

基于实验验证探究地锦草治疗急性肾损伤的作用机制

张丽娟¹, 贾学海¹, 郭亚萍², 李顺英¹, 杨璐³, 姚大红², 张珂^{1*}, 王航宇¹, 王金辉^{1,4}

(1. 石河子大学药学院/新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆石河子 832002;

2. 深圳技术大学药学院, 广东深圳 518118; 3. 新疆林果树种选育与栽培重点实验室, 乌鲁木齐 830052; 4. 哈尔滨医科大学药学院, 哈尔滨 150081)

[摘要] 目的:基于网络药理学、分子对接及实验验证探究地锦草对急性肾损伤(AKI)的疗效及作用机制。方法:利用中药系统药理数据分析平台(TCMSP)和SwissTargetPrediction数据库检索地锦草活性成分及靶点,采用GeneCards和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)筛选AKI靶点,并将药物靶点与疾病靶点取交集,构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,并对交集靶点进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)进行富集分析,并采用Discovery Studio软件对关键成分和核心靶点进行分子对接验证。采用庆大霉素(GM)诱导AKI大鼠模型,设置正常组、模型组、维拉帕米(16 mg·kg⁻¹)组、地锦草富集物(18、54、162 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组和地锦草70%乙醇提取物(423 mg·kg⁻¹)组连续给药14 d。检测造模及给药后24 h尿量;血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、24 h尿蛋白定量(24 hUTP)和尿酸(UA)的含量;肾脏丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化歧化酶(SOD)、一氧化碳合酶(NOS)和乳酸脱氢酶(LDH)的含量;酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒检测血清中白细胞介素(IL)-6和肿瘤坏死因子(TNF)-α水平;苏木素-伊红(HE)和Masson染色检测肾脏组织病理变化。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/核转录因子(NF)-κB信号通路相关蛋白的表达。结果:该研究从地锦草中筛选并鉴定出山柰酚、木犀草素、芹菜素、没食子酸和槲皮素等13种活性成分。通过生物信息学分析,这些成分与AKI共有289个靶点,其中62个为核心靶点,包括Akt1、TNF、肿瘤蛋白p53基因(TP53)和IL-1β等。这些靶点主要参与调控NF-κB、缺氧诱导因子-1(HIF-1)、TNF、PI3K/Akt及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等生物学过程。在动物实验中,成功构建了GM诱导的大鼠AKI模型。与模型组比较,地锦草提取物能显著降低大鼠24 hUTP、BUN和SCr水平(P<0.01),表明其对肾功能的改善作用。此外,地锦草提取物还能明显降低大鼠肾组织中的LDH活性和MDA含量(P<0.05, P<0.01),同时明显提高SOD、NOS活性和GSH含量(P<0.05),这表明地锦草提取物具有抗氧化和保护肾功能的潜力。进一步的炎症因子分析显示,地锦草提取物治疗的大鼠血清中IL-6和TNF-α水平显著降低(P<0.01),这表明地锦草提取物具有抗炎作用。此外,地锦草提取物还能调节PI3K/Akt/NF-κB信号通路上的蛋白表达,这进一步证实了其减轻GM诱导的AKI的作用机制。结论:地锦草提取物通过其多成分、多靶点的作用机制,对AKI具有显著的治疗作用,其效果体现在改善肾功能、抗氧化、抗炎及调节免疫反应等多个方面。这些发现为地锦草在AKI治疗中的应用提供了科学依据,并为未来的药物开发和临床研究指明了方向。

[关键词] 地锦草; 庆大霉素; 急性肾损伤; 氧化应激

[中图分类号] R692;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)13-0166-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20250414

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250321.1858.005>

[网络出版日期] 2025-03-24 09:46:11 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Based on Experimental Verification, Mechanism of *Euphorbia humifusa* in Treatment of Acute Kidney Injury was Explored

ZHANG Lijuan¹, JIA Xuehai¹, GUO Yaping², LI Shunying¹, YANG Lu³, YAO Dahong², ZHANG Ke^{1*},
WANG Hangyu¹, WANG Jinhui^{1,4}

(1. *Pharmaceutics College of Shihezi University/Key Laboratory of Xinjiang Plant Drug Resources Utilization Ministry of Education, Shihezi 832002, China;*

[收稿日期] 2024-12-11

[基金项目] 国家重大专项新药创新项目(2018ZX09735-005);石河子大学青年创新培育人才项目(CXPY202220)

[第一作者] 张丽娟,在读硕士,从事天然产物提取分离与活性研究,E-mail:dear_z20@163.com

[通信作者] *张珂,副教授,硕士生导师,博士,从事天然产物提取分离与活性研究,E-mail:tem_zk@163.com

2. School of Pharmacy, Shenzhen University of Technology, Shenzhen 518118, China;
3. Key Laboratory of Xinjiang Fruit Tree Breeding and Cultivation, Urumqi 830052, China;
4. School of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the efficacy and mechanism of *Euphorbia humifusa* on acute kidney injury (AKI) based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification. **Methods:** The active components and targets of *E. humifusa* were retrieved from TCMSP and SwissTargetPrediction database, and the AKI targets were screened by GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) databases. The drug targets and disease targets were intersected to construct a protein-protein interaction network, and the intersection targets were subjected to gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. Discover Studio software was used to verify the molecular docking of key components and core targets. Gentamicin (GM) was used to induce AKI rat model. Control group, model group, verapamil ($16 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, *E. humifusa* extract ($18, 54, 162 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) group and *E. humifusa* 70% ethanol extract ($423 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group were continuously administered for 14 days. Urine volume was detected 24 h after modeling and administration. Serum creatinine (SCr), Blood urea nitrogen (BUN), 24-hour urine protein (24 hUTP) and uric acid (UA) content; the contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), carbon monoxide synthase (NOS) and lactate dehydrogenase (LDH) in kidney were measured. The levels of interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The pathological changes of renal tissue were detected by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Western blot was used to detect the expression of PI3K/protein kinase B (Akt)/NF- κ B signaling pathway-related proteins. **Results:** In this study, 13 active components such as kaempferol, luteolin, apigenin, gallic acid and quercetin were screened and identified from *E. humifusa*. Through bioinformatics analysis, these components and AKI have a total of 289 targets, of which 62 are core targets, including Akt1, TNF, tumor protein p53 (TP53) and IL-1 β . These targets are mainly involved in the regulation of biological processes such as NF- κ B signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, TNF signaling pathway, PI3K/Akt signaling pathway and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. In animal experiments, we successfully constructed a GM-induced AKI model in rats. Compared with the model group, *E. humifusa* extract could significantly reduce the levels of 24 hUTP, BUN and SCr in rats ($P<0.01$), indicating its improvement effect on renal function. In addition, the extract of *E. humifusa* also significantly reduced LDH activity and MDA content in rat kidney tissue ($P<0.05$, $P<0.01$), and significantly increased SOD, NOS activity and GSH content ($P<0.05$), indicating that the extract of *E. humifusa* has the potential of anti-oxidation and protection of renal function. Further analysis of inflammatory factors showed that the levels of IL-6 and TNF- α in serum of rats treated with *E. humifusa* extract were significantly decreased ($P<0.01$), indicating that *E. humifusa* extract had anti-inflammatory effects. In addition, the extract of *E. humifusa* can also regulate the protein expression of PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway, which further confirmed its mechanism of reducing GM-induced AKI. **Conclusion:** The extract of *E. humifusa* has a significant therapeutic effect on acute kidney injury through its multi-component and multi-target mechanism. Its effect is reflected in improving renal function, anti-oxidation, anti-inflammation and regulating immune response. These findings provide a scientific basis for the application of *E. humifusa* in the treatment of acute kidney injury, and point out the direction for future drug development and clinical research.

