

## 慢性肾功能衰竭用药规律及潜在机制分析

傅奕<sup>1,2</sup>, 李鑫<sup>1</sup>, 朱莹<sup>1\*</sup>, 吴兆东<sup>2</sup>, 陈帮明<sup>2</sup>, 付义<sup>2</sup>, 刘永芳<sup>2</sup>, 舒梦<sup>2</sup>

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410007;

2. 江西省中医肾病临床医学研究中心/九江市中医院, 江西九江 332001)

**[摘要]** 目的: 阐释江西省名中医吴兆东主任医师治疗慢性肾功能衰竭的遣药组方规律, 并探讨潜在新方组合的潜在作用机制。方法: 收集2019年7月至2021年7月吴兆东主任门诊处方, 运用中医传承辅助平台(V2.5)进行数据挖掘, 分析处方药物的用药频次、药物关联, 并得出潜在中药新方组合。运用中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)、STRING及京都基因与基因组百科全书(KEGG)对“新处方”中药物靶标间相互作用关系进行分析, 并进行分子对接验证和实验验证。结果: ①共筛选出200首处方, 包含217味中药, 演化得到8个潜在新方组合: 处方1苦杏仁-黄芪-桔梗-当归-土茯苓-炒白术; 处方2防风-荆芥-地肤子-紫菀-薄荷; 处方3苦杏仁-紫菀-桔梗-枇杷叶-炙麻黄; 处方4紫苏梗-党参-黄连-太子参; 处方5旱莲草-炙黄芪-贯众-金樱子-薏苡仁-女贞子; 处方6泽兰-忍冬藤-络石藤-泽泻; 处方7黄芩-水蛭-赤芍-枇杷叶-北沙参; 处方8甘草-玄参-野菊花-土茯苓-六月雪。②筛选出潜在新方组合(新方1)的主要化学成分有18种; ③预测到新方1活性成分的作用靶标80个, 映射后得出新方1治疗CRF37个潜在靶标[(如白细胞介素(IL)-6、血管内皮生长因子(VEGF)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3、一氧化氮合酶(NOS)3、缺氧诱导因子(HIF)-1等]; ④中药-疾病靶标涉及的KEGG通路主要包括脂质和动脉粥样硬化、NF- $\kappa$ B、Toll样受体、HIF1信号通路。⑤新方1显著降低CRF大鼠血清肌酐、尿素氮, 提高肾组织NO、NOS3含量。结论: 新方1中药组合显示了多成分、多靶点的药物作用特点, 其机制可能与其抑制肾纤维化、抗炎、改善肠道微生态、改善肾脏缺氧缺血有关。

**[关键词]** 慢性肾功能衰竭; 遣药组方规律; 潜在机制; 数据挖掘; 网络药理学; 分子对接

**[中图分类号]** R284.2; R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0151-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220319

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220124.1124.005.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-25 9:13

### Medication Regularity for Chronic Renal Failure and Underlying Mechanism Based on Data Mining, Network Pharmacology, and Molecular Docking

FU Yi<sup>1,2</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, ZHU Ying<sup>1\*</sup>, WU Zhao-dong<sup>2</sup>, CHEN Bang-ming<sup>2</sup>, FU Yi<sup>2</sup>, LIU Yong-fang<sup>2</sup>, SHU Meng<sup>2</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. Jiangxi Traditional Chinese Medicine (TCM) Nephropathy Clinical Research Center/Jiujiang Hospital of TCM, Jiujiang 332001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To clarify the medication regularity of WU Zhao-dong, a famous chief physician in traditional Chinese medicine (TCM) of Jiangxi province, and investigate the potential mechanism of potential new prescriptions against chronic renal failure (CRF). **Method:** The outpatient prescriptions of WU Zhao-dong

