

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学和体外细胞实验分析黄芪治疗 IgA 肾病的作用机制

庞爽¹, 赵栓², 徐夏莲², 於佳炜², 丁小强^{1,2*}

(1. 复旦大学, 上海 200433; 2. 复旦大学附属中山医院, 上海肾脏疾病临床医学中心,
上海市肾脏疾病与血液净化重点实验室, 上海 200032)

[摘要] 目的:基于网络药理学方法分析黄芪治疗免疫球蛋白A肾病(IgAN)的多成分、多靶点、多通路作用机制,为该药材的基础研究和临床应用提供依据。方法:通过GeneCards,TCMID及中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)等数据库检索和文献挖掘筛选黄芪活性成分、作用靶点及与IgAN相关的疾病靶点,运用Cytoscape 3.7.1软件绘制网络图,利用网络拓扑分析黄芪治疗IgAN的关键靶点,采用R语言中的不同软件包分别进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。在此基础上,通过体外细胞实验验证黄芪中活性成分黄芪甲苷对人肾小球系膜细胞磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/肿瘤抑制基因p53(PI3K/Akt/p53)信号通路的激活作用。结果:筛选得到黄芪25个活性成分,49个药物-疾病共同作用靶点。GO功能富集分析包含条目84个,主要涉及细胞核激素受体结合、细胞核受体活性、脱氧核糖核酸结合转录激活因子活性等。KEGG通路富集分析包含通路88条,主要与PI3K/Akt信号通路、低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、晚期糖基化终末产物/晚期糖基化终末产物受体(AGE/RAGE)信号通路等密切相关。体外细胞实验证实,黄芪甲苷可通过调控PI3K/Akt/p53信号通路抑制重组人血小板衍生生长因子BB诱导的人肾小球系膜细胞增生。结论:黄芪多种活性成分可能通过作用于细胞凋亡、氧化应激和炎症反应等相关的靶点及通路,起到治疗IgAN的作用,为IgAN的新药开发及机制研究提供了思路。

[关键词] 黄芪; 免疫球蛋白A(IgA); IgA肾病; 网络药理学; 黄芪甲苷; 分子机制; 体外细胞实验

[中图分类号] R22;R857.3;R28;R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)15-0139-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210848 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210203.1038.002.html>

[网络出版日期] 2021-02-03 13:29

Analysis on Mechanism of Astragali Radix in Treating IgA Nephropathy Based on Network Pharmacology and *in Vitro* Cell Experiment

PANG Shuang¹, ZHAO Shuan², XU Xia-lian², YU Jia-wei², DING Xiao-qiang^{1,2*}

(1. Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Shanghai Key Laboratory of Kidney Disease and Blood Purification, Shanghai Clinical Medical Center of Kidney Disease, Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the multi-component, multi-target and multi-pathway mechanism of Astragali Radix against immunoglobulin A nephropathy (IgAN) by network pharmacology, aiming to provide evidence for its basic research and clinical application. **Method:** The active chemical components and targets of Astragali Radix and targets associated with IgAN were obtained by literature mining and GeneCards, Traditional

[收稿日期] 20201116(019)

[基金项目] 上海市肾脏疾病临床医学中心建设项目(2017ZZ01015);复旦大学附属中山医院优秀青年人才培养计划项目(2017ZSYX-QN07)

[第一作者] 庞爽,博士,从事中西医结合防治肾脏疾病研究工作,E-mail:pangshuang@fudan.edu.cn

[通信作者] *丁小强,主任医师,教授,从事中西医结合治疗肾脏疾病临床及科研工作,E-mail:ding_xiaoqiang@zs-hospital.sh.cn

Chinese Medicine Integrated Database (TCMID), Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) databases. Cytoscape 3.7.1 software was used to draw network interaction diagrams. The key targets of Astragali Radix against IgAN were searched by network topology. Gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis involved in the targets were analyzed by different packages in R programming language. On this basis, cell experiments *in vitro* were carried out to verify the activation effect of astragaloside IV on phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/tumor suppressor gene protein 53 (PI3K/Akt/p53) signaling pathway of human mesangial cells. **Result:** A total of 25 active components and 49 ingredient-disease targets of Astragali Radix were screened. The GO enrichment analysis included 84 items, which were related to nuclear hormone receptor binding, nuclear receptor activity, deoxyribonucleic acid binding transcriptional activation activity and other aspects. The KEGG pathway enrichment analysis included 88 KEGG pathways, which were closely related to PI3K/Akt signaling pathway, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway, advanced glycation end product/receptor of advanced glycation end product (AGE/RAGE) signaling pathway and others. Cell experiments *in vitro* confirmed that astragaloside IV could effectively inhibit the platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB)-induced proliferation of human mesangial cells by regulating PI3K/Akt/p53 signaling pathway. **Conclusion:** The active ingredients of Astragali Radix may play a role in the treatment of IgAN by acting on targets and pathways related to apoptosis, oxidative stress, inflammation response and others, providing ideas and directions for the new drug development and mechanism study of IgAN.

