

昆仙胶囊通过矫正“免疫-炎症”失衡网络有效干预糖尿病肾病的潜能及其分子机制研究

刘毓东¹, 马兆臣², 李聪翀¹, 林雅¹, 张彦琼^{1,2*}, 林娜^{2*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 药物重定位为现有药物提供了新的临床适应症。机体的“免疫-炎症”调节失衡是糖尿病肾病发生、发展的重要因素之一。中成药昆仙胶囊具有显著的抗炎和免疫调节作用, 且有少量临床证据表明, 该药具有缓解糖尿病肾病的潜能, 但其作用机制尚不明确。因此, 本研究整合“疾病基因-药物靶标-生物通路-功能模块”多层次关联网络分析及体内、体外实验验证, 探究昆仙胶囊治疗糖尿病肾病的药理作用及其分子机制。实验方案经中国中医科学院实验动物福利与伦理委员会审查, 符合实验动物福利与伦理相关规定。网络分析结果表明, 昆仙胶囊干预糖尿病肾病的候选网络靶标可显著参与调节机体免疫-炎症反应、缓解肾脏基底膜病变、调节肾脏血液流变学异常、调节机体能量代谢和各类激素代谢的功能模块, 且参与 PI3K/AKT/NF- κ B 通路的网络靶标数目最多。进一步的体内、体外实验验证表明, 昆仙胶囊灌胃给药可有效降低糖尿病肾病大鼠的血糖并改善胰岛素抵抗、降低血脂水平、抑制肾脏细胞外基质蛋白的生成和肾脏炎症、改善肾脏功能及病理损伤, 并能够有效抑制 PI3K/AKT/NF- κ B/TNF- α /IL-1 β 通路的活性。可见, 昆仙胶囊具有通过调节机体“免疫-炎症”失衡而缓解糖尿病肾病的潜能。

关键词: 糖尿病肾病; 昆仙胶囊; “免疫-炎症”失衡; 网络药理学; PI3K/AKT/NF- κ B

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0375-10

Investigation on therapeutic potential and molecular mechanisms of Kunxian capsule against diabetic kidney disease *via* reversing the imbalance of "immune-inflammation" network

LIU Yu-dong¹, MA Zhao-chen², LI Cong-chong¹, LIN Ya¹, ZHANG Yan-qiong^{1,2*}, LIN Na^{2*}

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: Drug repositioning provides new clinical indications for existing drugs. The imbalance between body's "immune-inflammation" regulation is one of the important factors in the occurrence and development of diabetic nephropathy (DN). Chinese patent medicine Kunxian capsule is clinically used for treating rheumatoid arthritis with satisfying immune-modulatory and anti-inflammatory actions. Notably, accumulating clinical evidence based on small cohorts had shown that Kunxian capsule may be used to treat DN. But the underlying pharmacological mechanisms remain unclear. Therefore, this study integrated "drug target-disease gene-biological pathway-function module" multi-level associated network analysis, and *in vivo* and *in vitro* experiments, to verify the pharmacological effects of Kunxian capsules in DN and to elucidate its molecular mechanisms. The experimental protocol was reviewed by the Laboratory Animal Welfare and Ethics Committee of China Academy of Chinese Medical Sciences, and it complies with the relevant regulations on laboratory animal welfare and ethics. As a result, the network analysis

收稿日期: 2021-07-27; 修回日期: 2021-08-25.

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2019ZX09731-002); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZXKT19002).

*通讯作者 Tel: 86-10-64032658, E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn; nlin@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1109

showed that the candidate targets of Kunxian capsule against DN were significantly involved into various functional modules which were related to modulation of immune-inflammation system, basement membrane lesion, abnormal hemorheology, energy metabolism and hormone metabolism, and the number of targets enriched by PI3K/AKT/NF- κ B pathway is the largest. In addition, both *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrated that Kunxian capsule by gavage effectively reduced blood glucose, improved insulin resistance, reduced blood lipid, inhibited renal extracellular matrix protein production and renal inflammation, improved renal function and pathological damages, and inhibited the activity of PI3K/AKT/NF- κ B/TNF- α /IL-1 β pathway in diabetic nephropathy rats. Collectively, these findings suggest the therapeutic potentials of Kunxian capsule to alleviate DN by regulating the imbalance of immune-inflammation system.

Key words: diabetic nephropathy; Kunxian capsule; imbalance of immune-inflammation system; network pharmacology; PI3K/AKT/NF- κ B

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病患者并发的慢性肾病,也是糖尿病最常见和最严重的慢性并发症之一。研究表明,25%~40%的1型糖尿病患者和5%~40%的2型糖尿病患者最终会发展为糖尿病肾病^[1]。现如今,糖尿病肾病已成为世界范围内引起终末期肾病的主要原因。不同于其他终末期肾病患者,晚期糖尿病肾病患者即使接受肾脏移植也存在着高复发的风险和较差的愈后性^[2]。目前对糖尿病患者的管理侧重于严格的血糖控制、抗高血压以及降脂治疗。然而,这些干预措施并不能阻止大部分患者慢性肾病的进展^[3]。因此,开发新的治疗药物则显得尤为重要。

昆仙胶囊 (Kunxian capsules, KXC) 由昆明山海棠、淫羊藿、枸杞子、菟丝子4味中药组成,是国家“九五”科技攻关项目成果转化中的中药6类新药,主治类风湿关节炎属风湿痹阻兼肾虚证^[4,5]。传统中医理论认为,糖尿病肾病以虚、瘀、浊为基本病机,虚是以气虚为主,瘀为络脉瘀滞,浊为浊毒内蕴。三者互相影响,兼见而致病。治法主要为化瘀通络、补虚、加强强毒的代谢^[6]。鉴于昆仙胶囊的功能主治与糖尿病肾病病机相吻合,应用昆仙胶囊治疗糖尿病肾病的小样本临床试验业已见报道^[7-9]。

目前,昆仙胶囊在糖尿病肾病方面的报道仅限于临床疗效分析,缺乏对其药理作用及机制的研究。因此,本研究整合“疾病基因-药物靶标-生物通路-功能模块”多层次关联网络分析及体内外实验验证,研究昆仙胶囊治疗糖尿病肾病的药理作用及其分子机制,从而为该药在治疗糖尿病肾病临床适应症的拓展提供可能性和生物学依据。