**[收稿日期]** 2021-11-02

**[基金项目]** 江西省科技厅一般项目(20212BAG70041); 江西省卫生健康委科技计划项目(20204305); 江西省中医药科研计划项目(2019A395)

**[第一作者]** 傅奕, 主治医师, 从事中医药治疗肾病研究, E-mail: 17707021828@163.com.

**[通信作者]** \* 朱莹, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中医内科工作, E-mail: zhuying089@126.com

from July 2019 to July 2021 were collected. Data mining was carried out by using the Traditional Chinese Medicine Inheritance Auxiliary Platform (V 2.5) to analyze the medication frequency and drug association and obtain potential new prescriptions. The interaction between drug targets in new prescriptions was analyzed by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), STRING, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), followed by verification by molecular docking and experiments. **Result:** A total of 200 prescriptions were screened out, with 217 Chinese medicinal drugs involved, and eight new potential prescriptions were derived. To be specific, Prescription 1: Armeniaceae Semen Amarum-Astragali Radix-Platycodonis Radix-Angelicae Sinensis Radix-Smilacis Glabrae Rhizoma-fried Atractylodis Macrocephalae Rhizoma, Prescription 2: Saposhnikoviae Radix-Schizonepetae Herba-Kochiae Fructus-Asteris Radix et Rhizoma-Menthae Haplocalycis Herba, Prescription 3: Armeniaceae Semen Amarum-Asteris Radix et Rhizoma-Platycodonis Radix-Eriobotryae Folium-prepared Ephedrae Herba, Prescription 4: Perillae Caulis-Codonopsis Radix-Coptidis Rhizoma-Pseudostellariae Radix, Prescription 5: Ecliptae Herba-Astragali Radix Praeparata Cum Melle-Dryopteridis Crassirhizomatis Rhizoma-Rosae Laevigatae Fructus-Coicis Semen-Ligustri Lucidi Fructus, Prescription 6: Lycopi Herba-Lonice Raejaponicae Caulis-Trachelospermi Caulis et Folium-Alismatis Rhizoma, Prescription 7: Scutellariae Radix-Hirudo-Paeoniae Radix Rubra-Eriobotryae Folium-Glehniae Radix, Prescription 8: Glycyrrhizae Radix et Rhizoma-Scrophulariae Radix-Chrysanthemi Indici Flos-Smilacis Glabrae Rhizoma-Serissae Herba. In Prescription 1, 18 main chemical components were screened out. Eighty targets of active components of Prescription 1 were predicted, and 37 potential targets for the treatment of CRF were obtained, including interleukin (IL)-6, vascular endothelial growth factor (VEGF), cysteinyl aspartate-specific protease-3 (Caspase-3), nitric oxide synthase 3 (NOS3), and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). The KEGG pathways involved in the targets of Chinese medicinal drugs and disease mainly included the signaling pathways of lipid and atherosclerosis, NF- $\kappa$ B, Toll-like receptors, and HIF-1. Prescription 1 significantly decreased serum creatinine and urea nitrogen, and increased the content of NO and NOS3 in renal tissues of CRF rats. **Conclusion:** Prescription 1 shows the multi-component and multi-target characteristics of action, and its mechanism may be related to its inhibition of renal fibrosis, anti-inflammation, improvement of intestinal microecology, and improvement of renal hypoxia and ischemia.

**[Keywords]** chronic renal failure; medication regularity; underlying mechanism; data mining; network pharmacology; molecular docking

慢性肾功能衰竭(CRF)是一个日益严重的公共卫生问题。当前,我国CRF患者已高达1.19亿,随着生活节奏加快、饮食结构改变,患病人数仍逐年增加<sup>[1-2]</sup>。CRF以肾功能不可逆损害、氧化应激和炎症为主要特征,最终导致肾纤维化。CRF早期大部分没有明显临床症状,晚期随着代谢毒素水平升高,常累及多脏。由于缺乏有效的治疗方案,CRF死亡率较高,对家庭、社会带来沉重负担<sup>[3]</sup>。

中医药治疗CRF历史悠久,可有效缓解临床症状,延缓肾功能进展,具独到优势。在病因病机方面,邹燕勤认为肾虚是CRF的主要病机,湿瘀是主要病理<sup>[4]</sup>;张星平认为肾为元气之根,元气亏虚是CRF根本原因<sup>[5]</sup>。在治法方面,各医家多主张辨证施治,张大宁制定了补肾活血以治本、祛湿降逆以治标的基本原则<sup>[6]</sup>;吕仁和临证多平衡阴阳气血,补

虚与排浊兼顾取得较好疗效<sup>[7]</sup>。目前虽然中医药治疗CRF取得了较多应用成果,但由于证候缺乏规范性,临证遣方用药灵活性,难以找寻其潜在规律,为CRF传承与创新带来了不小困难。因此,应用数据挖掘手段探究中医药治疗CRF的用药规律势在必行。而中国中医科学院中药研究所研制的中医传承辅助平台,为发现疾病的发展和用药规律创造了条件,具有重要的临床价值。

江西中医药大学附属九江市中医医院是全国中医肾病临床中心吴兆东主任医师是肾科学科带头人。吴兆东主任结合多年临证经验,集采诸家理论之长,在治疗CRF方面颇有良效。吴兆东主任认为CRF病机主要为脾肾亏虚,浊毒内蕴,气机升降失调。治法方面,既往医家多从肾论治CRF,而吴兆东主任创新性地主张CRF从脾胃论治,健脾益

肾, 培补后天以养先天, 配合调理气机升降, 临床疗效往往事半功倍。据此, 本研究拟以吴兆东主任门诊病例资料为基础, 运用数据挖掘和网络药理学策略, 初步挖掘其治疗CRF临床用药经验, 探究核心新方的效应机制, 为后续研究奠定基础。

## 1 资料与方法

**1.1 处方来源** 选取2019年7月至2021年7月吴兆东主任在九江市中医院诊治CRF一诊及复诊纸质处方, 共筛选200条。

**1.2 病历纳入标准** 参照2012年美国发布的肾脏病预后质量指南中关于CRF的诊断标准制定的标准。选取Ⅱ~Ⅴ期末透析患者。符合中医“肾衰病”诊断, 发病时间 $\geq 6$ 月, 服用中药汤剂者。参照疗效判定标准<sup>[8]</sup>评定治疗“有效”。