[Keywords] Astragali Radix; immunoglobulin A (IgA); IgA nephropathy; network pharmacology; astragaloside IV; molecular mechanism; *in vitro* cell test

免疫球蛋白A肾病(IgAN)是临床最常见的原发性肾小球肾炎之一,占原发性肾小球肾炎的25%~50%^[1],20%~40%的患者将逐渐出现肾小球硬化及间质纤维化^[2]。近年来其发病率在我国呈明显上升趋势,30%~40%的IgAN患者后期进展为进行性肾功能不全或终末期肾病^[3]。IgAN的主要病理机制是IgA₁分子糖基化障碍,形成大分子循环免疫复合物沉积于肾脏系膜区,进而诱发肾小球系膜细胞的过度增生。增生的肾小球系膜细胞导致健存肾单位进行性减少,引起渐进性的肾小球硬化。因此,抑制肾小球系膜细胞增生对减少IgAN肾小球硬化、抑制间质纤维化具有重要意义。使用糖皮质激素是目前IgAN最常用的治疗方法,但长期服用激素副作用大,同时撤减阶段病情易反复。因此,亟待挖掘新的治疗分子。

中药治疗IgAN具有明显优势,在疾病初期可养阴清热,避免激素副作用的过早出现,在激素撤减阶段可温阳补肾,恢复机体阴阳平衡,减少复发,起到减毒增效的作用^[4]。黄芪味甘,性微温,归脾、肺经,具有补气健脾、益卫固表、利尿消肿等功效^[5],能增加肾血流量、降低蛋白尿,是IgAN临床一线治疗最常用的中药之一。然而鉴于中药成分的复杂性和多靶点治疗的特异性,目前针对黄芪治疗IgAN

的作用机制尚未完全阐明。本研究拟借助网络药理学研究方法,筛选黄芪治疗IgAN的活性成分和作用靶点,并结合体外细胞实验进一步分析与验证黄芪治疗IgAN的分子机制,为黄芪治疗IgAN的临床应用提供新依据。

1 材料与方法

1.1 黄芪活性成分的收集与筛选 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)^[6]和中医药研究综合数据库TCMID^[7],并结合文献挖掘方法,对黄芪的活性成分进行检索。根据成分药代动力学吸收、分布、代谢、排泄(ADME)参数进行筛选,筛选条件为药物口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18,并查阅有机小分子生物活性数据库PubChem获得黄芪活性成分及其相应的典型SMILES结构,保存为SDF文件。

1.2 活性成分潜在靶点反向预测 结合SwissTargetPrediction数据库^[8],利用反向对接技术,精准预测黄芪活性成分分子靶点,选择物种为“Homo sapiens”,将从PubChem获得的SMILES结构导入SwissTargetPrediction数据库,得到所选化合物对应靶标蛋白的UniProt ID。

1.3 IgAN的靶点预测 GeneCards数据库^[9]是一个自动集成来自125个网络源以基因为中心的数据

库,包括基因组、转录组、蛋白质组、遗传信息、临床信息和功能信息等。登录 GeneCards,输入关键词“IgA nephropathy”“IgAN”“Berger Disease”,得到与 IgAN 相关的基因,以相关性分数(RC) ≥ 30 分为筛选条件,得到 IgAN 的候选靶点基因。

1.4 成分-靶点网络构建与分析 将筛选得到的黄芪活性成分和 IgAN 靶点的筛选结果导入 Cytoscape 3.7.1 软件进行可视化处理,构建成成分-靶点网络。网络图中活性成分和靶点用节点表示,节点之间相互作用关系用边表示。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将黄芪治疗 IgAN 的潜在靶点输入 STRING 11.0 中进行检索,选择物种为“Homo sapiens”,设置最低关系分数(minimum required interaction score) > 0.4 ,其余参数保持默认设置。运用 Cytoscape 3.7.1 对 PPI 关系结果进行分析,节点大小用于反映度值(degree)的大小,边的粗细用于反映结合分数(combined score)的大小,构建 PPI 网络图。

1.6 功能和通路富集分析 利用 Bioconductor 平台和 R 语言对获得的基因进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。首先进行 R 语言安装包的安装,包括 DOSE, clusterProfiler, enrichplot, colorspace, stringi, ggplot2, pathview 软件包,分别导出 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析表格,将分析结果排名的前 20 条进行可视化。

1.7 验证实验

1.7.1 材料 人肾小球系膜细胞购自上海信裕生物科技有限公司,黄芪甲苷、胎牛血清及 RPMI 1640 培养基(美国 Sigma 公司,批号分别为 Y001171, 16010159, 72400047),重组人血小板衍生生长因子 BB[PDGF-BB, 生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 C600154],肿瘤抑制基因 p53(p53)抗体(英国 Abcam 公司,批号 131442);磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)抗体(批号 4249),磷酸化 PI3K(p-PI3K)抗体(批号 13857, 1:1 000),蛋白激酶 B(Akt)抗体(批号 4691, 1:1 000)及磷酸化 Akt(p-Akt)抗体(批号 4060, 1:1 000)购自美国 CST 公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号 AF0003, 1:1 000),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(批号 A0208, 1:5 000)及 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(批号 A0423, 1:500)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.7.2 分组及给药 实验分为正常组、模型组及黄芪甲苷低、高浓度组,共 4 组。将人肾小球系膜细胞