材料与方

昆仙胶囊候选靶标谱的预测及其生物功能挖掘利用ETCM (www.tcmip.cn/ETCM/) 数据库收集昆仙胶囊中4味中药 (昆明山海棠、淫羊藿、菟丝子、枸杞子) 的

化学成分谱,并利用TCMIP v2.0平台 (www.tcmip.cn/) “化合物靶标预测工具”获得其候选靶标基因集 (可靠性参数 > 0.8)^[10]。进一步,采用富集算法,根据GO (gene ontology) 数据库和KEGG通路数据库,挖掘昆仙胶囊候选靶标谱显著参与的功能信息 ($P < 0.05$ 且 Benjamini 校正 $P < 0.05$)。

糖尿病肾病相关基因集的收集和整理 利用HPO (hpo.jax.org) 和 DisGeNet (www.disgenet.org) 等疾病数据库收集糖尿病肾病相关的症状表型并提取其所对应的基因集;利用DrugBank (www.drugbank.com) 数据库收集已知用于治疗糖尿病肾病的药物信息,并提取其相关靶标的基因集;将上述两个基因集整合去冗余后,得到糖尿病肾病相关基因集。

“昆仙胶囊候选靶标-糖尿病肾病相关基因”互作网络的建立 利用String数据库 (Search Tool for Known and Predicted Protein-Protein Interactions, http://string-db.org/, version: 10.0) 中的生物分子间相互作用信息,提取昆仙胶囊候选靶标及糖尿病肾病相关基因之间的互作关联性,进而构建“疾病基因-药物靶标”相互作用网络,经度值 (degree)、介数中心性 (betweenness centrality)、接近中心性 (closeness centrality) 的网络拓扑特征值计算,筛选出昆仙胶囊干预糖尿病肾病的核心靶标 (靶标依据上述3个参数排序后,以中位数为卡值,选择同时大于这3个指标中位数的靶标),并对核心靶标的功能进行富集分析 (显著性标准: $P < 0.05$ 且 Benjamini 校正 $P < 0.05$),挖掘昆仙胶囊干预糖尿病肾病核心靶标的生物学功能。

药品与试剂 昆仙胶囊 (广州白云山陈李济药厂有限公司, Z20060267); 二甲双胍 (metformin, MET; 中美上海施贵宝制药有限公司, H20023370); 达格列净 (dapagliflozin, DAP; 美国阿斯利康公司, J20170040); 链脲佐菌素 (美国Sigma-Aldrich公司); 胰岛素-C-肽、糖化血红蛋白、血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低

密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)、I型胶原(collagen I, CO I)、纤维黏连蛋白(fibronectin, FN)、白介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司); PBS缓冲液、枸橼酸盐缓冲液(博士德生物工程有限公司); 苏木素染色液、伊红染液(醇溶)、苏木素分色液、苏木素返蓝液、DAB显色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司); 中性树胶(广东光华科技股份有限公司); 即用型Ultra Sensitive SP超敏试剂盒(兔、鼠、羊; 迈新生物技术有限公司); I型胶原多克隆抗体、纤维黏连蛋白多克隆抗体(武汉贝茵莱生物科技有限公司); 全蛋白提取试剂盒(强)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); DMEM低糖培养基、DMEM高糖培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素、胰酶(美国Sigma-Aldrich公司); 磷酸酯肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K); 磷酸化磷酸酯肌醇-3-激酶(phosphorylation-phosphatidylinositol 3 kinase, p-PI3K); 蛋白激酶B(protein kinase B, AKT); 磷酸化蛋白激酶B(phosphorylation-protein kinase B, p-AKT); 核转录因子 κ B[nuclear factor kappa B, NF- κ B(p65)]; 磷酸化核转录因子 κ B[phosphorylation-nuclear factor kappa B, p-NF- κ B(p65)]; β -actin(美国Abcam公司); 羊抗兔IgG HRP、兔抗大鼠IgG HRP、HRP-兔抗山羊IgG(美国Proteintech公司)。

仪器 脱水机、石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司); 切片机(上海莱卡仪器有限公司); 组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); 鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); 摇床、涡旋混匀器(其林贝尔仪器制造有限公司); 低温离心机[艾本德(中国)有限公司]; 全波长酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

动物饲养及分组 雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠32只, 体重(200 \pm 10)g, 购自广东省医学实验动物中心(生产许可证编号: SCXK2013-0002, 中国广州)。所有大鼠均在无特定病原体的条件下饲养, 在实验之前, 所有大鼠适应环境饲养1周。所有动物实验均符合中国中医科学院伦理委员会的规定(IACUC-G16045)。

糖尿病肾病模型的建立: 随机选8只作为正常组, 正常组采用普通饲料饲养, 剩余24只采用高脂饲料饲养; 4周后, 高脂饲料饲养的24只腹腔注射35 mg·kg⁻¹链脲佐菌素(溶于0.1 mol·L⁻¹柠檬酸缓冲液中, pH值为4.5, 浓度1%), 正常组腹腔注射等量柠檬酸缓冲液。注射链脲佐菌素1周后, 将血糖>11.1 mmol·L⁻¹的成模大鼠随机分成模型组、昆仙胶囊组(480 mg·kg⁻¹, 临床等效剂量的3倍)、二甲双胍组(135 mg·kg⁻¹, 临床等

效剂量的1倍)。各给药组均连续灌胃4周, 每日1次。正常组和模型组给予等体积生理盐水。给药期间, 模型组及给药组大鼠全程高脂饮食, 自由饮水。糖尿病肾病模型大鼠的死亡率约为20%。

细胞培养及分组 人近端肾小管上皮细胞HK-2(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)置于37℃、5% CO₂培养箱中采用DMEM低糖培养基培养。

高糖模型的建立: 取处于指数生长期的细胞用胰蛋白酶消化, 将细胞按1.5 \times 10⁵个/孔的密度加入6孔板中, 用无血清低糖DMEM培养基同步化24 h。随机将HK-2细胞分正常组、高糖模型组、高糖+昆仙胶囊组(10和50 μ g·mL⁻¹)、高糖+达格列净组(10 μ mol·L⁻¹), 其中高糖组加入高糖培养基(葡萄糖终浓度为30 mmol·L⁻¹), 置于37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h。