**1.3 分析软件** “中医传承辅助平台(V2.5)”软件, 由中国中医科学院中药研究所提供。该软件具有关联规则、聚类算法及频次统计等算法与功能, 可用于名老中医处方的录入、保存以及分析、挖掘。

**1.4 数据分析** 通过中医传承辅助平台(V2.5)软件中数据分析模块中的方剂分析功能, 进行用药规律挖掘, 进行高频药物组合分析, 并得出潜在新方组合序列。

**1.5 新方组合序列1(以下简称新方1)主要化学成分收集及筛选** 应用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)及中药分子机制的生物信息学分析工具(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)检索所有药效组分。选取口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) $\geq 0.18$ 者。另外对未入选数据库, 但文献报道有生物活性的组分也纳。

**1.6 潜在靶标** 应用中药系统药理学数据库与分析平台及中药分子机制的生物信息学分析工具数据库平台检索新方1所有活性成分的靶基因, 通过Cytoscape 3.7.1软件(<https://cytoscape.org/>)构建活性成分-靶点互作网络。

**1.7 CRF疾病靶点筛选** 设置检索词为“Chronic renal failure”, 检索GeneCards及在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>), 筛选得CRF疾病靶点, 并将UniProt数据库(<https://www.uniprot.org>)所筛靶点并行标准化, 以获取Swiss-Prot ID。

**1.8 新方1活性组分与CRF共靶筛选并构建网络** 利用R及Perl取得新方1活性组分与CRF共靶。利用STRING构建共靶互作网络。

**1.9 活性组分-CRF-靶点网络构建** 采用Cytoscape 3.7.1 merge插件构建互作网络。

**1.10 基因本体(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)Pathway分析** 采用R GO.R包及Perl进行GO分析。采用KEGG.R包行KEGG Pathway分析。明确新方1治疗CRF的可能生物学效应机制。

**1.11 新方1对CRF大鼠治疗作用评价** 取无特定病原体级SD大鼠, 合格证号SCXK(湘)2021-0002, 本研究通过江西中医药大学实验动物伦理审查委员会批准, 编号JZLLSC2020026。随机分为空白组和模型组, 模型组大鼠采用5/6肾切除制备CRF模型。具体操作: 异氟烷麻醉大鼠, 在脊主向左旁开1 cm左侧肋弓0.5 cm处做一垂直于脊柱的切口。无菌条件下, 钝性游离肾包膜, 暴露左肾, 分支结扎左肾动脉的2/3, 关腹缝合。7 d后, 摘除右肾。28 d后, 大鼠血清肌酐、尿素氮较正常大鼠显著升高, 差异具有统计学意义, 则提示造模成功<sup>[9]</sup>。

造模成功大鼠随机分为模型组和新方1组, 新方1组按照临床中倍剂量总和 $\times 0.018 \times 5$ 计算给药量给予药液, 每天1次, 连续给药28 d。给药结束后, 取血清, 送医院检验科检测血清肌酐(肌酐测定试剂盒, 世纪沃德公司, 批号R39120101)、尿素氮(尿素氮测定试剂盒, 世纪沃德, 批号700300908)含量。取肾组织, 匀浆, 按照试剂盒说明书检测一氧化氮(NO, 南京建成生物工程研究所, 批号20210605)、内皮型一氧化氮合成酶(NOS)3(上海泽叶生物科技有限公司, 批号20210805)含量。

## 2 结果

**2.1 用药频数** 200首方中共217味中药, 使用频数高于40次的有22味药, 使用频数前3位分别是黄芪、六月雪、土茯苓。见表1。

**2.2 基于关联规则分析的组方规律分析** 按照药物组合出现频次由高到低排序, 前3位分别是“土茯苓、六月雪”“黄芪、六月雪”“土茯苓、黄芪”。见表2。分析所得药对的用药规则, 结果见表3。关联网络见图1。

**2.3 基于熵聚类的方剂组方规律分析**

**2.3.1 基于改进的互信息法的药物间关联度分析** 依据方剂数量, 结合经验判断和不同参数提取数据的预读, 设置相关度为6, 惩罚度为2, 进行聚类分析, 得到方剂中两两药物间的关联度, 将关联系数 $> 0.05$ 的药对列表。见表4。

**2.3.2 基于无监督熵层次聚类的新处方分析** 在以上核心组合提取的基础上, 运用无监督熵层次聚

表1 治疗CRF频数35次以上的药物情况

Table 1 Drugs with frequency above 35 of CRF treatment

序号	中药名称	频数/次	序号	中药名称	频数/次
1	黄芪	109	12	太子参	60
2	六月雪	108	13	虎杖	60
3	土茯苓	99	14	赤芍	55
4	炒白术	92	15	黄芩	52
5	水蛭	75	16	党参	51
6	泽泻	75	17	杜仲	49
7	石韦	73	18	川芎	47
8	当归	67	19	莪术	46
9	泽兰	67	20	苍术	46
10	牛膝	66	21	积雪草	44
11	车前草	62	22	山药	44

