

大黄素治疗糖尿病肾病的网络药理学

尹丹丹¹, 彦名南², 韩净净³, 张伟⁴, 崔学雷⁵, 刘亚平⁶, 石书龙⁶, 季宗文⁶

(1. 济宁医学院临床医学院(附属医院), 山东 济宁 272067; 2. 山东第一医科大学附属济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011;

3. 济宁市第一人民医院血液内科, 山东 济宁 272011; 4. 济宁市第一人民医院消化内科, 山东 济宁 272011;

5. 高青县高城中心卫生院中医科, 山东 高青 256301; 6. 济宁市第一人民医院内分泌科, 山东 济宁 272011)

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接技术及体外细胞实验探究大黄素治疗糖尿病肾病的作用机制。 **方法** 利用公共数据库获取大黄素和糖尿病肾病的交集靶点, 建立蛋白-蛋白互作网络, 对所得靶点进行基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 功能富集分析, 对大黄素与核心治疗靶点进行分子对接及分子动力学模拟。将小鼠肾足细胞 (mouse podocyte clone-5, MPC-5) 分为对照组、高糖组和大黄素干预组, 大黄素干预组分别给予 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的大黄素干预 24 h, 检测细胞活力、铁离子、相关基因表达水平。进行非靶向代谢组学分析, 筛选差异代谢物。 **结果** 获得 80 个大黄素治疗糖尿病肾病的潜在作用靶点, 其中核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) 是关键治疗靶点。GO 分析获得 190 条生物过程、80 条细胞组成、100 条分子功能。KEGG 富集分析得到铁死亡、脂质与动脉粥样硬化、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 等信号通路。大黄素与 NRF2 之间存在强而稳定的相互作用, 结合构象稳定。大黄素可显著改善高糖诱导的细胞损伤; 10 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素干预后, 细胞内铁离子水平、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、IL-17 的表达降低, 铁死亡核心标志物谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、NRF2 及其下游相关基因的 mRNA 表达升高 ($P < 0.001$)。代谢组学分析显示, 大黄素干预后共鉴定出 29 种差异代谢物, 其中 10 种上调、19 种下调。 **结论** 大黄素通过关键靶点 NRF2 协同调控铁死亡、IL-17 等多条信号通路, 发挥抗铁死亡、抗炎及代谢调节作用, 从而实现对糖尿病肾病的肾脏保护作用。

关键词: 大黄素; 核因子 E2 相关因子 2; 铁死亡信号通路; 糖尿病肾病; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

Network pharmacology of emodin in the treatment of diabetic kidney disease

YIN Dandan¹, YAN Mingnan², HAN Jingjing³, ZHANG Wei⁴, CUI Xuelei⁵,

LIU Yaping⁶, SHI Shulong⁶, JI Zongwen⁶

(1. Jining Medical University Clinical Medical College (Affiliated Hospital), Jining 272067, Shandong, China;

2. Jining NO.1 People's Hospital Affiliated to Shandong NO.1 Medical University, Jining 272011, Shandong, China;

3. Department of Hematology, Jining NO.1 People's Hospital, Jining 272011, Shandong, China;

4. Department of Gastroenterology, Jining NO.1 People's Hospital, Jining 272011, Shandong, China;

5. Department of Traditional Chinese Medicine, Gaocheng Central Health Center, Gaoqing 256301, Shandong, China;

6. Department of Endocrinology, Jining NO.1 People's Hospital, Jining 272011, Shandong, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of emodin in treating diabetic kidney disease (DKD) based on network pharmacology, molecular docking technology, and *in vitro* cell experiments. **Methods** The intersection targets of emodin and DKD were retrieved from public databases. A protein-protein interaction network was established, and gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) functional enrichment analyses were conducted on the obtained targets. Molecular docking and molecular dynamics simulation of emodin and core therapeutic

targets were carried out. Mouse podocyte clone-5 (MPC-5) cells were divided into a control group, a high-glucose group, and emodin intervention groups. The intervention groups were treated with 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$ emodin for 24 hours respectively. Untargeted metabolomics analysis was performed to screen differential metabolites. **Results** Eighty potential therapeutic targets of emodin for DKD were obtained, with nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) being the key therapeutic target. GO analysis identified 190 biological processes, 80 cellular components, and 100 molecular functions. KEGG enrichment analysis revealed signaling pathways, including ferroptosis, lipid and atherosclerosis, and interleukin-17 (IL-17). There was a strong interaction between emodin and NRF2, and the binding conformation was stable. Emodin could significantly alleviate cell damage induced by high glucose. After intervention with 10 $\mu\text{mol/L}$ emodin, the iron levels in cells, the expression of tumor necrosis factor (TNF) and IL-17 were significantly reduced, while the expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4), NRF2, and its downstream related genes was significantly increased ($P<0.001$). Metabonomics analysis showed that a total of 29 differential metabolites were identified after emodin intervention, with 10 up-regulated and 19 down-regulated. **Conclusion** Emodin exerts anti-ferroptosis, anti-inflammation and metabolic regulation effects by mediating multiple signaling pathways such as ferroptosis and IL-17 through the key target NRF2, thereby achieve a renoprotective effect on DKD.

Key word: Emodin; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Ferroptosis signaling pathway; Diabetic kidney disease; Network pharmacology

糖尿病肾病是由糖尿病引发的肾脏功能障碍及结构损伤,是糖尿病患者最常见且最严重的微血管并发症之一。其主要临床特征为肾小球滤过率持续下降及进展性蛋白尿^[1],也是终末期肾病的主要危险因素。自 2011 年以来,糖尿病肾病已超过肾小球肾炎,成为导致我国城市居民住院患者慢性肾脏病的首位病因^[2]。糖尿病肾病的发病机制复杂,涉及基因、遗传与环境因素的交互作用。在中医理论中,糖尿病肾病被归类为消渴病继发的“水肿”“尿浊”和“关格”等范畴^[3],其病理特征表现为“本虚标实”。如果不采取有效的干预措施,大多数患者最终会进展为终末期肾病,严重影响生活质量^[4]。目前临床治疗手段有限,主要包括强化降糖、降压、降脂和体质量控制,以及使用 SGLT2 抑制剂、非甾体选择性盐皮质激素受体拮抗剂等新型药物。然而,部分患者在积极治疗后仍出现病情进展,适合我国人群的个性化管理策略仍在探索阶段^[5-6]。

大黄素是从掌叶大黄、唐古特大黄或药用大黄根茎中提取的主要活性成分,属于羟基蒽醌类化合物。在《神农本草经》中,大黄素被记载具有“泻下攻积、清热泻火、活血化瘀”的功效。现代研究表明,大黄素具有抗菌、抗炎、抗纤维化、免疫抑制和抗癌等多种生物活性^[7],能够调节糖脂代谢,改善胰岛素抵抗^[8],抑制系膜细胞增殖^[9],延缓肾纤维化^[10],以及改善氧化应激,从而减轻肾损伤。此外,大黄素还能显著改善糖尿病模型动物的肾功能指标,通过减轻肾小球高滤过、抑制肾脏肥大和减少蛋白尿排出^[11]发挥其治疗作用。然而,大黄素的具体

治疗机制尚不明确。本研究通过整合网络药理学、分子对接、分子动力学模拟和实验验证等方法,旨在探讨大黄素治疗糖尿病肾病的分子基础,并为开发新型治疗药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

MPC-5 细胞(上海中乔新舟生物科技有限公司,中国)。

1.1.2 主要试剂与仪器

含 10 U/mL 干扰素 γ (interferon-gamma, IFN- γ) 的 RPMI-1640 无菌培养基、1% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 溶液、磷酸盐缓冲盐水 (phosphate-buffered saline, PBS) 溶液、甲醇、乙腈、DMEM 高糖基础培养液、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液均购自美国赛默飞世尔科技;细胞增殖-毒性检测 (cell counting Kit-8, CCK-8) 试剂购自美国 GLPBIO 公司;大黄素购自美国 MCE 公司;实时荧光定量 PCR 分析仪购自上海罗氏诊断产品有限公司,PCR 扩增仪购自美国伯乐公司;铁离子与亚铁离子检测试剂盒购自中国上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大黄素靶点的鉴定与筛选

运用 PubChem (<https://pubchem.ncbi>) 平台,以“Emodin”为检索词,下载大黄素的二维结构和 SMILES 序列。随后,利用 PharmMapper 平台

(http://www.lilab-ecust.cn/pha_rmMapper/)的反向药效团匹配方法,上传 SDF 格式的二维结构文件,筛选“Norm Fit”>0.5 的人类基因。在数据库 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中,通过配体二维和三维结构相似性的方法预测大黄素靶点,纳入全部概率>0 的靶点。最后,将每个数据库筛选的靶点合并,去除重复值,在 UniProt (<https://www.uniprot.org/>)中将蛋白靶名转换为基因名进行标准化校正。

1.2.2 糖尿病肾病靶点的鉴定与筛选

采用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>),以“diabeticnephropathy”“diabetic kidney disease”为检索词,收集糖尿病肾病相关靶点。利用基因表达综合 (gene expression omnibus, GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),以“diabetic kidney disease”为检索词,经筛选获得 GSE30122 和 GSE96084 两个数据集。GSE30122 数据集基于 GPL571 平台,包括 50 例糖尿病肾病患者和 19 例对照样本。GSE96084 数据集基于 GPL17586 平台,包括 20 例正常肾小管组织和 41 例糖尿病肾病肾小管组织。采用 R 4.5.1 对两个数据集的基因表达矩阵进行合并处理,以消除批次效应。以 $P_{adj}<0.05$ 和 $|\log_2(\text{fold change})|>1$ 为筛选标准,利用 LimMa 包分析正常组与糖尿病肾病组的差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG),绘制火山图和热图。随后,采用加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 对两个数据集进行分析,识别高度协同表达的基因,基于动态剪切和层次聚类将具有相似表达模式的基因分组为模块。计算各模块的特征值 (module eigengene, ME) 与样本表型的相关系数和 P 值,选择 $P<0.05$ 且相关系数最大的模块作为枢纽模块。将该模块基因与差异表达基因筛选所得的靶点取交集,与 GeneCards 数据库获取的靶点合并,作为后续分析的糖尿病肾病潜在靶点集。

1.2.3 蛋白相互作用网络构建

将大黄素和糖尿病肾病的潜在靶点取交集,视作大黄素治疗糖尿病肾病的潜在治疗靶点。通过 DisGeNET 数据库 (<https://disgenet.com>) 查询治疗靶点的基因属性,可视化处理以表现不同基因属性的占比情况。将治疗靶点输入 STRING 数据平台 (<https://string-db.org>) “Multiple proteins”模块,选择置信度 ≥ 0.4 ,设置隐藏游离节点,构建蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。使用 Cytoscape 3.9.1 中的 CytoNCA 工具来分析网络中心性、度中心性、接近中心性等参数^[12],筛选所有

参数均高于中位值的节点,确定为大黄素治疗糖尿病肾病的关键治疗靶点。对靶点的度值进行排序,利用 R 4.5.1 绘制条形图进行可视化处理。

1.2.4 基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析

采用 R 4.5.1 中的 clusterProfiler 软件包对治疗靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析涵盖生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 三大类别,分别选取各类别中富集最显著的前 10 个条目;KEGG 分析依据治疗靶点在通路中的富集占比进行排序,筛选出前 10 条主要通路。以 $P_{adj}<0.05$ 作为筛选标准,绘制气泡图对富集分析结果进行可视化展示。

