

基于网络药理学和实验验证探讨泽泻改善慢性肾小球肾炎的作用机制

仇之淼, 陆 宾, 卫梦娟*, 季莉莉

(上海中医药大学, 中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室, 上海市复方中药重点实验室, 上海 201203)

摘要: 本文旨在探讨泽泻 (*Alisma plantago-aquatica* Linn., ApL) 对慢性肾小球肾炎 (chronic glomerulonephritis, CGN) 小鼠的改善作用及其机制。动物实验过程均遵循上海中医药大学动物实验伦理委员会的规定。运用一次性尾静脉注射多柔比星 (doxorubicin, Dox, 20 mg·kg⁻¹) 方法建立 CGN 小鼠模型, 造模 1 周后每天灌胃给药 ApL 水提物 (85 和 255 mg·kg⁻¹), 两周后结束实验。检测小鼠尿白蛋白与肌酐的比值 (urine albumin-to-creatinine ratio, ACR)、血清白蛋白 (serum albumin, ALB)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和血清肌酐 (serum creatinine, SCr) 含量, 利用 HE (hematoxylin-eosin staining, H&E) 染色观察肾组织中病理损伤情况。根据 TCMSP 数据库获取 ApL 的化学成分及作用靶点, 并通过 Genecards 数据库获取 CGN 相关靶点。运用 String 及 Metascape 数据库进行蛋白互作、GO 功能和 KEGG 通路富集分析。研究结果发现, ApL (85 和 255 mg·kg⁻¹) 可以明显降低 CGN 小鼠 ACR 以及 SCr 和 BUN 含量, 并使 ALB 含量上升。网络药理学结果发现, 核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 相关通路以及氧化还原酶活性调节的生物过程可能是 ApL 改善 CGN 的关键因素。验证实验发现, ApL (85 和 255 mg·kg⁻¹) 可以抑制 CGN 小鼠 NF- κ B 的激活和其下游炎症因子的表达, 降低肾脏髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活力; 并促进核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 的激活, 增加其下游基因表达, 降低肾脏丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 提升谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平。本研究基于网络药理学结合实验验证发现 ApL 可能通过多靶点、多通路发挥改善小鼠 CGN 的作用, 其中对 NF- κ B 信号的抑制和 Nrf2 信号的激活可能是重要的作用机制。

关键词: 慢性肾小球肾炎; 泽泻; 网络药理学; 核因子- κ B; 核因子 E2 相关因子 2

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1430-11

Mechanism of *Alisma plantago-aquatica* Linn. improving chronic glomerulonephritis based on network pharmacology and experimental verification

QIU Zhi-miao, LU Bin, WEI Meng-juan*, JI Li-li

(The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicines, the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: This study aims to explore the improvement and the mechanism of the *Alisma plantago-aquatica* Linn. (ApL) on chronic glomerulonephritis (CGN). All animal experiments were followed the regulation of the Experimental Animal Ethical Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. CGN mouse model was established by a single tail-vein injection of doxorubicin (Dox) (20 mg·kg⁻¹). One week after Dox

收稿日期: 2022-06-21; 修回日期: 2022-10-12.

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项 (2018YFC1707302).

*通讯作者 Tel: 86-21-51328176, E-mail: wmj_aijia@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0759

administration, the mice received water extract of ApL (85 and 255 mg·kg⁻¹) by gavage once a day for 14 days. At the end of experiment, the urine albumin-to-creatinine ratio (ACR), serum albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) were detected, kidney histopathological H&E staining was analyzed. Active ingredients and action targets of ApL were collected from TCMSP database, and CGN-related targets were obtained from Genecards database. STRING platform was employed to perform protein-protein interaction (PPI), and Metascape platform was used for KEGG pathway and GO enrichment analysis. The results of experiments demonstrated that ApL (85 and 255 mg·kg⁻¹) could reduce the ACR and the content of SCr and BUN, and increase the content of ALB in mice. Network pharmacology results predicted that nuclear factor kappa-B (NF- κ B)-related pathway and biological process of oxidoreductase activity regulation may be involved in the ApL-provided amelioration on CGN. The verification results showed that ApL could inhibit the activation of NF- κ B and the expression of inflammatory factors in mice, and reduce the activity of renal myeloperoxidase (MPO). Meanwhile, ApL promoted the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and increased the expression of its downstream gene mRNA, and reduced the level of renal malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS), and further elevated renal glutathione (GSH) level. Based on network pharmacology combined experiments, this study found that ApL may improve CGN in mice through multiple targets and multiple pathways, in which the inhibition of NF- κ B signaling and the activation of Nrf2 signaling may be important mechanisms involved.

