

· 数据挖掘 ·

# 大黄抗肾脏纤维化的网络药理学及其活性成分的作用机制

周珊珊<sup>1</sup>, 艾中柱<sup>2</sup>, 李伟男<sup>3,4</sup>, 巴元明<sup>3,4\*</sup>

(1. 湖北中医药大学 中医临床学院, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学 药学院, 武汉 430065;  
3. 湖北省中医院, 武汉 430061; 4. 湖北省中医药研究院, 武汉 430074)

**[摘要]** **目的:** 通过网络药理学方法, 预测中药大黄抗肾脏纤维化的活性成分、潜在靶点及通路, 选取活性成分, 对筛选出的靶基因进行体外实验验证。**方法:** 检索中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 与中药分子机制分析综合数据库 (TCMID) 获取并筛选大黄主要活性成分, 利用相似度系综算法数据库 (SEA), 瑞士生物信息学研究所 (SIB), GeneCards 数据库预测和筛选大黄抗肾脏纤维化的潜在作用靶点。采用 String Version 10.5 数据库构建靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络; 运用 David 6.8 软件对关键靶点进行基因本体论 (GO) 富集分析、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。采用 Cytoscape Version 3.6.0 软件对关键蛋白相互作用网络、活性成分-关键靶点网络、活性成分-靶点-信号通路网络进行可视化分析。结合 Malacards 数据库筛选出与肾脏纤维化高关联性信号通路。进一步采用细胞实验验证: 选取 HK-2 细胞, 利用转化生长因子- $\beta_1$  ( $TGF-\beta_1$ ) 诱导细胞纤维化模型, 予大黄酸干预细胞 48 h, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), 血管内皮生长因子 (VEGF), 血小板衍生生长因子受体- $\alpha$  (PDGFR- $\alpha$ ), 免疫荧光检测 E-钙黏蛋白 (E-cadherin),  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 蛋白表达, 流式细胞术检测细胞凋亡。**结果:** 筛选得到大黄活性成分 17 个, 大黄抗肾脏纤维化潜在靶点 424 个, 关键靶点 5 个, 依次为蛋白激酶 B (Akt) 1, 丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 3, EGFR, 白细胞介素-6 (IL-6), VEGFA; GO 富集生物学过程主要涉及信号转导、细胞增殖、凋亡等生物过程; KEGG 通路富集结果发现磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/Akt, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, 叉头转录因子 (FoxO) 等通路与大黄抗肾脏纤维化作用机制相关。体外实验验证表明, 大黄酸抑制 E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGFR- $\alpha$  的表达水平, 同时抑制肾小管上皮细胞凋亡, 验证了网络药理学部分预测结果。**结论:** 本研究体现了大黄多成分、多靶点、多途径的作用特点, 其抗肾脏纤维化的作用机制可能与其抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF/PDGFR- $\alpha$  信号转导途径, 抑制细胞凋亡及肾小管上皮细胞上皮间质转化 (EMT) 有关。

**[关键词]** 大黄; 网络药理学; 肾脏纤维化; 靶点; 作用机制

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2020) 10-0163-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20201002

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200210.1235.002.html>

**[网络出版时间]** 2020-02-10 13:38

## Active Components and Mechanism of Rhei Radix et Rhizoma on Renal Fibrosis Based on Network Pharmacology

ZHOU Shan-shan<sup>1</sup>, AI Zhong-zhu<sup>2</sup>, LI Wei-nan<sup>3,4</sup>, BA Yuan-ming<sup>3,4\*</sup>

(1. Clinical Medical college of Traditional Chinese Medicine (TCM), Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;  
3. Hubei Provincial Hospital of TCM, Wuhan 430061, China;  
4. Hubei Provincial Academy of TCM, Wuhan 430074, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the active components, potential targets and signaling pathways of Rhei Radix et Rhizoma in the treatment of renal fibrosis based on the network pharmacology method, and then to verify

**[收稿日期]** 20191106(021)

**[基金项目]** 武汉市科技计划项目 (2017060201010223)

**[第一作者]** 周珊珊, 在读博士, 从事中医药防治慢性肾脏疾病研究, E-mail: zhouss2009@126.com

**[通信作者]** \* 巴元明, 硕士, 教授, 主任医师, 从事中医药防治慢性肾脏疾病研究, E-mail: bayuanming@126.com

the target genes *in vitro*. **Method:** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Traditional Chinese Medicine Integrated Database (TCMID) were retrieved to obtain the main active ingredients of Rhei Radix et Rhizoma. The potential anti-renal fibrosis targets of Rhei Radix et Rhizoma were predicted by similarity ensemble approach (SEA), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) and GeneCards Database. Target protein-protein interaction (PPI) network was constructed by using String Version 10.5 database. David 6.8 software was used for gene ontology (GO) enrichment analysis and the Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the key targets. Cytoscape Version 3.6.0 software was used for visualized analysis of PPI network, active ingredient-key target network and the ingredient-target-signal pathway network. In combination with Malachards database, the signal pathways with high correlation with renal fibrosis were screened. Then, cell experiments were used for verification; HK-2 cells were selected to establish fibrosis model by transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) stimulation. The cells were treated with rhein for 48 hours. Western blot assay was used to detect the protein expression level of hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF), and platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGFR- $\alpha$ ). Protein expression levels of E-cadherin and  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) were detected by immunofluorescence. Apoptosis was detected with flow cytometry. **Result:** Totally 17 active ingredients of Rhei Radix et Rhizoma and 424 targets of anti-renal fibrosis effect were screened out, including five key targets: protein kinase B (Akt) 1, mitogen activated protein kinases 3 (MAPK3), epidermal growth factor receptor (EGFR), interleukin (IL) -6 and VEGFA in turn. The biological process of GO enrichment mainly involved signal transduction, cell proliferation and apoptotic process. The results of KEGG pathway enrichment showed that phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt, HIF-1, VEGF, and forkhead transcription factor (FoxO) pathways were related to the anti-renal fibrosis mechanism of Rhei Radix et Rhizoma. Results of the *in vitro* experiment proved that rhein could inhibit the expression of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, HIF-1 $\alpha$ , VEGF and PDGFR- $\alpha$ . In addition, rhein inhibited apoptosis induced by TGF- $\beta_1$  in HK-2 cells. Part of the prediction results of network pharmacology were verified. **Conclusion:** This study reflects the multi-component, multi-target and multi-pathway mechanism characteristics of Rhei Radix et Rhizoma. The mechanisms of its anti-renal fibrosis effects may be related to inhibiting HIF-1  $\alpha$  / VEGF /PDGFR- $\alpha$  signaling pathway, apoptosis and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular epithelial cells.