1.2.5 分子对接

通过 PubChem 数据库下载大黄素的 3D 结构作为配体分子,利用蛋白质数据库 (protein data bank, PDB) 获取核心治疗靶点的晶体结构作为受体分子。通过 PyMOL 2.3.0 软件对这些蛋白质结构进行预处理,包括从晶体中去除水和原始配体,为后续分子对接分析做准备。将处理后的蛋白质结构导入 AutoDockTools1.5.7 中,进行加氢、电荷计算、电荷赋值和原子类型赋值。对于大黄素也进行相同的处理,并设置可旋转键以优化小分子的构象灵活性。随后,利用 AutoDockvina 1.1.2 软件进行小分子配体和蛋白质受体的分子对接,以预测大黄素对这些蛋白质的结合模式和亲和力,计算结合能^[13]。

1.2.6 分子动力学模拟

为了验证对接结果,对结合能得分最高的复合物进行了经典分子动力学模拟^[14]。对分子对接结果中结合能最强的构象应用 amber18 软件包,采用以下参数:蛋白使用蛋白质的琥珀 14 版力场,小分子配体采用广义琥珀力场,其 Austin Model 1 键电荷校正原子电荷通过 ANTECHAMBER 模块计算。复合物经 tleap 模块处理,添加氢原子与抗衡离子以中和电荷,选用可转移分子间势能 3 点模型水模型并设置周期性边界条件^[15]。

1.2.7 细胞实验验证

1.2.7.1 细胞培养与模型建立

MPC-5 细胞在 33 ℃、5% CO₂ 条件下,以含 10 U/mL 干扰素 γ 的 RPMI-1640 培养液培养,维持未分化状态。诱导分化时,移除干扰素 γ ,将培养温度调整至 37 ℃,培养 2 周。实验前,细胞置于含 1% FBS 的无糖培养液中同步化 24 h。将细胞分为对照组 (正常糖浓度,11.1 mmol/L 葡萄糖)、高糖组

(33.3 mmol/L 葡萄糖) 和大黄素干预组 (高糖基础上分别加入 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素), 处理 24 h。

1.2.7.2 细胞活力检测与毒性分析

将 MPC-5 足细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板, 无血清同步 24 h 后, 更换含 33.3 mmol/L D-葡萄糖的 RPMI-1640, 同时加入 0、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素 (0.1% DMSO), 每组 6 复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h。每孔加 10 μL CCK-8 试剂, 3.5 h 后采用酶标仪检测 450 nm 吸光度值, 计算细胞活力。利用双相四参数 logistic 拟合得上升段半数有效浓度 (effective concentration, EC_{50})、下降段半数抑制浓度 (inhibitory concentration 50, IC_{50}) 数值, 明确其安全浓度范围。

1.2.7.3 铁离子水平的检测

细胞分组处理后, PBS 洗涤 1 次并吸净残留液体, 使用胰酶进行细胞消化。用 BeyoLysisTM Buffer H 裂解, 匀浆后冰浴 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清用于后续检测。加入 1 mol/L 盐酸置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清用于铁离子含量的检测。配制标准溶液, 加入待测样品后混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 根据标准曲线计算铁离子浓度。

1.2.7.4 采用 qRT-PCR 法检测各基因的 mRNA 表达水平

采用 Trizol 法提取各组细胞总 RNA, 取 1 μg 总 RNA, 加入 1 μL 随机六聚体引物后加入焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 处理水补足至 12 μL 。在混合液中依次加入: 4 μL 反应缓冲液 (5 倍浓缩液), 1 μL 核糖核酸酶抑制剂, 2 μL 脱氧核糖核苷三磷酸混合液, 1 μL BeyoRTTM II M-MLV 反转录酶, 轻柔吹打混匀。25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。qRT-PCR 法检测核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 及白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 的 mRNA 表达水平。反应体系: SYBR 预混液 (2 $\times$) 12.5 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , 模板 2.0 μL , H_2O 9.5 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。以上实验均独立重复 3 次, 每次设置 6 个复孔作为技术重复。

1.2.8 非靶向代谢组学分析

将 MPC-5 细胞分为对照组 (11.1 mmol/L 葡萄

糖)、高糖组 (33.3 mmol/L 葡萄糖) 和大黄素干预组 (高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素)。培养 48 h 后弃培养液, 预冷 PBS 洗涤 3 次, -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 使用 80% 甲醇水溶液快速淬灭代谢活性^[16]。加入内标 (L-2-氯苯丙氨酸, 10 μL , 0.3 mg/mL), 涡旋 30 s 后超声冰浴提取 10 min (40 kHz, 300 W); -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 取上清液真空干燥, 复溶 100 μL 50% 甲醇水溶液中^[17], 使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 转移至进样瓶, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测^[18]。

后续采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱进行正、负离子模式检测, 原始数据经 ProteoWizard 转 mzXML 格式, 使用 XCMS 程序包完成峰提取、对齐与归一化, 最终进行主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析及通路富集分析^[19]。

1.3 统计学处理

1.3.1 细胞实验

采用 GraphPad Prism 10.0 统计学软件, 所有数据经 Shapiro-Wilk 检验均符合正态分布, 经 Brown-Forsythe 检验均满足方差齐性, 所得数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 继以 Tukey's 多重比较检验进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

1.3.2 非靶向代谢组学分析

每组设 6 个生物学重复, 样本来源于独立个体, 不进行技术重复。样本按随机顺序进样, 每 8 个实验样本插入 1 个质控样本, 以检测系统稳定性。采用无监督的主成分分析初步观察组间分离趋势, 再建立有监督正交偏最小二乘法-判别分析模型筛选大黄素相关差异代谢物^[20]。模型通过 7 轮交叉验证和 2 000 次置换检验评估可靠性, 并以多重相关系数和交叉验证决定系数作为拟合优度与预测能力的评估指标^[21]。基于模型中的变量投影重要性评分, 将评分值 >1 且 $P<0.05$ 的代谢物定义为差异代谢物, 映射到 KEGG 数据库。采用 Fisher 精确检验评估各通路中代谢物富集的显著性, 较低的 P 值表明代谢通路具有较高的统计学意义。

2 结 果

2.1 大黄素的作用靶点

通过 PubChem 数据库获取大黄素的二维结构 (图 1A), 系统检索 PharmMapper 和 Swiss Target Prediction 数据库, 共获得 126 个大黄素的作用靶点, 采用 Cytoscape 3.9.1 建立大黄素-靶点网络图 (图 1B)。