生化指标检测 采用ELISA法检测大鼠血清、尿液及细胞培养液中生化指标。造模成功后, 每周定时测量大鼠的体重、血糖、尿量。每周采血1次, 检测胰岛素、C-肽和糖化血红蛋白的水平; 实验在第9周结束时, 大鼠禁食12 h, 代谢笼收集大鼠尿液, 检测尿微量白蛋白、肌酐的水平; 采集大鼠血清, 检测TC、TG、LDL-C、HDL-C的水平及IL- 1β 、TNF- α 的水平; 收集细胞培养液, 检测IL- 1β 和TNF- α 的水平, 以及I型胶原和纤维黏连蛋白的水平, 以上所有检测流程均按生产厂家说明书进行。

HE染色 取大鼠肾组织用10%福尔马林固定, 按照常规操作流程制得石蜡切片, 脱蜡复水后采用苏木精-伊红染色方法观察肾组织的病理学变化。所有切片均在光学显微镜下观察。

免疫组化 通过检测I型胶原和纤维黏连蛋白观察糖尿病肾病造成的细胞外基质(ECM)的病变, 并进一步利用免疫组织化学染色法进行定位。具体操作如下: 取各组大鼠肾组织石蜡切片按常规流程处理后与I型胶原(1:800)和纤维黏连蛋白(1:800)抗体在4℃孵育过夜。洗涤后, 将切片与试剂盒中的二抗孵育, 室温下放置30 min后显色、复染、封片, 于光学显微镜下观察并拍照, 并用Image-Pro Plus6.0软件对结果进行分析。

Western blot 采用Western blot法分析昆仙胶囊对PI3K/AKT/NF- κ B通路相关蛋白的调控作用。大鼠肾脏组织和HK-2细胞按上述造模方法处理后, 用RIPA裂解液冰上裂解30 min, 4℃、12 000 r·min⁻¹离心15 min。用BCA试剂盒检测各组蛋白浓度后电泳分离蛋白, 湿转法将蛋白转移至PVDF膜上。使用10%脱脂牛奶封闭30 min, 加一抗置4℃冰箱孵育过夜, TBST洗涤2次, 每次15 min, 加入二抗孵育1 h, TBST洗涤3次, 每次10 min, 用ECL发光液检测免疫反应蛋白条带。

蛋白质相对表达量使用 Image J 软件分析。

免疫荧光 利用免疫荧光法分析 NF-κB (p65) 的核转。取各组大鼠肾组织石蜡切片,脱蜡后,用枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 进行抗原修复,用含 0.05% TritonX-100 和 10% 山羊血清的 PBS 封闭,然后与 1:100 稀释的 NF-κB 和 p-NF-κB 抗体 4 °C 孵育过夜;切片洗净后二抗孵育,在室温避光 45 min,充分清洗后使用 DAPI 染色。切片在荧光显微镜下观察,结果用 Image J 软件进行分析。

统计学分析 本研究所有实验均重复进行 3 次。使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。数据用均值 ± 标准差表示,用单因素 ANOVA 分析组间差异, $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 均代表组间差异具有统计学意义。

结果

1 昆仙胶囊具有干预糖尿病肾病的潜能

利用 TCMIP v2.0 平台的“化合物靶标预测工具”,共获得 1 080 个昆仙胶囊候选靶标基因。依据 GO 数

据库和 KEGG 通路数据库进行富集分析,结果表明,昆仙胶囊候选靶标直接作用于 2 型糖尿病相关通路、胰岛素信号通路和肾病相关通路。从功能模块来看,昆仙胶囊候选靶标参与机体各种物质代谢、能量合成与分解以及激素合成和代谢相关最显著的功能模块,包括 ABC 转运蛋白、脂肪细胞因子、丙氨酸等;其次是与机体神经系统调节相关的功能模块,包括神经活性配体-受体相互作用、钙通路、长时程增强等;再次是与心血管系统调节相关的功能模块,包括血管内皮生长因子、醛固酮调节的钠重吸收、血管平滑肌收缩等;最后是与机体免疫系统调节相关的功能模块,包括 Fc RI 复合物、B 细胞传导等,以及细胞功能相关的功能模块,包括丝裂原活化蛋白激酶信号通路、细胞凋亡等 (图 1)。