正常复苏,培养在添加了 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,于 5% CO₂, 37 °C 传代培养后,以每孔 1.5×10^5 个细胞铺 12 孔板。培养 24 h 待细胞贴壁后,除正常组外,其余 3 组加入 $25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PDGF-BB 诱导人肾小球系膜细胞增生^[10-11]。48 h 后,黄芪甲苷低浓度组每孔加入 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芪甲苷 1 mL,黄芪甲苷高浓度组每孔加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芪甲苷 1 mL,正常组和模型组每孔加入 RPMI 1640 培养基 1 mL,继续培养 48 h 后收集细胞。

1.7.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PI3K/Akt/p53 信号通路相关蛋白表达情况 裂解细胞提取总蛋白,参照二辛可宁酸(BCA)法进行蛋白定量,经凝胶电泳转膜封闭后,孵育 PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, p53 一抗, 1:1 000 封闭液稀释, 4 °C 过夜;二抗用 5% 脱脂牛奶 1:5 000 稀释,加入二抗室温摇床孵育 1 h,用 Western blot 缓冲液洗 3 次,每次 5 min。增强型化学发光试剂常规显影,采用 3500BR 型全自动凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司)进行分析,以 β -actin 为内参,计算各组肾小球系膜细胞 PI3K/Akt/p53 信号通路相关蛋白表达情况,实验重复 3 次。

1.7.4 细胞爬片及免疫荧光染色 将盖玻片从 75% 乙醇中取出,酒精灯烤干表面液体,放入 6 孔板内。加入血清 100 μL 覆盖盖玻片,放回培养箱孵育 1 h;吸弃血清,将浓度为 1.0×10^6 个/L 的细胞悬液从上方加入孔板,放回培养箱 37 °C 培养,使细胞贴壁;轻轻吸去培养液,利用 4% 多聚甲醛溶液室温固定 12 min,固定完成后吸去固定液,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2~7.4)润洗 1 遍,用含有 10% 胎牛血清的 PBS 封闭 30 min;然后用封闭液配制质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的一抗稀释液,染色 1 h,用 PBS 润洗 3 遍;再用 PBS 稀释荧光二抗并染色 1 h,重复用 PBS 润洗 3 遍。

1.8 统计学处理 数据用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪活性成分的筛选 在 TCMSP 数据库中设置 OB $\geq 30\%$, DL ≥ 0.18 ,筛选得黄芪活性成分 25 个,基本信息详见表 1。虽然黄芪皂苷和甜菜碱的 DL 较低,但研究显示这些成分在 IgAN 治疗中有明显的药理作用^[9-11],因此将这些成分也纳入后续的研究中。

2.2 药物-疾病共同靶点的筛选 将活性成分对应

表 1 黄芪活性成分的基本信息

Table 1 Basic information of active ingredients in Astragali Radix

ID	化合物	相对分子质量	OB/%	DL	degree
MOL000374	C4	642.67	41.72	0.69	16
MOL000401	黄芪皂苷 I astragaloside I	869.17	46.79	0.11	16
MOL000403	黄芪皂苷 II astragaloside II	827.13	46.06	0.13	15
MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucoside	626.67	49.28	0.62	15
MOL000405	黄芪皂苷 III astragaloside III	785.09	31.83	0.10	14
MOL000407	黄芪甲苷 astragaloside IV	785.09	22.50	0.15	14
MOL000433	叶酸 folic acid	441.45	68.96	0.71	13
MOL000379	C5	462.49	36.74	0.92	10
MOL000387	联苯双酯 bifendate	418.38	31.10	0.67	10
MOL000354	异鼠李素 isorhamnetin	316.28	49.60	0.31	7
MOL000098	槲皮素 quercetin	302.25	46.43	0.28	7
MOL000422	山柰酚 kaempferol	286.25	41.88	0.24	6
MOL000239	华良姜素 jaranol	314.31	50.83	0.29	6
MOL000442	C3	314.31	39.05	0.48	6
MOL000398	二氢异黄酮 isoflavanone	316.33	109.99	0.30	6
MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin	314.36	53.74	0.48	5
MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	316.38	74.69	0.30	5
MOL000380	C1	300.33	64.26	0.42	5
MOL000417	毛蕊异黄酮 calycosin	284.28	47.75	0.24	5
MOL000438	C6	302.35	67.67	0.26	5
MOL000392	刺芒柄花素 formononetin	268.28	69.67	0.21	4
MOL000211	丁子香酚 mairin	456.78	55.38	0.78	3
MOL000430	甜菜碱 (betaine)	117.17	40.92	0.01	2
MOL000296	常春藤皂苷元 hederagenin	414.79	36.91	0.75	1
MOL000033	C2	428.82	36.23	0.78	1

注: C1.(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofuran[3,2-c]chromen-3-ol; C2.(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol; C3.1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene; C4.5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside; C5.9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside; C6.(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol(表 2 同)。

的靶点输入 UniProt 数据库,并使用 SwissTargetPrediction 数据库对靶点信息进行补充,去重后筛选得到黄芪的作用靶点共 138 个。以“IgA nephropathy”作为关键词,在 GeneCards 数据库