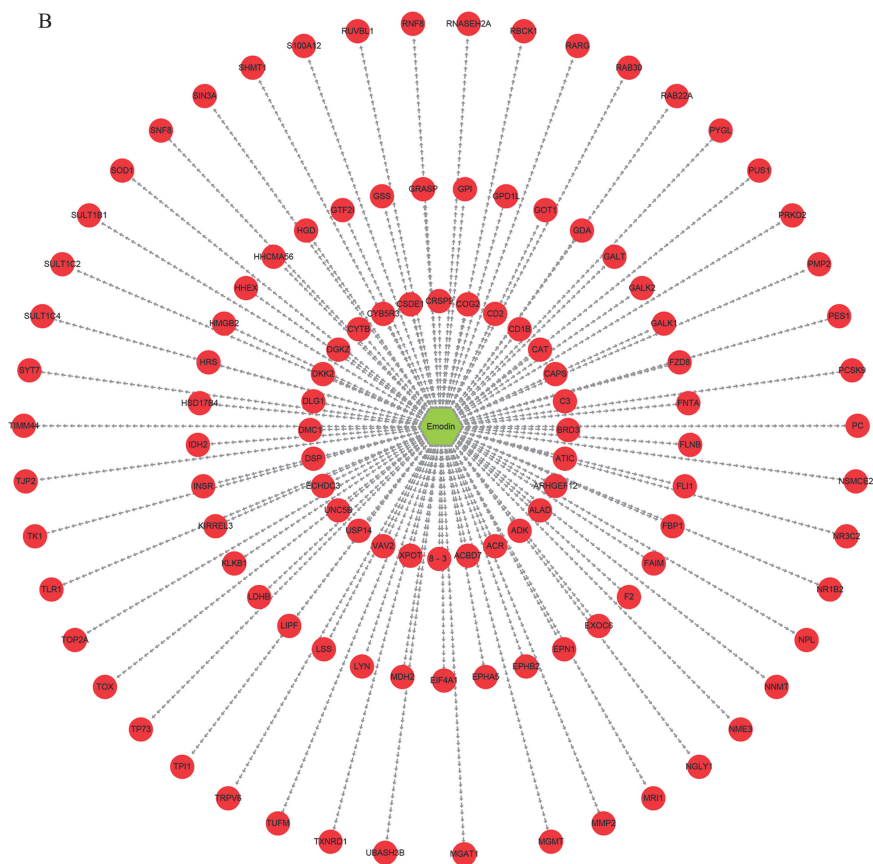


图 1 大黄素二维结构和靶点可视化

A: 大黄素化学结构式; B: 大黄素-靶点网络图

Figure 1 Visualization of the two-dimensional structure and targets of emodin

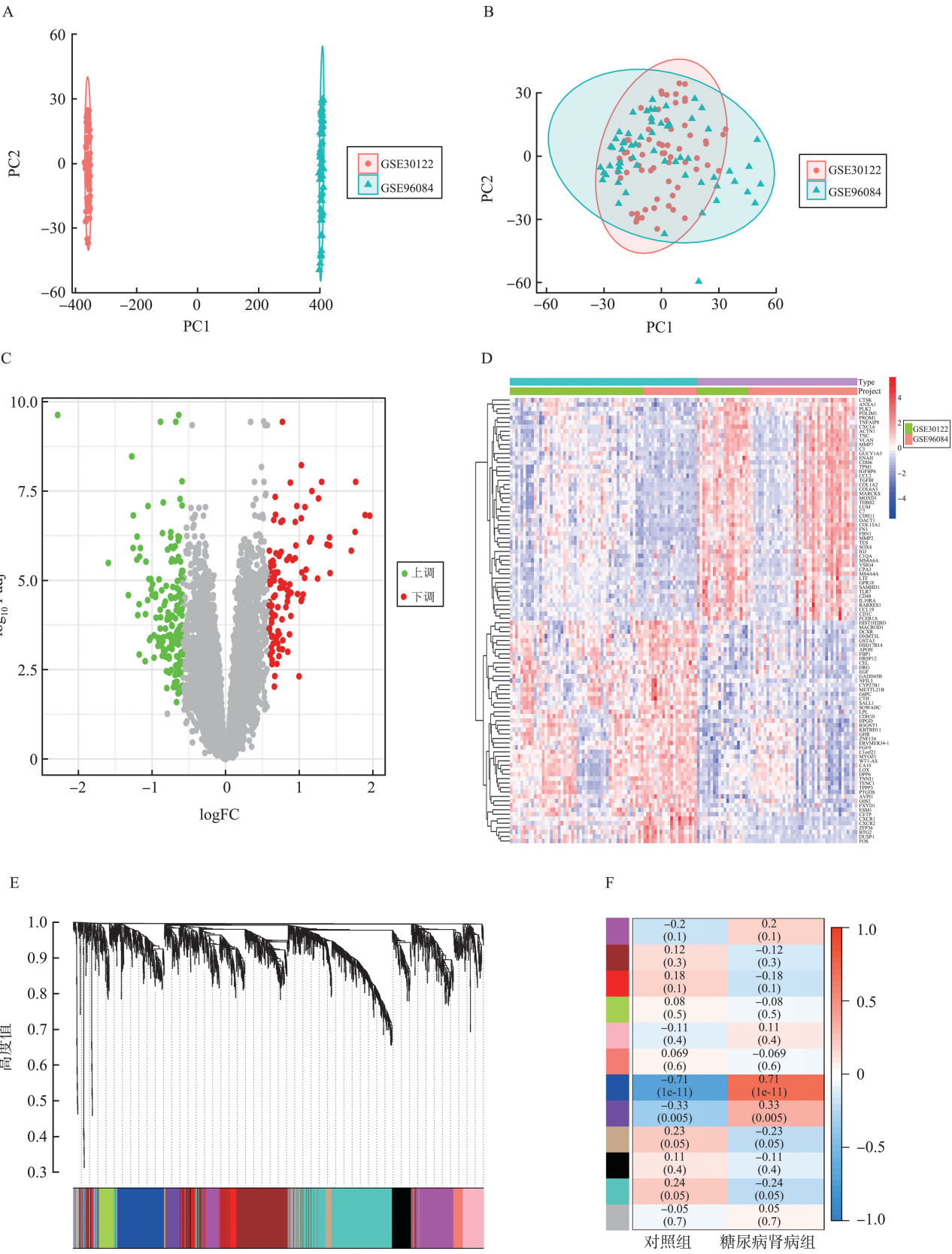
A: Chemical structure of emodin; B: Diagram of the emodin-target network.

2.2 糖尿病肾病的作用靶点

通过 GeneCards 数据库获得 1 184 个糖尿病肾病的靶点。GSE30122 和 GSE96084 两个数据集校正后的对照样本和糖尿病肾病样本之间存在明显的分离(图 2A、B), 筛选后得到具有显著性差异表达基因 274 个(图 2C), 红色表示基因表达上调, 绿色表示基因表达下调; 根据 *P* 值选取前 50 个上调基因和前 50 个下调基因绘制热图(图 2D)。WGCNA 网络(图 2E、F)得到 12 个模块, 绘制模块-特征关系的热图(图 2G), 蓝色模块与糖尿病肾病的相关性最强, 可以认为蓝色模块包含的 247 个基因和糖尿病肾病密切相关(图 2H)。将 GEO 数据库得到的 274 个差异表达基因和 WGCNA 得到的 247 个基因取交集, 得到 94 个糖尿病肾病的潜在靶点。将其与 GeneCards 数据库中检索到的 1 184 个基因进行合并, 去重, 最终确定 1 272 个糖尿病肾病的作用靶点。

2.3 大黄素治疗糖尿病肾病的 PPI 网络

将糖尿病肾病和大黄素的靶点取交集,得到 80 个共同靶点作为大黄素治疗糖尿病肾病的潜在治疗靶点(图 2I)。这些治疗靶点属于酶、酶调节剂、激酶、核受体等 8 个类别,其中激酶占 25.6%,酶 21.75%,表明大黄素在治疗糖尿病肾病中具有多层调控特性(图 3A)。通过 STRING 平台、Cytoscape 3.9.1 建立治疗靶点的 PPI 网络图(图 3B、C)。对所有治疗靶点的度值进行排序(图 3D),其中高度连接的靶点包括 NRF2、AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKTserine/threonine kinase 1, AKT1)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)、间质-上皮细胞转化因子(mesenchymal-epithelial transition factor, MET)、类固醇受体辅激活因子(steroid receptor coactivator, SRC)。这些靶点位于 PPI 网络的核心位置,可视作大黄素治疗糖尿病肾病的核心治疗靶点。



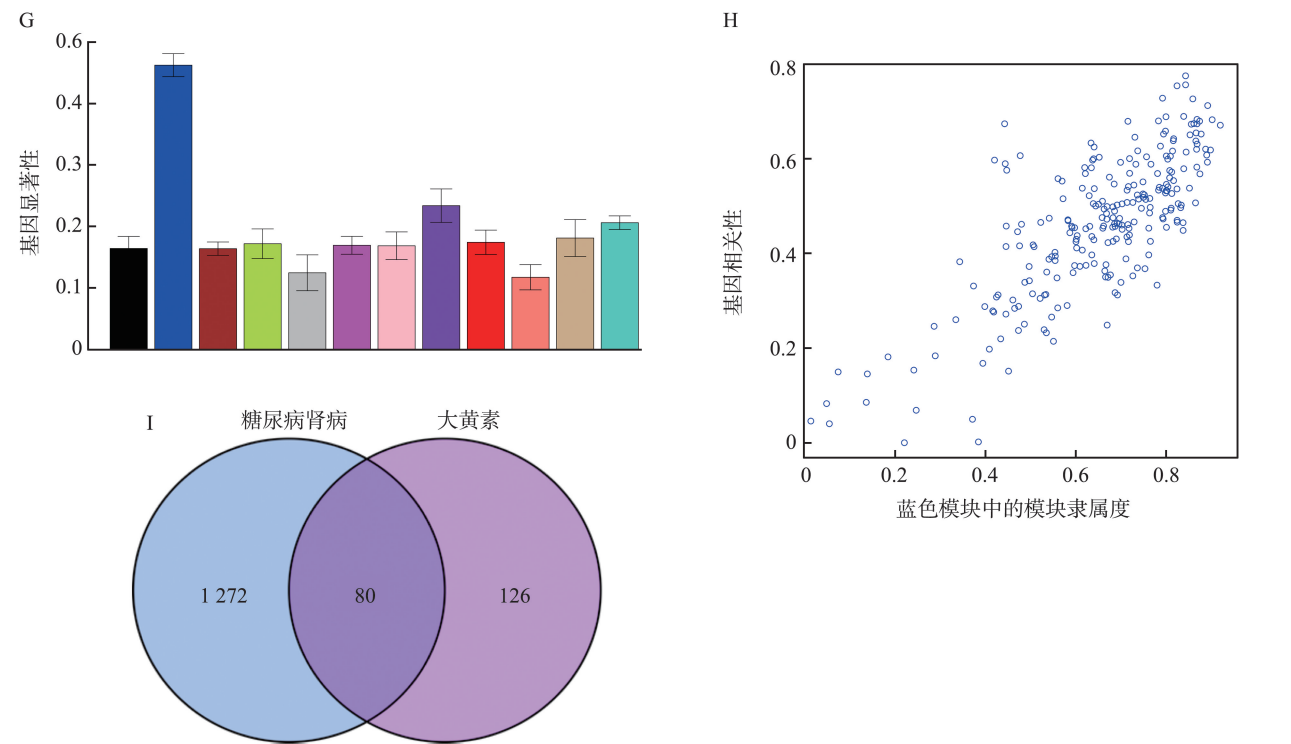
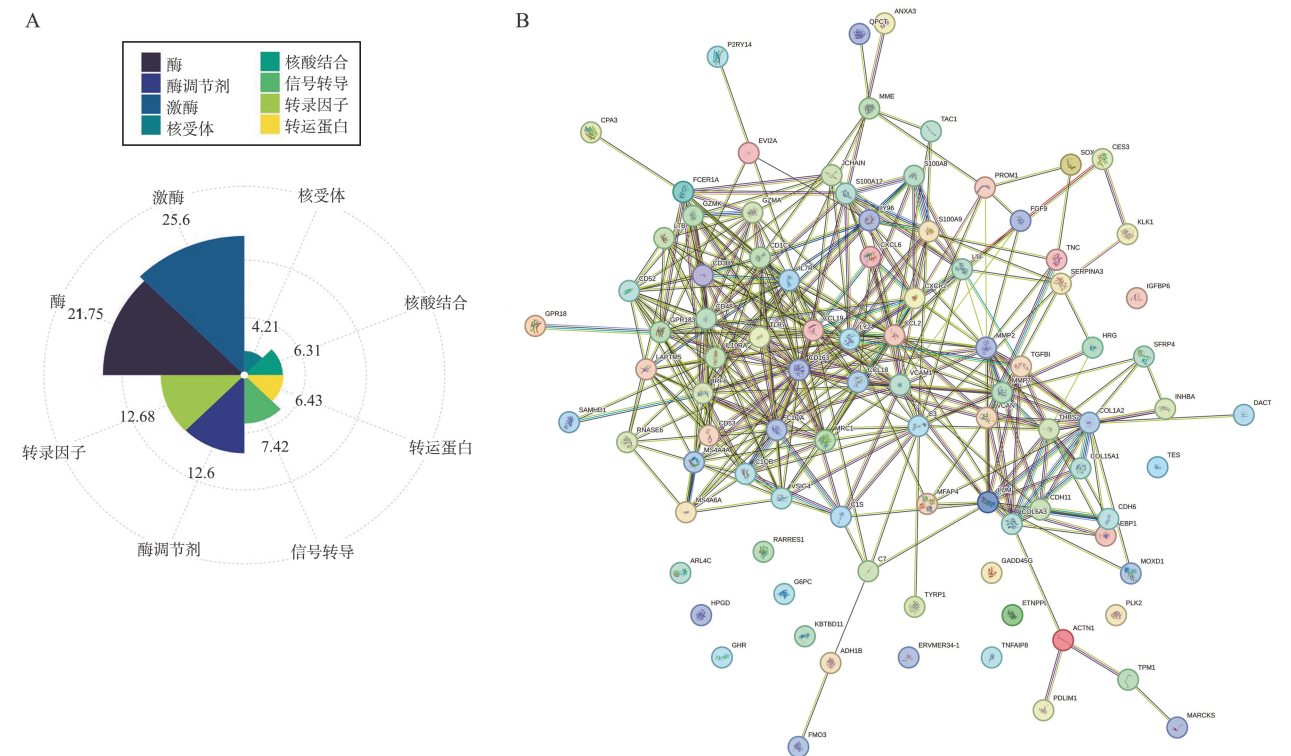


图 2 大黄素和糖尿病肾病的交集靶点
A:批次校正前的 PCA 图; B:批次校正后的 PCA 图; C:差异表达基因火山图; D:前 50 个差异表达基因热图; E:基因聚类树状图; F:模块-临床特征的关系; G:各模块基因显著性柱状图; H:枢纽模块基因与糖尿病肾病的相关性分析; I:大黄素与糖尿病肾病的交集靶点韦恩图。

Figure 2 Intersection targets of emodin and DKD
A: PCA plot before batch correction; B: PCA plot after batch correction; C: Volcano plot for DEGs; D: Heatmap for top 50 DEGs; E: Clustering dendrogram of genes; F: The relationship between the module and clinical traits; G: Bar graph of gene significance for each module; H: Correlation analysis between hub module genes and DKD; I: Venn diagram of intersection targets of emodin and DKD.