2 昆仙胶囊主要通过调节“免疫-炎症”失衡干预糖尿病肾病

通过数据库收集整理,共得到 3 472 个糖尿病肾病相关基因,其中有 562 个是昆仙胶囊的候选靶标。进

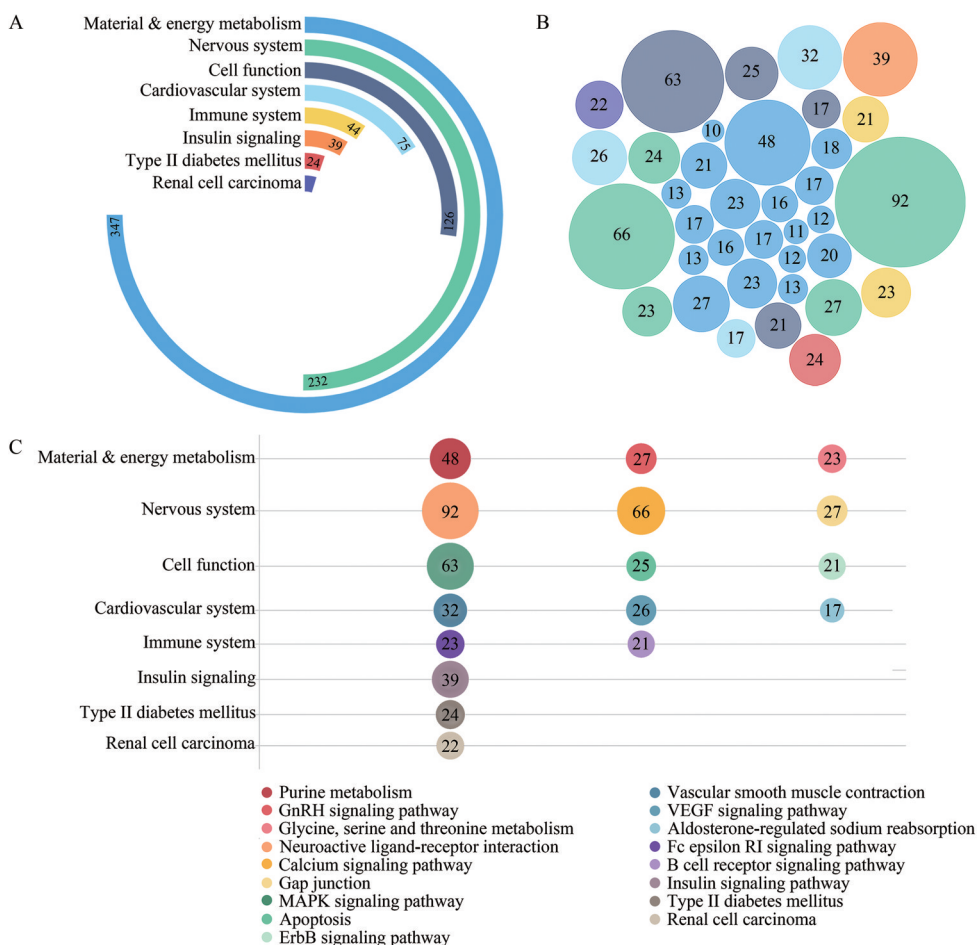


Figure 1 Enrichment analysis shows that Kunxian capsule (KXC) has the potentials to treat diabetic nephropathy (DN). A: Number of putative targets of KXC involved into different functional modules; B: Different color bubbles represent different functional modules, and the different sizes with the same color represent the number of targets involved into the functional module; C: The top three pathways involved into each functional module

一步构建“疾病基因-药物靶标”相互作用网络,共包含3 246个基因节点和25 992条边。经网络拓扑特征值计算,筛选出1 212个核心节点,其中,366个是昆仙胶囊干预糖尿病肾病的核心靶标。生物功能富集分析结果显示昆仙胶囊干预糖尿病肾病的核心靶标主要通过5个功能模块,分别是调节机体免疫-炎症反应、缓解肾脏基底膜病变、调节肾脏血液流变学异常、调节机体能量代谢和各类激素代谢(图2),其中参与“免疫-炎症”失衡调节的核心靶标最多。接下来,本研究拟利用糖尿病肾病动物模型和细胞模型,系统评价昆仙胶囊的干预药效及作用机制。

3 昆仙胶囊可有效改善糖尿病肾病大鼠的生理功能紊乱和代谢异常,并减轻肾脏病理损伤

与正常对照组相比,糖尿病肾病大鼠的体重显著降低,而尿量和血糖水平明显上升;昆仙胶囊给药4周后,上述指标均有显著改善(图3A~C);糖尿病肾病模型大鼠的胰岛素、C-肽、糖化血红蛋白水平在6~9周内均显著升高,经昆仙胶囊干预后均恢复正常(图3D~F);脂质代谢方面,经昆仙胶囊治疗后显著降低了糖尿病肾病大鼠血清中TC、TG、LDL-C水平,而HDL-C水平则显著升高(图3G~J)。肾功能调节方面,糖尿病肾病大鼠的尿微量白蛋白、肌酐及尿微量白蛋白与肌酐的比值(UACR)均显著升高,同时肾脏指数也显

著升高;经昆仙胶囊干预后上述指标均显著下降(图3K~N)。

HE染色结果显示,模型组大鼠肾小体呈分叶状,肾小球血管萎缩严重(蓝色箭头),系膜基质明显增多(绿色箭头),肾小管上皮细胞体积增大,胞浆出现空泡样变性(红色箭头),小管间质发生炎性浸润和细胞增生(黄色箭头);而昆仙胶囊组大鼠肾小体呈轻微分叶状,肾小管空泡样变性程度较轻(红色箭头),系膜基质增多较少(绿色箭头);二甲双胍组大鼠肾组织病理变化与昆仙胶囊组无明显差异(图4A)。免疫组化结果表明,ECM的病理改变标志物I型胶原和纤维黏连蛋白的水平在糖尿病肾病模型大鼠肾组织中显著升高,昆仙胶囊干预则可以显著降低上述异常表达(图4B~D)。

4 昆仙胶囊通过调节由PI3K/AKT/NF- κ B通路介导的“免疫-炎症”失衡环节干预糖尿病肾病

经ELISA检测,糖尿病肾病模型大鼠血清中IL-1 β 和TNF- α 的含量显著升高,经昆仙胶囊干预后被显著降低(图5A、B);Western blot结果显示,糖尿病肾病模型大鼠肾组织(图5C~E)中的p-PI3K、p-AKT、p-NF- κ B水平以及p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-NF- κ B/NF- κ B比值均显著升高;昆仙胶囊则显著降低p-PI3K、p-AKT和p-NF- κ B蛋白的表达水平及磷酸化蛋白与总蛋白的比值。同样,昆仙胶囊对上述指标及I型胶原和纤维黏连蛋

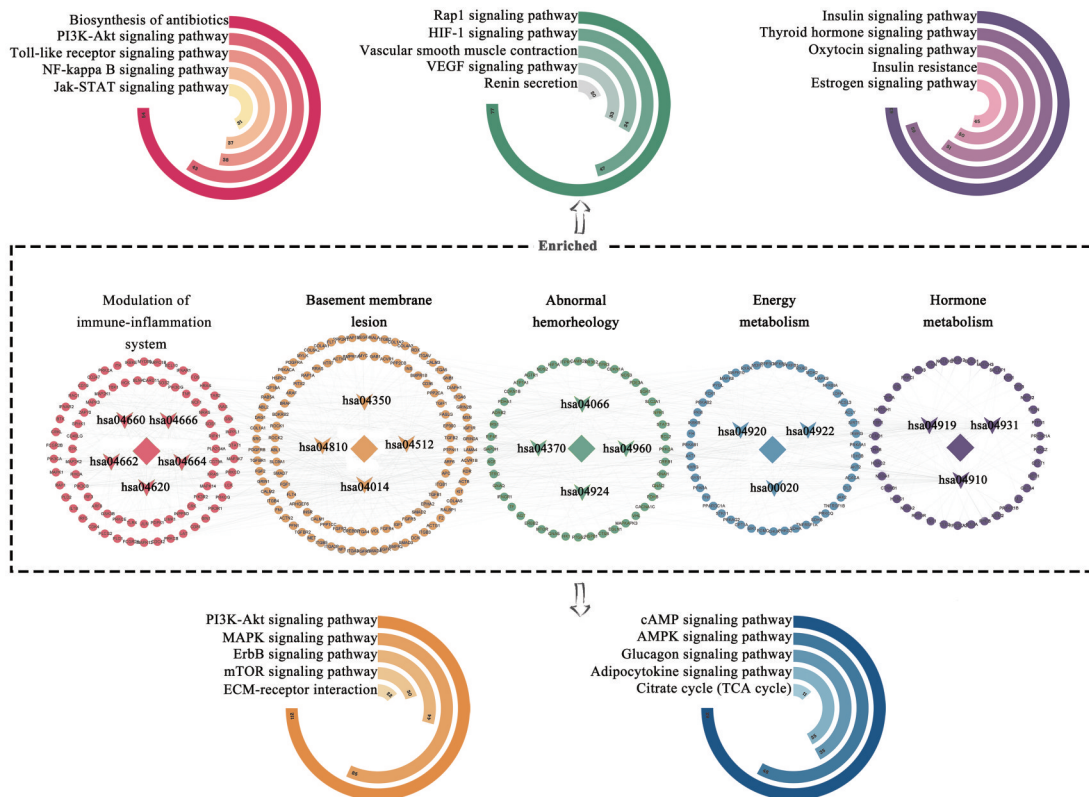


Figure 2 Enriched functional modules of KXC intervention in DN based on the "drug-disease" interaction network