表2 CRF治疗处方中支持度为60的药物组合

Table 2 Drug combination with support of 60 of CRF treatment

序号	药物模式	频度/g	序号	药物模式	频度/g
1	土茯苓、黄芪	92	15	石韦、六月雪	64
2	土茯苓、石韦	64	16	炒白术、六月雪	79
3	土茯苓、六月雪	96	17	当归、六月雪	60
4	土茯苓、炒白术	78	18	水蛭、六月雪	60
5	土茯苓、当归	60	19	土茯苓、黄芪、石韦	62
6	泽兰、泽泻	66	20	土茯苓、黄芪、六月雪	90
7	黄芪、泽泻	65	21	土茯苓、黄芪、炒白术	75
8	黄芪、石韦	66	22	土茯苓、石韦、六月雪	62
9	黄芪、六月雪	94	23	土茯苓、炒白术、六月雪	75
10	牛膝、黄芪	62	24	黄芪、石韦、六月雪	61
11	黄芪、炒白术	85	25	黄芪、炒白术、六月雪	76
12	黄芪、当归	63	26	土茯苓、黄芪、石韦、六月雪	60
13	水蛭、黄芪	61	27	土茯苓、黄芪、炒白术、六月雪	73
14	泽泻、六月雪	63			

注:频度是每天喂养2次

类算法,得到8个新处方,见表5。新方核心组合药物网络和新方药物网络见图2。

2.4 新方1活性成分筛选 通过前述数据库对进行新方组合序列1药效组分检索,结果见表6。

2.5 新方1活性成分收集和筛选 获得18个生物活性成分,其作用靶点共37个(不含重复),其中排名靠前的主要成分有 $\beta$ -谷固醇、豆甾醇等。对应成分与作用靶点,发现1个活性成分可作用多个靶点,如 $\beta$ -谷固醇可对应靶点白细胞介素(IL)-6、血管内皮生长因子A(VEGFA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-3、NOS3、缺氧诱导因子(HIF)-1 $\alpha$ 、

表3 处方中药物组合关联规则(置信度为0.85)

Table 3 Association rules of drug combinations in prescriptions (confidence 0.85)

序号	规则	置信度
1	土茯苓->黄芪	0.929 292 929
2	石韦->土茯苓	0.876 712 329
3	六月雪->土茯苓	0.888 888 889
4	土茯苓->六月雪	0.969 696 970
5	当归->土茯苓	0.895 522 388
6	泽泻->泽兰	0.880 000 000
7	泽兰->泽泻	0.985 074 627
8	泽泻->黄芪	0.866 666 667
9	石韦->黄芪	0.904 109 589
10	六月雪->黄芪	0.870 370 370
11	黄芪->六月雪	0.862 385 321
12	牛膝->黄芪	0.939 393 939
13	炒白术->黄芪	0.923 913 043
14	当归->黄芪	0.940 298 507
15	石韦->六月雪	0.876 712 329
16	炒白术->六月雪	0.858 695 652
17	当归->六月雪	0.895 522 388
18	黄芪、石韦->土茯苓	0.939 393 939
19	土茯苓、石韦->黄芪	0.968 750 000
20	黄芪、六月雪->土茯苓	0.957 446 809
21	土茯苓、六月雪->黄芪	0.937 500 000
22	土茯苓、黄芪->六月雪	0.978 260 870
23	土茯苓->黄芪、六月雪	0.909 090 909
24	黄芪、炒白术->土茯苓	0.882 352 941
25	土茯苓、炒白术->黄芪	0.961 538 462
26	石韦、六月雪->土茯苓	0.968 750 000
27	土茯苓、石韦->六月雪	0.968 750 000
28	炒白术、六月雪->土茯苓	0.949 367 089
29	土茯苓、炒白术->六月雪	0.961 538 462
30	石韦、六月雪->黄芪	0.953 125 000
31	黄芪、石韦->六月雪	0.924 242 424

PON1、NR3C2;多个活性成分也可共同作用1个靶点,如 $\beta$ -谷固醇、豆甾醇、异鼠李素、槲皮素、山柰酚等都可以对应靶点NOS3;证实新方1是以多靶点、多途径来发挥整体作用。

2.6 CRF的靶点筛选 通过检索GeneCards、OMIM数据库得到CRF治疗靶点,设置Relevance score $\geq$ 5并删去重复靶点,共得到795个靶点。

2.7 共同靶点筛选及互作网络构建 将795个CRF靶点与药物活性成分作用靶点80个应用R语

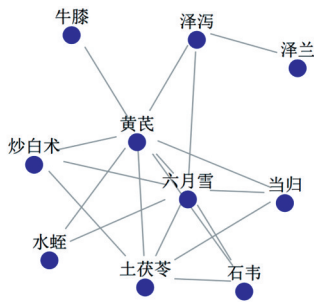


图1 支持度60,置信度0.85条件下的药物关联网络展示  
Fig. 1 Drug association network under the condition of support 60 and confidence 0.85

表4 基于改进的互信息法的药物间关联度分析  
Table 4 Correlation Analysis between drugs based on method of improved mutual information