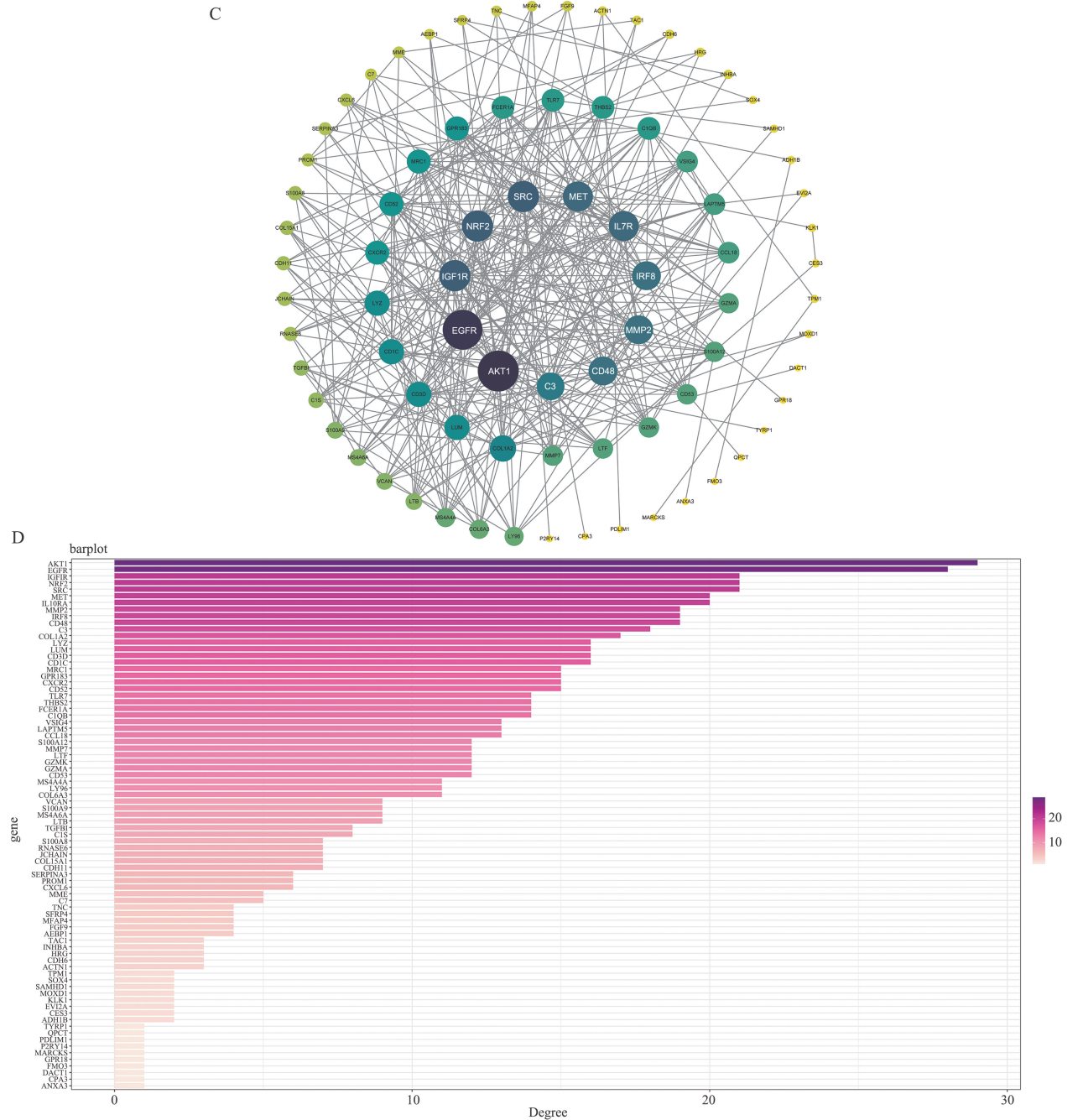


图 3 治疗靶点的 PPI 网络分析
A:治疗靶点的基因属性; B、C:治疗靶点的 PPI 网络图; D:度值柱状图。

Figure 3 PPI network analysis of therapeutic targets

A: Genetic properties of therapeutic targets; B,C: PPI network of the therapeutic targets; D: Bar graph of degree values.

2.4 治疗靶点的 GO 和 KEGG 富集分析结果

对 80 个治疗靶点进行 GO 富集分析,共获得 370 个 GO 条目,其中 190 个 BP、80 个 CC 和 100 个 MF。为更直观了解基因功能,以 P 值作为排序参考,为每个分类选择前 10 条目生成气泡图(图 4A)。显著富集的 BP 包括“对肿瘤坏死因子的反应”“对氧化应激的反应”“凋亡信号通路的调节”,揭示大黄素可能通过调控氧化应激、改善肾脏微循环障碍、抑制肾细胞程序性死亡从而治疗糖尿病肾病^[22],

CC 包括“膜筏”“黏着斑”“质膜胞质侧”,大黄素可能通过脂筏介导受体信号、延缓肾脏纤维化及拟制肾小管上皮细胞间质转化从而改善糖尿病肾病。

将治疗靶点映射 KEGG 富集通路中,按 P 值筛选前 10 条通路绘制条形气泡图(图 4B),P 值代表富集的显著性,颜色越深,显著性越高。结果显示,治疗靶点显著富集于“铁死亡”“IL-17 信号通路”“血脂与动脉粥样硬化”“EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药”等通路,其中铁死亡通路是最为显著的富集通路。

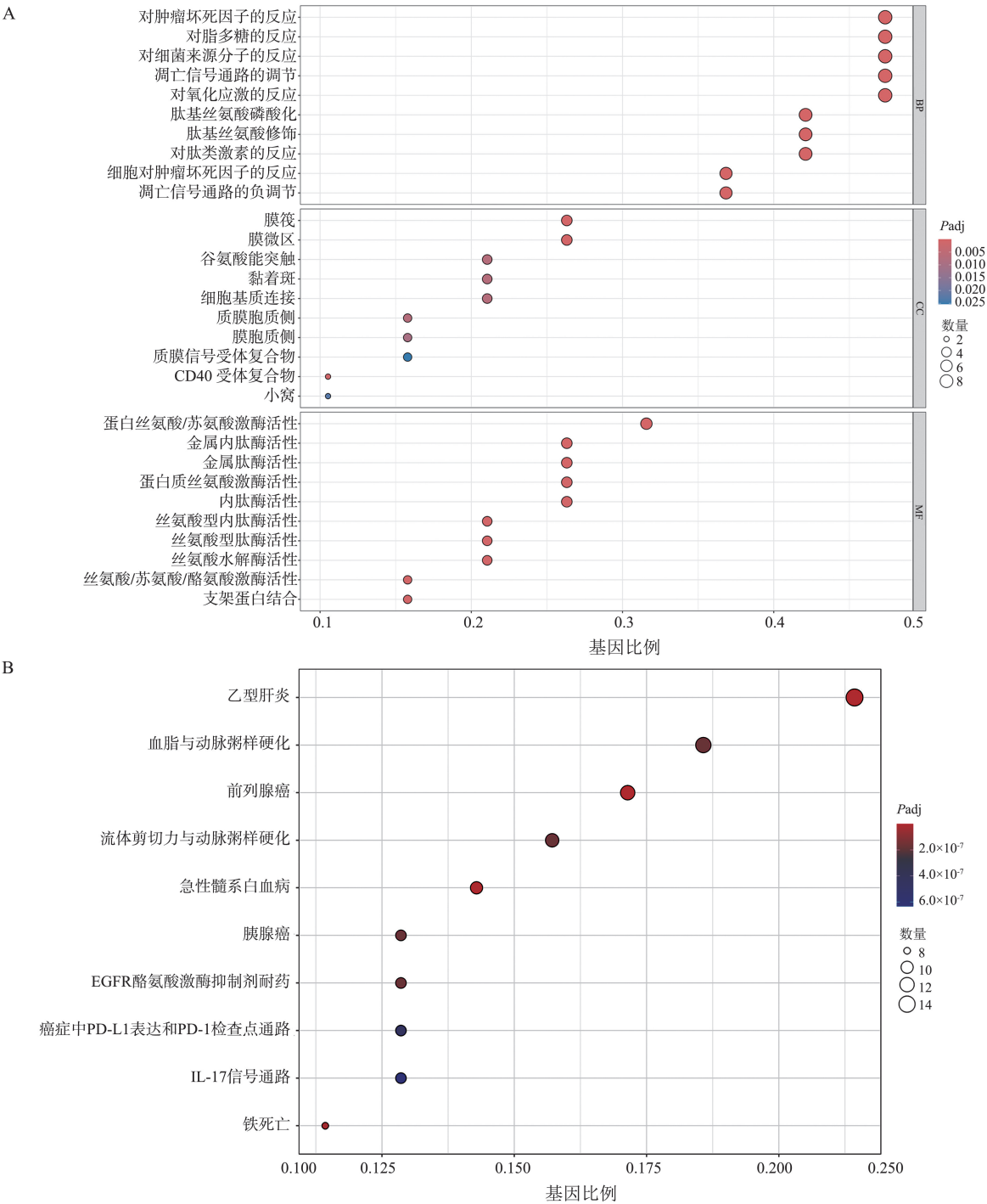


图 4 治疗靶点的富集分析结果
A:GO 分析及其功能注释; B:前 10 条富集的 KEGG 通路。

Figure 4 Results of enrichment analysis of therapeutic targets

A: GO analysis and its functional annotation; B: The top 10 enriched KEGG pathways.

2.5 分子对接

利用分子对接技术分析前六个核心靶点基因和大黄素的结合活性(图 5),计算所得的结合能通常接近或低于-7 kcal/mol,表明两者之间存在较强的结合作用。其中,大黄素与 NRF2 结合能最低,为-8.6 kcal/mol,表明大黄素与核心靶点之间

有很强的结合活性,其与 NRF2 蛋白表面的深空腔紧密结合,表现出良好的结构互补性和理想的结合模式(图 5D)。结合口袋主要由疏水性氨基酸残基构成,这些残基与配体形成相互作用的稳定复合物。