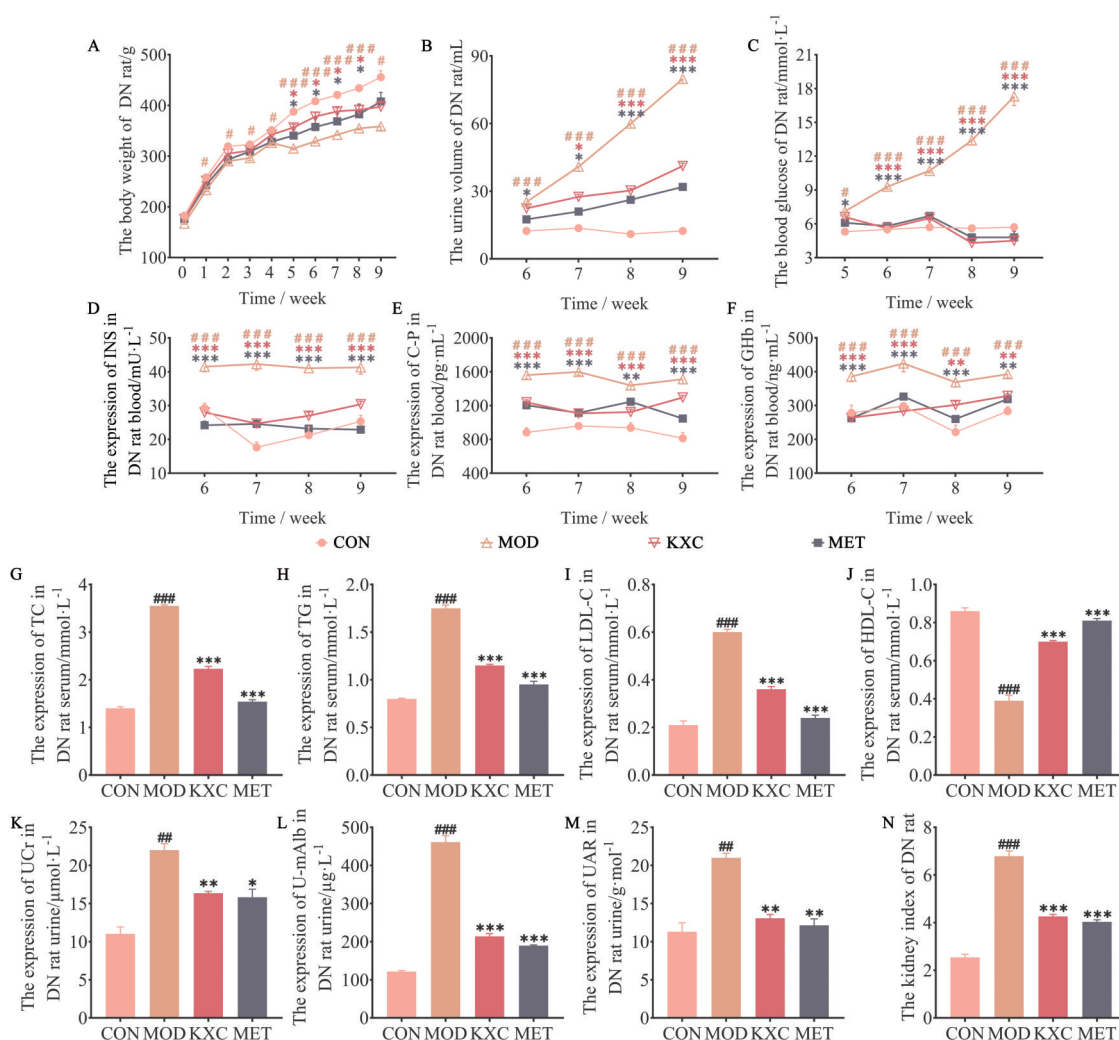


Figure 3 Effects of KXC on biochemical indexes, lipid metabolism and liver function in DN rats of different groups ($n = 32$). Changes of body weight (A), urine volume (B), blood glucose (C) in 9 weeks. Changes of insulin (INS) (D), c peptide (C-P) (E), glycated hemoglobin (GHb) (F) in 6–9 weeks. Changes of lipid metabolism (G–J) and liver function (K–N). Data were represented as $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs the CON group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the MOD group

白的水平的干预效果在体外高糖诱导的HK-2细胞模型中也得到了验证(图6A~G)。免疫荧光结果显示,在糖尿病肾病模型大鼠肾组织中,NF- κ B(p65)转移到细胞核中的数量显著升高,而这种情况在灌胃昆仙胶囊4周后发生了逆转(图7A、B)。

讨论

药物重定位为现有药物提供了新的临床适应症,与开发新药相比,成本和风险更低。随着研究的深入,越来越多的证据表明,“免疫-炎症”失衡环节在糖尿病肾病的发生和发展中起着重要作用,持续的微炎症和随后的ECM扩张是诱发糖尿病肾病的重要原因^[11]。然而,糖尿病肾病的临床治疗尚以控制血糖、血压为主,暂无从抗炎-免疫角度治疗其的有效药物。本研究

采用生物分子网络挖掘及实验验证相结合的方法,考察昆仙胶囊通过调节“免疫-炎症”失衡网络发挥治疗糖尿病肾病的潜能。通过药物候选靶标谱的预测及功能富集分析发现,昆仙胶囊的候选靶标显著参与多条糖尿病和肾病相关通路,初步表明该品种具有缓解糖尿病肾病的潜能。进一步,通过“疾病基因-药物靶标”互作网络构建和功能挖掘发现,PI3K/AKT/NF- κ B通路介导的“免疫-炎症”失衡网络模块可能是昆仙胶囊有效干预糖尿病肾病的核心环节。