[Keywords] *Euphorbia humifusa*; gentamicin; acute kidney injury; oxidative stress

急性肾损伤(AKI)是指因疾病或药物所导致的肾脏正常排泄功能在短时间内全部或部分丧失的肾脏疾病^[1],是一种临床常见的肾脏疾病,其特征是尿量显著减少、血清肌酐水平迅速升高,或两者兼而有之^[2]。通常AKI患者的住院死亡率在20%~50%或者更高。除去病理性AKI外,多数药源性AKI的发生都是由氨基糖苷类抗生素(AMG)引起^[3-6]。

氨基糖苷类抗生素是一类具有强大杀菌能力、低细菌耐药性和抗生素后效应的老牌抗生素,广泛应用于治疗严重的革兰氏阴性细菌感染,因而具有广泛的应用价值^[7]。然而,其肾损伤性限制了临床上的广泛应用^[8]。在氨基糖苷类抗生素中,庆大霉

素的抗菌谱最宽,杀菌效力仅次于 β -内酰胺类的阿莫西林,但其具有较为严重的肾损伤性,其肾损伤的病理机制主要依赖于免疫、炎症和氧化应激级联反应的刺激^[9]。此外,庆大霉素还可能通过增加肾脏组织自由基生成和降低抗氧化防御机制,引发急性小管坏死和肾小球充血,最终导致肾功能障碍^[10-13]。因此,探索有效的治疗靶点和药物对改善AKI患者的预后具有重要临床意义。

地锦草作为一种传统中药,是大戟科植物地锦的全草干燥后进行入药。性温平,味辛辣,归肝经和大肠经,具有清热解毒、凉血止血的功效^[14]。现代药理学研究发现,地锦草具有抗氧化、抑制肾功能损伤等生物活性,表明地锦草治疗肾损伤具有良

好的前景。然而,地锦草水提取物与70%乙醇提取物的活性成分存在不同,单独提取无法充分发挥其药理活性,本研究将2种提取浸膏混合后进行富集,保留了更多的活性成分,从而增强其药效作用^[15]。已有研究证明维拉帕米可以减轻AKI中的炎症损伤并阻止近端肾小管上皮细胞凋亡,最终改善间质纤维化^[16]。本研究通过大鼠体内实验,以维拉帕米为阳性药物,初步探究地锦草预防和治疗AKI的物质基础和作用机制。

基于AKI的高发病率和严重预后,以及氨基糖苷类抗生素的严重肾损伤性,结合地锦草的抗氧化和抗炎特性,本研究应用网络药理学和分子对接技术,探究地锦草中活性成分对AKI的潜在作用机制,并通过体内实验进行验证,旨在为地锦草治疗AKI提供理论依据,揭示地锦草中活性成分的作用机制,为AKI的治疗提供新的思路和策略。

1 材料

1.1 药材 地锦草购买于亳州市中正中药材饮片有限公司(批号20100108),产地新疆,经石河子大学王琪教授鉴定其为大戟科植物地锦 *Euphorbia humifusa* 的干燥全草。

1.2 动物 SPF级雄性 Sprague-Dawley 大鼠70只,体质量220~270 g,购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,合格证号SCXK(豫)2019-0002。大鼠饲养于石河子大学药学院动物实验中心,室温保持在20~25℃、相对湿度50%~60%、12 h/12 h昼夜光变化,提供标准的食物颗粒和水。

1.3 伦理 动物实验方案中使用的麻醉剂、实验方法及动物数量均经石河子大学附属医院伦理委员会批准,伦理批准编号A2024-306。

1.4 药物与试剂 硫酸庆大霉素注射液(宜昌人福药业,国药准字H42022058,规格2 mL:8万单位×10支);盐酸维拉帕米片(天津市中央药业有限公司,国药准字H12020051,规格40 mg×30片);尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)、24 h尿蛋白定量(24 hUTP)、尿酸(UA)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮合酶(NOS)试剂盒、马松(Masson)染液(南京建成生物工程研究所,货号分别为C013-2-1、C011-2-1、C035-2-1、C012-2-1、A045-4、A001-3-2、A003-1-2、A006-2-1、A020-2-2、A014-1-2、D026-1-3),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号为G1120);大鼠白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 酶联免疫

吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号分别为E-EL-R0015c、E-EL-R2856c);核转录因子(NF)- κ B p65/RELA、NF- κ B抑制蛋白(I κ B) α /NFKBIA、蛋白激酶B(Akt)1/2/3抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为BA0610、BM3932、BM4400);phospho-Akt1/2/3(Ser473)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K) p85 α /PIK3R1、phospho-PI3K p85 α (Tyr607)抗体,IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、ECL发光液(亲和生物科技有限公司,批号分别为AF0016、A00318-1、AF3241、DF6087、AF7014、AF5103、KF8005);辣根酶标记兔抗山羊免疫球蛋白G(IgG,H+L)和辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)和 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(中山金桥生物技术有限公司,批号分别为ZB-2306、ZB-2305、TA-9)。

1.5 仪器 906GP型-80℃冰箱、Sorvall ST 8R型高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司);TGL-15B型离心机(上海安亭科学仪器厂制造);GT200型球磨机(上海净信实业发展有限公司);DB-09型石蜡包埋机(湖北德力森科技有限公司);3001型全自动酶标仪(美国Thermo公司);Axio Imager A2型正置高分辨荧光显微镜(北京博瑞斯科技有限公司);Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell型凝胶电泳仪[(伯乐生命医学产品(上海)有限公司)];DYCZ-TRANS2型转印电泳仪(北京六一生物科技有限公司);FUSION FX6-XT型多功能化学发光荧光凝胶成像系统(法国Vilber Bio Imaging公司)。

2 方法

2.1 地锦草保护肾功能作用机制网络药理学及分子对接分析

2.1.1 地锦草活性成分的查找与筛选 在中药系统药理数据分析平台(TCMSP)数据库中检索“地锦草”获得地锦草化学成分。通过PubChem数据库补充化合物的名称及Smiles号。在Swiss ADME中导入Smiles号,通过药动学规则筛选。筛选标准:(1)Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge中2种及以上的类药性原则为“yes”,表明化合物具有良好的成药性;(2)肠胃吸收结果为“high”,表明化合物具有良好的生物利用度。同时满足上述2条标准的化合物为地锦草中有效的活性成分。将筛选的地锦草活性成分的Smiles号导入SwissTargetPrediction数据库,每个活性成分取“probability”值>0的潜在作用靶点,汇总所有靶点信息。

2.1.2 AKI靶点预测与药物-疾病共同靶点收集 通过GeneCards数据库和在线人类孟德尔遗传

(OMIM)数据库,以关键词“acute kidney injury”收集AKI相关基因,去除重复基因后,确定AKI的潜在作用靶点。使用Venny 2.1.0将地锦草活性成分靶点与AKI疾病相关靶点取交集。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将地锦草与AKI共同靶点导入STRING数据库进行分析,结果保存为*tsv格式文件并导入Cytoscape 3.7.2软件中,运用“Network Analyzer”的功能对PPI结果进行网络拓扑学分析,构建PPI网络,利用Cytoscape 3.7.2软件中的插件CytoNCA进行核心靶点的筛选。