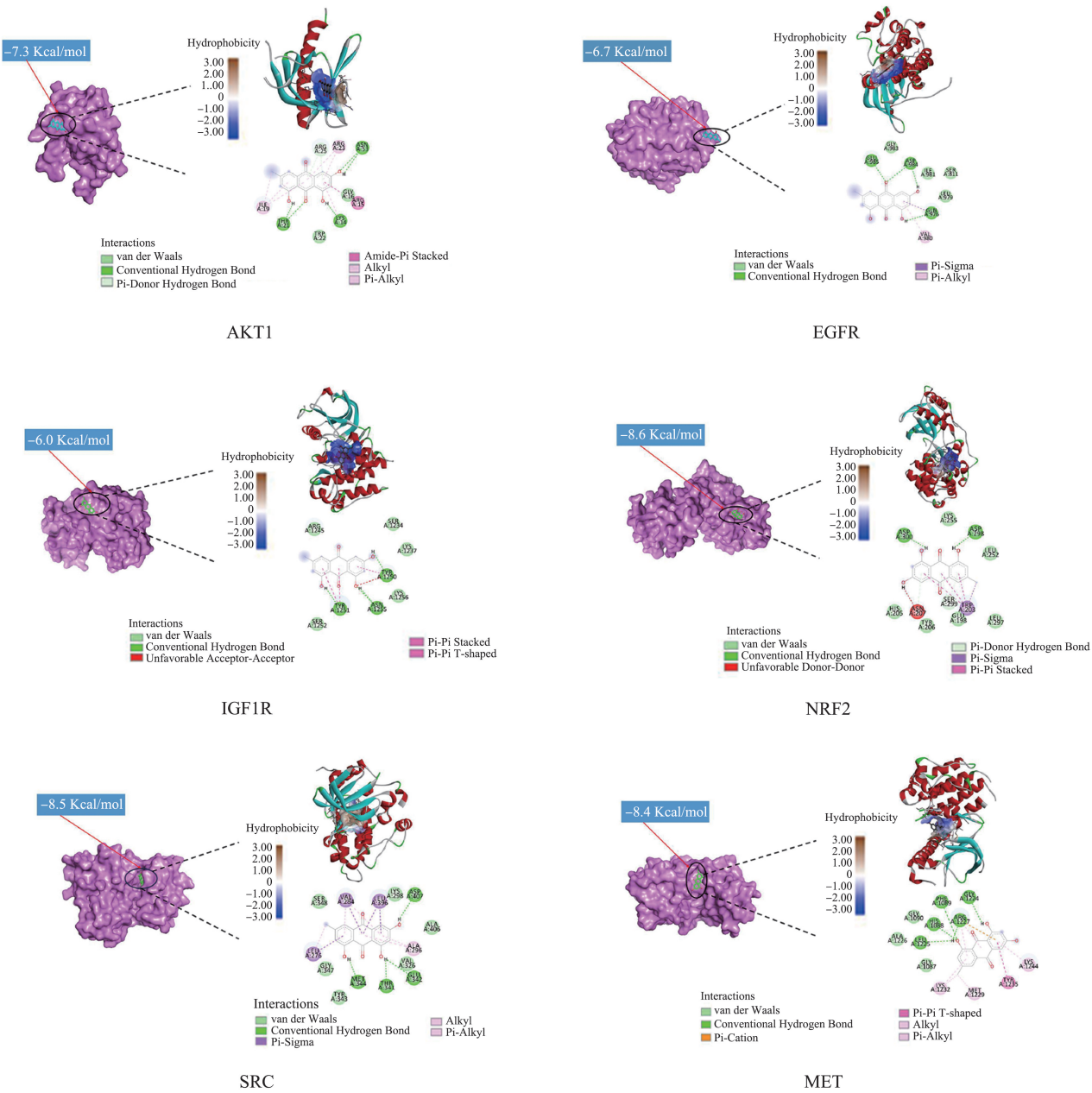


图 5 大黄素和核心治疗靶点的分子对接
Figure 5 Molecular docking of emodin and core therapeutic targets

2.6 分子动力学模拟

为进一步研究大黄素与 NRF2 的结合模式,我们选取最佳对接位作为分子动力学模拟的起始结构。通过计算每个模拟快照的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD),以评估复合物的构象稳定性。在整个过程中,复合物的 RMSD 值在 30 ns 后稳定在约 3.5 Å 左右 (图 6A),表明大黄素的结合并未引起受体构象的显著或连续变化。此外,旋转半径 (radius of gyration, Rg) 展示蛋白-配体复合物整体结构的紧凑程度变化,在整个模拟过程中波动极小 (图 6B),进一步证实大黄素结合对蛋白质折叠无明显影响。残基均方根波

动 (root mean square fluctuation, RMSF) 展示蛋白质每个残基在模拟过程中的波动程度,大部分残基的波动值较低 (<1.5 Å),表明蛋白的核心结构区域刚性稳定 (图 6C)。在特定残基编号处出现峰值 (>2.5 Å),这些通常是环区或柔性末端。根据计算结果,大黄素与 NRF2 之间的结合自由能估计为 -22.2 kJ/mol (图 6D)。具体而言,范德华相互作用 (-34.59 kJ/mol) 和静电效应 (-13.85 kJ/mol) 对结合具有显著的促进作用,其中范德华力是主要贡献因素。然而,极性溶剂化效应 (+24.28 kJ/mol) 则表现出相反的作用,削弱了整体结合能力。

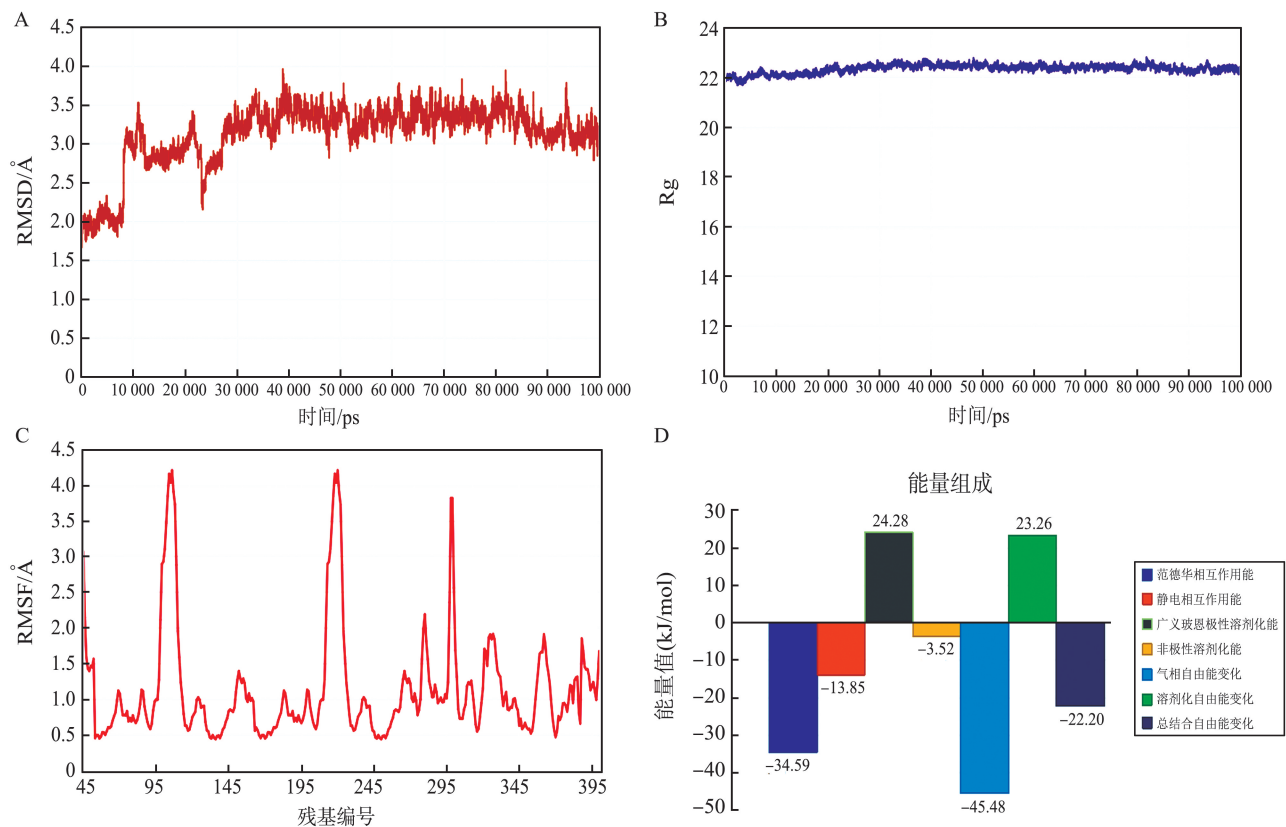


图6 大黄素-NRF2 复合物的分子动力学模拟
A:复合物随时间变化的 RMSD 值; B:复合物随时间变化的 Rg 值; C:复合物随时间变化的 RMSF 值; D:复合物的能量组成。
Figure 6 Molecular dynamics simulation of emodin and NRF2
A: The RMSD values of the complex over time; B: The Rg values of the complex over time; C: The RMSF values of the complex over time; D: Energy component of the complex.

2.7 细胞实验验证

2.7.1 糖尿病肾病细胞模型构建成功的验证

与对照组相比,高糖组细胞活力显著下降,铁离子水平显著升高,表明高糖诱导了明显的细胞损伤及铁代谢紊乱。同时,高糖组中 NRF2 及其下游关键基因 GPX4、SLC7A11 的 mRNA 表达水平显著下调,而促炎因子 TNF、IL-17 的表达显著上升。上述结果共同验证了高糖处理 24 h 可成功建立糖尿病肾病足细胞损伤模型。

2.7.2 细胞增殖-毒性的表达

低浓度大黄素呈剂量依赖性保护,高糖组 0 μmol/L 存活率约 51%,5 μmol/L 时存活率由 51% 升至 78%,10 μmol/L 达峰值 85% ($P<0.001$,为最佳保护浓度);超过 10 μmol/L 后活力开始逐渐回落,20 μmol/L 降至 76.3%,40 μmol/L 降落至 58%,已接近于模型组的细胞存活率,因此考虑高于 40 μmol/L 浓度已经出现药物毒性。双相四参数 logistic 拟合得保护段 $EC_{50} = 9.9 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 8.6~11.1)、 $IC_{50} = 21.7 \mu\text{mol/L}$ (95% CI: 18.5~25.4),模型 $R^2 = 0.973$,治疗指数 ≈ 2.2 ,体内应用需控制血

药峰值 $<20 \mu\text{mol/L}$,以避免毒性,40 μmol/L 以上不建议使用(图 7、8A)。

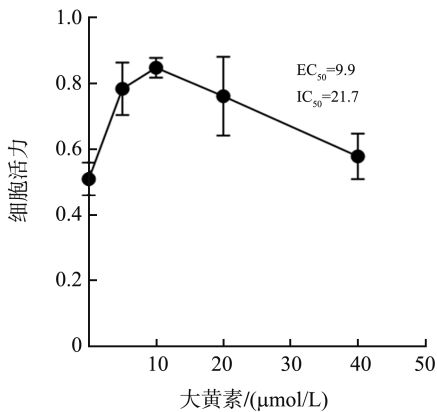


图7 CCK-8 评估不同浓度的大黄素处理 MPC-5 细胞 24 h 后的细胞活力
Figure 7 The CCK-8 assay was used to evaluate the cell viability of MPC-5 cells treated with different concentrations of emodin for 24 hours

2.7.3 大黄素对糖尿病肾病细胞模型的保护作用

与对照组相比,高糖组 Fe^{2+} 水平升高,然而给予大黄素后,铁离子水平下降,其中 10 μmol/L 大黄素

干预下铁离子水平下降最为明显(图 8B);qPCR 检测相关基因 mRNA 表达水平,结果显示,大黄素减轻高糖诱导的 *GPX4* 基因表达的下调(图 8C);高糖组 *NRF2* 基因表达下调,大黄素上调了下降的 *NRF2* 基因的表达(图 8D);同样,*SLC7A11* 基因的表达水

平变化也类似于 *NRF2*(图 8E)。大黄素处理后, *NRF2* 核转位增强,*HO-1* 和 *NQO1* 显著上调(图 8F、G),另一方面高糖诱导 *TNF*、*IL-17*(图 8H、I)表达升高。