[ **Key words** ] Rhei Radix et Rhizoma; network pharmacology; renal fibrosis; target; mechanism of action

肾脏纤维化是各种原因引起的慢性肾脏病进行性发展的共同病理学特征,是导致终末期肾脏病的关键。肾脏纤维化以大量成纤维细胞及肌纤维细胞的增生,细胞外基质的产生和堆积导致的肾小管间质纤维化、肾小球硬化和肾内血管硬化为主要特征,此外,肾脏纤维化过程中还伴有炎症反应,最终导致不可逆性的肾损伤<sup>[1]</sup>。因此抗肾脏纤维化对于延缓和治疗慢性肾脏疾病具有十分重要的意义。近年来,肾脏纤维化的病理生理机制研究取得了较大进展,国内外致力于其分子层面的挖掘以期发现其新的作用靶点,从而寻求治疗的突破口。但是,由于肾脏纤维化机制复杂,单一的靶向药物可能具有一定的治疗局限,是肾脏病学中的一个重大科学问题。而中药具有多成分,多靶点,多途径的特点,在肾脏纤维化的治疗和辅助治疗方面具有很大的潜力。

大黄始载于《神农本草经》,是蓼科植物药用大黄、唐古特大黄、掌叶大黄的干燥根和根茎,性寒,味

苦,有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经、利胆退黄之效。现代药理研究认为大黄具有抑菌抗炎<sup>[2]</sup>、活血止血、调节胃肠道、保肝利胆<sup>[3]</sup>、保护肾脏<sup>[4]</sup>、保护心脑血管<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6]</sup>等药理作用。大黄在临床上对于肾脏疾病的治疗,主要用于泌尿系感染、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、膀胱出血等疾病的治疗和辅助治疗。已有相关研究表明,大黄可以通过减少细胞外基质聚集(ECM),抑制肾小管上皮细胞间充质转化(EMT),抑制炎症,调节脂质代谢、改善微循环等<sup>[7-8]</sup>。延缓肾纤维化。然而由于中草药化学成分复杂,作用靶点较多,很难科学全面地阐述其物质基础及分子机制。

网络药理学是药理学中的新兴学科,基于系统生物学和多向药理学,从整体层面研究中草药治疗疾病的分子机制,为药物成分与疾病靶点之间的复杂作用提供生物学网络构建以及网络可视化分析。特别适合中药多成分,多靶点,多途径的物质基础研

究。本研究采用网络药理学方法,构建大黄活性成分对肾脏纤维化的“成分-靶标-通路”网络,获得大黄抗肾脏纤维化的主要活性成分、关键靶标及信号转导通路,在此基础上,采用转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 诱导 HK-2 细胞获得纤维化模型,予大黄酸干预,观察其是否作用于筛选出的相关信号转导途径,以明确其机制,为后续实验提供新的思路和科学依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人肾小管上皮细胞系 HK-2 购于武汉大学中国细胞典藏中心。

**1.2 药物与试剂** 大黄酸(美国 Sigma 公司,批号 R7269); TGF- $\beta_1$  (美国 Peprotech 公司,批号 0218209-1-H13); DMEM 高糖培养基,胎牛血清,胰酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 8119228, 10091-148, 25200-026); 细胞增殖毒性检测试剂盒 (CCK-8) (日本同仁化学研究所,批号 CK-04); 羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 辣根过氧化物酶(HRP)二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA1054); 兔血管内皮生长因子(VEGF), E-钙黏蛋白(E-cadherin)多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为 20874-1-Ig, 19003-1-AP); 兔血小板衍生生长因子受体  $\alpha$  (PDGFR- $\alpha$ ), 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),  $\alpha$ -SMA 多克隆抗体(美国 Affinity 公司,批号分别为 AF5179, AF1009, AF5246, AF5694)。

**1.3 仪器** 303AS-1 型电热恒温培养箱(日本 Azone 公司); 微量移液器,  $\mu$ lISKANMK3 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司); DY CZ-40 型电泳仪和转膜仪(北京六一仪器厂); HI650 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); CytoFLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司); 5702R 型低速离心机(德国 Eppendorf 公司); BX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 大黄活性成分的筛选** 利用 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>), TCMID 数据库 (<http://www.megabionet.org/tcmid/>) 整合的化学成分,共同作为大黄的化学成分。由于中药汤剂需通过吸收(absorption), 分布(distribution), 代谢(metabolism) 和排泄(excretion) 的药代动力学(ADME) 过程发挥药效作用。因此模拟 ADME 过程筛选活性成分, 主要以口服利用度预测(OB) 和类药

性(DL) 参数作为筛选中药活性成分的重要评价指标<sup>[9]</sup>。因此整合 TCMSP, TCMID 数据库的化学成分, 筛选出同时满足 OB $\geq$ 30% 和 DL $\geq$ 0.18 的化学成分作为大黄的活性成分。

**2.1.2 活性成分潜在靶点预测与筛选** 利用 PubChem 数据库找到筛选出的大黄活性成分的 Smiles 化学式, 将活性成分对应的 Smiles 化学式输入到 SEA (<http://sea.bkslab.org/>) 与 SIB (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库, 得到作用靶点。为提高作用靶点的准确度, 将 SEA 和 SIB 数据库得到的作用靶点取交集。通过蛋白质数据库 UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) 将靶点名称输入并限定物种为人, 检索得到的最后靶点作为大黄潜在作用靶点, 并校正为其官方名称(official symbol), 获取 Unitprot 编号。利用在线文本挖掘服务器 GeneCards (<http://www.genecards.org/>), 人类孟德尔遗传 OMIM (<http://www.omim.org/>) 数据库输入关键词“renal fibrosis” 查找分析相关的人类基因, 整合 GeneCards 和 OMIM 数据库收录的所有相关基因。利用 Omishare (<https://www.omishare.com/>) 平台将上诉收集到的药物靶点和肾脏纤维化相关靶点进行映射, 并绘制 Venn 图, 同时获取活性成分-疾病的共同作用靶点作为大黄活性成分抗肾脏纤维化的潜在靶点。

**2.1.3 “大黄-肾脏纤维化”靶点相互作用网络** String Version 10.5 数据库 (<https://string-db.org/>) 是一种包含实验验证得到的和通过生物信息学方法预测得到的蛋白-蛋白相互作用(PPI) 的数据库。将潜在作用靶点导入 String 数据库, 限定物种为人, 获取其相互作用关系。利用 Cytoscape Version 3.6.0 软件进行 PPI 网络分析和可视化处理, 利用 Network Analyzer 分析其度中心性(Degree), 接近中心性(Betweenness Centrality) 及紧密度中心性(Closeness Centrality) 等网络拓扑特征值。网络中一个节点的度表示与该节点直接相互作用的节点的数目, 度值越大则表示该节点参与的生物功能越多, 在网络中的重要性越大。因此以大于平均自由度的靶点作为网络关键靶点进行下一步机制研究。