2.1.4 基因本体(GO)生物功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 通过DAVID数据库对得到的交集靶点进行GO功能注释和KOBAS数据库对交集靶点进行KEGG通路富集分析,利用微生信平台对GO和KEGG通路富集结果进行可视化分析。

2.1.5 “活性成分-靶点-疾病-通路”网络构建 将地锦草活性成分、AKI和富集到的前20条KEGG通路及其涉及的靶点数据整合,导入Cytoscape 3.7.2软件中构建“活性成分-靶点-疾病-通路”网络。

2.1.6 分子对接 将“活性成分-靶点-疾病-通路”网络中中度值排名前5位的有效活性成分与PPI网络中前5位的潜在靶点进行分子对接。在PubChem数据库中获取地锦草活性成分的SDF文件,作为配体文件。蛋白质受体文件从PDB数据库中获取,通过软件对蛋白受体进行去水、加氢等操作。使用Discovery Studio进行分子对接并计算结果,受体-配体的结合程度可以通过分子对接结果中的结合能水平来判断。结合能越高,对接效果越好。

2.2 动物实验

2.2.1 地锦草大孔树脂富集物(EHEE)的制备 地锦草70%乙醇提液浸膏(EHAE)的制备:取干燥的地锦草饮片,第1次加入10倍量70%乙醇,回流提取2 h,收集提取液,第2次加入8倍量70%乙醇,微沸提取2 h,收集提取液,合并2次提取液,回收得流浸膏,提取率为31.35%。

EHEE的制备:地锦草70%乙醇提取2次后,第3次加入8倍量纯水,微沸提取2 h,将提取液全部收集,回收得流浸膏。将地锦草70%乙醇提液浸膏745.08 g与水提物浸膏437.12 g混合均匀后,取混合浸膏500 g加入纯水1 000 mL分散,将分散好的浸膏过HPD-100型大孔吸附树脂进行吸附,吸附完成后使用纯水洗脱2个体积,接着使用70%乙醇洗脱

8个体积,浓缩后得到EHEE浸膏,提取率11.94%。

2.2.2 分组及给药 将大鼠适应性饲养1周后,取体质量(220±20)g的SD大鼠70只,随机分为正常组(10只),庆大霉素诱导造模组(60只)。庆大霉素诱导组大鼠每天腹腔注射庆大霉素(100 mg·kg⁻¹)1次,连续7 d,建立AKI模型,收集尿液然后眼眶取血,检测SCr、BUN、UA、24 hUTP含量,给药组与正常组有统计学差异确定造模成功^[17-18]。将造模成功的大鼠分为模型组、EHEE(18、54、162 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组,EHAE423 mg·kg⁻¹组及维拉帕米(16 mg·kg⁻¹)6个组,每组10只。庆大霉素剂量根据课题组前期实验结果制订^[17],维拉帕米组根据人的给药剂量换算而来。地锦草在2020年版《中华人民共和国药典》中,规定成人用药量9~20 g。结合前期实验结果,确定了地锦草生药成人每日用药量为5 g·(70·kg)⁻¹,换算后为71.4 mg·kg⁻¹,进一步换算出大鼠的每日给药量为450 mg·kg⁻¹。经过计算EHEE的提取率为11.94%,则相应的EHEE的给药剂量为53.71 mg·kg⁻¹。以此剂量为中间剂量,并按照3倍剂量梯度关系设定低剂量和高剂量,最终确定EHEE的低、中、高给药剂量分别为18、54、162 mg·kg⁻¹;EHAE的提取率为31.35%,计算出EHAE的给药剂量为140.63 mg·kg⁻¹,在此基础上,按照3倍剂量梯度关系确定EHAE的给药剂量为423 mg·kg⁻¹。

第8天起,以0.01 mL·(200 g)⁻¹的灌胃溶液量对各组大鼠进行灌胃给药,EHEE组和EHAE组给予相应剂量的溶液,维拉帕米组给予维拉帕米溶液,正常组和模型组则通过口服给予相应的空白溶剂,连续给药治疗14 d。

2.2.3 样本采集与处理 治疗结束后第1天,将大鼠置于代谢笼中收集24 h尿液,尿液分装后于-80℃保存待检。尿液收集结束后,用1%戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,腹主动脉取血,4℃静置2 h,3 500 r·min⁻¹离心5 min(离心半径12 cm,下同)收集血清,储存于-80℃,供测血生化指标。取双侧肾袢除肾包膜,在预冷的生理盐水中洗涤,分别称质量计算大鼠肾指数,左侧肾脏拍照记录后沿矢状面剖开,使用10%中性甲醛溶液浸泡于阴凉干燥处固定,右侧肾组织用锡箔纸包裹于-80℃保存。

2.2.4 尿液和血清检测 利用全自动生化分析,检测尿液中24 hUTP,血清中BUN、SCr和UA的含量。ELISA法按照使用说明书检测IL-6和TNF-α。

2.2.5 组织生化指标检测 利用全自动生化分析检测肾脏组织根据说明书检测肾脏组织中MDA、

GSH、SOD、NOS和LDH的含量。

2.2.6 肾组织病理学观察 将固定的肾组织进行石蜡包埋制备组织切片,脱蜡,进行HE染色,染色后的切片脱水透明,封片,高倍光学显微镜下观察肾组织病理变化并拍照。

将肾组织石蜡切片脱蜡后根据Masson染液说明书进行Masson染色,吹干后,封片,在高倍光学显微镜下观察肾组织纤维化程度并拍照。

2.2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾组织PI3K/Akt/NF- κ B信号通路相关蛋白的表达 取各组大鼠肾组织,使用蛋白酶抑制剂与细胞裂解液提取肾组织匀浆总蛋白。 $12\ 000\ r\cdot\min^{-1}$ 离心10 min,收集上清液。用BCA法检测蛋白浓度。将上述蛋白溶液与4 \times 的上样缓冲液混合后,置于沸水中加热5 min。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,于5%脱脂奶粉中封闭2 h后,分别加入磷酸化(p)-Akt、Akt、p-PI3K、PI3K、NF- κ B p65、I κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 β -actin一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜;TBST洗涤后,加入二抗(1:10 000),孵育1.5 h,加入化学发光试剂检测蛋白条带,通过凝胶成像系统显影,并用Image J软件分析条带灰度值。

2.2.8 统计学分析 使用GraphPad Prism 8.0进行数据分析和可视化,数据以 $\bar{x}\pm s$ 可视化表现,两两比较采用 t 检验分析,多组比较符合正态分布、方差齐时采用单因素方差分析(One-way ANOVA);方差不齐时采用Brown-Forsythe和Welch ANOVA检验。如不满足正态分布,则采用Kruskal-Wallis检验, $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学分析 通过数据库收集地锦草的活性成分,共得到38个活性成分,通过药理学规则筛选,发现13个活性成分符合要求。SwissTargetPrediction数据库收集13个活性成分的靶点,汇总后剔除重复靶点,最终获得406个地锦草潜在靶点。通过GeneCards数据库和OMIM数据库搜索AKI相关的潜在靶点,去除重复后共得到4 445个潜在靶点。将地锦草靶点与AKI潜在靶点取交集后共得到289个交集靶点,即为地锦草抗AKI的潜在靶点。接着,将交集靶点导入STRING数据库,构建PPI网络,采用Cytoscape软件对PPI网络进行可视化,共涉及289个节点和6 220条边,其中度值越大,节点越大,表明对应的重要程度越高。以Degree unDir \geq 41.24, Closeness unDir \geq 0.001 959,

