Y, et al. Luteolin attenuates lupus nephritis by regulating macrophage oxidative stress via HIF-1 α pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 953: 175823.
- [16] Bai ZR, Lu ZM, Liu R, et al. Igaratimod restrains circulating follicular helper T cell function by inhibiting glucose metabolism via Hif1 α -HK2 axis in rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 757616.
- [17] 褚福瑞. 芪黄健脾滋肾颗粒体内外物质基础及对系统性红斑狼疮的网络药理学研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [18] Chen HY, Chiang YF, Hong YH, et al. Quercetin ameliorates renal injury and pyroptosis in lupus nephritis through inhibiting IL-33/ST2 pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(11): 2238.
- [19] Song ZY, Ji LN, Wu S, et al. Molecular mechanism of QH-BJ drug pair in the treatment of systemic lupus erythematosus based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Medicine*, 2022, 101(48): e32062.
- [20] Guo MF, Dai YJ, Gao JR, et al. Uncovering the mechanism of *Astragalus membranaceus* in the treatment of diabetic nephropathy based on network pharmacology[J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 5947304.
- [21] O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(9): 553-65.
- [22] Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, et al. Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1084.
- [23] Ma ZW, Li L, Livingston MJ, et al. p53/microRNA-214/ULK1 axis impairs renal tubular autophagy in diabetic kidney disease[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(9): 5011-26.
- [24] Ba X, Huang Y, Shen P, et al. WTD attenuating rheumatoid arthritis via suppressing angiogenesis and modulating the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 696802.
- [25] Wang SY, Liu RC, Yu Q, et al. Metabolic reprogramming of macrophages during infections and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2019, 452: 14-22.
- [26] Liang CL, Wei YY, Chen Y, et al. Zhen-Wu-Tang ameliorates lupus nephritis by diminishing renal tissue-resident memory CD8⁺ T cells via suppressing IL-15/STAT3 pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116597.
- [27] Escalona E, Olate-Briones A, Alborno-Muñoz S, et al. Neu1 deficiency and fibrotic lymph node microenvironment lead to imbalance in M1/M2 macrophage polarization[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1462853.
- [28] Yuan YX, Hu RC, Park J, et al. Macrophage-derived chemokine CCL22 establishes local LN-mediated adaptive thermogenesis and energy expenditure[J]. *Sci Adv*, 2024, 10(26): eadn5229.
- [29] Cai WW, Cheng JW, Zong SY, et al. The glycolysis inhibitor 2-deoxyglucose ameliorates adjuvant-induced arthritis by regulating macrophage polarization in an AMPK-dependent manner[J]. *Mol Immunol*, 2021, 140: 186-95.
- [30] Yuan SW, Zeng YT, Li JW, et al. Phenotypical changes and clinical significance of CD4⁺/CD8⁺ T cells in SLE[J]. *Lupus Sci Med*, 2022, 9(1): e000660.
- [31] Geng R, Shang HJ, Chen ZQ, et al. ROS-responsive resiquimod prodrug nanoparticles for macrophage reprogramming and enhanced immune checkpoint inhibitor therapy in bladder cancer[J]. *Biomaterials*, 2026, 326: 123677.
- [32] Bai LX, Feng CJ, Xu X, et al. Investigation of the immunomodulatory effects and molecular mechanisms of cichoric acid on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2026, 168(Pt 1): 115865.
- [33] 钱爱. 基于 AMPK/ULK1 信号通路调控巨噬细胞 M1/M2 极化途径探讨芪黄健脾滋肾颗粒对 SLE 肾损害的干预机制[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2025.

(编辑:经媛)