中进行检索,去重后共筛选得到 IgAN 疾病作用靶点 1 034 个。在 Venny 2.1.0 平台上分别录入黄芪活性成分与 IgAN 的作用靶点,绘制韦恩图,两者取交集后获得药物-疾病共同靶点 49 个,见表 2。

表 2 黄芪治疗 IgAN 的潜在靶点

Table 2 Potential targets of Astragali Radix against IgAN

基因名	UniProt ID	靶点	对应成分
ABCB1	Q6TBL4	P-糖蛋白 1	黄芪皂苷 I, II
ADH1B	P00325	乙醇脱氢酶 1B	常春藤皂苷元、甜菜碱
AKR1B1	P15121	醛糖还原酶	异鼠李素、甜菜碱、槲皮素
ALOX5	P09917	花生四烯酸 5-脂氧合酶	槲皮素、山柰酚
BCL2	P03372	B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)	槲皮素、山柰酚
BCL2L1	P10415	Bcl-X	黄芪皂苷 I
CASP3	P42574	半胱氨酸天冬氨酸水解酶蛋白 酶-3(Caspase-3)	槲皮素、山柰酚

续表2

基因名	UniProt ID	靶点	对应成分
CASP8	Q14790	Caspase-8	槲皮素
CASP9	P55211	Caspase-9	槲皮素
CAV1	Q03135	小窝蛋白-1	槲皮素
CCND1	P24385	G ₁ /S特异性细胞周期蛋白D ₁	槲皮素
CRP	P02741	C-反应蛋白	槲皮素
CYP1A1	P04798	细胞色素P450 1A1	槲皮素、山柰酚
CYP3A4	P08684	细胞色素P450 3A4	槲皮素、山柰酚
DRD1	P21728	多巴胺D ₁ 受体	黄芪皂苷 I, II, III, IV
DRD2	P14416	多巴胺D ₂ 受体	黄芪皂苷 I
EGFR	P00533	表皮生长因子受体	槲皮素
ESR1	P03372	雌激素受体1	异鼠李素, 3,9-di-O-methylnissolin, 7-O-methylisomucronulatol, C1, 刺芒柄花素, 毛蕊异黄酮
FGF2	P09038	成纤维细胞生长因子2	黄芪皂苷 I, II, III, IV
FOS	P01100	原癌基因 c-Fos	槲皮素
GSTM1	P09488	谷胱甘肽S-转移酶 Mu 1	槲皮素、山柰酚
GSTP1	P09211	谷胱甘肽S-转移酶 P	槲皮素、山柰酚
HIF1A	Q16665	低氧诱导因子-1 α	槲皮素
HPSE	Q9Y251	乙酰肝素酶	黄芪皂苷 I, II, III, IV
HSP90AA1	P07900	热休克蛋白90 α A ₁	黄芪皂苷 I, III, IV
HSPB1	P04792	热休克蛋白 β ₁	槲皮素
HTR2A	Q9P2Q9	5-羟色胺受体2A	黄芪皂苷 I
ICAM1	P05362	细胞间黏附分子1	槲皮素、山柰酚
IL-6	P05231	白细胞介素-6	槲皮素
LGALS3	P17931	半乳糖凝集素-3	黄芪皂苷 I, II, III, IV
LGALS9	O00182	半乳糖凝集素-9	黄芪皂苷 I
MYC	P01106	Myc原癌基因蛋白	槲皮素
NOS3	P29474	一氧化氮合酶3	槲皮素
NQO1	P15559	还原型辅酶/醌氧化还原酶1	槲皮素
PARP1	P09874	多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1	槲皮素
PGR	P06401	孕酮受体	丁子香酚, 常春藤皂苷元, C2, 山柰酚
PLAU	P00749	尿激酶型纤溶酶原激活剂	槲皮素
PON1	P27169	血清对氧磷酶/芳基酯酶1	槲皮素
PPARG	P37231	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ	异鼠李素, 7-O-methylisomucronulatol, 刺芒柄花素, 毛蕊异黄酮, 槲皮素, 山柰酚
PRKCA	P17252	蛋白激酶C α 型	槲皮素
PRSS1	P07477	阳离子胰蛋白酶原1	华良姜素, 异鼠李素, 3,9-di-O-methylnissolin, 7-O-methylisomucronulatol, C1, 刺芒柄花素, 毛蕊异黄酮, 槲皮素, 山柰酚, C3
PTAFR	P25105	血小板活化因子受体	黄芪皂苷 I, II
PTGS1	P23219	前列腺素G/H合酶1	华良姜素, 常春藤皂苷元, 异鼠李素, 联苯双酯, 刺芒柄花素, 毛蕊异黄酮, 甜菜碱, 3,9-di-O-methylnissolin, 7-O-methylisomucronulatol, C1, 槲皮素, 山柰酚
RB1	P06400	视网膜母细胞瘤相关蛋白	槲皮素
SELE	P16581	E-选择素	槲皮素、山柰酚
STAT3	P40763	信号转导与转录激活因子3	黄芪皂苷 I, III, IV
VCAM1	P19320	血管细胞黏附蛋白1	槲皮素、山柰酚
VDR	Q6SZ90	维生素D受体	黄芪皂苷 I, II
VEGFA	P15692	血管内皮生长因子A	槲皮素, 黄芪皂苷 I, II, III, IV