Betweenness unDir \geq 258.88为筛选条件,筛选并分析网络,最终获得ATP结合盒亚家族B成员1(ABCB1)、Akt、NF- κ B1、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)3、IL-1 β 和TNF等62个核心靶点。最后采用Cytoscape软件可视化“活性成分-靶点-疾病-通路”网络图。见增强出版附加材料。

KEGG富集分析共得到246条通路,选取富集程度最高的20条结果绘制KEGG富集通路气泡图,结果显示地锦草活性成分抗AKI主要分布在NF- κ B、TNF、PI3K/Akt、MAPK和缺氧诱导因子-1(HIF-1)等信号通路。见增强出版附加材料。

GO生物功能富集条目共116条,其中生物过程(BP)64条,分子功能(MF)15条,细胞组分(CC)37条。GO富集涉及的生物过程主要包括蛋白磷酸化对激酶活性的正调控、细胞表面受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、炎症反应的负调控、炎症反应、腺苷酸环化酶激活肾上腺素能受体信号通路等;涉及的细胞组成主要富集到细胞外空间、质膜、基底膜、细胞核等;涉及的分子功能主要富集到ATP结合核受体活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、前列腺素E受体活性、细胞周期蛋白依赖性蛋白丝/苏氨酸激酶活性等过程。

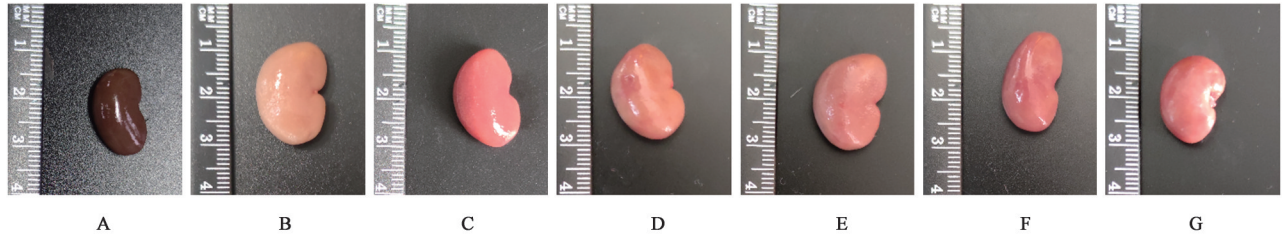
3.2 分子对接 为进一步探究地锦草中化合物治疗AKI的关键靶蛋白的结合位点和结合模式,通过RCSB PDB蛋白数据库获取地锦草关键蛋白PDB文件,通过PubChem数据库获取地锦草中关键化合物SDF文件。使用Discovery studio 4.5进行分子对接。选取评分较高的分子-配体进行分子对接可视化。结果表明,地锦草中4',5-dihydroxyflavone、鞣花酸、ensaculin、槲皮素、谷甾醇可稳定地结合Akt(PDB ID:1UNQ)、IL-1 β (PDB ID:1HIB)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶Src(PDB ID:1A07)、TNF(PDB ID:2AZ5)和肿瘤蛋白p53基因(TP53, PDB ID:8F0W)等关键靶点。因此,地锦草可能通过PI3K/Akt信号通路和炎症信号通路发挥抗AKI的作用。见增强出版附加材料。

3.3 体内实验验证

3.3.1 地锦草对AKI大鼠肾脏指数及外观的影响 对比观察各组肾脏外观,结果显示正常组大鼠肾脏体积相对较小,颜色为深红色且色泽饱满,而模型组大鼠肾脏较其他组更加肿大且肾脏颜色变浅趋近于白色,这是AKI典型的病理变化。经过维拉帕米和地锦草治疗后,肾脏肿胀情况有所好转,且肾脏颜色逐渐红润,这表明地锦草可能对肾脏具

有保护作用。此外,肾脏指数的测量结果进一步证实了观察到的变化:与正常组比较,模型组的肾脏指数显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,EHAE组肾脏指数显著降低($P<0.01$)。表明地锦草治疗能够

显著改善由庆大霉素诱导的AKI大鼠的肾脏病理状态,减轻肾脏损伤。肾脏指数的降低反映了地锦草对肾脏体积和质量的积极影响,这与观察到的肾脏外观改善相一致。见图1、表1。



注:A.正常组;B.模型组;C.维拉帕米组;D-F.EHEE低、中、高剂量组;G.EHAE组(图2-图4同)

图1 地锦草对AKI大鼠肾脏形态的影响

Fig. 1 Comparison of kidney of *Euphorbia humifusa* on GM-induced AKI in rats

表1 地锦草对AKI大鼠肾脏指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of *Euphorbia humifusa* on GM-induced AKI kidney index in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	肾指数
正常组		0.006 7±0.000 3
模型组		0.013 0±0.002 7 ¹⁾
维拉帕米组	16	0.009 7±0.002 1
EHEE低剂量组	18	0.011 8±0.002 1
EHEE中剂量组	54	0.009 9±0.001 8
EHEE高剂量组	162	0.009 6±0.000 8
EHAE组	423	0.009 1±0.000 3 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$

3.3.2 地锦草对AKI大鼠24 hUTP和血清BUN、SCr含量的影响 通过测定24 hUTP、BUN及SCr是判断肾损伤发生发展程度。实验结果表明,与正常组比较,模型组大鼠的24 hUTP水平显著升高($P<0.01$),表明肾脏功能受损。EHEE组和EHAE组大鼠的24 hUTP含量则呈现出剂量依赖性的显著降低($P<0.01$),这表明地锦草提取物对肾脏具有保护作用,能够减轻24 hUTP的排泄。与正常组比较,模型组大鼠血清中的BUN和SCr含量显著升高($P<0.01$),这也是肾功能损伤的典型标志。与模型组比较,EHEE高剂量组和EHAE高剂量组,其血清BUN和SCr含量明显降低($P<0.05, P<0.01$),并且这种降低效果同样呈现出剂量依赖性。这一系列结果表明,地锦草提取物不仅能够减少24 hUTP的排泄,还能够改善血清中的肾功能指标,从而对AKI具有显著的治疗作用。见表2。

3.3.3 地锦草对AKI大鼠肾组织GSH、SOD、MDA、LDH和NOS活力及含量的影响 与正常组

表2 地锦草对AKI大鼠肾功能指标的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of *Euphorbia humifusa* on renal function indexes in AKI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	24 hUTP/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组		3.65±0.85	36.44±4.87	3.81±0.29
模型组		15.04±1.17 ¹⁾	188.70±46.54 ¹⁾	7.65±0.98 ¹⁾
维拉帕米组	16	5.64±0.83 ³⁾	53.33±10.32 ³⁾	5.21±0.70 ³⁾
EHEE低剂量组	18	11.08±0.79 ³⁾	177.6±26.86	6.55±0.98
EHEE中剂量组	54	7.67±1.31 ³⁾	145.00±43.49	5.46±1.04 ²⁾
EHEE高剂量组	162	5.84±0.94 ³⁾	96.75±21.37 ³⁾	5.09±0.76 ³⁾
EHAE组	423	4.67±0.92 ³⁾	56.26±12.78 ³⁾	5.93±0.39