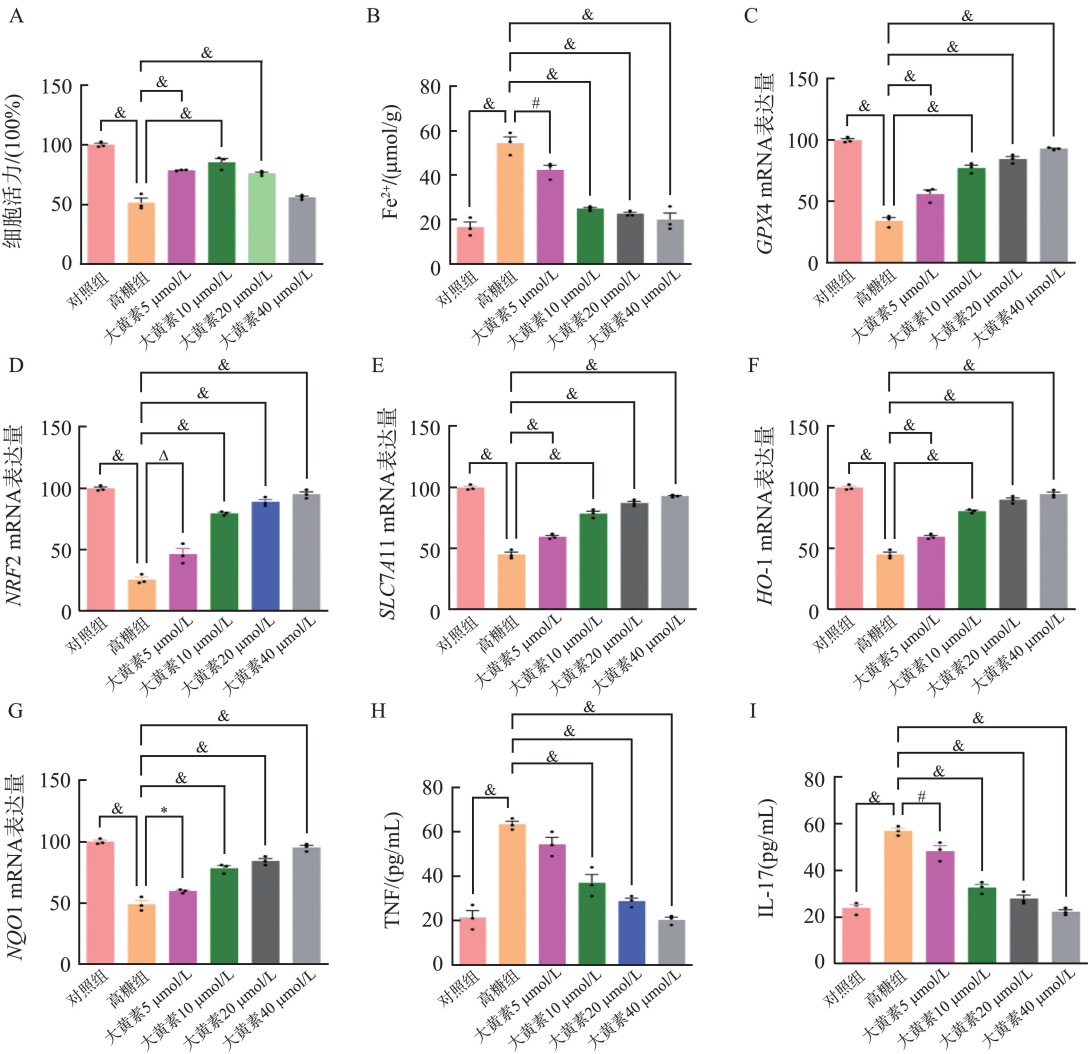


图 8 大黄素干预后各分组细胞活力、铁离子水平及相关基因表达水平测定 (* $P<0.05$; # $P<0.01$; $\Delta P<0.001$; & $P<0.001$)
A:细胞活力; B:铁离子水平; C:*GPX4* 的 mRNA 表达量; D:*NRF2* 的 mRNA 表达量; E:*SLC7A11* 的 mRNA 表达量; F:*HO-1* 的 mRNA 表达量; G:*NQO1* 的 mRNA 表达量; H: *TNF* 水平; I: *IL-17* 水平。
Figure 8 Assessment of cell viability, iron ion levels, and related gene expression in MPC-5 cells following emodin intervention across different groups(* $P<0.05$; # $P<0.01$; $\Delta P<0.001$; & $P<0.001$)
A: Cell viability; B: Iron ion levels; C: *GPX4* mRNA expression; D: *NRF2* mRNA expression; E: *SLC7A11* mRNA expression; F: *HO-1* mRNA expression; G: *NQO1* mRNA expression; H: *TNF* levels; I: *IL-17* levels.

2.8 代谢组学

正交偏最小二乘法-判别分析模型参数为 $R^2 = 0.91$, $Q^2 = 0.85$; 2 000 次置换检验显示 Q^2 截距为 -0.18,表明模型稳健、未过拟合。高糖组与对照组在 PC1 和 PC3 空间中明显分离,表明糖尿病肾病引起了显著的代谢变化。大黄素干预组在主成分分析图上表现向对照组靠拢,提示大黄素部分逆转了高糖饮食带来的异常变化,具有改善代谢紊乱的潜力

(图 9A)。随后将大黄素治疗组的差异代谢物整合进行分析,其中脂类和类脂分子所占比例最高(28.07%),其次是有机酸类(22.459%)以及有机杂环化合物(9.93%)(图 9B)。

大黄素干预后,共 29 种代谢物水平发生显著变化,具体表现为 10 种代谢物水平升高,19 种代谢物水平降低(图 9C),大黄素干预组与对照组的颜色相近,表示大黄素可以进一步逆转代谢紊乱。代谢

物富集分析显示共有 20 条代谢通路显著富集,其中铁死亡通路、丙氨酸-天冬氨酸和谷氨酸代谢、牛磺酸-亚牛磺酸代谢、半胱氨酸-甲硫氨酸代谢、甘氨酸-丝氨酸和苏氨酸代谢、谷胱甘肽代谢显著富集(图 9D)。

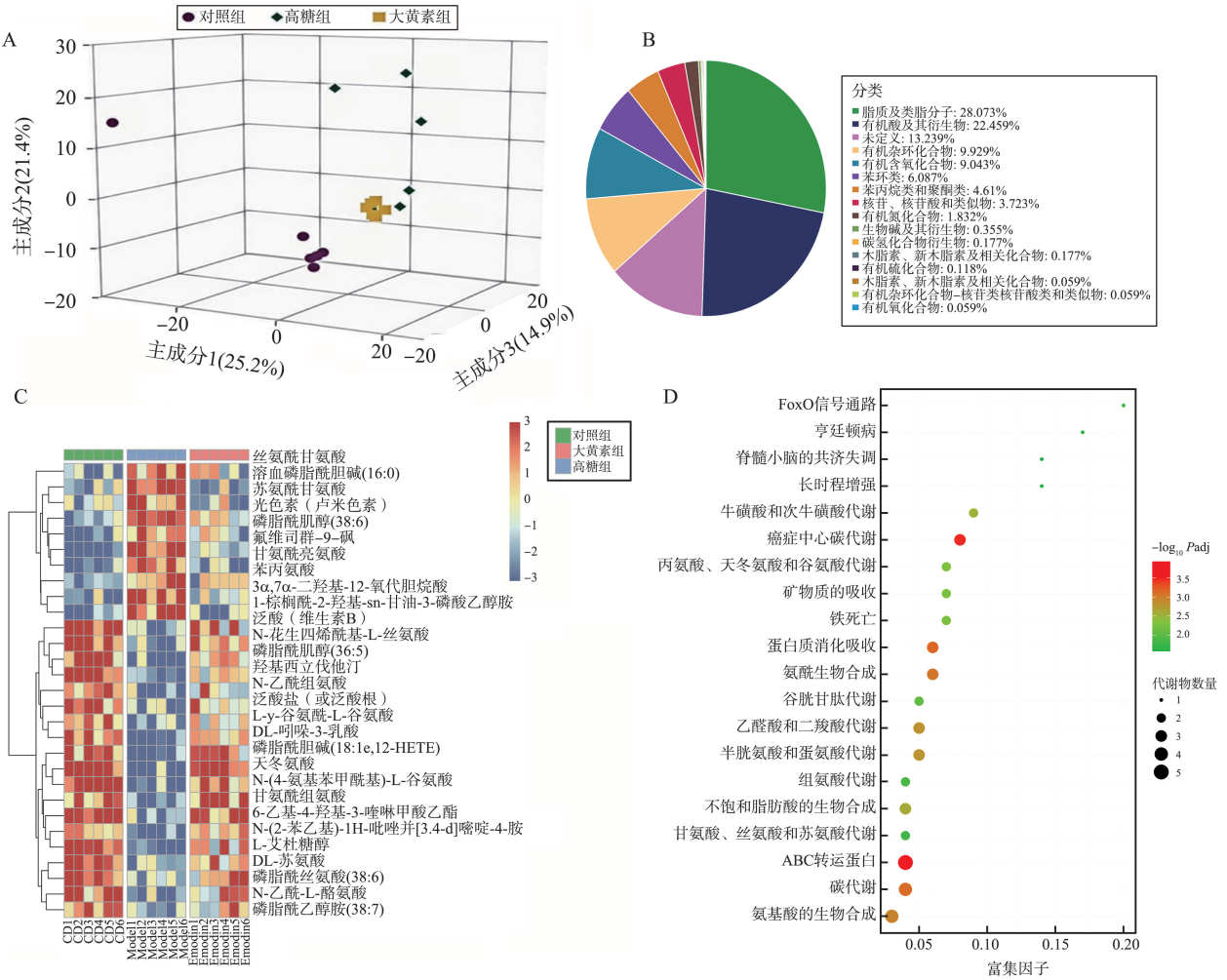


图 9 差异代谢物的鉴定与分析
A:主成分分析图; B:不同类别代谢物的比例分布; C:差异代谢物热图; D:差异代谢物 KEGG 通路富集分析。

Figure 9 Identification and analysis of differential metabolites

A: Principal component analysis diagram; B: Proportion distribution of different types of metabolites; C: Heat map of differential metabolites; D: KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites.