**2.1.4 活性成分-关键靶点网络图构建** 对上述筛选出的大黄活性成分和治疗肾脏纤维化的网络关键靶点, 利用 Cytoscape Version 3.6.0 软件进行可视化分析, 构建活性成分-关键靶点网络模型。网络中, 节点(node) 代表大黄活性成分, 大黄活性成分抗肾脏纤维化关键靶点; 边(edge) 代表大黄活性成

分与关键靶点之间的相互关系。对系统网络进行分析,进一步阐明大黄关键活性成分以及抗肾脏纤维化的关键靶点。

**2.1.5 基因本体(GO)富集,京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集与成分-靶点-通路网络构建** David 数据库(<http://www.david.niaid.nih.gov>)为大规模基因或蛋白质提供系统生物功能注释信息,并能提供富集分析结果。利用 David 6.8 数据平台对关键靶点进行 GO 富集和 KEGG 通路富集分析,GO 分析时选择生物学过程(BP),细胞组成(CC)和分子功能(MF)3个模块进行功能注释。以进一步揭示大黄抗肾脏纤维化作用机制。对 KEGG 富集出的通路信息,以  $P < 0.05$  作为显著性强的临界筛选,以 Count 值降序排列,结合 Malacards-Human disease database(<https://www.malacards.org/>)数据库搜索与肾脏纤维化相关的信号通路,与 KEGG 富集的通路进行筛选,列出大黄活性成分抗肾脏纤维化相关的前 20 位关键通路,并利用 Cytoscape Version 软件构建活性成分-靶点-通路网络图。

## 2.2 细胞实验验证

**2.2.1 细胞培养** HK-2 细胞复苏后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱内培养。待细胞贴壁长满 80%,用胰酶消化传代,取对数生长期的细胞用于实验。将传代的 HK-2 细胞随机分为空白组、模型组及大黄酸组,用无血清培养基同步化培养 12 h 后,空白组不做处理;模型组予 10 μg·L<sup>-1</sup> 的 TGF-β<sub>1</sub> 干预 48 h;大黄酸组予 10 μg·L<sup>-1</sup> 的 TGF-β<sub>1</sub> 及大黄酸干预 48 h。

**2.2.2 CCK-8 法筛选大黄酸最佳浓度** 取对数期生长的 HK-2 细胞按每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个接种于 96 孔板中,每孔 100 μL。于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至贴壁后,吸弃培养基。无血清培养基同步化培养 12 h 后,予 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度梯度大黄酸,作用 48 h,每孔加入 CCK-8 10 μL,在 37 °C 孵育 4 h 后,酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 A,细胞活力 =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{阴性组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{阴性组}}) \times 100\%$ 。根据细胞活力筛选药物最佳浓度。

**2.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HIF-1α, VEGF, PDGFR-α 蛋白表达水平** HK-2 细胞在冰上用含鸡尾酒蛋白酶抑制剂的 Ripa 缓冲液溶解 30 min。用 BCA 蛋白检测试剂盒检测总蛋白浓度。10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离等量的蛋白质(30 μg),然后电泳转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶在 TBST 缓冲液中

室温下封闭 2 h,加入抗体(HIF-1α, VEGF, PDGFR-α, 内参 GADPH, 稀释比 1:1 000),4 °C 孵育过夜。次日, TBST 洗膜后,加入二抗羊抗兔 IgG HRP 进行孵育,用增强化学发光(ECL)系统成像,采用 BandScan 软件对蛋白进行半定量分析。

**2.2.4 免疫荧光检测 E-cadherin, α-SMA 的表达** 将各组细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次后,0.5% TritonX-100 渗透细胞 15 min, 10% 羊血清室温下封闭细胞 30 min,加入用抗体 α-SMA (1:100), E-cadherin (1:100)于 4 °C 过夜, PBS 洗涤 3 次后, cy3 标记的羊抗兔 IgG H&L(1:200)在 37 °C 下染色 60 min。用 PBS 洗涤后,用 DAPI 对细胞进行复染,观察细胞核,并用荧光显微镜进行拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量蛋白的积分吸光度 IA 行统计分析。

**2.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞,终止消化后收集细胞;将各组细胞用 PBS 润洗 2 次, 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min;加入 Binding Buffer 500 μL,重悬细胞; AnnexinV-FITC 5 μL 混匀后加入 PI 5 μL,混匀;室温避光反应 5~15 min(同时设阴性组,即正常细胞不加 AnnexinV-FITC 和 PI;阳性组 1,以凋亡效果最明显的溶剂组作为阳性组,只加 AnnexinV-FITC 5 μL 单标;阳性组 2,以凋亡效果最明显的溶剂组作为阳性组,只加 PI 单标 5 μL);流式细胞仪上机检测细胞凋亡情况。

**2.3 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行统计学分析,实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐,组间两两比较采用 Dunnett's T3 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 大黄活性成分** 根据 TCMSp, TCMID 数据库,结合筛选条件 OB ≥ 30% 和 DL ≥ 0.18 共得到大黄活性成分 17 个。见表 1。

**3.2 大黄活性成分抗肾脏纤维化作用靶点预测** 将 SEA 和 SIA 数据库得到的所有靶点,删除重复并去除假阳性项,整合得到大黄作用靶点共 669 个。由 GeneCards 与 OMIM 数据库检索整合得到的肾脏纤维化靶点共 4 232 个,大黄活性成分作用靶点与肾脏纤维化作用靶点进行基因映射,共得潜在作用靶点 424 个。见图 1。