Key words: chronic glomerulonephritis; *Alisma plantago-aquatica* Linn.; network pharmacology; nuclear factor kappa-B; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

慢性肾小球肾炎 (chronic glomerulonephritis, CGN) 简称慢性肾炎 (chronic nephritis), 是由遗传因素、药物诱导、病毒或细菌感染等多因素引起的以肾小球病变为主的一类疾病^[1], 慢性肾小球肾炎主要病理特征为大量蛋白尿、水肿、高血压及肾小球病变等^[2]。其起病隐匿, 并伴随不同程度的肾损伤, 如不及时控制将会导致终末期肾衰竭^[3]。

泽泻 (*Alisma plantago-aquatica* Linn., ApL) 为传统中药, 其性味甘、淡, 归肾、膀胱经, 为传统的利水渗湿药^[4], 在临床应用中作为复方的重要组成成分被广泛用于多种慢性肾炎的治疗^[5], 如当归芍药散可通过降血脂, 减少尿蛋白含量改善慢性肾炎患者肾损伤, 五苓散可有效减轻慢性肾炎患者的肾功能损伤及炎症损伤, 六味地黄丸对肝肾阴虚型慢性肾炎患者的肾功能有明显改善作用^[6-8]。但目前对于 ApL 改善慢性肾炎的作用机制尚不明确。本研究基于多柔比星诱导的 CGN 小鼠模型, 将网络药理学结合实验验证, 探讨 ApL 治疗 CGN 可能的作用机制, 为其临床治疗慢性肾炎的应用提供更多的科学依据。

材料与方法

药物和仪器 泽泻饮片 (江西普正制药有限公司, 经上海中医药大学吴立宏研究员鉴定), 为泽泻科植物泽泻 *Alisma plantago-aquatica* Linn. 的干燥块茎, 泽泻水提物为前期实验室制备所得 (得率 18.9%), 具体方法见文献^[9]。醋酸泼尼松片 (prednisone, PNS) 购自上

海上药信谊药厂有限公司 (批号: 0181911101); 多柔比星 (doxorubicin, Dox, 批号: HY-15142)、2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (H2DCFDA, 批号: HY-D0940) 购自 MedChemExpress (MCE) 公司。尿蛋白 (urinary protein, 货号: C035-2-1)、血清白蛋白 (serum albumin, ALB, 货号: A028-2-1)、血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN, 货号: C013-2-1)、肌酐 (serum creatinine, SCr, 货号: C011-2-1)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO, 货号: A044-1-1)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA, 货号: A003-1-2)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH, 货号: A006-2-1) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 23-乙酰泽泻醇 B (alisol B monoacetate, ABA) (货号: F0711AS) 和 24-乙酰泽泻醇 A (alisol A monoacetate, AAA) (货号: M0502AS) 购自大连美仑有限公司; 23-乙酰泽泻醇 C (alisol C monoacetate, ACA) (货号: JOT-10621) (成都普菲德生物技术有限公司); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (Sigma 公司); 乙腈 (色谱纯, Fisher Chemical 公司); 冰醋酸 (分析纯, 国药集团化学试剂上海有限公司); 核纤层蛋白 B1 (Lamin B1) 抗体 (货号: 13435)、核因子 κ B p65 (nuclear factor-kappa B p65, NF- κ B p65, p65) 抗体 (货号: 4764) (Cell Signaling Technology 公司); 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 抗体 (货号: GTX103322) (GeneTex 公司); 过氧化物酶结合的山羊兔抗 (货号: 31460) (Thermo Fisher Scientific 公司)。BCA 试剂盒 (货号: 23225) 购自赛默飞世尔科技有限

公司; PrimeScript[®]RT Master Mix (货号: RR036A)、SYBR[®]Premix Ex Taq (货号: RR420A) 购自 Takara 公司。Trizol、QuantStudio 6 flex 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Life Technology 公司); 低温高速离心机、涡旋震荡仪 (德国 Eppendorf 公司); Synergy H4 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 病理切片扫描机 (日本 Olympus 公司)。

实验动物 SPF 级雄性 ICR 小鼠 (18 ± 2 g), 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物许可证号: SYXK (沪) 2020-0009, 饲养于上海中医药大学实验动物中心, 室温 (22 ± 1) °C, 相对湿度 $65\% \pm 5\%$, 12 h 昼夜循环, 动物实验均按照上海中医药大学动物管理和使用委员会批准的方案 (伦理号: PZSHUTCM210903012)。

动物分组及造模 雄性 ICR 小鼠 35 只, 随机分为 5 组, 每组 7 只: ① 对照组; ② Dox 组: Dox ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); ③ PNS 阳性药组: Dox+PNS ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); ④ ApL 低剂量组: Dox+ApL ($85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); ⑤ ApL 高剂量组: Dox+ApL ($255 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。适应性饲养 1 周后, 除空白组小鼠, 其余均采用一次性尾静脉注射 Dox 方法造模, 造模剂量 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 造模 1 周后按分组每天灌胃给药, 除给药组外对照组与模型组均给予生理盐水, 连续给药 2 周; 实验期间每 3 天测量小鼠体重 1 次, 造模前取尿 1 次, 造模后每隔 5 天取尿 1 次。实验结束后收集小鼠血液和肾组织。

尿液指标检测 将代谢笼收集到的尿液样本以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1\ 000 \times \text{g}$ 离心 5 min, 取上清, 根据尿蛋白、肌酐定量试剂盒说明书检测小鼠尿蛋白和尿肌酐含量。尿蛋白与肌酐的比值 (ACR) = 尿蛋白含量/尿肌酐含量。

血清指标检测 取血后将其 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h 后, $860 \times \text{g}$ 离心 15 min, 取上清液得血清。参照肌酐、BUN、ALB 试剂盒说明书检测小鼠血清肌酐、尿素氮及白蛋白水平。