高血糖被认为是触发和维持多个信号通路活性的主要致病因素,并且是糖尿病肾病进展为终末期肾病的主要诱因,因此疾病早期对血糖的控制至关重要。糖化血红蛋白作为糖尿病患者血糖控制的金标准,可以反映患者长期血糖的稳定状态^[12]。本研究发现昆仙

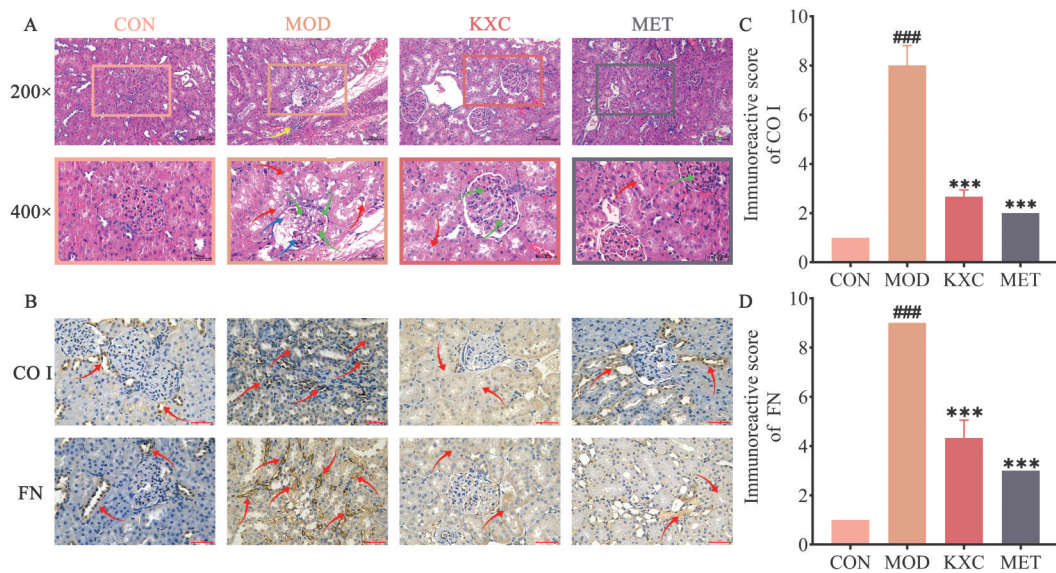


Figure 4 Effects of KXC on the histological changes of kidney in DN rats of different groups ($n = 32$). A: Boxes represent the area with typical pathological changes (scale bar: 200 \times : 100 μ m; 400 \times : 50 μ m); B-D: Localizations and immunoreactive scores of collagen I (CO I) and fibronectin (FN) proteins in kidney tissues of DN rats examined by immunohistochemistry (scale bar: 50 μ m). Data were represented as $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. ### $P < 0.001$ vs the CON group; *** $P < 0.001$ vs the MOD group

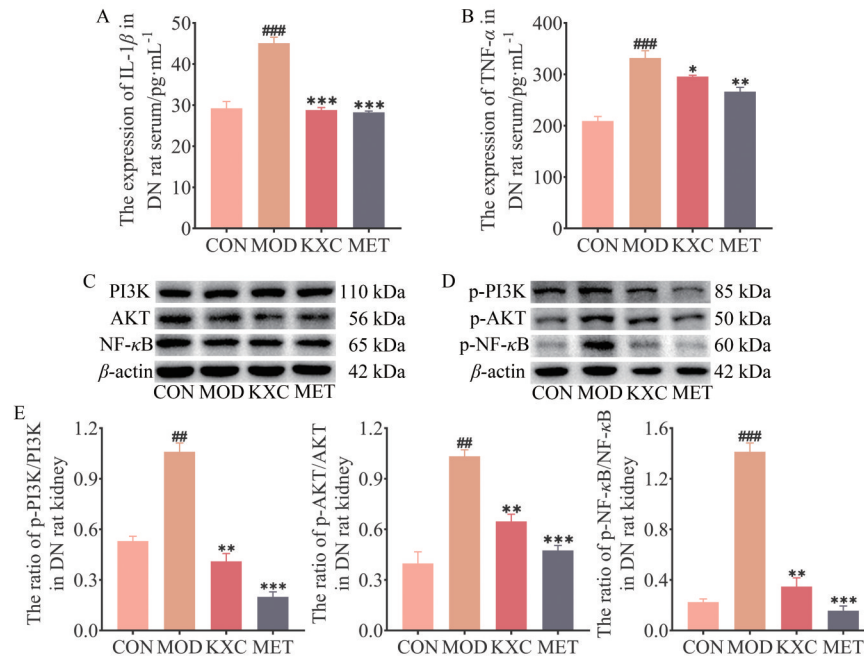


Figure 5 Expression of interleukin-1 β (IL-1 β , A) and tumor necrosis factor α (TNF- α , B) in serum of DN rats. Expression of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), protein kinase B (AKT), nuclear factor kappa B (NF- κ B), and phosphorylation-phosphatidylinositol 3 kinase (p-PI3K), phosphorylation-protein kinase B (p-AKT) and phosphorylation-nuclear factor kappa B (p-NF- κ B) proteins in kidney tissues of DN rats (C-E) ($n = 32$). Data were represented as $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs the CON group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the MOD group

胶囊经 480 mg·kg⁻¹灌胃给药 4 周后可显著降低糖尿病肾病大鼠异常升高的血糖及糖化血红蛋白, 显著降低模型组异常升高的胰岛素及 C 肽水平, 改善胰岛素抵抗, 相关结果与文献报道的研究结果一致^[13]。已知血

脂紊乱、脂质代谢的变化与糖尿病肾病的发生发展密切相关^[14]。因此, 本研究采用 ELISA 法进行检测, 相关研究表明, 昆仙胶囊可显著逆转糖尿病肾病导致的 TC、TG、LDL-C 升高和 HDL-C 降低, 有效降低模型