2.3 “药物-成分-疾病-靶点”网络模型的构建及分析 将黄芪的25个活性成分与49个药物-疾病共同靶点输入Cytoscape 3.7.1中,构建“药物-成分-疾病-靶点”相互作用网络图。结果涉及19个成分(6个活性成分靶点与疾病靶点无交集,故删除)和49个药物-疾病共同靶点,充分体现了黄芪多成分、多靶点治疗IgAN的作用。degree表示该成分与作用靶点的关联个数,该值越大,与之相连的节点数越多。结合表1中成分的degree可知,联苯双酯、异鼠李素、槲皮素、山柰酚和黄芪皂苷(I, II, III, IV)等的degree较大,推测可能是黄芪发挥药效的活性成分;结合表2中对应成分信息可知,IL-6, VEGFA, PTGS1, PRSS1, PPARG, PGR, LGALS3, HPSE, FGF2, ESR1, DRD1可能是黄芪治疗IgAN的作用靶点。

2.4 构建PPI网络关系图 将上述49个共同靶点输入STRING 11.0中进行检索,构建PPI网络图,经Cytoscape 3.7.1的MCODE插件聚类分析,筛选出PPI网络关系图中的核心靶点。结果表明黄芪治疗IgAN过程中有生长因子、肿瘤蛋白、细胞周期蛋白等物质参与。其中关联度值最高的为IL-6,其能与36个蛋白发生相互作用,提示该靶蛋白在整个网络中发挥较为重要的作用。

2.5 靶点功能及通路富集分析 将49个共同靶点经R语言运行后,得到84个GO条目,选取P最小的前20个GO功能富集条目绘制条形图,见图1,颜色越红表示显著性越高。结果发现细胞核激素受体结合、细胞核受体活性、脱氧核糖核酸结合转录激活因子活性、细胞凋亡半胱氨酸内肽酶活性富集的基因数排名靠前。KEGG通路富集共获得88条通路,选取P最小的前20个KEGG通路富集条目绘制条形图,见图2。结果发现涉及PI3K/Akt信号通路, HIF-1信号通路,晚期糖基化终末产物/晚期糖基化终末产物受体(AGE/RAGE)信号通路等,表明黄芪活性成分可通过调控多个通路发挥治疗IgAN的作用。

2.6 黄芪甲苷对PI3K/Akt/p53信号通路相关蛋白表达的影响 由图3,4可知,模型组的p-PI3K/PI3K值显著低于正常组($P<0.01$),黄芪甲苷高、低浓度组的p-PI3K/PI3K值显著高于模型组($P<0.01$);模型组的p-Akt/Akt值明显低于正常组($P<0.05$),黄芪甲苷高、低浓度组的p-Akt/Akt值明显高于模型组($P<0.05, P<0.01$);模型组的p53蛋白相对表达量显著低于正常组($P<0.01$),黄芪甲苷高、低浓度组的p53蛋

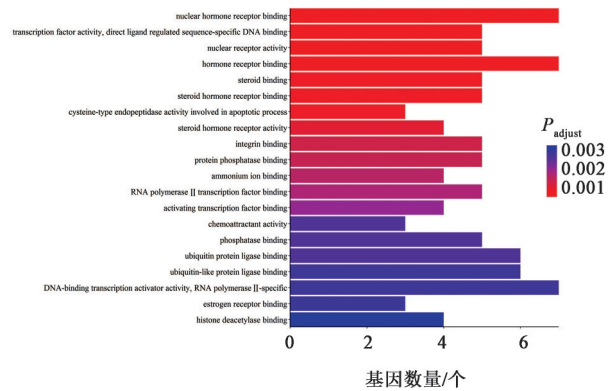


图1 黄芪活性成分治疗IgAN靶点的GO功能富集分析

Fig. 1 GO enrichment analysis of targets of active ingredients in Astragali Radix against IgAN

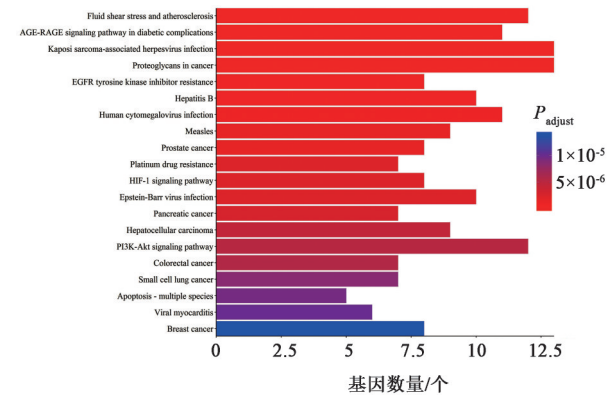


图2 黄芪活性成分治疗IgAN靶点的KEGG通路富集分析

Fig. 2 KEGG pathway analysis of targets of active ingredients in Astragali Radix against IgAN