肾脏组织 H&E 染色观察 小鼠肾脏固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 并包埋于石蜡中。对样品进行切片 ($5 \mu\text{m}$), 用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, H&E) 染色, 显微镜下观察肾组织损伤情况。

肾小球病理评分 HE 病理染色评分按照 0~4 分半定量计分方式对肾小球损害程度进行评分, 评分细则如表 1, 每只小鼠评价 20 个肾小球, 取平均值为肾小球评分^[10]。

肾组织 F4/80 染色 小鼠肾脏固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 并包埋于石蜡中。对样品进行切片后, 先后采用 F4/80 及对应二抗和色源底物孵育, 最后在显微镜下观察。

肾组织活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检

Table 1 Glomerular score

Score	Glomerulonephritis
0	Normal glomerulus
1	Focal, mild or early proliferative
2	Multifocal proliferative with increased matrix and inflammatory cells
3	Diffuse proliferative
4	Extensive sclerosis/crescents: proteinuria

测 取肾组织 15 mg, 加入 500 μL 的 PBS 缓冲液清洗, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $500 \times \text{g}$ 离心 10 min, 弃上清; 加入 10 倍量的 PBS 缓冲液, 低温研磨, 得到 10% 的肾组织匀浆液; $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $500 \times \text{g}$ 离心 10 min, 取上清后 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\ 000 \times \text{g}$ 离心 10 min, 取出上清同时留存沉淀; 沉淀加入 500 μL 的 PBS 缓冲液, 在 $10\ 000 \times \text{g}$ 、10 min 条件下离心, 弃上清, 沉淀加入 150 μL 的 PBS 溶液 (含 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2DCFDA) 避光孵育 1 h, 取 100 μL 测定荧光值 (激发光 $485 \pm 20 \text{ nm}$, 发射光 $525 \pm 20 \text{ nm}$); 使用 BCA 试剂盒检测上清液的蛋白浓度以校准 ROS 值。

肾组织 MDA、GSH 和 MPO 检测 按照检测试剂盒说明书检测小鼠肾组织中的 MDA、GSH 及 MPO。

肾组织 RNA 提取和逆转录 剪取 10 mg 肾脏组织, 加入 1 mL Trizol 冰上匀浆, 静置 5 min 后加入 200 μL 氯仿, 振荡 15 s, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000 \times \text{g}$ 离心 15 min, 取上清液移至预冷离心管, 加入 0.5 mL 异丙醇, 振荡 15 s, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000 \times \text{g}$ 离心 10 min, 吸弃上清, 加入 1 mL 预冷 75% 乙醇, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $7\ 500 \times \text{g}$ 离心 5 min, 吸弃上清, 置于超净台内晾干, 得到 RNA 沉淀。加入 50 μL DEPC 水充分溶解, 于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。Nano Drop 测 RNA 纯度, 用 PrimeScript[®]RT Master Mix 试剂盒进行逆转录, 合成 cDNA。

荧光实时定量聚合酶链反应实验 按照 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒方法, 使用 Step One Plus 仪器进行 Real-time PCR 扩增。扩增完成后, 目标基因的相对表达量以 actin 作为内参标准化, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算, 其结果同正常组数据进行比较观察相关基因的表达变化。引物序列见表 2。

Western blot 实验 制备肾组织胞浆核蛋白样本, 蛋白以 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 在电流作用下转移至聚偏二氟乙烯膜; 以 5% BSA 或 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜, 加相应的抗体 Nrf2 (1:1 000)、p65 (1:1 000)、Lamin B1 (1:1 000) 于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境过夜孵育; 洗脱未结合的抗体, 以与辣根过氧化物酶结合的二抗 (山羊兔抗 1:5 000) 于室温下进行孵育; 洗脱未结合的二抗, 以 ECL 对 PVDF 膜进行显色反应, 置于凝胶成像仪中曝光。蛋白以内参 Lamin B1 进行相对定量分析。

Table 2 RT-qPCR primer sequences. iNOS: Inductible nitric oxide synthase; COX-2: Cyclooxygenase-2; IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha; IL-1 β : Interleukin-1 β ; Gclm: Glutamate-cysteine ligase modifier subunit; Gclc: Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit; Ho-1: Heme oxygenase-1; Gstm1: Glutathione S-transferase M1; Sod1: Superoxide dismutase 1; Gstp1: Glutathione S-transferase pi-1

Gene	Sequence (5'-3')
iNOS	Forward: TGCCACGGACGAGACGGATAG Reverse: CTCTCAAGCACCTCCAGGAACG
COX-2	Forward: ATTCCAAACCAGCAGACTCATA Reverse: CTTGAGTTTGAAGTGGTAACCG
IL-6	Forward: CTCCAACAGACTGTCTATAC Reverse: CCAATGCACAACCTCTTTCTCA
TNF- α	Forward: AGGCACTCCCCAAAAGAT Reverse: CAGTAGACAGAAGAGCGTGGTG
IL-1 β	Forward: AGTTGACGGACCCAAAAG Reverse: CTTCTCCACAGCCACAATGA
Gclm	Forward: CTGGGGAATGAAGTGATGGT Reverse: CAATGACCCGAAAGAAGTGC
Gclc	Forward: CGGAGGAACGATGTCTGAGT Reverse: CTGGGGAATGAAGTGATGGT
Ho-1	Forward: CAATGACCCGAAAGAAGTGC Reverse: CTCGTGGAGACGCTTTACATGG
Sod1	Forward: TGTCCATTGAAGATCGTGTGAT Reverse: TCATCTTGTCTCATGGACCA
Gstm1	Forward: GAAGCTCTACTCTGAGTTCTCTG Reverse: TCAAACATACGGTACTGGTCAA
β -Actin	Forward: TTCGTTGCCGGTCCACACCC Reverse: GCTTTGCACATGCCGGAGCC
Gstp1	Forward: ATGCCACCATACACCATTGTC Reverse: GGGAGCTGCCCATACAGAC