**3.3 “大黄-肾脏纤维化”蛋白互作(PPI)网络分析** 通过在线 String 平台获得 PPI 网络,该网络包括

表 1 大黄筛选出的 17 个候选化合物信息

Table 1 Information of 17 candidate compounds selected from Rhei Radix et Rhizoma

| MOL       | 成分名称  | OB/%  | DL   |
|-----------|---|-------|------|
| MOL002281 | toralactone                                 | 46.46 | 0.24 |
| MOL000471 | aloe-emodin                                 | 83.38 | 0.24 |
| MOL000096 | (-)-catechin                                | 49.68 | 0.24 |
| MOL002268 | rhein                                       | 47.07 | 0.28 |
| MOL002260 | procyanidin B-5,3'-O-gallate                | 31.99 | 0.32 |
| MOL002235 | EUPATIN                                     | 50.80 | 0.41 |
| MOL002276 | sennoside E <sub>qt</sub>                   | 50.69 | 0.61 |
| MOL002293 | sennoside D <sub>qt</sub>                   | 61.06 | 0.61 |
| MOL002251 | mutatochrome                                | 48.64 | 0.61 |
| MOL002259 | physciondiglucoside                         | 41.65 | 0.63 |
| MOL002303 | palmidin A                                  | 32.45 | 0.65 |
| MOL000554 | gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside    | 30.25 | 0.67 |
| MOL002297 | daucosterol <sub>qt</sub>                   | 35.89 | 0.70 |
| MOL002280 | torachryson-8-O-beta-D-(6'-oxayl)-glucoside | 43.02 | 0.74 |
| MOL000358 | beta-sitosterol                             | 36.91 | 0.75 |
| MOL002288 | emodin-1-O-beta-D-glucopyranoside           | 44.81 | 0.80 |
| MOL000073 | ent-epicatechin                             | 48.96 | 0.24 |

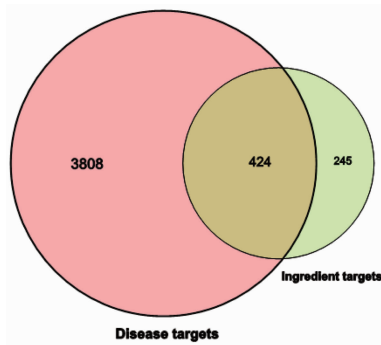


图 1 “大黄-肾脏纤维化”基因映射 Venn  
Fig.1 Rhubarb on kidney fibrosis gene mapping by Venn

429 个节点,8 036 条边,网络中节点平均自由度为 37.5,提取大于平均自由度的节点构建子网络,见图 2。子网络包括 132 个节点,3 267 条边,节点的颜色及大小代表节点的自由度,颜色越深、节点越大代表该节点的自由度越高,在网络中的重要性越强。根据子网络中节点自由度为平均自由度 2 倍以上的节点筛选出 9 个关键节点<sup>[10]</sup>,按自由度从高到低排序依次为蛋白激酶 B1 (Akt1),血管内皮生长因子 A (VEGFA),肿瘤蛋白 P53 (TP53),白细胞介素-6

(IL-6),表皮生长因子受体 (EGFR),白蛋白 (ALB),酪氨酸专一性蛋白激酶 (SRC),丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3),信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3),展示前 9 位关键节点的网络拓扑参数,见表 2。

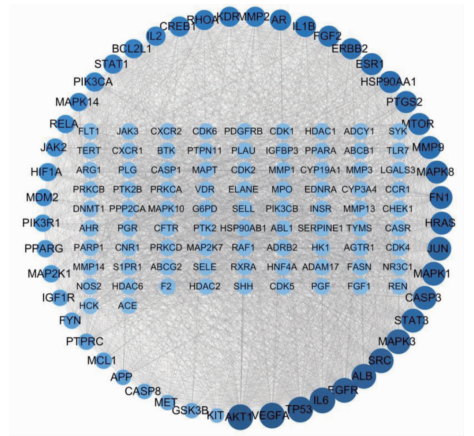


图 2 “大黄-肾脏纤维化”蛋白相互作用 (PPI) 网络  
Fig.2 PPI network of rhubarb renal fibrosis

表 2 PPI 网络关键节点及其拓扑参数

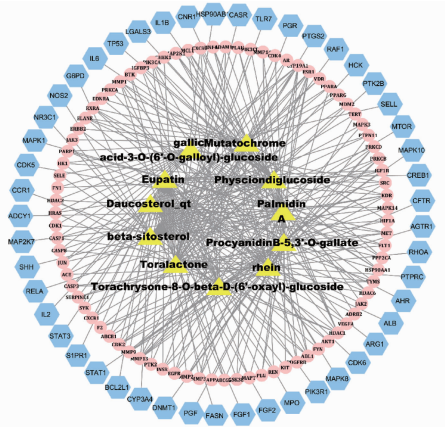
Table 2 Key nodes and topological parameters of PPI network

| 名称    | Degree | Betweenness Centrality | Closeness Centrality |
|-------|--------|------------------------|----------------------|
| Akt1  | 119    | 0.04                   | 0.92                 |
| VEGFA | 113    | 0.03                   | 0.88                 |
| TP53  | 110    | 0.03                   | 0.86                 |
| IL-6  | 110    | 0.03                   | 0.86                 |
| EGFR  | 106    | 0.03                   | 0.84                 |
| ALB   | 106    | 0.03                   | 0.84                 |
| SRC   | 105    | 0.02                   | 0.83                 |
| MAPK3 | 105    | 0.02                   | 0.83                 |
| STAT3 | 102    | 0.02                   | 0.82                 |

3.4 大黄“活性成分-关键靶点”网络图构建 使用 Cytoscape Version 3. 6. 0 软件构建大黄活性成分-关键靶点网络图,见图 3。

网络图分析结果显示,由上述 PPI 网络分析筛选出来的关键靶点对应的的大黄活性成分有 11 个,包括 rhein, Physciondiglucoside, Toralactone, Eupatin, beta-sitosterol, Daucosterol<sub>qt</sub>, Mutatochrome, Palmidin A 等,大黄相同活性成分可以作用于多个靶标,同一靶标对应不同的化学成分,充分体现了大黄抗肾脏纤维化多成分,多靶点的作用特点。

3.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析 利用 David 在线平台对 PPI 网络中大于平均自由度



黄色三角形代表大黄活性成分;粉色圆形代表 Degree 值 > 1 的靶点;紫色多边形代表 Degree 值为 1 的靶点;边代表活性成分与靶标之间的关系

图 3 大黄活性成分-关键靶点网络

Fig. 3 Network of active components-key targets of rhubarb

的 132 个关键靶点进行富集分析,以  $P < 0.05$ , Count 值降序排列筛选出排名前 10 位的 GO 条目,见图 4;结合 Malarcards 数据库的肾脏纤维化相关通路信息筛选出排名前 20 的与肾脏纤维化相关的通路,见图 5。

GO 富集分别从生物过程 (BP), 细胞成分 (CC), 分子功能 (MF) 3 个水平对靶点进行分类分析,从图 4 看出,在生物过程中,靶点主要涉及信号转导 (signal transduction), RNA 聚合酶 II 启动子转录的阳性调控 (positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter), 细胞增殖的正向调控 (positive regulation of cell proliferation), 凋亡过程的负调节 (negative regulation of apoptotic process) 等生物过程;在细胞成分中,其靶点主要涉及核 (nucleus), 质膜 (plasma membrane), 胞质溶胶 (cytosol), 细胞质 (cytoplasm) 分子关联的基因;在分子功能中,靶点主要涉及蛋白质结合 (protein binding), ATP 结合 (ATP binding), 相似蛋白结合 (identical protein binding) 等。