白相对表达量明显高于模型组($P<0.05$)。p53蛋白免疫荧光染色结果显示,模型组的p53蛋白荧光强度较正常组降低,说明PDGF-BB能抑制人肾小球系膜细胞p53蛋白的表达;黄芪甲苷高浓度组的p53蛋白荧光强度较模型组显著增强,与Western blot结果一致,说明黄芪甲苷能提高人肾小球系膜细胞p53蛋白表达水平,提示黄芪甲苷可能通过激活p53表达抑制人肾小球系膜细胞过度增生,见图5。

3 讨论

3.1 IgAN发病与脾肾关系密切 IgAN归属于中医“血尿”“水肿”等范畴,其病因主要是外邪侵袭,素体阴虚、气虚或气阴两虚等^[12]。病位常以肾为中心,并涉及脾^[13]。病情多属本虚标实,本虚主要是阴虚和气阴两虚,标实则外感、湿热、瘀血等^[14]。血尿和蛋白尿是IgAN最常见的症状,IgAN的病机转化多呈阴虚-气阴两虚-阴阳两虚的过程,与脾肾关系尤为密切,肾阴虚则热伤血络,脾气虚则统血无权。黄芪为补气诸药之最,能温补脾肾,又以解虚热,起到益气升清、统血摄血的作用。

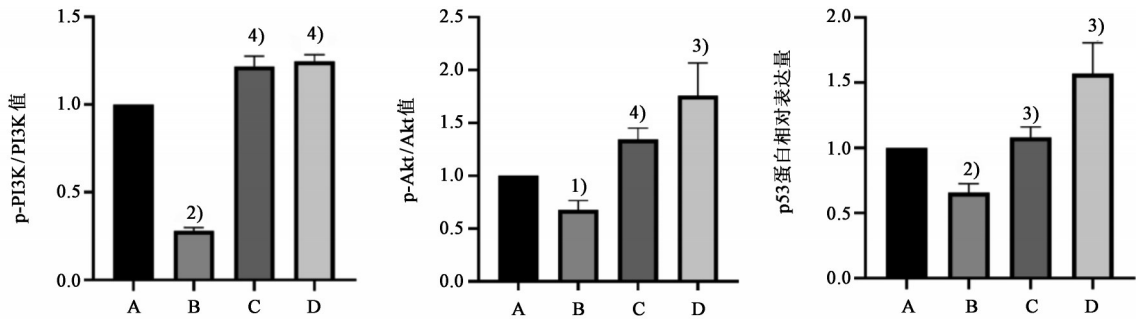


图3 黄芪甲苷对人肾小球系膜细胞PI3K/Akt/p53信号通路蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of astragaloside IV on protein expression of PI3K/Akt/p53 pathway in human mesangial cells of each group($\bar{x}\pm s, n=6$)

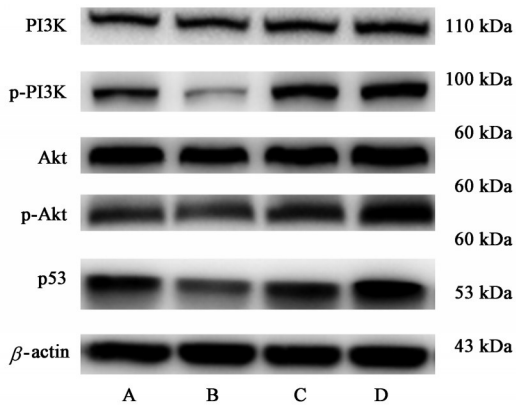


图4 各组人肾小球系膜细胞的PI3K/Akt/p53信号通路蛋白表达电泳分析

Fig. 4 Electrophoresis of PI3K/Akt/p53 signaling pathway protein expression of human mesangial cells in each group

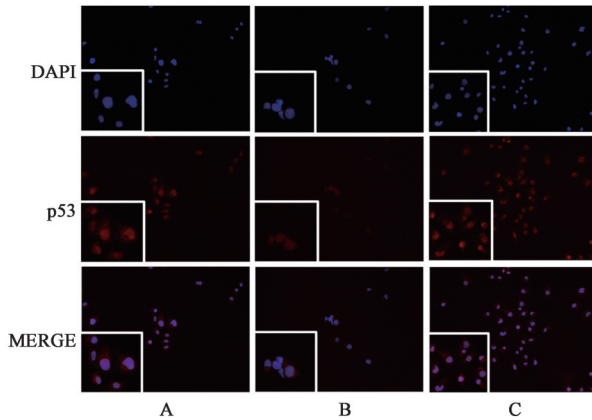


图5 黄芪甲苷对人肾小球系膜细胞p53蛋白表达的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of astragaloside IV on protein expression of p53 in human mesangial cells of each group(IF, $\times 200$)

3.2 黄芪对IgAN的治疗发挥关键作用 IgAN发病机制尚不完全清楚, IgA₁分子糖基化障碍、免疫异常及遗传是当前IgAN发病机制的研究热点, 其中IgA₁分子糖基化障碍被认为是IgAN发生的首要机