细胞实验 RAW264.7细胞系购于美国 (American Type Culture Collection), 培养于含 5% 灭活胎牛血清、 1×10^4 u·L⁻¹青霉素和 100 mg·L⁻¹链霉素的 DMEM 培养液中, 细胞在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 取对数生长期的细胞用于实验。

过表达抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 启动子区域结合荧光素酶序列的 L-02 细胞株 (L-02-ARE) 系构建于汉恒生物公司, 培养于含 2 μ g·L⁻¹嘌呤霉素, 10% 灭活胎牛血清、 1×10^4 u·L⁻¹青霉素和 100 mg·L⁻¹链霉素的 DMEM 培养液中, 培养条件同上。

药物抗炎活性筛选实验 取对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板, 待细胞贴壁且生长状态良好时加入 23-乙酰泽泻醇 B、24-乙酰泽泻醇 A 和 23-乙酰泽泻醇 C (10 和 25μ mol·L⁻¹) 预孵, 孵育 30 min 后加入 30 ng·mL⁻¹ LPS 共同孵育 24 h 后收取细胞, 提取细胞 RNA 进行逆转录。

荧光素酶报告基因分析 取对数生长期 L-02-ARE 细胞以 1.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 过夜贴壁后

加入 23-乙酰泽泻醇 B、24-乙酰泽泻醇 A 和 23-乙酰泽泻醇 C (10 和 25μ mol·L⁻¹) 孵育, 孵育 24 或 48 h 后使用 Stedy-GLO[®] Luciferase Assay (Promega 公司) 单荧光素报告基因试剂盒测定细胞的 luciferase 活性。

成分收集及靶点预测 通过中药系统药理数据库和分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP) 寻找 ApL 的化学成分, 并通过文献报道进行补充, 根据口服生物利用度 (oral relative bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 且类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 初步筛选药物活性成分及其作用的蛋白质靶点。接着利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 标准化筛选所得的蛋白质靶点信息。以“chronic nephritis”为关键词在 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org>) 搜索慢性肾炎的疾病潜在靶点。将符合条件的疾病靶点与成分靶点取交集, 得到交集靶点, 利用微生信可视化在线作图网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 绘制韦恩图。

构建蛋白互作网络图 将交集靶点导入 STRING11.0 数据库 (<https://string-db.org>) 进行蛋白互作 (protein protein interaction, PPI) 分析, 将物种类型设为“Homo sapiens”, 最小互作用阈值设定为“highest confidence > 0.9”, 其余均为默认设置, 得到 PPI 网络, 将所得 TSV 文件导入 Cytoscape3.6.0 中进行分析, 得到 ApL 与慢性肾小球肾炎交集靶点的 PPI 网络图, 并进行拓扑学分析得到核心靶点。

KEGG 及 GO 富集分析 将核心靶点导入 Metascape 平台, 设置 $P < 0.01$, 分别进行生物学过程和代谢通路的富集分析, 包括细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)。

构建“中药-有效成分-交集靶点-信号通路”网络图 根据 KEGG 富集分析的结果得到信号通路、靶点与成分的相互作用关系, 通过 Cytoscape 3.6.0 软件将 ApL 及其有效成分、交集靶点、信号通路四者的关系可视化, 构建“中药-有效成分-交集靶点-信号通路”网络图。

统计学分析 实验数据用均值 \pm 标准误 (standard error of mean, SEM) 表示, 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 以 one-way ANOVA 方式进行方差分析, 两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为具有统计学显著性差异标准。

结果

1 ApL 改善 Dox 诱导的 CGN 小鼠肾损伤

结果显示, 与正常组相比, 模型组血清 ALB 含量

和体重显著下调 ($P < 0.001$), 给予 PNS ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 ApL (85 和 $255 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后 ALB 含量显著增加 ($P < 0.001$), 而对体重无明显影响 (图 1A、B)。与模型组相比, 升高的尿 ACR ($P < 0.01, P < 0.001$)、SCr 和 BUN 水平 ($P < 0.01$) 在给予 ApL (85 和 $255 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后, ACR ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$)、SCr ($P < 0.05, P < 0.01$)、BUN ($P < 0.01$) 显著降低 (图 1C~E)。HE 染色结果显示, 模型组小鼠肾小球变形、系膜细胞与系膜基质增多、鲍曼氏囊腔缩小、炎性细胞浸润增加, 肾小球病理评分发现, PNS ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 ApL (85 和 $255 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 给药后小鼠肾脏损伤得到显著改善, 且 ApL 高剂量组优于低剂量组 (图 1F)。