3 讨论

近年来,中药在糖尿病肾病治疗中展现出活性高、作用谱广、毒副作用轻微等独特优势。网络药理学利用拓扑分析,可以对药物进行有效成分筛选、潜在成分鉴定、药理活性预测,以及药物、基因和疾病的共模块分析^[23]。本研究结果表明,NRF2、AKT1、EGFR、IGF1R、MET、SRC 是大黄素治疗糖尿病肾病的核心靶点。其中 NRF2 在 PPI 网络中度值位居前列,被认为是主要的治疗靶点。

大黄素通过激活 NRF2 蛋白,增强抗氧化酶活性^[24],与“抗氧化活性”和“铁离子稳态”直接关

联,可显著调控铁死亡、TNF 和 IL-17 等通路,抑制高糖诱导的活性氧积累,从而减轻氧化应激。铁死亡是一种铁依赖的脂质过氧化驱动 的细胞死亡方式,其特点是铁离子过量和脂质过氧化产物的积聚,同时抗氧化因子被迅速消耗,在显微镜下可观察到线粒体嵴的减少或消失、膜密度升高以及形态的萎缩^[25]。铁死亡与糖尿病肾病中肾小管上皮细胞损伤、足细胞丢失及纤维化和恶化高度相关^[26-28]。在高糖高脂环境中,细胞内的亚铁离子不断累积,通过芬顿反应催生大量活性氧,导致肾小球系膜细胞、足细胞以及近端小管上皮细胞的脂质过氧化加剧,从而触发铁死亡。与此同时,细胞膜里富含的多不饱和脂肪酸,在酰基辅酶 A 合

成酶长链家族成员4、溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶3和脂氧合酶的共同催化下,生成大量脂质过氧化物^[29],进一步加剧铁死亡。本研究GO分析显示,大黄素可能通过调控氧化应激、改善肾脏微循环障碍、抑制肾细胞程序性死亡、介导脂筏受体信号以及延缓肾脏纤维化和肾小管上皮细胞间质转化,从而改善糖尿病肾病。KEGG富集分析则显示,大黄素显著调控铁死亡、IL-17等通路,其中铁死亡通路富集度最高,IL-17通路次之,为后续实验验证提供了理论依据。

分子对接是一种基于配体-靶相互作用预测和分子水平构象关系描述的技术。配体-靶点复合物的结合能越低,则意味着配体与受体结合活性越大、结合能力越强。当结合能 ≤ -5.0 kcal/mol时,则视为成分与靶点具有较好的活性;当结合能 ≤ -7.0 kcal/mol时,结合活性强烈^[30]。分子对接仅能提供配体与靶标相互作用的静态视图。而分子动力学模拟则能够揭示相互作用的动态行为,包括残基波动、结构域移动以及蛋白质-配体分离。本研究结果显示,大黄素与NRF2结合能达 -8.6 kcal/mol,分子动力学模拟进一步证实了大黄素能够与NRF2稳定结合。NRF2是细胞抗氧化防御系统的关键转录因子,在所有细胞类型中均可表达。NRF2通过其多个功能结构域(如Neh1-7)精密调控自身稳定性和转录活性^[31]。本研究结果显示,某些中药通过NRF2及其上下游相关因子组成的信号通路,可以抑制氧化应激、炎症、细胞焦亡、凋亡和铁死亡,并激活自噬,由此减轻肾脏纤维化、维护肾功能,最终延缓糖尿病肾病进展^[32]。本研究通过网络药理学及分子对接、分子动力学模拟锚定NRF2这一关键靶点,将其与铁死亡联系起来。

NRF2-KEAP1轴的激活可以增强其下游基因(如HO-1、SLC7A11)的表达^[33-35],从而提高谷胱甘肽的合成,抑制脂质过氧化物的积累,并上调铁代谢调节蛋白^[36]。NRF2直接结合HO-1启动子区域,显著上调其表达,导致血红素分解。 Fe^{2+} 释放后迅速被铁蛋白整合封存,细胞内游离铁池下降,脂质过氧化物水平显著降低,从而抑制了铁依赖性细胞死亡^[37]。NQO1通过维持细胞内的氧化还原平衡,高表达时可显著降低脂质过氧化物水平,从而抑制铁死亡并减轻氧化应激反应^[38]。此外,NRF2的激活可抑制ACSL4表达,从而减少脂质过氧化物的生成^[39]。NRF2上调SLC7A11,促进胱氨酸摄取,从而维持细胞内谷胱甘肽水平并抑制铁死亡关键调节因子GPX4的失活^[40-41]。在高糖环境下,大黄素能

够通过激活PPAR γ ,抑制系膜区p38MAPK的过度活化进而改善系膜细胞的收缩功能^[42]。此外,大黄素还可以下调TNF、IL-17通路活性、抑制炎症因子表达^[43],减轻足细胞损伤^[44-45]。本研究结果显示,大黄素能激活糖尿病肾病模型NRF2表达,上调其下游GPX4和SLC7A11表达,同时NRF2核转位增强,HO-1和NQO1表达也会显著上调。高糖诱导促炎因子TNF和IL-17表达升高,大黄素干预后,炎症因子表达显著降低,通过抑制铁死亡进一步减少肾损伤标记物表达,改善糖尿病肾病肾脏功能和形态学病变。

糖尿病肾病的机制十分复杂,中医学认为,消渴病迁延不愈,会导致病邪入络,使痰、热、瘀等病理产物积聚于肾络,形成“微型癥瘕”,最终导致肾脏受损、肾功能失调^[46]。从现代医学角度来看,这一过程与铁死亡驱动的足细胞-肾小管上皮细胞连锁损伤高度吻合。高糖环境导致游离铁离子在肾络“微血管-足细胞”区域异常积聚,引起微循环障碍和缺血缺氧,类似“气血不畅”,形成类似“瘀血”的金属负荷^[47];芬顿反应产生活性氧,引发多不饱和脂肪酸过氧化和氧化应激,类似于“瘀久化热”,导致肾络受损^[48]。铁死亡细胞释放损伤相关分子模式,诱导NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3炎症小体,吸引巨噬细胞浸润和细胞外基质积聚,形成“痰湿壅滞”的微观版^[49]。因此,铁死亡作为一种“微观癥瘕”的表现形式,导致脂质过氧化物堆积、线粒体萎缩和细胞膜破裂,可视作“瘀热互结”在细胞层面的体现^[50]。在糖尿病肾病中,铁死亡主要表现为足细胞丢失和肾小管上皮细胞损伤,进一步推动肾脏纤维化和功能丧失。炎症和铁死亡形成正反馈循环:释放的损伤相关分子进一步激活免疫反应,从而加剧肾脏炎症。大黄素作为一种具有活血化瘀和清热泻火功效的重要活性成分,其作用机制与“微型癥瘕”理论高度一致。大黄素通过NRF2-KEAP1轴“疏通”这一瘀阻,促进NRF2核转位,进一步上调HO-1、SLC7A11、GPX4基因的表达,从而达到“化瘀”和“清热”的效果,抑制铁死亡。同时下调TNF、IL-17通路,减少“痰湿”生成,从而逆转微型癥瘕的病理基础^[51]。因此,中药“活血化瘀、清热化痰”的理论在糖尿病肾病中得到了“抑制铁死亡、减轻炎症、保护足细胞”的现代诠释,为精准辨证提供分子标志物和干预靶点。

代谢组学分析进一步从系统层面揭示了大黄素干预糖尿病肾病代谢的调控网络。本研究结果表明,高糖诱导显著的代谢紊乱,大黄素干预后,

代谢谱明显恢复正常,提示其具有逆转代谢失衡的潜力。差异代谢物分析显示,脂质及其衍生物的占比最高,表明脂质代谢紊乱可能是糖尿病肾病早期的关键特征之一,而大黄素可能通过调节脂类代谢和抗氧化应激反应发挥其作用。KEGG通路富集分析进一步表明,铁死亡通路是调控的核心代谢轴,伴随谷胱甘肽、半胱氨酸-甲硫氨酸和牛磺酸等抗氧化相关代谢通路的显著富集,表明大黄素可以通过增强谷胱甘肽系统功能抑制脂质过氧化和铁死亡。值得注意的是,GPX4作为铁死亡的关键调控因子,其上游代谢物如谷胱甘肽和胱氨酸水平在大黄素干预后显著回升,与细胞实验结果形成良好互证。

综上所述,本研究以网络药理学为主线,结合分子对接、分子动力学模拟和细胞实验,系统阐明了大黄素干预糖尿病肾病的分子机制,并重点关注“NRF2-铁死亡”轴进行实验验证。大黄素通过激活NRF2-抑制铁死亡这一核心过程,协同调控TNF和IL-17炎症通路、凋亡通路以及糖脂代谢网络,从而减轻足细胞损伤并延缓肾纤维化。“微型癥瘕”理论与铁死亡和炎症机制相结合,不仅为糖尿病肾病的中医病机提供了现代分子生物学的支持,也为中药单体或复方的机制研究提供了新的阐释框架。未来可进一步开展临床样本中铁死亡标志物与中医证型的相关性研究,推动中西医结合在糖尿病肾病精准防治中的应用。然而,仅凭网络药理学和体外验证仍存在一定的局限性。为更好地探讨大黄素治疗糖尿病肾病的铁死亡相关机制,尚需要进一步的体内实验验证。

参考文献:

[1] 张俊清, 苏白海, 张捷, 等. 糖尿病肾脏疾病早期预测与诊断专家共识[J]. 中华内科杂志, 2021, 60(6): 522-532.
Zhang Junqing, Su Baihai, Zhang Jie, et al. Expert consensus on early prediction and diagnosis of diabetic kidney disease[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2021, 60(6): 522-532.

[2] Zhang L X, Long J Y, Jiang W S, et al. Trends in chronic kidney disease in China[J]. N Engl J Med, 2016, 375(9): 905-906.

[3] 杜宇彤, 周佳丽, 栗宇, 等. 大黄有效成分干预糖尿病肾病的机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27(10): 182-186.
Du Yutong, Zhou Jiali, Li Yu, et al. Research progress on the mechanism of Dahuang (*rhei Radix et rhizoma*)

active components in intervening diabetic nephropathy[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2025, 27(10): 182-186.

[4] Alicic R Z, Rooney M T, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017, 12(12): 2032-2045.

[5] Tziomalos K, Athyros V G. Diabetic nephropathy: new risk factors and improvements in diagnosis[J]. Rev Diabet Stud, 2015, 12(1/2): 110-118.

[6] Salami M, Salami R, Mafi A, et al. Therapeutic potential of resveratrol in diabetic nephropathy according to molecular signaling[J]. Curr Mol Pharmacol, 2022, 15(5): 716-735.

[7] Zheng X Y, Yang S M, Zhang R, et al. Emodin-induced autophagy against cell apoptosis through the PI3K/AKT/mTOR pathway in human hepatocytes[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 3171-3180. DOI:10.2147/DDDT.S204958

[8] Wang S, Huang X F, Zhang P, et al. Chronic Rhein treatment improves recognition memory in high-fat diet-induced obese male mice[J]. J Nutr Biochem, 2016, 36: 42-50. DOI:10.1016/j.jnutbio.2016.07.008.

[9] Xu S Z, Lv Y Y, Zhao J, et al. The inhibitory effect of Rhein on proliferation of high glucose-induced mesangial cell through cell cycle regulation and induction of cell apoptosis[J]. Pharmacogn Mag, 2016, 12(Suppl 2): S257-S263.

[10] Tu Y, Gu L B, Chen D P, et al. Rhein inhibits autophagy in rat renal tubular cells by regulation of AMPK/mTOR signaling[J]. Sci Rep, 2017, 7: 43790. DOI: 10.1038/srep43790

[11] Fu S J, Zhou Y N, Hu C, et al. Network pharmacology and molecular docking technology-based predictive study of the active ingredients and potential targets of rhubarb for the treatment of diabetic nephropathy[J]. BMC Complement Med Ther, 2022, 22(1): 210. DOI: 10.1186/s12906-022-03662-6

[12] 陈宇航, 丁雷, 魏然, 等. 基于网络药理学和生物信息学探讨鼻敏方调节铁死亡治疗变应性鼻炎的作用[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2025, 33(4): 254-261.
Chen Yuhang, Ding Lei, Wei Ran, et al. Differential gene analysis of ferroptosis in the treatment of allergic rhinitis with Bi-Min-Formul based on GEO using network pharmacology and molecular docking[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology in Integrative Medicine, 2025, 33(4): 254-261.