KEGG 通路富集 (图 5) 分析结果显示,靶点主要与磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt), 缺氧诱导因子-1 (HIF-1), 肿瘤坏死因子 (TNF), 大鼠肉瘤 (Ras), VEGF, 叉头转录因子 (FoxO), Toll 样受体 (Toll-like receptor), Wnt 信号通路 (Wnt signaling pathway), 核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 等信号通路相关。这些通路跟肾脏纤维化的形成机制有着密切的联系,有研究显示这些通路直接或间接介导并参与肾脏纤维化的发生发展过程。上述结果表明

大黄主要化学成分的作用靶点涉及的生物学过程多样化,并分布于不同的代谢通路,体现了其多成分,多靶点,多途径的治疗特点。

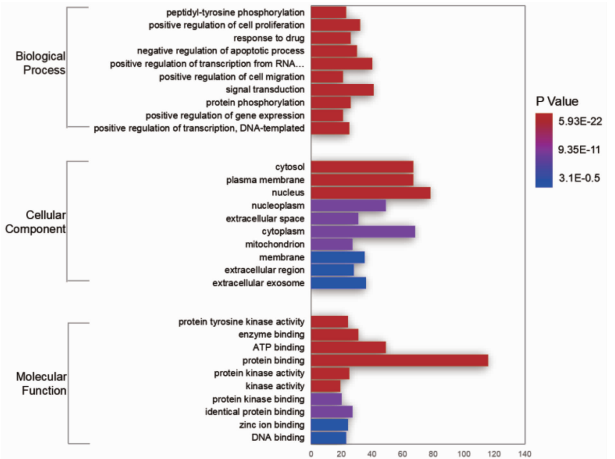
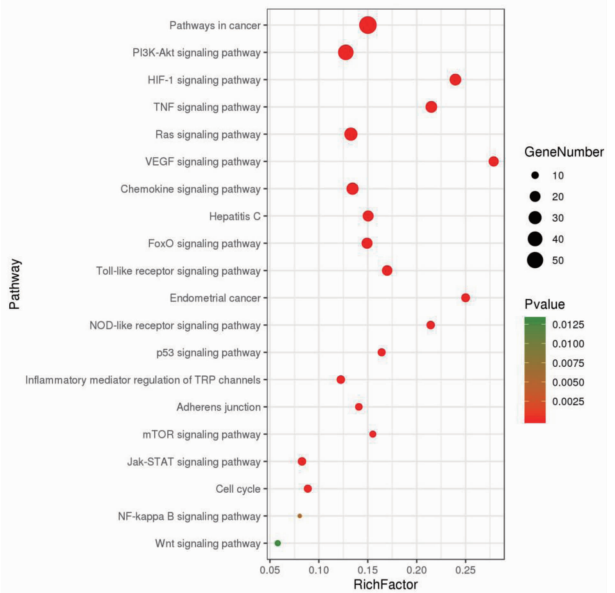


图 4 关键靶点的 Go 富集

Fig. 4 Go enrichment map of key targets



圆点大小代表富集在该通路上的靶点数目,颜色越红代表 P 越小,横坐标为富集在该通路上的靶点数目与该通路总靶点数目的比值

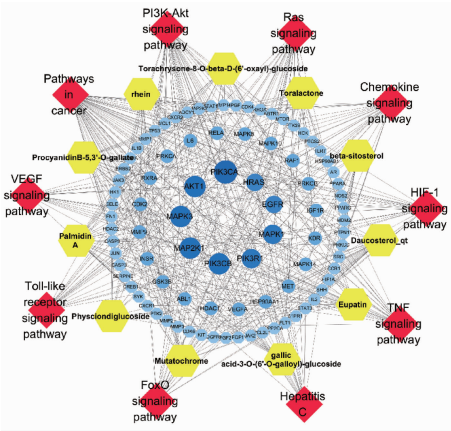
图 5 KEGG 富集排名前 20 位的信号通路

Fig. 5 Top 20 signaling pathways of KEGG enrichment

3.6 大黄“活性成分-靶点-通路”网络图构建 选取 KEGG 富集筛选出的排名前 10 的信号通路,提取富集在相应信号通路的靶点,将其与大黄活性成分输入到 Cytoscape 软件中,构建“活性成分-靶点-通路”图,见图 6。

网络图分析结果显示,KEGG 富集筛选出的 10 条关键信号通路相关的靶点对应的活性成分包括 11 个,与上述大黄“活性成分-靶点”网络分析一

致。涉及到的靶点主要包括 PIK3CA, Akt1, MAPK3, MAP2K1, PIK3CB, PIK3R1, MAPK1, EGFR, IL6, VEGFA 等, 其中 Akt1, MAPK3, EGFR, IL-6, VEGFA 与上述“大黄-肾脏纤维化”PPI 网络分析的关键靶标一致。



红色菱形代表信号通路; 黄色多边形代表大黄活性成分; 蓝色圆形代表作用靶点; 边代表靶点与活性成分、靶点与信号通路、活性成分与信号通路之间的关系

图 6 大黄活性成分-靶点-通路网络

Fig. 6 Active component-target-pathway network of rhubarb

**3.7 大黄酸对 HK-2 细胞活性的影响** HK-2 细胞在大黄酸 (0, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 浓度下作用 48 h 后, CCK-8 结果显示, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  及以上浓度明显影响细胞活性 ( $P < 0.01$ ), 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以下浓度对细胞活性无明显影响。根据大黄酸对 HK-2 细胞的保护作用, 选择 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为干预浓度。见表 3。

表 3 大黄酸对 HK-2 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

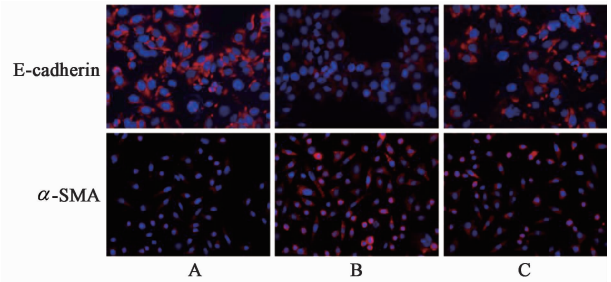
Table 3 Effect of rhein on HK-2 cells viability ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 细胞存活率/%                        |
|-----|---------------------------------------|--------------------------------|
| 大黄酸 | 0                                     | 98.57 $\pm$ 1.49               |
|     | 12.5                                  | 97.24 $\pm$ 0.84               |
|     | 25                                    | 99.13 $\pm$ 0.26               |
|     | 50                                    | 66.33 $\pm$ 0.98 <sup>1)</sup> |
|     | 100                                   | 42.18 $\pm$ 0.76 <sup>1)</sup> |
|     | 200                                   | 28.07 $\pm$ 1.21 <sup>1)</sup> |