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05, ^3)$ $P<0.01$

比较,模型组大鼠的肾组织中MDA、LDH和NOS的含量及其活性显著增加($P<0.01$),这反映了氧化应激和细胞损伤的加剧。同时,SOD的活性和GSH的含量明显降低($P<0.05, P<0.01$),表明了机体抗氧化防御机制的削弱。经过EHEE治疗后,观察到明显的改善效果。治疗组大鼠的肾组织中MDA含量及LDH和NOS的活性明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),这表明地锦草的抗氧化作用有助于减轻氧化应激和细胞损伤。同时,SOD的活性和GSH的含量得到了明显提升,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),显示出地锦草在增强机体抗氧化能力方面的潜力。这些结果表明,EHEE通过调节氧化应激和抗氧化平衡,对AKI大鼠具有显著的保护作用。这证实了地锦草在治疗AKI方面的潜在价值。见表3。

表3 地锦草对AKI大鼠氧化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of *Euphorbia humifusa* on oxidation index of AKI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	GSH/mmol·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	LDH/U·g ⁻¹	NOS/U·mg ⁻¹
正常组		18.95±6.28	147.80±24.11	1.63±0.18	13.12±1.50	0.29±0.08
模型组		9.46±1.70 ¹⁾	81.15±28.19 ²⁾	2.38±0.55 ²⁾	20.88±6.20 ²⁾	0.70±0.12 ²⁾
维拉帕米组	16	10.92±2.44	139.90±30.01 ⁴⁾	2.04±0.48	15.99±3.51	0.45±0.14
EHEE低剂量组	18	10.70±2.07	136.20±22.12 ³⁾	1.97±0.30	15.39±2.25 ⁴⁾	0.50±0.17
EHEE中剂量组	54	15.95±3.40 ⁴⁾	153.6±36.13 ⁴⁾	1.73±0.33 ⁴⁾	15.35±1.84 ³⁾	0.44±0.10 ⁴⁾
EHEE高剂量组	162	19.91±3.60 ⁴⁾	144.10±27.96 ⁴⁾	1.74±0.29 ⁴⁾	16.53±1.43	0.35±0.06 ⁴⁾
EHAE组	423	7.82±2.80	140.80±29.91 ⁴⁾	1.70±0.25 ⁴⁾	15.91±1.80 ³⁾	0.36±0.114 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表4-表6同)

3.3.4 地锦草对AKI大鼠血清IL-6、TNF-α水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清IL-6、TNF-α含量明显增高($P<0.05$),这一变化是AKI炎症反应的生物标志。经地锦草治疗后AKI大鼠血清中IL-6、TNF-α含量相较于庆大霉素组出现了明显降低($P<0.05, P<0.01$),说明地锦草可以降低AKI大鼠炎症因子水平,从而有助于改善肾损伤。这些结果提示地锦草的这一抗炎作用可能与其调节免疫反应和减轻炎症损伤的能力有关。通过降低IL-6和TNF-α等关键炎症介质的水平,地锦草可能有效地缓解了AKI大鼠的肾脏炎症过程。见表4。

表4 地锦草对AKI大鼠血清炎症因子的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of *Euphorbia humifusa* on serum inflammatory factors in AKI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF-α	IL-6
正常组		22.23±1.86	19.01±0.40
模型组		85.87±12.74 ¹⁾	24.44±2.66 ¹⁾
维拉帕米组	16	37.19±5.72 ⁴⁾	18.81±0.47 ⁴⁾
EHEE低剂量组	18	64.85±13.55 ³⁾	21.13±1.56
EHEE中剂量组	54	50.44±10.97 ⁴⁾	19.58±1.46 ³⁾
EHEE高剂量组	162	36.37±5.38 ⁴⁾	19.37±1.10 ⁴⁾
EHAE组	423	29.95±4.20 ⁴⁾	19.28±0.79 ⁴⁾

3.3.5 地锦草对AKI肾脏组织病理变化的影响 HE染色结果表明,正常组大鼠肾脏细胞排列紧密,肾小管结构及细胞形态均未见明显异常。模型组大鼠肾脏组织微观结构出现的病理性改变是非常明显的,主要表现为肾脏细胞散乱,空泡化严重,肾间质中出现大量炎性细胞浸润,这些都是AKI的典型特征。经地锦草富集物治疗后,即使是低剂量处理,大鼠的肾组织切片也显示出了显著的改善,即肾小管上皮细胞的坏死现象减少,肾小管空泡化程度减轻,炎性细胞的浸润也有所减少。当中剂量、

高剂量的地锦草富集物及地锦草醇提物和维拉帕米治疗组的大鼠肾组织仅表现出轻度的肾小管变性,并无明显的炎性浸润。这些发现表明,地锦草富集物能够以剂量依赖的方式AKI大鼠的肾脏病理损伤,显著改善了肾脏组织的病变,见图2。进一步的Masson染色结果则显示,所有实验组之间的染色结果没有显著差异,这表明庆大霉素诱导的AKI并未发生进一步的发展,说明模型构建是成功的且相对稳定,见图3和增强出版附加材料。综上所述,地锦草富集物不仅能够显著改善AKI大鼠的肾脏病理损伤,还能够稳定肾脏组织的病变状态,这为地锦草在AKI治疗中的应用提供了有力的形态学证据。

3.3.6 地锦草对AKI肾脏组织PI3K/Akt/NF-κB信号通路相关蛋白的影响 笔者对大鼠肾组织中PI3K/Akt/NF-κB信号通路上的蛋白的表达水平进行了分析。与正常组比较,模型组大鼠的肾组织中p-PI3K和p-Akt蛋白表达下降,IκBα、TNF-α、IL-1β和IL-6蛋白表达明显上调($P<0.05, P<0.01$),这一变化与AKI期间的炎症反应和细胞应激相关。在给予EHEE治疗后,与模型组比较,EHEE高剂量组大鼠肾组织p-Akt蛋白表达呈上调趋势,但差异无统计学意义。p-PI3K蛋白表达显著上调($P<0.01$);NF-κB p65和TNF-α蛋白表达呈下调趋势,但差异无统计学意义。IκBα、IL-1β和IL-6蛋白表达明显下调($P<0.05, P<0.01$)。这一结果表明,地锦草富集物可能通过调节PI3K/Akt/NF-κB信号通路,抑制氧化应激和炎症反应,从而对AKI大鼠具有保护作用。PI3K/Akt信号通路可以通过激活抗氧化酶[如SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和过氧化氢酶(CAT)]来提高细胞的抗氧化能力^[19]。NF-κB信号通路是细胞应对炎症和应激的关键调节因子,其激活可导致多种炎症介质(TNF-α、IL-1β和IL-6)的表

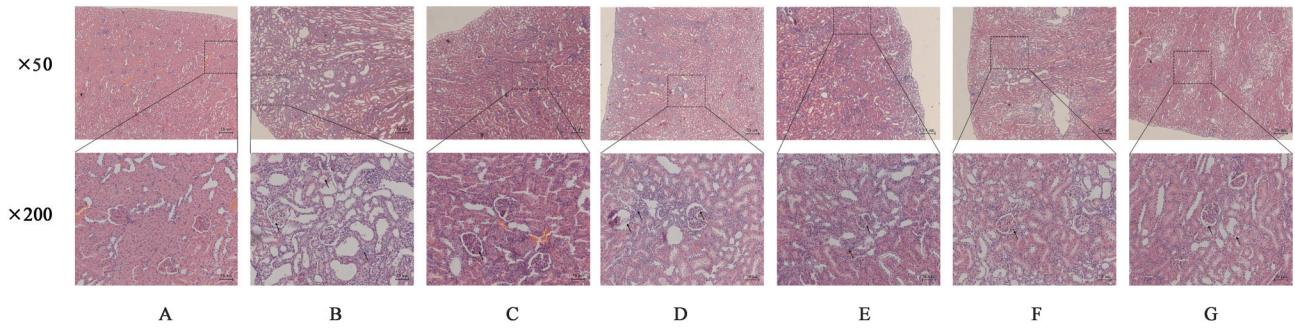


图2 地锦草对AKI大鼠肾脏组织病理改变的影响(HE)