2 网络药理学有效成分与关键靶点获取及蛋白互作 PPI 网络的构建

通过 TCMSP 及文献^[11]挖掘, 获得 23-乙酰泽泻醇 B、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 C 等 16 个有效成分及相关蛋白靶点, 导入 Uniprot 数据库得到基因名称, 删除重复项后得到药物靶点 101 个。通过 GeneCards 数据库经筛选得到共 1 503 个 CGN 相关靶点, 与药物靶点取交集得到共 23 个靶点 (图 2A)。可视化分

析结果得到包含 43 个节点, 89 条边, 平均节点度值为 4.1 的 PPI 蛋白互作网络图。图中得到多个可能在 ApL 改善 CGN 中发挥重要作用的核心靶点, 以节点大小及节点颜色深浅代表度值高低, 连线粗细及颜色深浅代表相互作用的强弱 (图 2B)。

3 KEGG 通路及 GO 功能富集分析

KEGG 分析的结果显示, NF- κ B 信号通路、TNF 信号通路、NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路等可能参与 ApL 改善 CGN 的过程 (图 3)。GO 富集分析结果显示, 多个细胞组分和生物过程也可能参与其中, 如炎症反应的调节 (regulation of inflammatory response)、与炎症反应有关的细胞因子产生 (cytokine production involved in inflammatory response)、对氧化应激的反应 (response to oxidative stress)、氧化还原酶活性的调节 (regulation of oxidoreductase activity)、正向调节氧化还原酶活性 (positive regulation of oxidoreductase activity) 和氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity) 等 (图 4)。