药对	关联系数	药对	关联系数
黄芪-虎杖	0.062 263 79	黄芪-郁金	0.051 676 63
黄芪-牛膝	0.061 510 86	苏梗-山萸肉	0.051 539 33
黄芪-积雪草	0.060 492 52	虎杖-土茯苓	0.051 500 86
苏梗-莪术	0.055 892 83	苏梗-当归	0.051 291 35
苏梗-牛膝	0.054 038 52		

表5 基于熵层次聚类的治疗CRF新处方  
Table 5 New prescriptions for treatment of CRF based on entropy hierarchical clustering

序号	新方组合序列
1	苦杏仁-黄芪-桔梗-当归-土茯苓-炒白术
2	防风-荆芥-地肤子-紫菀-薄荷
3	苦杏仁-紫菀-桔梗-枇杷叶-炙麻黄
4	苏梗-党参-黄连-太子参
5	旱莲草-炙黄芪-贯众-金樱子-薏苡仁-女贞子
6	泽兰-忍冬藤-络石藤-泽泻
7	黄芩-水蛭-赤芍-枇杷叶-北沙参
8	甘草-玄参-野菊花-土茯苓-六月雪

言软件及Perl语言程序筛选出共同靶点,共37个输入Venny 2.1软件,得到的韦恩图见增强出版附加材料;应用STRING输入37个共同靶点,在“high confidence:0.4”模式下构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI),见增强出版附加材料。应用count.R插件统计出现频次前30蛋白靶点,出现频次较高有IL-6、VEGFA、Caspase-3、NOS3、HIF-1 $\alpha$ 等。

2.8 生物分子网络构建 采用Cytoscape 3.7.1在活性成分-CRF-靶点PPI网络图。其中红色代表疾病,紫色代表新方1,蓝色代表活性成分,绿色代表新方1活性成分与CRF的共同靶点。见增强出版附加材料。

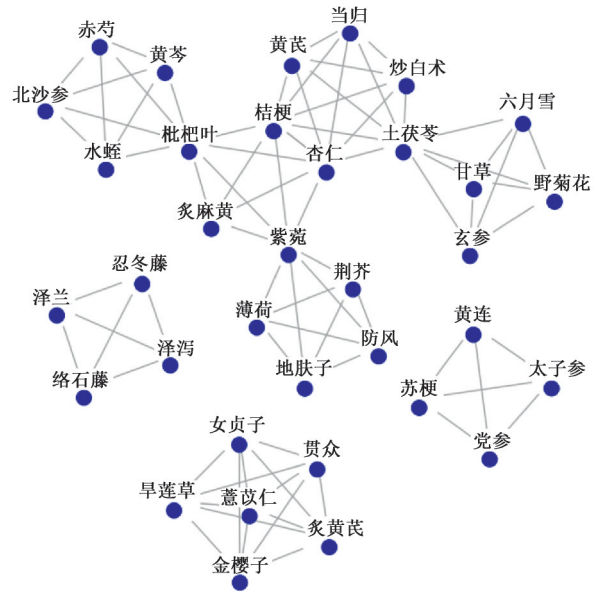


图2 新方核心组合药物网络展示  
Fig. 2 Network of new prescription core combination drugs

表6 新方1中组合序列活性成分  
Table 6 Active components of new prescription 1 combination sequence

分子编号	活性成分名称	OB/%	DL
MOL000049	3 $\beta$ -乙酰氧基苍术酮	54.07	0.22
MOL000358	$\beta$ -谷固醇	36.91	0.75
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76
MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24
MOL001689	金合欢素	34.97	0.24
MOL004355	菠菜甾醇	42.98	0.76
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
MOL001689	金合欢素	34.97	0.24
MOL004355	菠菜甾醇	42.98	0.76
MOL004580	顺式二氢槲皮素	66.44	0.27
MOL000006	木犀草素	36.16	0.25
MOL013119	内啡肽	40.56	0.74
MOL004328	柚皮素	59.29	0.21
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76
MOL004576	紫杉叶素	57.84	0.27
MOL004580	顺式二氢槲皮素	66.44	0.27
MOL000546	薯蓣皂苷元	80.88	0.81

2.9 GO分析及核心通路筛选 利用R语言软件对以上共同靶点进行GO功能分析得到的柱状图、气泡图,见增强出版附加材料,其中的生物过程主要涉及类固醇结合、类固醇激素受体活性、核受体活性、转录因子活性等。提示新方1可能通过调控多

个复杂的生物过程而治疗CRF。分析新方1作用靶点的KEGG Pathway富集,33个共同靶点主要分布于脂质和动脉粥样硬化、核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、Toll样受体(TLR)、HIF-1 $\alpha$ 等通路中,表明新方1通过作用于多通路协同治疗CRF。

**2.10 分子对接** 结合能 $\leq -4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 为分子与靶点结合性较好。5种主要成分都能与靶点蛋白较好地结合。其中豆甾醇与NOS3结合性最好。结果表明,这5种主要成分与蛋白靶点相互作用,结合后呈现稳定状态。见表7。

表7 新方1中主要成分与相应关键靶点分子对接

Table 7 Docking of main components with corresponding key target molecules of new prescription 1