Fig. 2 Effect of *Euphorbia humifusa* on pathological changes of kidney tissue in AKI rats (HE)

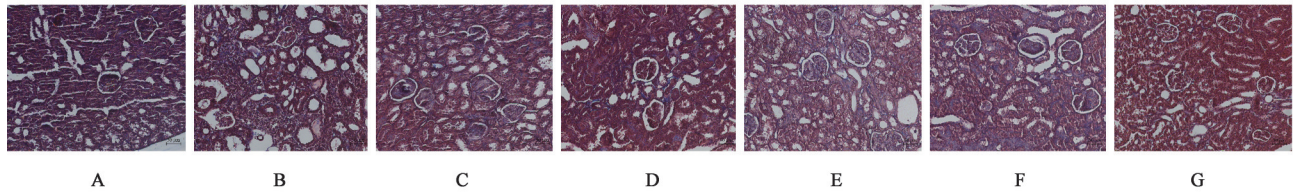


图3 地锦草对AKI大鼠的肾脏组织的影响(Masson, x200)

Fig. 3 Pathological changes of *Euphorbia humifusa* on renal tissue in AKI rats (Masson, x200)

达增加。Akt可以直接或间接激活IKK复合体,促进I κ B的磷酸化和降解,从而释放NF- κ B进入细胞核,激活目标基因的转录。因此,地锦草富集物对PI3K/Akt/NF- κ B信号通路的调节作用,可能是其减轻肾脏病理损伤和改善肾功能的分子机制之一。这些发现为地锦草在肾脏疾病的治疗中提供了新的分子靶点和治疗策略。见表5,图4、表6。

4 讨论

庆大霉素诱导的AKI是临床情况下经常遇到的破坏性并发症,主要机制是肾小管细胞凋亡^[20]。地锦草具有抗病毒、抗肿瘤、抗炎和抗氧化活性,其特异的抗炎抗氧化作用对于AKI具有较好地治疗作用,但其作用机制尚未完全明确。本研究联合网络药理学,结合庆大霉素诱导AKI模型进行实验验证,初步揭示地锦草改善AKI的作用及作用机制。

本研究通过对地锦草治疗AKI的靶点进行PPI

网络分析,共鉴定出62个核心靶点,包括ABCB1、Akt、NF- κ B1、MAPK3、IL-1 β 和TNF等。进一步的分子对接验证显示,地锦草中的关键化合物能够与这些关键靶点稳定结合,揭示了这些靶点在地锦草改善AKI过程中发挥着重要作用^[21-22]。KEGG富集分析结果表明,NF- κ B信号通路、TNF信号通路、PI3K/Akt信号通路、MAPK信号通路和HIF-1信号通路等在地锦草改善AKI中发挥着关键作用。这些信号通路的激活或抑制可能通过调节炎症反应、细胞凋亡和肾小管上皮细胞的修复等机制,共同促进AKI的恢复。

一般情况下血清BUN和SCr水平越高则反映肾功能损伤越严重,两者也有着不同的含义,当血清BUN升高时提示肾脏实质发生了病变,当肾小球滤过发生降低时,则SCr会升高^[23-24]。本研究显示,模型组大鼠血清BUN和SCr升高,提示庆大霉素诱

表5 地锦草对AKI大鼠肾脏NF- κ B信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of *Euphorbia humifusa* on NF- κ B signaling pathway related proteins in kidney of AKI rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NF- κ B p65/ β -actin	I κ B α / β -actin	TNF- α / β -actin	IL-1 β / β -actin	IL-6/ β -actin
正常组		0.54 \pm 0.47	0.53 \pm 0.04	0.58 \pm 0.07	0.68 \pm 0.20	0.65 \pm 0.06
模型组		1.12 \pm 0.27	0.94 \pm 0.13 ²⁾	0.95 \pm 0.08 ²⁾	1.39 \pm 0.18 ¹⁾	0.98 \pm 0.11 ²⁾
维拉帕米组	16	0.77 \pm 0.20	0.54 \pm 0.17 ⁴⁾	0.89 \pm 0.03	0.89 \pm 0.45	0.68 \pm 0.11 ³⁾
EHEE低剂量组	18	0.91 \pm 0.16	0.90 \pm 0.11	1.19 \pm 0.45	1.02 \pm 0.31	0.85 \pm 0.16
EHEE中剂量组	54	1.00 \pm 0.12	0.81 \pm 0.11	0.87 \pm 0.20	0.73 \pm 0.10 ⁴⁾	0.89 \pm 0.13
EHEE高剂量组	162	0.72 \pm 0.10	0.69 \pm 0.04 ³⁾	0.74 \pm 0.14	0.67 \pm 0.01 ⁴⁾	0.65 \pm 0.11 ³⁾
EHA组	423	0.77 \pm 0.16	0.85 \pm 0.12	0.96 \pm 0.08	0.67 \pm 0.16 ⁴⁾	0.90 \pm 0.16

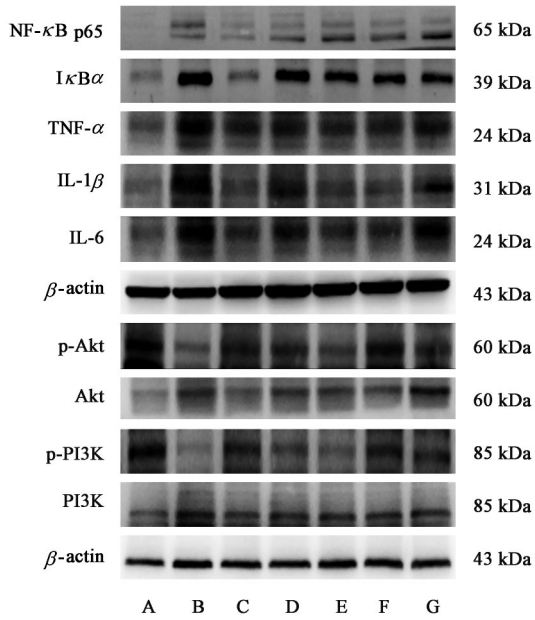


图4 各组大鼠肾脏组织PI3K/Akt/NF-κB信号通路蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway protein expression in kidney tissue of rats in each group

表6 地锦草对AKI大鼠肾脏PI3K/Akt信号通路相关蛋白的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of *Euphorbia humifusa* on PI3K/Akt signaling pathway related proteins in kidney of AKI rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	p-Akt/Akt	p-PI3K/PI3K
正常组		1.51±0.33	1.70±0.08
模型组		0.65±0.27 ¹⁾	0.55±0.13 ²⁾
维拉帕米组	16	1.07±0.16	1.31±0.14 ⁴⁾
EHEE低剂量组	18	0.83±0.18	0.86±0.09
EHEE中剂量组	54	1.08±0.11	1.11±0.39
EHEE高剂量组	162	1.21±0.29	1.06±0.08 ⁴⁾
EHA组	423	0.89±0.29	0.94±0.22