4 “中药-有效成分-交集靶点-信号通路”的网络构建

利用 Cytoscape 3.6.0 软件构建“中药-有效成分-交集靶点-信号通路-疾病”网络图, 网络中共有 88 个

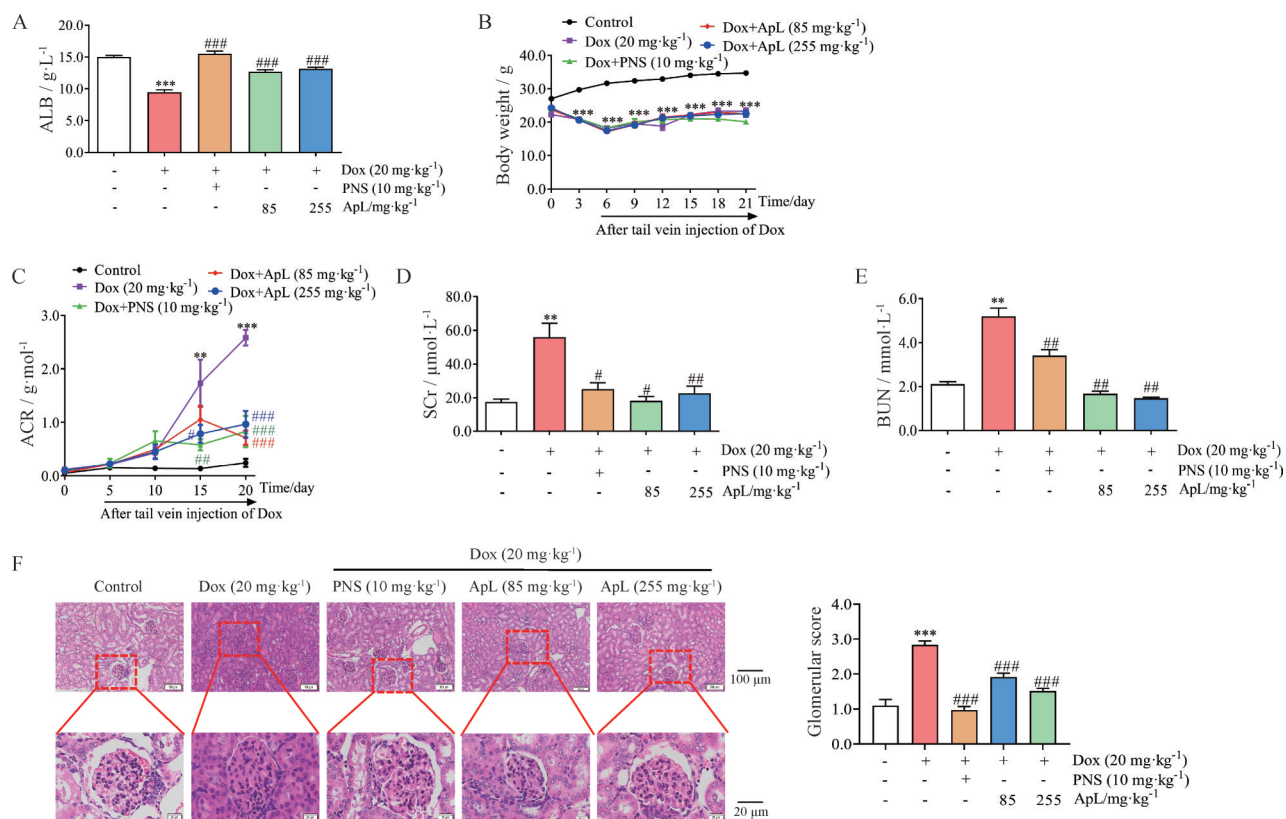


Figure 1 *Alisma plantago-aquatica* Linn. (ApL) improved doxorubicin (Dox)-induced chronic glomerulonephritis (CGN) in mice. A: Serum albumin (ALB) content ($n = 5$); B: Body weight ($n = 7$); C: Urine albumin-to-creatinine ratio (ACR) value ($n = 5$); D: Serum creatinine (SCr) content ($n = 5$); E: Serum blood urea nitrogen (BUN) content ($n = 5$); F: Kidney H&E staining. The red box indicates the site of glomerular lesion. Glomerular, interstitial and perivascular disease was scored from (0) to (4) as described in methods ($n = 3$). Mean \pm SEM. $^{**}P < 0.01, ^{***}P < 0.001$ vs control group; $^{\#}P < 0.05, ^{\#\#}P < 0.01, ^{\#\#\#}P < 0.001$ vs Dox group. PNS: Prednisone

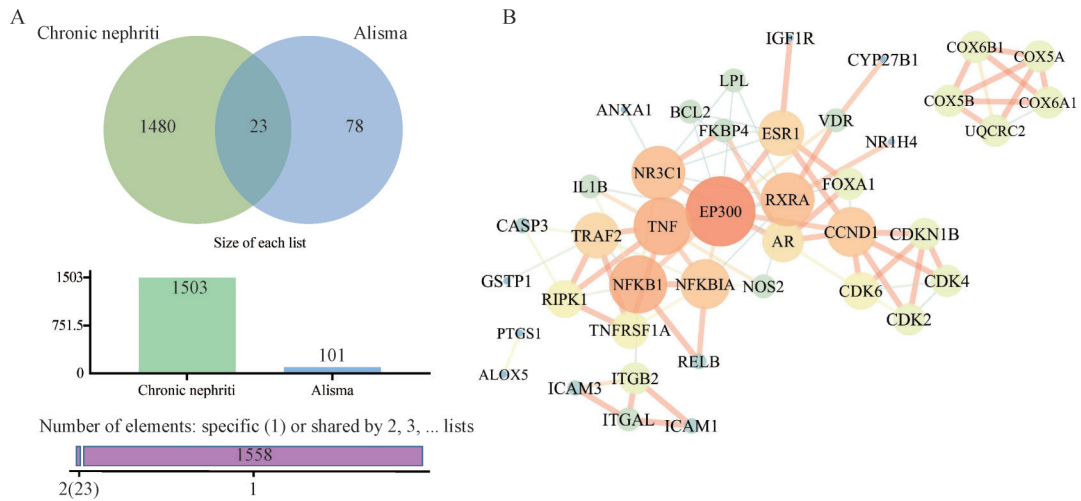


Figure 2 Venn diagram and protein-protein interaction (PPI) analysis. A: Venn diagram; B: PPI analysis

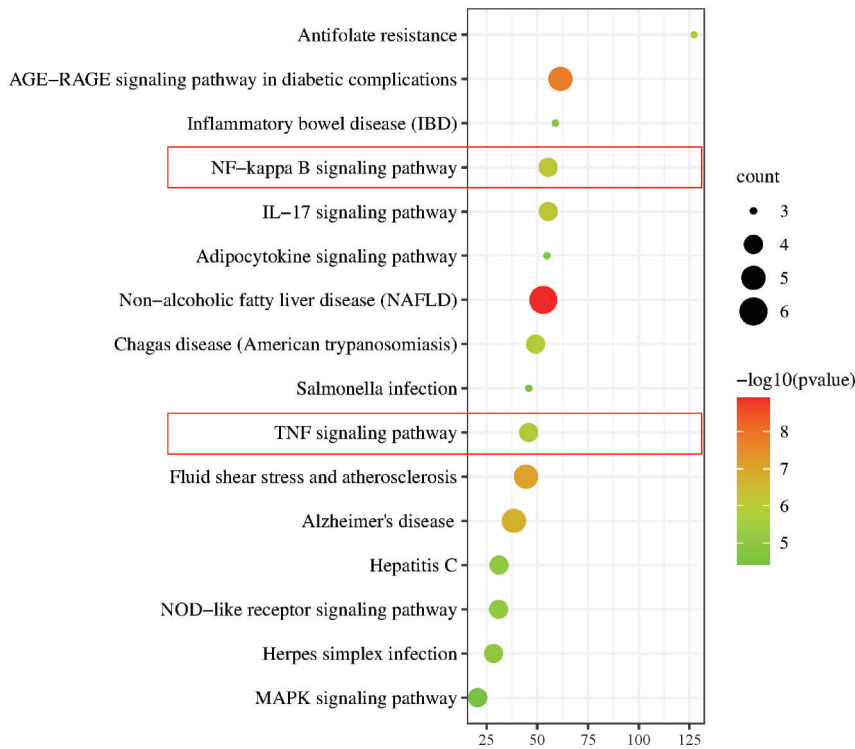


Figure 3 Pathway enrichment analysis

节点, 335条边。其中橙色矩形代表ApL, 黄色椭圆代表ApL的活性成分(17个), 浅蓝三角形代表信号通路(48个), 深蓝色矩形代表关键靶点(23个), 其中有NFKB1 (NF-κB)、TNF、IL1B (IL-1β)、NOS2 (iNOS) 等多个炎症相关靶点, 及抗氧化相关靶点GSTP1。此网络体现了ApL通过多成分、多靶点、多通路的方式干预CGN的特点(图5)。