成分	IL-6	NOS3	Caspase-3	VEGFA	HIF-1 $\alpha$
$\beta$ -谷固醇	-5.53	-7.61	-7.43	-6.61	-7.83
豆甾醇	-4.72	-8.29	-7.78	-6.22	-7.94
槲皮素	-4.91	-5.45	-4.37	-5.13	-7.61
异鼠李素	-5.11	-6.51	-4.88	-4.74	-5.53
山奈酚	-4.62	-6.43	-5.02	-4.55	-5.62

### 2.11 新方1对CRF大鼠NOS3表达影响

**2.11.1 对血清肌酐、尿素氮影响** 模型组血清肌酐、尿素氮(日立H7600型全自动生化分析仪,肌酐、尿素测定试剂盒)较空白组明显增加( $P<0.05$ ),给予新方1治疗后,血清肌酐、尿素氮较模型组明显降低( $P<0.05$ )。结果见表8。

表8 新方1对血清肌酐、尿素氮含量影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 8 Effect of serum creatinine and urea nitrogen of new prescription 1 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g	血清肌酐/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	尿素氮/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组		67.59 $\pm$ 5.62	7.23 $\pm$ 1.57
模型组		112.34 $\pm$ 15.57 <sup>1)</sup>	19.62 $\pm$ 4.16 <sup>1)</sup>
新方1组	7.2	71.63 $\pm$ 4.15 <sup>2)</sup>	10.73 $\pm$ 2.63 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ (表9同)

**2.11.2 对肾组织NO、NOS3含量影响** 模型组NO、NOS3含量较正常组显著下降( $P<0.05$ ),给予新方1治疗后,NO、NOS3含量较模型组显著升高( $P<0.05$ )。结果见表9。

## 3 讨论

**3.1 数据挖掘分析** 本研究应用中医传承辅助系统,解析吴兆东主任治疗CRF的用药规律。经过关联算法分析,提炼出吴兆东主任治疗CRF常用的药物有黄芪、六月雪、土茯苓、炒白术、水蛭、石韦、当

表9 新方1对肾组织NO、NOS3含量影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 9 Effect on contents of no and NOS3 in renal tissue of new prescription 1 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	NOS3/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
空白组		62.53 $\pm$ 6.32	0.91 $\pm$ 0.23
模型组		29.67 $\pm$ 8.33 <sup>1)</sup>	0.32 $\pm$ 0.61 <sup>1)</sup>
新方1组	7.2	42.36 $\pm$ 5.14 <sup>2)</sup>	0.77 $\pm$ 0.26 <sup>2)</sup>

归、泽兰、牛膝、泽泻等。基于关联规则的处方用药规律分析发现,常用药物组合有:①土茯苓、六月雪;②黄芪、六月雪;③土茯苓、黄芪;④土茯苓、黄芪、六月雪;⑤黄芪、炒白术;⑥炒白术、六月雪;⑦土茯苓、炒白术;⑧黄芪、炒白术、六月雪等。基于熵层次聚类的治疗CRF新处方有:①苦杏仁-黄芪-桔梗-当归-土茯苓-炒白术;②防风-荆芥-地肤子-紫菀-薄荷;③苦杏仁-紫菀-桔梗-枇杷叶-炙麻黄;④苏梗-党参-黄连-太子参;⑤旱莲草-炙黄芪-贯众-金樱子-薏苡仁-女贞子;⑥泽兰-忍冬藤-络石藤-泽泻;⑦黄芩-水蛭-赤芍-枇杷叶-北沙参;⑧甘草-玄参-野菊花-土茯苓-六月雪。

吴兆东主任认为CRF多涉及脾肾,病机分虚实,虚证以脾肾亏虚为主,治以补脾益肾;实证以湿浊、水湿、湿热、血瘀等多见,治以清热利湿、和络泄浊等。补益气血多选用黄芪、当归、炒白术;活血化瘀药物多选水蛭、泽兰、牛膝;淡渗利湿药物多用石韦、泽泻;清热利湿泄浊多用土茯苓、虎杖、黄芩。

**3.2 新方1潜在作用机制** 新方1由黄芪、当归、炒白术、土茯苓、苦杏仁、桔梗组成,全方具有益肾健脾、祛湿泄浊、畅调气机之功效。方中黄芪味甘、性微温,归脾肺经,具有健脾益气、升阳固表、消肿利湿等功效,可治CRF三焦失司<sup>[10]</sup>,为君药;当归味甘辛,性温,归心肝脾经,具有生血活血之功,为臣药。黄芪、当归,君臣配伍,益气养血,可显著降低尿蛋白、抑制肾纤维化、提高促红细胞生成素含量<sup>[11]</sup>。炒白术味甘、苦性温,归脾经、胃经,具健运脾胃、燥湿行水之效,可以抑制NF- $\kappa$ B信号通路,降低IL-6、TNF- $\alpha$ 等<sup>[12]</sup>,通过调节肠道微生态,抑制内毒素,发挥免疫调节作用<sup>[13]</sup>,而为佐药。黄芪、当归、白术为补益脾肾、补血的主要组合<sup>[14]</sup>。土茯苓味甘、淡,性平,归肝、胃经,具有利湿泄浊、清热排毒、和络通经等功效;可降低尿毒症毒素,为治疗CRF要药<sup>[15]</sup>,与炒白术共为佐药。苦杏仁、桔梗为药对,苦杏仁肃降,桔梗宣升,一升一降,条畅气机,即可通调水道,利水消肿,又可清除痰浊之邪<sup>[16]</sup>。吴兆东主任认为CRF患者浊毒不降,脏腑气机升降受阻,多采用“提