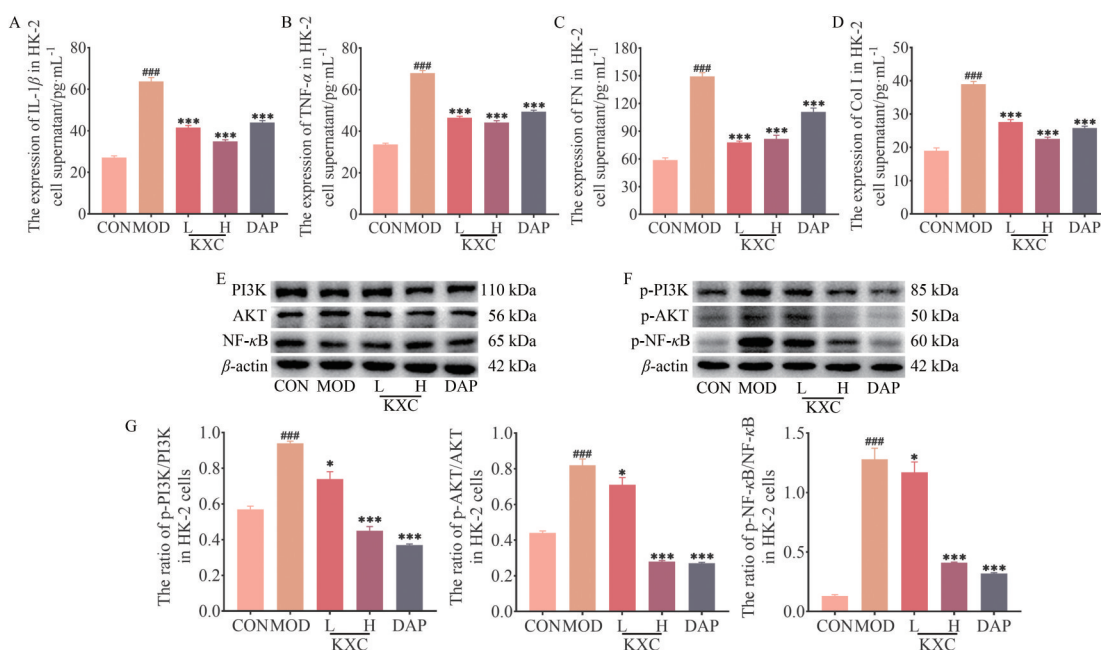


Figure 6 Levels of IL-1 β (A), TNF- α (B), FN (C), and Co I (D) in cell supernatant of HK-2 cells. Expression of PI3K, AKT, NF- κ B, and p-PI3K, p-AKT, and p-NF- κ B proteins in HK-2 cells (E-G, respectively). Data were represented as $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. ### $P < 0.001$ vs the CON group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs the MOD group

大鼠的血脂水平。糖尿病肾病中肾脏功能会受损并发生病理损伤,其形态学异常包括早期肾小球肥大、肾小球基底膜增厚、足细胞减少、系膜基质扩张和肾小管损伤,在晚期,进一步发展为肾小球硬化和肾小管间质纤维化^[15]。HE染色分析结果显示,昆仙胶囊干预可逆转糖尿病肾病大鼠肾脏的形态学改变,同时也能明显改善肾脏指数、尿微量白蛋白、肌酐和尿微量白蛋白与肌酐比值等肾功能指标。已有肾脏活检分析表明,炎症细胞存在于糖尿病肾病的所有病理阶级(I~IV)的肾小球及其间质中,并进一步导致肾小球粥样硬化、管状萎缩和间质纤维化^[16]。本研究通过ELISA检查发现,昆仙胶囊经480 mg·kg⁻¹灌胃给药4周后可显著降低糖尿病肾病大鼠肾组织及细胞中IL-1 β 和TNF- α 的蛋白表达水平,以及ECM积聚标志物I型胶原和纤维黏连蛋白的水平,阻止肾组织向纤维化的发展。

PI3K/AKT/NF- κ B通路在多种疾病的炎症反应中起着关键的调节作用^[17-19]。有研究表明,长链非编码RNA牛磺酸上调基因可通过抑制PI3K/AKT通路来抑制系膜细胞的增殖和细胞外基质的积累。芒果苷可以通过PI3K/AKT通路降低转化生长因子- β 介导的I型胶原、纤维黏连蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白的升高,从而抑制肾间质纤维化。转录因子NF- κ B同样在糖尿病肾病的发病机制中起着重要的作用。在稳态条件下,NF- κ B存在于细胞质中,并与其抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)结合;然而,I κ B激酶的活化导致I κ B的磷

酸化、泛素化和降解,NF- κ B从抑制单元中释放出来,移位到细胞核中,从而促进了一系列促炎基因的表达(细胞因子、趋化因子、白细胞黏附分子、免疫受体、细胞配体和生长因子)^[20]。更有研究表明,蛋白尿本身就是NF- κ B的重要激活物,也是肾小管上皮细胞的重要促炎刺激因子^[21]。本研究通过对“疾病基因-药物靶标”网络进行分析发现,昆仙胶囊治疗糖尿病肾病的网络靶标被显著富集到PI3K/AKT/NF- κ B通路,提示该通路可能是昆仙胶囊有效干预糖尿病肾病中“免疫-炎症”失衡的关键通路。进一步的体内外实验验证发现,昆仙胶囊显著抑制了PI3K/AKT通路及NF- κ B的核转位,并减少下游细胞因子IL-1 β 和TNF- α 的释放,从而缓解肾脏炎症损伤,保护肾脏功能。

本研究整合“疾病基因-药物靶标-生物通路-功能模块”多层次关联网络分析及体内外实验验证,发现昆仙胶囊可能是治疗糖尿病肾病的有效候选药物,而其作用机制可能是靶向矫正PI3K/AKT/NF- κ B/IL-1 β /TNF- α 信号轴介导的“免疫-炎症”失衡环节。相关研究结果为拓展昆仙胶囊新的适应症提供一定的理论和实验依据。

作者贡献: 刘毓东负责实验验证、数据统计和文章撰写;马兆臣和李聪参与部分实验验证与数据采集;林雅负责参与部分实验方法指导;林娜和张彦珍负责总体研究方案设计、论文审阅和修改以及研究经费支持。