5 ApL抑制CGN小鼠肾脏NF-κB信号通路的激活

网络药理学结果提示, NF-κB信号通路可能参与ApL改善CGN的过程, 首先对小鼠肾组织中MPO水

平检测, 发现Dox给药后, 小鼠肾组织MPO水平明显升高 ($P < 0.001$), ApL给药后(85和255 mg·kg⁻¹)能够显著降低肾组织中MPO的活力 ($P < 0.01$) (图6A)。接着对肾组织中p65的核转位进行分析, 结果发现ApL可以明显降低由Dox诱导的p65核转位增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图6B)。同时, 对炎症相关基因IL-6、COX-2、TNF-α、IL-1β和iNOS的mRNA表达进行检测, 结果显示, 给药ApL(85和255 mg·kg⁻¹)后能够显著降低CGN小鼠肾组织中以上炎症因子的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图6C)。F4/80免疫染色结果显示(图

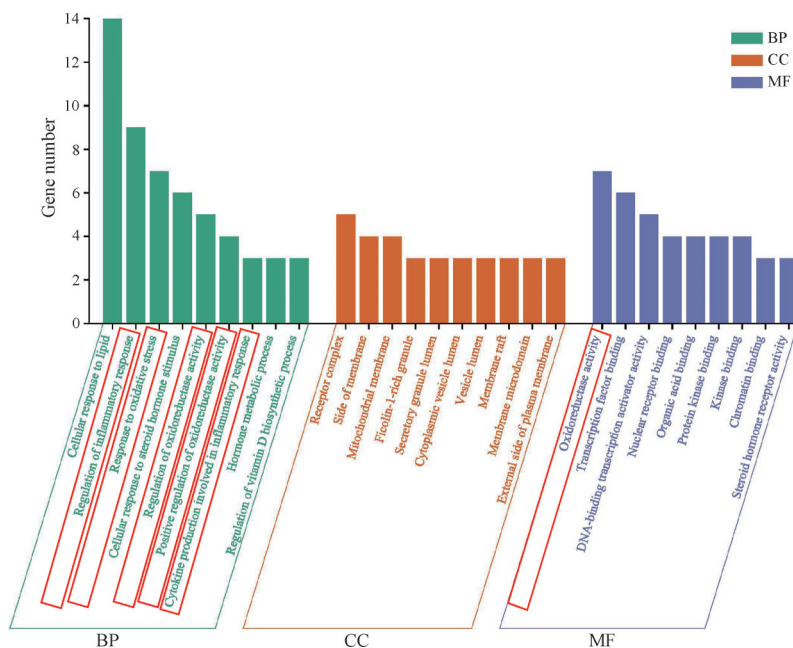


Figure 4 Gene ontology (GO) enrichment analysis. BP: Biological process; CC: Cellular component; MF: Molecular function