壶揭盖”法恢复气机,利于邪浊瘀毒排出。

为探索新方1治疗CRF的潜在作用机制,进一步开展网络药理学预测、分子对接及实验验证。结果表明,筛选出新方1的生物活性成分28个,从活性成分-靶点互作网络构建结果中得知其关键活性成分是 $\beta$ -谷固醇、豆甾醇、槲皮素、异鼠李素、山柰酚。基于活性成分-CRF-靶点互作网络,发现IL-6、VEGFA、Caspase-3、NOS3、HIF-1 $\alpha$ 等关键靶点。 $\beta$ -谷固醇可降低血清总胆固醇含量,从而抑制肾损害<sup>[17]</sup>。 $\beta$ -谷固醇可抑制巨噬细胞M1极化,增强M2极化,降低TNF- $\alpha$ 、IL-6水平,抑制TLR而发挥调节免疫作用<sup>[18]</sup>。豆甾醇是一种天然的类固醇,抑制LPS/TLR通路而改善全身炎症反应<sup>[19]</sup>,调节TNF- $\alpha$ /VEGFR轴,抑制血管新生<sup>[20]</sup>。异鼠李素通过作用TGF- $\beta_1$ /Smad3和TGF- $\beta_1$ /p38 MAPK通路抑制细胞外基质形成而抑制纤维化<sup>[21]</sup>。山柰酚可通过抑制ASK1/MAPK通路,显著降低氧化应激和脂质过氧化<sup>[22]</sup>;通过NF- $\kappa$ B信号通路抑制炎症因子释放<sup>[23]</sup>。IL-6在高糖环境下通过激活JAK/STAT、Ras-Raf-MAP等途径,参与免疫炎症、肾纤维化过程<sup>[24]</sup>。VEGFA是VEGF的亚型,VEGFA与VEGFR2结合可加重肾间质纤维化<sup>[25]</sup>。Caspase-3介导CRF肾小管细胞GSDME表达从而引起继发性坏死和纤维化<sup>[26]</sup>。肾表皮生长因子受体可介导足细胞自噬和炎症浸润<sup>[27]</sup>。NOS3可减少SOD水平,发挥抗氧化、抑炎作用<sup>[25]</sup>。动物实验也发现,给予新方1治疗后,NO、NOS3含量较模型组显著升高,提示新方1可能通过作用于NOS3而发挥抗氧化、抑炎效应。

结合KEGG数据库对通路注释分析发现,新方1有效成分可能通过作用于脂质和动脉粥样硬化、NF- $\kappa$ B、TLR、HIF-1 $\alpha$ 等通路。脂质和动脉粥样硬化是CRF合并心血管风险的主要因素<sup>[28]</sup>;NF- $\kappa$ B通路激活炎症反应,参与了CRF进展<sup>[29]</sup>;TLR介导天然性免疫反应,介导炎症、肾损伤和肾纤维化<sup>[30]</sup>;HIF-1 $\alpha$ 调控肾脏氧感应,导致肾脏缺氧及间质纤维化,是治疗CRF的关键<sup>[31]</sup>。

综上,新方1可能通过 $\beta$ -谷固醇、豆甾醇槲皮素、异鼠李素、山柰酚等成分作用于IL-6、VEGFA、Caspase-3、NOS3、HIF-1 $\alpha$ 等靶点,调控脂质和动脉粥样硬化、NF- $\kappa$ B、TLR、HIF-1 $\alpha$ 等通路,发挥多成分、多靶点、多途径、多环节整合调节效应而治疗CRF。分子对接也确证上述成分和靶点之间有较强的结合活性。

**3.3 总结** 吴兆东主任治疗CRF以补益脾肾、益气

养血、通畅气机、和络泄浊为主。本研究基于中医传承辅助系统平台开展吴兆东主任用药规律数据挖掘研究,获得了既往传统医案整理和统计学研究未获得的新知识、新信息,为吴兆东主任CRF治验的深入挖掘和传承提供有益参考。