导大鼠肾小管出现明显水肿、坏死,地锦草及阳性药给药治疗后大鼠血清BUN、SCr均发生了明显降低,说明肾小管损伤得到了改善。这些结果提示地锦草可改善庆大霉素诱导的AKI,保护受损肾小管,对维持肾单位正常生理功能具有积极作用。

UTP是众多肾脏疾病的主要症状之一^[25]。蛋白尿的评估有助于及时有效地监测疾病的病程和评估药物治疗有效性^[26]。在本次实验中笔者统计了大鼠造模后和治疗后24 hUTP,结果显示经过庆大霉素诱导后的AKI大鼠出现了24 hUTP增多的情况,而在地锦草等药物治疗后庆大霉素诱导的AKI大鼠24 hUTP有了明显降低,说明地锦草能有效改善大鼠蛋白尿的症状。当大鼠出现严重AKI和慢性肾损伤时,UA会发生一定程度的增高^[27],使用

100 mg·kg⁻¹的庆大霉素作用大鼠7 d后检测血清UA结果显示无明显差异,说明此AKI模型肾损伤程度较为合适,无过度肾损伤也未拖延进展为慢性肾损伤。

LDH是一种于肝脏、肾脏、心肌、骨骼肌和红细胞中普遍存在高浓度存在的酶^[28]。肾脏在生物体中具有最高的静息能量代谢率,肾脏细胞代谢率对维持正常肾功能至关重要。在缺氧环境下,机体细胞主要依靠糖酵解途径来满足能量需求,本途径会产生丙酮酸和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)。在没有氧化磷酸化的情况下,糖酵解的继续依赖于NAD⁺从NADH的再生,并伴随着丙酮酸发酵成乳酸盐,该反应由LDH参与催化。因此,LDH的细胞释放被用作损伤标志物,然而,LDH在肾内的确切位置尚不清楚^[29-30]。在AKI和慢性肾脏疾病模型中,LDH表达均显著上升,这显示肾脏能量代谢率发生了明显下降,肾脏正常功能发生了异常^[31]。研究表明地锦草能有效地减少庆大霉素诱导的AKI大鼠肾脏LDH释放。

氧化应激在AKI大鼠引起的肾小管损伤的病理过程中有着重要的地位^[32]。MDA、SOD、GSH、NOS等是反映机体内氧化应激水平的主要物质,生物体内氧化应激反应中的抗氧化剂防御系统主要包括SOD和GSH等。除此之外,NOS也是反应氧化应激的重要指标,在体内NO主要由NOS途径产生,NO是生物体内普遍存在的血管舒张因子和信使分子^[33-35]。PI3K/Akt信号通路激活后,可以提高抗氧化系统中SOD和GSH,降低氧化系统中MDA和LDH等酶的表达,从而抑制氧化应激。本次实验结果表明,模型组大鼠肾组织中MDA含量和NOS活力相较于正常组发生了显著升高,而肾组织SOD活力和GSH含量则产生了显著降低,经地锦草各组 and 阳性药给药治疗后,给药组大鼠肾脏组织MDA含量和NOS活力相比模型组有了不同程度降低,SOD活力和GSH含量发生了明显升高。Western blot结果显示,庆大霉素诱导后,p-PI3K和p-Akt蛋白表达降低,给药治疗后蛋白表达水平增加,提示地锦草能够通过改善大鼠抗氧化能力,减少过氧化物的蓄积,从而减轻缓解肾脏氧化应激损伤状况来达到减轻或治疗肾脏损伤的作用。

庆大霉素诱导的大鼠AKI发生和发展过程中经常伴有不同程度的炎症反应^[36-37]。有研究发现,当庆大霉素诱导大鼠肾脏肾小管发生损伤时,肾小管上皮细胞会通过释放TNF-α、IL-6等炎性因子使

肾脏发生炎症。从机制上讲,脂多糖与肾小管上皮细胞的Toll样受体4(TLR4)结合,导致NF- κ B信号传导的激活及其下游炎症细胞因子的产生,例如IL-1 β 、TNF- α 和IL-6^[38]。在肾脏中,TNF- α 的过量分泌将会导致肾脏炎症反应的发生,而IL-6作为一种多效性促炎细胞因子,其失调与慢性炎症和多因素自身免疫紊乱有关,这两者分泌增多即会导致肾脏炎症反应加重^[39-40]。这些炎性细胞因子可能激活NF- κ B,放大初始炎症信号,并引发恶性循环,加剧炎症反应,进一步损害机体微循环^[41]。庆大霉素诱导后大鼠血清炎症因子IL-6、TNF- α 水平发生了明显增加,提示庆大霉素诱导大鼠肾组织已经发生了较为严重的炎症损伤。研究结果表明,模型组大鼠血清IL-6、TNF- α 炎症因子相较于正常组的水平有了显著升高,在经地锦草和阳性药给药治疗后,治疗组大鼠血清IL-6、TNF- α 水平出现了明显降低。此外,Western blot验证结果也显示,庆大霉素诱导后,NF- κ B、I κ B、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白水平增加,表明肾组织有严重的炎症损伤,地锦草给药后抑制了NF- κ B和炎症因子水平的增加。这些结果表明地锦草能有效降低庆大霉素诱导的AKI大鼠的促炎细胞因子水平,改善肾脏炎症反应,减轻了炎症因子对大鼠肾组织的进一步损伤。

综上所述,地锦草能有效减轻庆大霉素诱导的AKI,保护受伤肾小管,通过PI3K/Akt/NF- κ B信号通路缓解肾脏氧化应激损伤,改善肾脏炎症反应。这些作用可能与其抗氧化、抗炎和调节能量代谢的多重药理活性有关,为地锦草在肾脏疾病的治疗中提供了科学依据。

本研究通过网络药理学初步预测了地锦草改善AKI的作用机制,仅在动物实验层面探讨了地锦草通过PI3K/Akt/NF- κ B信号通路对AKI的影响,但未在细胞水平上开展相关研究,且地锦草可能通过其他通路对AKI产生影响,这些潜在机制有待进一步探究。在未来的研究中,课题组将根据网络药理学预测的结果,对地锦草的潜在作用靶点、活性成分和相关信号通路的作用机制进行深入研究。通过多层面的研究,全面揭示地锦草在AKI治疗中的潜在价值,为其后续的开发和利用提供理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] YOSU L, KEVIN L, CHANTAL J, et al. Vancomycin-associated cast nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28

(6):1723-1728.