利益冲突: 本文作者声明不存在任何利益冲突。

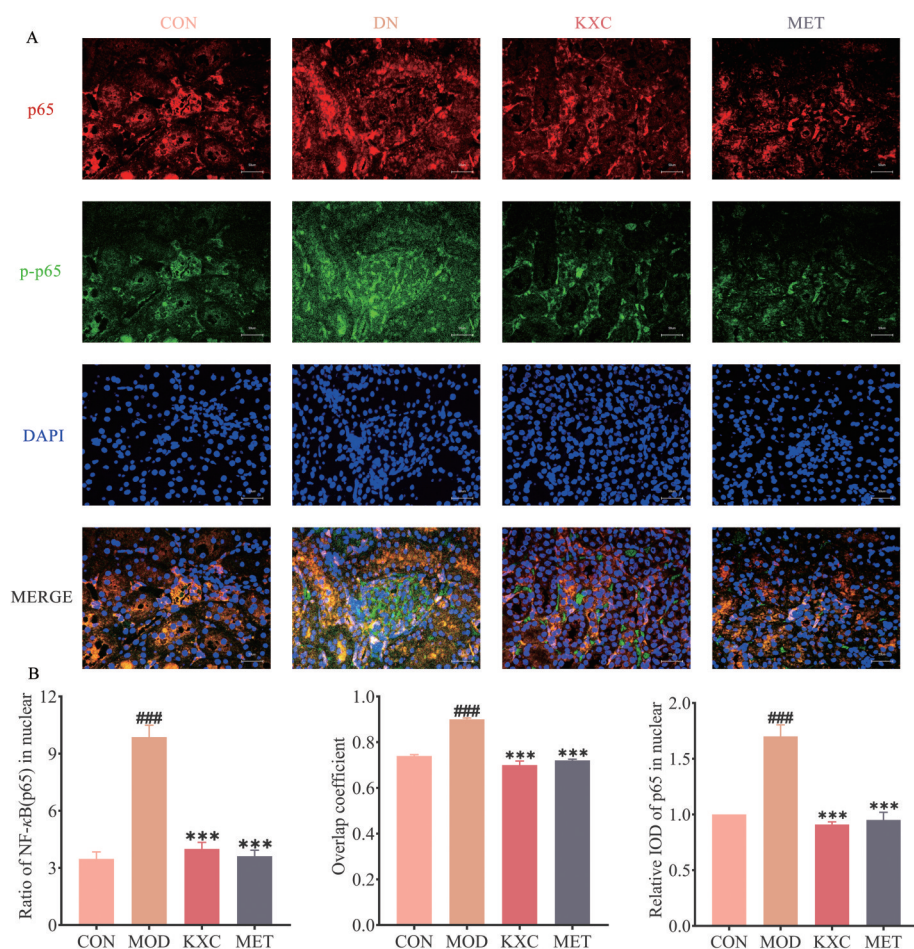


Figure 7 Immunofluorescence analysis shows the translocation of NF- κ B (p65) protein to the nucleus in DN kidney tissues (A, B, $n = 32$). Data were represented as $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments (scale bar: 50 μ m). ### $P < 0.001$ vs the CON group; *** $P < 0.001$ vs the MOD group. IOD: Integrated optical density

References

- [1] Umanath K, Lewis JB. Update on diabetic nephropathy: Core Curriculum 2018 [J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71: 884-895.
- [2] Coemans M, Van Loon E, Lerut E, et al. Occurrence of diabetic nephropathy after renal transplantation despite intensive glycemic control: an observational cohort study [J]. *Diabetes Care*, 2019, 42: 625-634.
- [3] Flyvbjerg A. The role of the complement system in diabetic nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13: 311-318.
- [4] Tang Y, Zhang Y, Li L, et al. Kunxian capsule for rheumatoid arthritis: inhibition of inflammatory network and reducing adverse reactions through drug matching [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 485.
- [5] Xu CF, Cui LL, Yan HX, et al. HPLC characteristic chromatograms and quantitative analysis of Kunxian capsules [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 6213-6220.
- [6] Tong XL, Zhou Q, Zhao LH, et al. Experience on TCM syndrome differentiation and treatment of diabetic nephropathy [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志)*, 2014, 29: 144-146.
- [7] Cui LL, Xu CF, Yan HX, et al. Research progress of clinical application of Kunxian capsule [J]. *World Chin Med (世界中医药)*, 2021, 16: 1754-1758.
- [8] Deng Y, Zhu DK, Tao X, et al. Advances in the pharmacological action and clinical application of Kunxian capsules in the treatment of immunological kidney diseases [J]. *China Med Herald (中国医药导报)*, 2020, 17: 48-50, 61.
- [9] Wang HM, Wu YW, Chen ZX. Clinical effect of Kunxian capsules combined with valsartan in the treatment of diabetic nephropathy stage IV proteinuria [J]. *China Med Herald (中国医药导报)*, 2020, 17: 156-159.
- [10] Zhang Y, Mao X, Chen W, et al. A discovery of clinically approved formula FBRP for repositioning to treat HCC by inhibiting PI3K/AKT/NF- κ B activation [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 890-904.
- [11] Robinson TW, Freedman BI. Glycated albumin and blood sugar control in advanced chronic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2018, 33: 1087-1090.

- [12] Yazdanpanah S, Rabiee M, Tahriri M, et al. Evaluation of glycosylated albumin (GA) and GA/HbA1c ratio for diagnosis of diabetes and glycemic control: a comprehensive review [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2017, 54: 219-232.
- [13] Ren H, Shao Y, Wu C, et al. Metformin alleviates oxidative stress and enhances autophagy in diabetic kidney disease *via* AMPK/SIRT1-FoxO1 pathway [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 500: 110628.
- [14] Huang M, Zhu C, Liang QL, et al. Effect of Tangshen Formula on phospholipids metabolism in diabetic nephropathy patients [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 780-786.
- [15] Yang D, Livingston MJ, Liu Z, et al. Autophagy in diabetic kidney disease: regulation, pathological role and therapeutic potential [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 669-688.
- [16] Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 124: 139-152.
- [17] Zang XJ, Li L, Du X, et al. LncRNA TUG1 inhibits the proliferation and fibrosis of mesangial cells in diabetic nephropathy *via* inhibiting the PI3K/AKT pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23: 7519-7525.
- [18] Song Y, Liu W, Tang K, et al. Mangiferin alleviates renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice through regulating the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 9481720.
- [19] Wang WD, Li ZJ, Chen YY, et al. Recent advances in lncRNAs and chronic kidney disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1918-1925.
- [20] Kondylis V, Kumari S, Vlantis K, et al. The interplay of IKK, NF-kappaB and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277: 113-127.
- [21] Huang WJ, Liu WJ, Xiao YH, et al. Tripterygium and its extracts for diabetic nephropathy: efficacy and pharmacological mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109599.