制^[15]。现代药理研究发现, 用黄芪注射液刺激脂多糖诱导的IgAN患者外周血B淋巴细胞, 可显著降低细胞上清IgA₁异常糖基化水平^[16]。黄青等^[17]研究发现黄芪甲苷能有效下调IgAN大鼠脾淋巴细胞密度, 抑制脾免疫功能亢进, 减少IgA₁分子糖基化障碍, 进一步降低肾脏IgA免疫复合物沉积, 从而改善血尿、蛋白尿症状。高植明^[18]研究发现黄芪提取物(黄芪多糖、黄芪总皂苷、黄芪总黄酮)能有效减少IgAN患者外周血IgA₁异常糖基化, 其机制可能与黄芪调控Cosmc基因表达有关。在中药复方治疗IgAN中, 黄芪起到了不可替代的重要作用。研究显示, 固本通络汤能有效治疗IgAN, 其中发挥最关键作用的核心药物是黄芪, 其与IgAN的14个靶蛋白相互关联, 通过诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和p53参与调控肾脏多种细胞, 诱导细胞凋亡^[19]。因此, 黄芪在临床治疗IgAN中发挥着关键作用。

3.3 研究黄芪治疗IgAN的靶点和分子机制具有重要意义 中药是我国的民族瑰宝, 在几千年的实践与创新中受到国内外越来越多的认可, 被广泛应用于临床, 尤其是对复杂疾病的治疗, 具有疗效显著、副作用少的特点。然而, 目前明确中药的作用机制仍是难题。本研究借助网络药理学方法, 发现黄芪的主要活性成分黄芪皂苷、联苯双酯、槲皮素等可能通过关键靶点进一步调控PI3K/Akt, AGE/RAGE, HIF-1等相关信号通路产生炎症、凋亡、自噬作用。研究者通过大量临床试验发现, 三黄益肾胶囊可显著下调IgAN患者血清VEGF表达水平, 改善患者肾功能, 而三黄益肾胶囊的主药之一就是黄芪^[20]。不仅如此, 临床研究还发现黄芪颗粒可有效降低IgAN患者血清IL-6表达水平, 减少其对肾脏的直接损害^[21]。说明本研究通过网络药理学预测黄芪治疗IgAN的作用靶点与临床试验结论一致。

PDGF-BB是一种血小板来源生长因子, 对细胞

有增生作用,其参与了肾脏发育过程中毛细血管祥形成的调控,对肾小球系膜细胞的发育具有重要意义^[22]。体内外研究均已证实PDGF-BB可诱导人肾小球系膜细胞异常增生,模拟IgAN发病时人肾小球系膜细胞的病理改变^[10-11]。因此本研究利用PDGF-BB诱导人肾小球系膜细胞异常增生,建立IgAN体外细胞模型,以验证前期网络药理学研究的正确性和可靠性。

细胞凋亡和自噬在肾小球系膜细胞增生的病理过程中发挥关键性作用^[23-27]。研究者发现PI3K/Akt信号通路在IgAN患者体内被异常激活,同时用糖基化异常的IgA₁体外刺激肾小球系膜细胞,可使肾小球系膜细胞异常增生,并激活PI3K/Akt信号通路^[28-29]。近年来高通量测序技术在生命科学领域得到广泛应用,国内外研究者通过高通量测序在转录组水平研究IgAN,均发现IgAN的发病机制与PI3K/Akt信号通路相关^[30-32]。PI3K/Akt信号通路是与细胞自噬和凋亡均密切相关的信号通路,将其抑制可减少肾小球系膜细胞异常增生,从而抑制肾脏纤维化,缓解肾小球硬化^[33-35]。在PI3K/Akt信号通路下游调控的诸多分子中,p53是迄今为止发现与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因,在细胞自噬和凋亡信号网络中处于中心环节。因此,本研究选择PI3K/Akt/p53信号通路和黄芪质量评价重要指标之一的黄芪甲苷探索黄芪活性成分治疗IgAN的关键靶点和通路。研究结果显示,黄芪甲苷可通过调控PI3K/Akt/p53信号通路,抑制PDGF-BB诱导的人肾小球系膜细胞增生,与网络药理学分析结果一致,说明本研究结果具有一定的科学性和可靠性,有助于进一步探究黄芪治疗IgAN的分子机制。目前黄芪治疗IgAN的研究仍存在诸多关键性问题尚未解决,如药效物质不明确、作用机制研究不够深入等。相信随着对中药研究的不断深入,多学科交叉推动中医药传承创新,将充分发挥中医药治疗慢性疾病的独特优势,加快推进中药现代化建设,为创建中西医并重的新医药学体系奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] DONADIO J V, GRANDE J P. IgA nephropathy[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(10): 738-748.
- [2] JENNIFER C R, MARK H, HEATHER N R. IgA nephropathy[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12(4): 677-686.
- [3] LAI K N, TANG S C, SCHENA F P, et al. IgA

nephropathy [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.1.