- [2] CHEN W, WANG B, LIANG S, et al. Fullerenols as efficient ferroptosis inhibitor by targeting lipid peroxidation for preventing drug-induced acute kidney injury [J]. J Colloid Interface Sci, 2025, 680(Pt A): 261-273.
- [3] KELLUM J A, ROMAGNANI P, ASHUNTANTANG G, et al. Acute kidney injury [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1):52.
- [4] JACOB J, DANNENHOFFER J, RUTTER A. Acute kidney injury [J]. Primary Care Diabetes, 2020, 47(4): 571-584.
- [5] OH D J. A long journey for acute kidney injury biomarkers [J]. Ren Fail, 2020, 42(1): 154-165.
- [6] SASSEN M C, KIM S W, KWON T H, et al. Dysregulation of renal sodium transporters in gentamicin-treated rats [J]. Kidney Int, 2006, 70(6): 1026-1037.
- [7] HEFFERNAN A J, SIME F B, LIPMAN J, et al. Individualising therapy to minimize bacterial multidrug resistance [J]. Drugs, 2018, 78(6): 621-641.
- [8] ABD-ELMAWLA M A, ELSAMANOUDIE N M, ISMAIL M F, et al. The interplay of Tap SAKI and NEAT-1 as potential modulators in gentamicin-induced acute kidney injury via orchestrating miR-22-3p/TLR4/MyD88/NF- κ B/IL-1 β milieu: Novel therapeutic approach of betanin [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 143(Pt 3): 113577.
- [9] JOSPE-KAUFMAN M, SIOMIN L, FRIDMAN M. The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2020, 30(13): 127218.
- [10] SCHENTAG J J, CUMBO T J, JUSKO W J, et al. Gentamicin tissue accumulation and nephrotoxic reactions [J]. JAMA, 1978, 240(19): 2067-2069.
- [11] GURU A, SUDHAKARAN G, VELAYUTHAM M, et al. Daidzein normalized gentamicin-induced nephrotoxicity and associated pro-inflammatory cytokines in MDCK and zebrafish: Possible mechanism of nephroprotection [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2022, 258: 109364.
- [12] SOEORG H, PADARI H, KIPPER K, et al. Pharmacokinetics of Gentamicin Components C1, C1a, and C2/C2a/C2b and subsequent decline in glomerular filtration rate in neonates [J]. AAPS J, 2022, 24(4): 77.
- [13] KHAKSARI M, ESMAILI S, ABEDLOO R, et al. Palmatine ameliorates nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by gentamicin in rats [J]. Arch Physiol Biochem, 2021, 127(3): 273-278.
- [14] RAKOTONDRABE T F, FAN M, GUO M. Exploring potential antidiabetic and anti-inflammatory flavonoids from *Euphorbia humifusa* with an integrated strategy [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 980945.
- [15] 叶向库, 刘雪霏. 不同溶剂花生壳提取物抗氧化性的初步研究 [J]. 农产品加工·学刊, 2012(12): 42-43.
- YE X K, LIU X F. Preliminary study on antioxidant activity of peanut shell extracts with different solvents [J]. Academic

- Period Farm Prod Process, 2012(12):42-43.
- [16] SONG Y, GUO F, ZHAO Y, et al. Verapamil ameliorates proximal tubular epithelial cells apoptosis and fibrosis in diabetic kidney[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 911: 1745-52.
- [17] 丰姝姝, 高旭杰, 张珂, 等. 山楂叶提取物对庆大霉素诱导大鼠急性肾损伤的影响及机制研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2023, 41(2): 258-264.
- FENG S S, GAO X J, ZHANG K, et al. Effect of hawthorn leaf extract on gentamicin-induced acute kidney injury in rats and its mechanism[J]. J Shihezi Univ: Nat Sci, 2023, 41(2): 258-264.
- [18] LIU C, KANG Y, ZHANG H, et al. Establishment of simple and routine methods in early diagnosis of gentamicin-induced kidney injury based on a rat model[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 7160903.
- [19] ZHOU M H, ZHANG H, XU W J, et al. Effect of PI3K/Akt/HIF-1 α signaling pathway on oxidative stress and apoptosis in nucleus pulposus cells [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2024, 28(2): 446-456.
- [20] HUANG H, JIN W W, HUANG M, et al. Gentamicin-induced acute kidney injury in an animal model involves programmed necrosis of the collecting duct[J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(9): 2097-2115.
- [21] XIE W, YANG X, WU L, et al. Network pharmacology analysis: A promising approach for the research of traditional Chinese medicine[J]. J Explorat Res Pharmacol, 2020, 5(4): 49-50.
- [22] SHAHZADI Z, YOUSAF Z, ANJUM I, et al. Network pharmacology and molecular docking: Combined computational approaches to explore the antihypertensive potential of Fabaceae species[J]. Bioresour Bioprocess, 2024, 11(1): 53.
- [23] LEVEY A S, JAMES M T. Acute kidney injury [J]. Annals Int Med, 2017, 167(9): 66-80.
- [24] KAGAWA T, ZÁRYBNICKÝ T, OMI T, et al. A scrutiny of circulating microRNA biomarkers for drug-induced tubular and glomerular injury in rats [J]. Toxicology, 2019, 415: 26-36.
- [25] KAMIŃSKA J, DYMICKA-PIEKARSKA V, TOMASZEWSKA J, et al. Diagnostic utility of protein to creatinine ratio (P/C ratio) in spot urine sample within routine clinical practice [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2020, 57(5): 345-364.
- [26] PALLET N, BASTARD J P, CLAEYSSSENS S, et al. Proteinuria typing: How, why and for whom? [J]. Ann Biol Clin (Paris), 2019, 77(1): 13-25.
- [27] FATHALLAH-SHAYKH S A, CRAMER M T. Uric acid and the kidney [J]. Pediatr Nephrol, 2014, 29(6): 999-1008.
- [28] JURISIC V, RADENKOVIC S, KONJEVIC G. The actual role of LDH as tumor marker, biochemical and clinical aspects [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 867: 115-124.
- [29] OSIS G, TRAYLOR A M, BLACK L M, et al. Expression of lactate dehydrogenase A and B isoforms in the mouse kidney [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2021, 320(5): 706-718.
- [30] PARK J S, SAEED K, JO M H, et al. LDHB deficiency promotes mitochondrial dysfunction mediated oxidative stress and neurodegeneration in adult mouse brain [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(2): 261.
- [31] NASRALLAH H, AISSA I, SLIM C, et al. Effect of oleuropein on oxidative stress, inflammation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in rat kidney [J]. Life Sci, 2020, 255: 117833.
- [32] YAN L J, ALLEN D C. Cadmium-induced kidney injury: Oxidative damage as a unifying mechanism [J]. Biomolecules, 2021, 11(11): 1575.
- [33] UDI S, HINDEN L, AHMAD M, et al. Dual inhibition of cannabinoid CB (1) receptor and inducible NOS attenuates obesity-induced chronic kidney disease [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(1): 110-127.
- [34] CARNICER R, DUGLAN D, ZIBERNA K, et al. BH4 increases nNOS activity and preserves left ventricular function in diabetes [J]. Circ Res, 2021, 128(5): 585-601.
- [35] CARLSTRÖM M. Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health [J]. Nat Rev Nephrol, 2021, 17(9): 575-590.
- [36] MARTIN-SANCHEZ D, GUERRERO-MAUVECEIN J, FONTECHA-BARRIUSO M, et al. Bone marrow-derived RIPK3 mediates kidney inflammation in acute kidney injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2022, 33(2): 357-373.
- [37] FU Y, XIANG Y, LI H, et al. Inflammation in kidney repair: Mechanism and therapeutic potential [J]. Pharmacol Ther, 2022, 237: 108240.
- [38] YANG Y, XU J, TU J, et al. *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. extracts improve sepsis-associated acute kidney injury by inhibiting NF- κ B-mediated inflammation and pyroptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117101.
- [39] KAUR S, BANSAL Y, KUMAR R, et al. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28(5): 115327.
- [40] NISHAD R, MUKHI D, KETHAVATH S, et al. Podocyte derived TNF- α mediates monocyte differentiation and contributes to glomerular injury [J]. FASEB J, 2022, 36(12): e22622.
- [41] LIAN J, XU Y, SHI J, et al. Acteoside and isoacteoside alleviate renal dysfunction and inflammation in lipopolysaccharide-induced acute kidney injuries through inhibition of NF- κ B signaling pathway [J]. PLoS One, 2024, 19(5): e0303740.

[责任编辑 顾雪竹]