注: 设空白组存活率为 100%, 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.8 大黄酸对肾小管上皮细胞间充质转化的影响** 与空白组比较, 模型组细胞存在于质膜上的 E-cadherin 染色显著减弱甚至消失 ( $P < 0.01$ ),  $\alpha$ -SMA 表达显著上调 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 大黄酸干预后  $\alpha$ -SMA 表达明显减弱, 而 E-cadherin 表达明显

增强 ( $P < 0.05$ )。见图 7, 表 4。



A. 空白组; B. 模型组; C. 大黄酸组 (图 8 同)

图 7 大黄酸对 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK2 细胞中 E-cadherin,  $\alpha$ -SMA 的影响 (免疫荧光,  $\times 400$ )

Fig. 7 Effect of rhein on E-cadherin and  $\alpha$ -SMA in HK-2 cells induced by TGF- $\beta_1$  (IF,  $\times 400$ )

表 4 大黄酸对 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK2 细胞中 E-cadherin,  $\alpha$ -SMA 荧光强度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of rhein on fluorescence intensity of E-cadherin and  $\alpha$ -SMA in HK-2 cells induced by TGF- $\beta_1$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | E-cadherin                          | $\alpha$ -SMA                       |
|-----|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 空白  | -                                     | 0.034 2 $\pm$ 0.002 1               | 0.016 3 $\pm$ 0.002 0               |
| 模型  | -                                     | 0.023 6 $\pm$ 0.001 7 <sup>1)</sup> | 0.032 7 $\pm$ 0.002 2 <sup>1)</sup> |
| 大黄酸 | 25                                    | 0.028 7 $\pm$ 0.001 9 <sup>2)</sup> | 0.025 9 $\pm$ 0.001 3 <sup>2)</sup> |

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 5, 6 同)。

**3.9 大黄酸对 HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGFR- $\alpha$  蛋白表达的影响** 与空白组比较, 模型组细胞 HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGFR- $\alpha$  蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 大黄酸干预后 HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGFR- $\alpha$  蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。见图 8, 表 5。

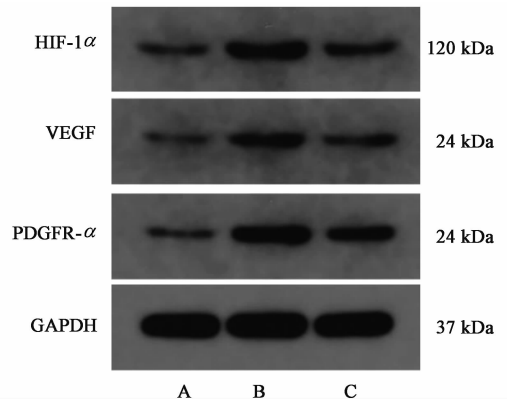


图 8 HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGFR- $\alpha$  蛋白的表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and PDGFR- $\alpha$  protein expression

表 5 大黄酸对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HK2 细胞中 HIF-1α, VEGF, PDGFR-α 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of rhein on expression of HIF-1 α, VEGF and PDGFR-α in HK-2 cells induced by TGF-β<sub>1</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 浓度/<br>μmol·L <sup>-1</sup> | HIF-1α/<br>GAPDH          | VEGF/<br>GAPDH            | PDFGR-α/<br>GAPDH         |
|-----|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白  | -                           | 0.26 ± 0.05               | 0.23 ± 0.04               | 0.25 ± 0.02               |
| 模型  | -                           | 0.68 ± 0.07 <sup>1)</sup> | 0.61 ± 0.03 <sup>1)</sup> | 0.83 ± 0.04 <sup>1)</sup> |
| 大黄酸 | 25                          | 0.44 ± 0.04 <sup>2)</sup> | 0.40 ± 0.02 <sup>2)</sup> | 0.53 ± 0.02 <sup>2)</sup> |

3.10 大黄酸对肾小管上皮细胞凋亡的影响 与空白组比较,模型组细胞凋亡率显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,大黄酸干预后细胞凋亡率明显降低( $P < 0.05$ )。见表 6。

表 6 大黄酸对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 HK-2 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of Rhein on apoptosis of HK-2 cells induced by TGF-β<sub>1</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 浓度/μmol·L <sup>-1</sup> | 细胞凋亡率/%                    |
|-----|-------------------------|----------------------------|
| 空白  | -                       | 5.86 ± 0.73                |
| 模型  | -                       | 19.28 ± 0.59 <sup>1)</sup> |
| 大黄酸 | 25                      | 14.26 ± 0.52 <sup>2)</sup> |

#### 4 讨论

慢性肾脏病中医学将其归属于“关格”“虚劳”“水肿”“癃闭”等范畴。由于其病因复杂,病症繁多,病程迁延日久,慢性肾功能衰竭为肾脏疾病的最后转归,肾脏纤维化作为慢性肾脏疾病的主要病理特点对于慢性肾脏疾病的防治具有重要意义。中医认为“久病入络,病久必瘀”,王清任《医林改错》中提到:“元气即虚,必不能达于血管,血管无力,必停留而瘀。”故常将“本虚标实,正虚邪实”作为慢性肾功能衰竭的主要病机概括,本虚为脏腑精气亏损和气血阴阳亏虚,标实为湿热内蕴、瘀血阻滞,水湿内停。故治疗上以“利湿泻浊,活血化瘀”为其主要治则之一<sup>[11-12]</sup>。大黄药用历史悠久,作用广泛,《神农本草经》中记载:大黄“主下瘀血、血闭、寒热、破癥瘕积聚、留饮、宿食、荡涤肠胃、推陈致新、通利水谷、调中化食、安和五脏”,其功效符合现代慢性肾脏疾病的病理机制,被广泛用于临床治疗慢性肾脏疾病,收到良好的疗效。

本研究基于网络药理学方法对大黄活性成分进行挖掘,共筛选出 17 个活性成分,其中 rhein, physciondiglucoside, toralactone, palmidin A, eupatin,

beta-sitosterol 等 11 个化合物为药物成分-靶点-通路网络图中的核心节点。大黄酸、大黄素为作为中药大黄的主要活性成分,相关药理研究证实,其药理机制主要包括抑制炎症反应<sup>[13]</sup>、抗氧化应激<sup>[14]</sup>、抑制肾小管上皮细胞间充质转化<sup>[15]</sup>、诱导细胞凋亡<sup>[16]</sup>、诱导细胞自噬<sup>[17]</sup>等,然而其抗肾脏纤维化的具体作用靶点尚不明确。