- [4] 吴斌. 糖皮质激素副作用的中医药研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(3): 719-721.
- [5] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 428.
- [6] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [7] XUE R C, FANG Z, ZHANG M X, et al. TCMID: traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D1089-D1095.
- [8] GFELLER D, MICHIELIN O, ZOETE V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [9] REBHAN M, CHALIFA C V, PRILUSKY J, et al. GeneCards: Integrating information about genes, proteins and diseases [J]. *Trends Genet*, 1997, 13(4): 163.
- [10] MAO X, XU Z H, XU X L, et al. TGF- β inhibits the autophagy of podocytes by activating mTORC1 in IgA nephropathy[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 385(1): 111670.
- [11] WU H J, JIANG W N, ZHANG Y, et al. Regulation of intracellular decorin via proteasome degradation in rat mesangial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(4): 1010-1019.
- [12] 赵结, 史伟, 孟立锋. 从伏邪论治IgA肾病的理论探讨[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(10): 4709-4712.
- [13] 张惜燕, 邢玉瑞. IgA肾病中医病因病机理论研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(7): 896-898.
- [14] 朱逸云, 王琳, 陈以平. 基于“中医传承辅助平台”分析探讨陈以平教授治疗IgA肾病用药规律的研究[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2019, 8(5): 201-207.
- [15] 谢院生, 陈香美. IgA肾病的诊治研究进展[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2019, 8(1): 1-5.
- [16] JI L, CHEN X L, ZHONG X, et al. Astragalus membranaceus up-regulate Cosmc expression and reverse IgA dys-glycosylation in IgA nephropathy[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 195.
- [17] 黄青, 朱淑琴, 洪婷, 等. 黄芪甲苷对IgA肾病大鼠脾免疫细胞的影响[J]. *解剖科学进展*, 2017, 26(6): 602-604.
- [18] 高植明. 黄芪提取物对IgAN患者IgA₁异常糖基化的作用及其分子机制研究[J]. *北方药学*, 2016, 13(8): 115-116.
- [19] SHEN P, SHEN J, SUN C, et al. A system biology approach to understanding the molecular mechanisms

- of Gubentongluo decoction acting on IgA nephropathy [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16(1):312.
- [20] 钟燕斌,周永恒,刘仕欣,等. 三黄益肾胶囊联合糖皮质激素治疗IgA肾病的疗效观察及其对VEGF水平的影响[J]. 中国中医药科技, 2016, 23(5):523-525.
- [21] 梁一鸣. 黄芪颗粒对IgA肾病患者血清中MCP-1、TNF- α 和IL-6水平的影响[J]. 新中医, 2015, 47(5):115-117.
- [22] OSTENDORF T, KUNTER U, GRÖNE H J, et al. Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis [J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(5):909-918.
- [23] LIU D, LIU Y X, CHEN G C, et al. Rapamycin enhances repressed autophagy and attenuates aggressive progression in a rat model of IgA nephropathy[J]. Am J Nephrol, 2017, 45(4):293-300.
- [24] DESHPANDE S, ABDOLLAHI M, WANG M, et al. Reduced autophagy by a microRNA-mediated signaling cascade in diabetes-induced renal glomerular hypertrophy[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):6954.
- [25] LEAF I A, DUFFIELD J S. What can target kidney fibrosis?[J]. Nephrol Dial Transplant, 2017, 32(suppl 1):i89-i97.
- [26] WANG G B, ZHAO T T, WANG L Y, et al. Studying different binding and intracellular delivery efficiency of ssDNA single-walled carbon nanotubes and their effects on LC3-related autophagy in renal mesangial cells via miRNA-382[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(46):25733-25740.
- [27] WANG A M, REN J, WANG C P, et al. Heparin prevents intracellular hyaluronan synthesis and autophagy responses in hyperglycemic dividing mesangial cells and activates synthesis of an extensive extracellular monocyte-adhesive hyaluronan matrix after completing cell division[J]. J Biol Chem, 2014, 289(13):9418-9429.
- [28] SHARON N C, FABIO S, GRAZIA S, et al. Altered modulation of WNT-beta-catenin and PI3K/Akt pathways in IgA nephropathy[J]. Kidney Int, 2010, 78(4):396-407.
- [29] ZHANG Q, YAN L L, CHEN M Y, et al. IgA₁ isolated from Henoch-Schönlein purpura children promotes proliferation of human mesangial cells *in vitro*[J]. Cell Biol Int, 2019, 43(7):760-769.
- [30] LUAN R, TIAN G, CI X, et al. Differential expression analysis of urinary exosomal circular RNAs in patients with IgA nephropathy [J]. Nephrology, 2021, doi: 10.1111/nep.13855.
- [31] WANG Z Y, LIAO Y, WANG L X, et al. Small RNA deep sequencing reveals novel miRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with IgA nephropathy [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(4):3378-3386.
- [32] FANG X, LU M, XIA Z K, et al. Use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to perform urinary proteomic analysis of children with IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis [J]. J Proteomics, 2021, doi: 10.1016/j.jprot.2020.103979.
- [33] WANG E M, FAN Q L, YUE Y, et al. Ursolic acid attenuates high glucose-mediated mesangial cell injury by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway [J]. Med Sci Monit, 2018, 24:846-854.
- [34] 赵娅,冯慧,周珍,等. 基于藏族医学“整体观”认识的防治糖尿病肾病新药发现思路[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3):167-172.
- [35] LU X X, FAN Q L, XU L, et al. Ursolic acid attenuates diabetic mesangial cell injury through the up-regulation of autophagy via miRNA-21/PTEN/Akt/mTOR suppression[J]. PLoS One, 2015, 10(2):e0117400.

[责任编辑 刘德文]