[13] 李明波, 黄燕波, 刘俊城, 等. 黄芪桂枝五物汤治疗强直性脊柱炎的网络药理学探讨[J]. 山东大学学报(医学版), 2022, 60(3): 29-38.
Li Mingbo, Huang Yanbo, Liu Juncheng, et al. Exploration of Huangqi Guizhi Wuwu Tang in the treatment of

ankylosing spondylitis based on network pharmacology [J]. *Journal of Shandong University(Health Sciences)*, 2022, 60(3): 29-38.

[14] Shayo M J, Samwel B, Shadrack D M, et al. Drug re-positioning identifies salvinorin A and deacetylgedunin (DCG) enriched plant extracts as novel inhibitors of Mpro, RBD-ACE2 and TMPRSS2 proteins [J]. *RSC Adv*, 2024, 14(29): 21203-21212.

[15] 张文顺, 曲超, 石岩, 等. 基于分子对接技术、分子动力学模拟中药复方益糖康防治糖尿病肾病作用机制研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(2): 107-114.

[16] 章玉婷, 王安慧, 杨晋妮, 等. 非酒精性脂肪性肝病细胞模型中胆固醇代谢紊乱机制[J]. *中国药科大学学报*, 2023, 54(4): 490-500.

Zhang Yuting, Wang Anhui, Yang Jinni, et al. Mechanism of cholesterol metabolic disorder in a cell model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2023, 54(4): 490-500.

[17] 薛华, 何雨昕, 郭子旭, 等. 基于 UHPLC-QTOF-MS 探讨高原鼠兔棕色脂肪低氧环境代谢分子机制[J]. *重庆医科大学学报*, 2025, 50(2): 267-274.

Xue Hua, He Yuxin, Guo Zixu, et al. Molecular mechanism of brown adipose tissue metabolism in the hypoxic environment in plateau pikas: a study based on ultra-performance liquid chromatography-quadruple time-of-flight mass spectrometry [J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2025, 50(2): 267-274.

[18] Zhao D M, Zhong R, Wang X T, et al. Mitochondrial dysfunction in diabetic nephropathy: insights and therapeutic avenues from traditional Chinese medicine [J]. *Front Endocrinol*, 2024, 15: 1429420. DOI:10.3389/fendo.2024.1429420

[19] Patti G J, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(4): 263-269.

[20] 何文秀, 王吉文, 杨联林, 等. 基于网络药理学和代谢组学与分子对接技术预测鱼腥草破壁饮片抗辐射质量标志物[J]. *中成药*, 2025, 47(3): 1014-1023.

[21] 张雄宝, 陈佳晖, 傅亚婷, 等. 基于血清代谢组学分析热习服相关代谢产物及通路特征[J]. *海军军医大学学报*, 2024, 45(5): 569-577.

Zhang Xiongbao, Chen Jiahui, Fu Yating, et al. Analysis of heat acclimatization related metabolites and pathway characteristics based on serum metabonomics [J]. *Academic Journal of Naval Medical University*, 2024, 45(5): 569-577.

[22] Wu C W, Cao L, Liu M, et al. Exploring the mechanisms underlying the therapeutic effect of the drug pair Rhubarb-Coptis in diabetic nephropathy using network pharmacology and molecular docking analysis [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(24): 1343. DOI:10.21037/atm-22-5550

[23] 庄延双, 蔡宝昌, 张自力. 网络药理学在中药研究中的应用进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(1): 156-160.

[24] Merecz-Sadowska A, Sadowski A, Zielińska-Bliźniewska H, et al. Network pharmacology as a tool to investigate the antioxidant and anti-inflammatory potential of plant secondary metabolites-a review and perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(14). DOI:10.3390/ijms26146678

[25] Du B X, Fu Q, Yang Q, et al. Different types of cell death and their interactions in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 87-105.

[26] Hu J Q, Gu W J, Ma N, et al. Leonurine alleviates ferroptosis in cisplatin-induced acute kidney injury by activating the Nrf2 signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(15): 3991-4009.

[27] Feng Q, Yang Y, Qiao YJ, et al. Quercetin ameliorates diabetic kidney injury by inhibiting ferroptosis via activating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(4): 997-1018.

[28] Xue M J, Tian Y W, Zhang H, et al. Curcumin nanocrystals ameliorate ferroptosis of diabetic nephropathy through glutathione peroxidase 4 [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1508312. DOI:10.3389/fphar.2024.1508312

[29] Chu J Y, Wang K W, Lu L L, et al. Advances of iron and ferroptosis in diabetic kidney disease [J]. *Kidney Int Rep*, 2024, 9(7): 1972-1985.

[30] 范晓艳, 王元耕, 陈泽涛. 黄芪桂枝五物汤治疗心衰的网络药理学机制[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2022, 60(11): 70-81.

Fan Xiaoyan, Wang Yuangeng, Chen Zetao. Network pharmacologic mechanism of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction in treating heart failure [J]. *Journal of Shandong University(Health Sciences)*, 2022, 60(11): 70-81.

[31] Hayes J D, Dinkova-Kostova A T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(4): 199-218.

[32] 张钦媛, 陈彦旭, 秦大凯, 等. 中药调控 Nrf2 信号通路干预糖尿病肾病研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(18): 277-285.

[33] Wang J, Peng X J, Zhang X Y, et al. Design, synthesis, and evaluation of nitroxide radical derivatives based on Rhein as potential anti-aging agents targeting the Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2025, 19: 5153-5167. DOI:10.2147/DDDT.S516209

[34] 李星桥, 夏烨, 刘波. 头手足三联针法基于 Nrf2/SLC7A11 调控铁死亡治疗大鼠缺血性脑卒中机制研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2025, 27(2): 200-205.

- Li Xingqiao, Xia Ye, Liu Bo. Mechanism of head-hand-foot tripleacupuncture kinesitherapy based on Nrf2/SLC7A11 regulating ferroptosis in the treatment of ischemic stroke in rats[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2025, 27(2): 200-205.
- [35] 赵雅, 冯萧, 张存钰, 等. 疮灵液通过 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路调控铁死亡改善糖尿病足溃疡的作用及机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(10): 1344-1355.
- Zhao Ya, Feng Xiao, Zhang Cunyu, et al. Chuangling Ye ameliorates diabetic foot ulcers by regulating ferroptosis via the Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway: mechanisms and therapeutic effects [J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2025, 41(10): 1344-1355.
- [36] Shen G, Wen H Y, Li H J, et al. Emodin protects against severe acute pancreatitis-associated acute lung injury by activating Nrf2/HO-1/GPX4 signal and inhibiting ferroptosis *in vivo* and *in vitro*[J]. BMC Gastroenterol, 2025, 25(1): 57. DOI: 10.1186/s12876-025-03660-1
- [37] Li J C, Lu K M, Sun F L, et al. Panaxydol attenuates ferroptosis against LPS-induced acute lung injury in mice by Keap1-Nrf2/HO-1 pathway [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 96. DOI:10.1186/s12967-021-02745-1
- [38] Yuan Z N, Wang X Y, Qin B Y, et al. Targeting NQO1 induces ferroptosis and triggers anti-tumor immunity in immunotherapy-resistant KEAP1-deficient cancers [J]. Drug Resist Updat, 2024, 77: 101160. DOI: 10.1016/j.drug.2024.101160
- [39] Chen J Y, Li X P, Ge C D, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(3): 467-480.
- [40] Liu H, Zhang T A, Zhang W Y, et al. Rhein attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury *via* inhibition of ferroptosis through NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway [J]. Exp Neurol, 2023, 369: 114541. DOI: 10.1016/j.expneurol.2023.114541
- [41] 刘法, 韩丹, 徐梓威, 等. 萝卜硫素对糖尿病视网膜病变大鼠铁死亡途径和铁稳态的影响[J]. 眼科新进展, 2025, 45(11): 870-882.
- Liu Fa, Han Dan, Xu Ziwei, et al. Effects of sulforaphane on the ferroptosis pathway and iron homeostasis in rats with diabetic retinopathy [J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2025, 45(11): 870-882.
- [42] 刘友霞, 刘毅, 曹铭锋, 等. 大黄素对高糖环境下系膜细胞收缩功能的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2010, 48(9): 14-18.
- Liu Youxia, Liu Yi, Cao Mingfeng, et al. Effect of emodin on the systolic function of mesangial cells in high glucose environment[J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2010, 48(9): 14-18.
- [43] 范立荣, 李松林, 李函舟, 等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨三黄益肾胶囊对糖尿病肾病大鼠氧化应激的影响[J]. 天津中医药, 2025, 42(3): 381-386.
- Fan Lisong, Li Songlin, Li Hanzhou, et al. Effect of Sanhuang Yishen Capsule on oxidative stress in rats with diabetic nephropathy based on Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2025, 42(3): 381-386.
- [44] Zeng P, Wang X M, Ye C Y, et al. Mechanistic insights into the anti-depressant effect of emodin: an integrated systems pharmacology study and experimental validation[J]. Aging, 2021, 13(11): 15078-15099.
- [45] Li Q Q, Gao J, Pang X H, et al. Molecular mechanisms of action of emodin: as an anti-cardiovascular disease drug[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 559607. DOI: 10.3389/fphar.2020.559607
- [46] 赵进喜, 王世东, 傅强, 等. 吕仁和教授诊治糖尿病与肾病学术思想与传承[J]. 现代中医临床, 2016, 23(3): 1-3.
- Zhao Jinxi, Wang Shidong, Fu Qiang, et al. Academic idea and inheritance of Professor Lü Renhe's experience for treating diabetes and kidney disease[J]. Modern Chinese Clinical Medicine, 2016, 23(3): 1-3.
- [47] 李颖娟, 任婉婷, 刘新艳. 铁死亡的相关机制及其对糖尿病肾病影响的研究进展[J]. 中国医药导报, 2024, 21(13): 184-187.
- Li Yingjuan, Ren Wanting, Liu Xinyan. Research progress on the mechanism of ferroptosis and its effect on diabetic nephropathy [J]. China Medical Herald, 2024, 21(13): 184-187.
- [48] Chatgililoglu C. Biomarkers of oxidative and radical stress [J]. Biomolecules, 2024, 14(2): 194-200.
- [49] Gu X Y, Huang Z C, Ying X, et al. Ferroptosis exacerbates hyperlipidemic acute pancreatitis by enhancing lipid peroxidation and modulating the immune microenvironment [J]. Cell Death Discov, 2024, 10(1): 242-231.
- [50] Jiang X J, Stockwell B R, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266-282.
- [51] Li L, Zhu ZJ. Pharmacological modulation of ferroptosis as a therapeutic target for liver fibrosis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1071844. DOI: 10.3389/fphar.2022.1071844

(编辑:徐苗蓁)