通过网络药理学发现新方1治疗CRF的作用特点是多成分、多靶点的,其主要参与调控脂质和动脉粥样硬化、NF- $\kappa$ B、Toll样受体、HIF-1 $\alpha$ 等通路而抑制CRF进展。从理论和实验层面研究了新方1治疗CRF的作用机制,为中医辨治CRF提供值得借鉴的遣药组方思路。然,应用关联规则和聚类研究得到的组方规则、核心组合和新处方等还需进一步临床验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] LV J C, ZHANG L X. Prevalence and disease burden of chronic kidney disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 3-15.
- [2] HEERSPINK H, STEFÁNSSON B V, CORREA-ROTTER R, et al. Dapagliflozin in patients with chronic kidney disease [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (15): 1436-1446.
- [3] RUIZ-ORTEGA M, RAYEGO-MATEOS S, LAMAS S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(5): 269-288.
- [4] 张荣东,林莺,刘利华. 国医大师邹燕勤从肾虚湿瘀论治慢性肾脏病经验 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(6): 109-111.
- [5] 刘新,肖春霞,张星平,等. 张星平运用元气理论辨治慢性肾功能衰竭经验 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34 (10): 4639-4642.
- [6] 樊威伟. 张大宁从虚、瘀、湿、逆论治慢性肾功能衰竭经验 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(11): 916-919.
- [7] 张宏,王旭昀,刘美奇,等. 国医大师吕仁和教授治疗慢性肾功能衰竭经验总结 [J]. *西部中医药*, 2020, 33(2): 37-39.
- [8] 国家药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则(试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 164.
- [9] 余柯娜,麻志恒,钟利平,等. SD大鼠与C57小鼠5/6肾切除慢性肾功能衰竭模型比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(8): 48-53, 87.
- [10] 苏醒,徐建龙,包蓓艳. 黄芪当归汤辅助治疗慢性肾功能衰竭(3期~4期)的临床研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(2): 495-497.
- [11] 刘婕,冯兴中. 吕仁和治疗慢性肾功能衰竭药对挖掘与浅析 [J]. *世界中医药*, 2017, 12(3): 606-609.

- [12] 顾思浩,孔维崧,张彤,等. 白术的化学成分与药理作用及复方临床应用进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1):69-73.
- [13] 文雯,程祖强,侯凯. 基于肠道微生态的白术散作用机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2021:1-11.
- [14] 夏平,张露,刘琼,等. 基于"肾虚湿瘀"理论治疗慢性肾脏病的核心方药分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(6):1075-1084.
- [15] 范为民,李艳. 国医大师李济仁教授辨治肾系疾病经验摘要[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(12):3027-3029.
- [16] 易志忠,陈国忠,欧智海,等. 基于"升降相因"探讨脏腑气机升降及药对配伍理论[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(2):228-229, 239.
- [17] LIU Y, LEI L, WANG X, et al. Plasma cholesterol-raising potency of dietary free cholesterol versus cholesteryl ester and effect of  $\beta$ -sitosterol [J]. Food Chem, 2015, 169:277-282.
- [18] LIU R, HAO D, XU W, et al.  $\beta$ -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice [J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 161-168.
- [19] ANTWI A O, OBIRI D D, OSAFO N, et al. Stigmasterol inhibits lipopolysaccharide-induced innate immune responses in murine models [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 53: 105-113.
- [20] KANGSAMAKSIN T, CHAITHONGYOT S, WOOTHICHAIKANGSANG C, et al. Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  [J]. PLoS One, 2017, 12(12):e0189628.
- [21] LIU N, FENG J, LU X, et al. Isorhamnetin inhibits liver fibrosis by reducing autophagy and inhibiting extracellular matrix formation via the TGF-1/Smad3 and TGF-1/p38 MAPK pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 2019:6175091.
- [22] LIU C, LIU H, LU C, et al. Kaempferol attenuates imiquimod-induced psoriatic skin inflammation in a mouse model [J]. Clin Exp Immunol, 2019, 198(3): 403-415.
- [23] IMRAN M, RAUF A, SHAH Z A, et al. Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review [J]. Phytother Res, 2019, 33(2):263-275.
- [24] FEIGERLOVÁ E, BATTAGLIA-HSU S F. IL-6 signaling in diabetic nephropathy: From pathophysiology to therapeutic perspectives [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 37:57-65.
- [25] ZHANG Y, ZHANG Y. lncRNA ZFAS1 improves neuronal injury and inhibits inflammation, oxidative stress, and apoptosis by sponging miR-582 and upregulating NOS3 expression in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Inflammation, 2020, 43(4): 1337-1350.
- [26] WEN S, WANG Z H, ZHANG C X, et al. Caspase-3 promotes diabetic kidney disease through gasdermin E-mediated progression to secondary necrosis during apoptosis [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 313-323.
- [27] LAWAN A, BENNETT A M. Mitogen-activated protein kinase regulation in hepatic metabolism [J]. Trends Endocrinol Metab, 2017, 28(12): 868-878.
- [28] POZNYAK A, GRECHKO AV, POGGIO P, et al. The Diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1835.
- [29] LIU W, ZHU H, FANG H. Propofol potentiates sevoflurane-induced inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B-mediated inflammatory responses and regulation of mitogen-activated protein kinases pathways via toll-like receptor 4 signaling in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Am J Med Sci, 2017, 354(5):493-505.
- [30] FENG Q, LIU D, LU Y, et al. The interplay of renin-angiotensin system and Toll-like receptor 4 in the inflammation of diabetic nephropathy [J]. J Immunol Res, 2020, 2020(1):6193407.
- [31] 唐群,吴华,张熙,等. 六味地黄汤对慢性肾衰模型大鼠PHD2和HIF-1 $\alpha$ 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(4):290-296.

[责任编辑 顾雪竹]