根据 PPI 网络分析筛选出 132 个关键靶点,其中大于平均自由度 2 倍的有 9 个靶点依次为 Akt1, VEGFA, TP53, IL-6, EGFR, ALB, SRC, MAPK3, STAT3。为进一步探究大黄活性成分抗肾脏纤维化的具体机制,通过对大黄活性成分关键靶点的富集分析,发现大黄活性成分对信号转导,细胞凋亡和细胞增殖等生物过程具有一定的影响。根据通路富集结果可以发现,其中 PI3K/Akt, HIF-1, TNF, Ras, VEGF, FoxO, Toll-like receptor, NOD-like receptor, Wnt, NF-κB 等通路均与肾脏纤维化相关,且多数为公认的纤维化重要通路。由于肾脏纤维化的形成涉及炎症细胞浸润,肾内固有细胞损伤、活化、增殖以及表型转化、促纤维化因子分泌以及细胞外基质聚集和降解失衡,其发生机制复杂,许多通路均直接或间接参与了这一过程,同时通过筛选的结果表明了大黄的作用具有多靶点多途径的特点。

通过对筛选出的通路对应的靶标进行成分-靶标-信号通路网络分析发现, Akt1, MAPK3, EGFR, IL-6, VEGFA 为该网络中的关键节点,且与 PPI 网络分析筛选出的 9 个作用最强的靶点重合。其中 Akt1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,该蛋白参与多种生物学过程,包括细胞代谢、增殖、调节细胞生长及血管生成等<sup>[18]</sup>, Akt 激活依赖于 PI3K 途径,被认为是该途径的关键节点,而 PI3K/Akt 信号通路肾脏纤维化密切相关,并且为 KEGG 富集出的关键通路。有相关研究表明芦荟大黄素在体内外研究中能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路延缓肾脏纤维化<sup>[19]</sup>。MAPK3 是在哺乳动物中发现的第一个丝裂原活化蛋白激酶,也称 ERK1,由于 ERK1 及其近亲 ERK2 (MAPK1) 均参与生长因子信号传导,因此该家族被冠名“丝裂原激活”。由 ERK1 介导的信号通路在肾脏纤维化过程中亦发挥着重要作用,有研究表明,抑制 ERK1/2 信号通路,对预防体外高糖诱导 HK-2 细胞上皮细胞间充质转化,延缓肾脏纤维化具有重要意义<sup>[20]</sup>。EGFR 是上皮生长因子 (EGF) 细胞增殖和信号传导的受体,同时也是多种受体通路的重要介体,起到信号汇聚点的作用,能将

信号整合与多样化。有研究通过抑制 Akt 和 ERK, 以及下调细胞膜上的 EGFR 聚类抑制 EGFR 信号, 从而抑制 HEK293 人类胚胎肾细胞的增殖和细胞周期进展, 并建议将 EGFR/Akt/ERK 信号抑制作为抗肾脏纤维的一种潜在治疗策略<sup>[21]</sup>。IL-6 是一种炎性细胞因子, 属于白细胞介素的一种。除单核/巨噬细胞、淋巴细胞等炎症细胞外, 肾脏固有细胞入肾小球系膜细胞, 足细胞和肾小管上皮细胞等多种非免疫细胞亦可产生白细胞介素。作为炎症介质, 参与了肾脏纤维化发生的全过程包括炎症细胞浸润, 成纤维细胞活化和细胞外基质的生成与降解。VEGFA 是 PDGF/VEGF 生长因子的家族成员, 在血管生成, 血管发生和内皮细胞生长中发挥着重要作用。近年来缺血缺氧在肾脏纤维化的作用中日益明确, 越来越多的证据表明肾脏慢性缺氧损伤是导致肾小管间质损伤的重要因素。HIF-1 $\alpha$  在缺氧环境中可通过上调相关靶基因, 如 VEGF, PDGF<sup>[22]</sup> 的表达, 从而促进血管内皮细胞增殖、血管生成, 对肾脏发挥保护性作用。尽管稳定的 HIF-1 $\alpha$  的上调在急性肾损伤中具有保护作用, 但长期的激活却在一定程度上促进肾脏纤维化的发生, 并且相关研究认为在肾小管上皮细胞中, HIF-1 $\alpha$  为低氧引起凋亡的关键因子<sup>[23]</sup>。

为了验证网络药理学部分预测, 本研究用 TGF- $\beta_1$  诱导 HK-2 细胞, 选取活性成分大黄酸干预 HK-2 细胞。TGF- $\beta_1$  是肾间质纤维化的主要因素, 也是诱导肾小管上皮细胞间充质转化的关键诱导因子。为了保证大黄酸对细胞活性不产生影响, 笔者通过 CCK-8 法筛选出大黄酸的最佳浓度为 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究结果显示, 模型组 E-cadherin 表达明显下降,  $\alpha$ -SMA 表达明显增强, 说明 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK-2 细胞发生了 EMT。众所周知,  $\alpha$ -SMA 为肌成纤维细胞标志蛋白, 活化的肌成纤维细胞是合成 ECM 的主要来源, 因此抑制 EMT 对抗肾脏纤维化具有重要的意义。结果证实大黄酸干预细胞后, 能够上调 E-cadherin 的表达, 抑制  $\alpha$ -SMA 的表达, 从而逆转 EMT 的发生。有研究发现, HIF 信号转导途径参与了肾小管上皮细胞间充质转分化<sup>[11]</sup>。因此, 进一步探究大黄酸抗肾脏纤维化的作用是否与抑制 HIF-1 $\alpha$  信号转导途径介导的 EMT 有关。Western blot 结果证实, 模型组 HIF-1 $\alpha$  被激活, 蛋白水平上调, 说明 HIF-1 $\alpha$  参与了肾小管上皮细胞转分化的过程, 同时检测到 HIF-1 $\alpha$  下游效应因子 VEGF, PDGFR- $\alpha$  表达上调。VEGF 作为维持内皮细

胞生长的重要细胞因子, 在肾脏中被证明有双重作用<sup>[24]</sup>。一方面, 对于缺氧诱发的组织损伤, VEGF 表达的上调可以促进新血管生成而对局部肾脏组织起到保护作用; 另一方面, 持续的低氧损伤在慢性肾脏病肾间质中的促炎反应, 被认为与 VEGF 表达的上调伴随着新血管的过度生成密切相关。PDGF 是间充质细胞和肌成纤维细胞的关键促分裂原和化学吸引剂, PDGFR- $\alpha$  为其受体链中的一种, 在正常的成年肾脏中, PDGF 配体和受体的表达极低, 但在肾纤维化过程中表达显著增加, 因此靶向 PDGF 配体或受体能够有效限制上皮细胞表型转化及肌成纤维细胞复制, 从而减少胶原的沉积<sup>[25]</sup>。此研究证实, 大黄酸干预后的肾小管上皮细胞, VEGF, PDGFR- $\alpha$  蛋白表达水平下降, HIF-1 $\alpha$ /VEGF/PDGFR- $\alpha$  信号转导途径得到抑制。此外, 研究表明细胞凋亡可以通过减少肾脏固有细胞, 释放炎症介质, 诱导上皮细胞 EMT 从而促进肾脏纤维化, 网络药理学功能富集结果显示大黄对细胞凋亡具有负调节的作用。因此, 笔者通过流式细胞技术检测到, 与模型组比较, 大黄酸明显抑制 HK-2 细胞的凋亡, 此结果与网络药理学的分析结果一致。

综上所述, 本研究通过网络药理学方法对大黄抗肾脏纤维化进行了系统分析, 并选取了大黄活性成分大黄酸对筛选出的关键生物学靶点进行实验验证, 初步证实了大黄酸通过调节 HIF-1 $\alpha$ /VEGF/PDGFR- $\alpha$  信号转导途径, 逆转上皮细胞 EMT, 抑制细胞凋亡达到抗肾脏纤维化的作用。然而由于肾脏纤维化发生机制复杂, 其生物学靶点众多, 大黄抗肾脏纤维化的作用机制仍需大量的体内外实验加以阐明, 本实验旨在为进一步研究其作用机制奠定基础。

#### [参考文献]

- [1] LI A, ZHANG X, SHU M, et al. Arctigenin suppresses renal interstitial fibrosis in a rat model of obstructive nephropathy [J]. *Phytomedicine*, 2017, 30:28-41.
- [2] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(13):227-234.
- [3] DONG X, FU J, YIN X, et al. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(8):1207-1218.
- [4] LU Z, ZENG Y, LU F, et al. Rhei Radix et Rhizoma attenuates renal tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats by alleviating indoxyl sulfate overload[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12):e0144726.

- [ 5 ] BAI Y, SU Z, SUN H, et al. Aloe-emodin relieves high-fat diet induced QT prolongation via MiR-1 inhibition and IK1 up-regulation in rats [ J ]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(5) : 1961-1973.
- [ 6 ] HUANG Q, LU G, SHEN H M, et al. Anti-cancer properties of anthraquinones from Rhei Radix et Rhizoma [ J ]. Med Res Rev, 2007, 27(5) : 609-630.
- [ 7 ] CHEN T, ZHENG L Y, XIAO W, et al. Emodin ameliorates high glucose induced-podocyte epithelial-mesenchymal transition *in-vitro* and *in-vivo* [ J ]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(4) : 1425-1436.
- [ 8 ] HE D, LEE L, YANG J, et al. Preventive effects and mechanisms of rhein on renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy [ J ]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(8) : 1216-1219.
- [ 9 ] 郑文江, 谢富淇, 黄慧婷, 等. 基于网络药理学的射干-麻黄药对治疗支气管哮喘的分子机制探讨 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(19) : 182-194.
- [ 10 ] ZHANG Y, LI Y, MAO X, et al. Thyroid hormone synthesis: a potential target of a Chinese herbal formula HaizaoYuhu Decoction acting on iodine-deficient goiter [ J ]. Oncotarget, 2016, 7(32) : 51699-51712.
- [ 11 ] SUN S, NING X, ZHANG Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition [ J ]. Kidney Int, 2009, 75 : 1278-1287.
- [ 12 ] 沈倩, 冯松杰. 中医药治疗慢性肾衰竭临床研究进展 [ J ]. 河北中医, 2014, 36(4) : 625-627.
- [ 13 ] 党珏, 李燕, 刘美辰, 等. 大黄有效成分与附子有效成分配伍在 Caco-2 细胞模型上的转运分析 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7) : 1-6.
- [ 14 ] 李妹娟, 王和生, 王通渤, 等. 制何首乌中大黄素对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化模型中 JAK2/STAT3 通路的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18) : 101-106.
- [ 15 ] 许科, 张犁. 大黄酸抗肾脏纤维化研究进展 [ J ]. 新中医, 2012, 44(5) : 119-121.
- [ 16 ] HE D, LEE L, YANG J, et al. Preventive effects and mechanisms of rhein on renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy [ J ]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(8) : 1219-1226.
- [ 17 ] TU Y, GU L, CHEN D, et al. Rhein inhibits autophagy in rat renal tubular cells by regulation of AMPK/mTOR signaling [ J ]. Sci Rep, 2017, doi: 10.1038/srep43790.
- [ 18 ] KOBAYASHI S, BOGGON T J, DAYARAM T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib [ J ]. N Engl J Med, 2005, 352(8) : 786-792.
- [ 19 ] DOU F, LIU Y, LIU L, et al. Aloe-emodin ameliorates renal fibrosis via inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [ J ]. Rejuvenation Res, 2019, 22(3) : 218-229.
- [ 20 ] JI T, SU S L, ZHU Y, et al. The mechanism of mulberry leaves against renal tubular interstitial fibrosis through ERK1/2 signaling pathway was predicted by network pharmacology and validated in human tubular epithelial cells [ J ]. Phytother Res, 2019, 33(8) : 2044-2055.
- [ 21 ] PAN X, LI J, HE X, et al. Gadolinium chloride promotes proliferation of HEK293 human embryonic kidney cells by activating EGFR/PI3K/Akt and MAPK pathways [ J ]. Biometals, 2019, 32(4) : 683-693.
- [ 22 ] HIGGINS D F, KIMURA K, BERNHARDT W M, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis *in vivo* via HIF-1 stimulation of epithelial-mesenchymal transition [ J ]. J Clin Invest, 2007, 117(12) : 3810-3820.
- [ 23 ] HU J, WANG W, ZHANG F, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  mediates the profibrotic effect of albumin in renal tubular cells [ J ]. Sci Rep, 2017, 7(1) : 15878.
- [ 24 ] GERT M. Capillary rarefaction, hypoxia, VEGF and angiogenesis in chronic renal disease [ J ]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26 : 1132-1137.
- [ 25 ] JAMES C. Bonner Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases [ J ]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(4) : 255-273.

[ 责任编辑 周冰冰 ]