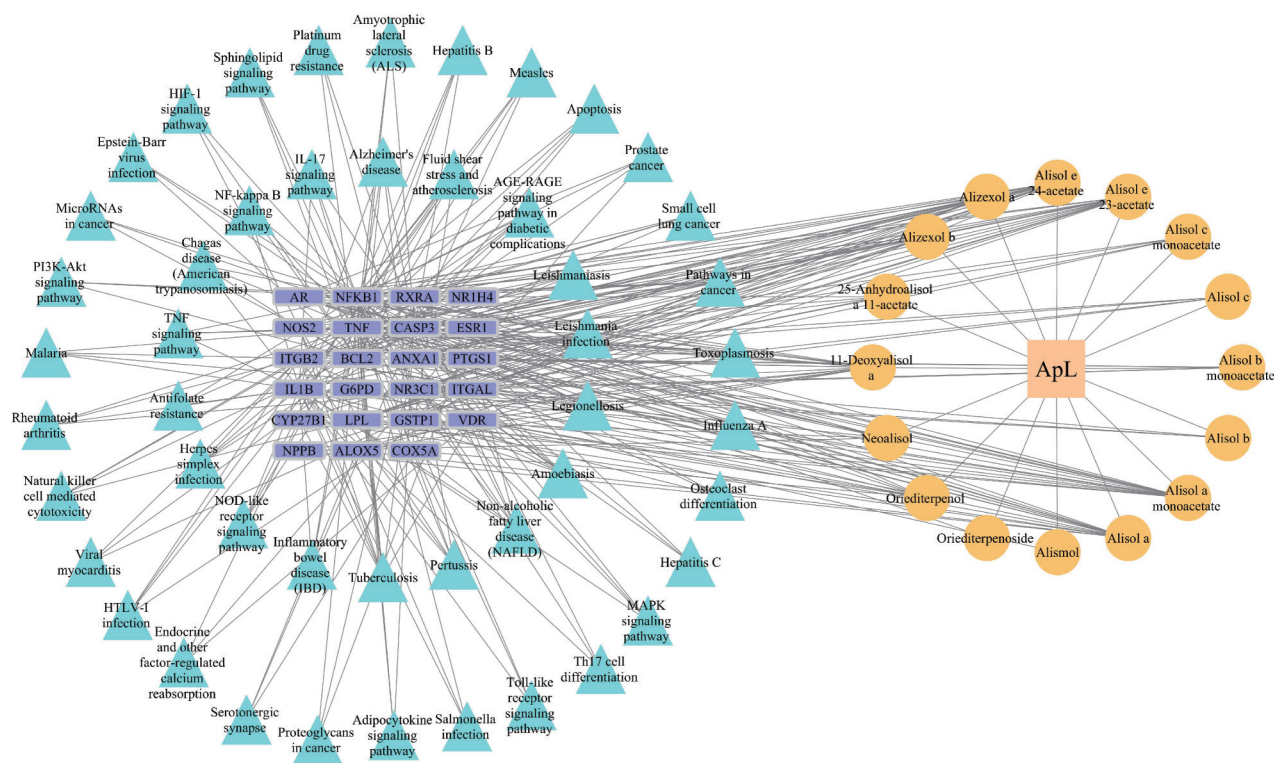


Figure 5 Network of ApL-active ingredient-intersection target-pathway-CGN. The orange rectangle represents ApL, the yellow oval represents active ingredient, the dark blue rectangle represents intersection target, the light blue triangle represents signal pathway

6D), 与 Dox 组比, 给药 ApL (85 和 255 mg·kg⁻¹) 后小鼠肾组织中炎症细胞浸润得到明显改善 ($P < 0.001$)。

6 ApL 促进 CGN 小鼠肾脏 Nrf2 系统的激活

GO 分析结果表明, ApL 改善 CGN 小鼠肾损伤可能与抑制氧化应激损伤有关。因此, 检测肾组织中 ROS、MDA 和 GSH 的水平, 结果显示, 给药 ApL (85 和

255 mg·kg⁻¹) 后能够显著降低 CGN 小鼠肾组织中 ROS ($P < 0.001$) 及 MDA ($P < 0.05$) (图 7A、B), 并进一步提升肾组织中 GSH 含量 ($P < 0.01$, 图 7C)。由于 Nrf2 在氧应激损伤中的重要作用, 接着对小鼠肾组织中 Nrf2 的核转位激活进行检测, 结果发现, ApL (85 和 255 mg·kg⁻¹) 给药后能逆转 Dox 诱导的 Nrf2 核转位水

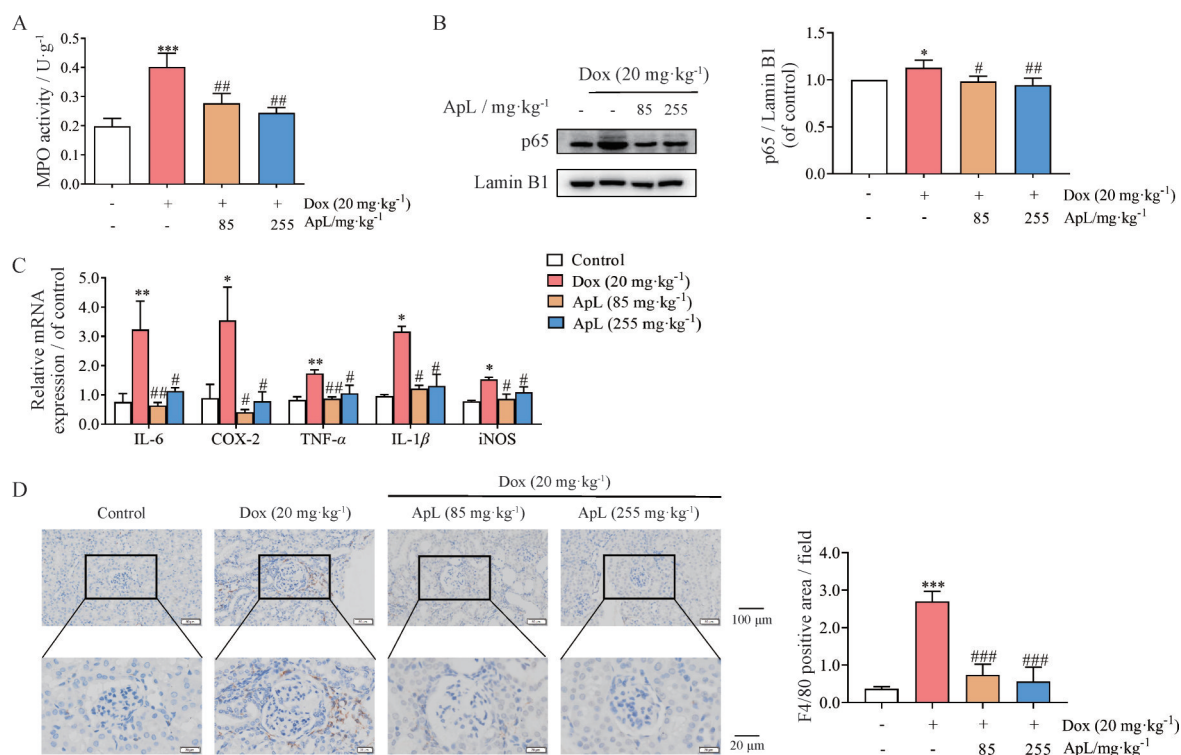


Figure 6 ApL inhibited the activation of NF- κ B signaling pathway in kidney tissue of CGN mice. A: Renal myeloperoxidase (MPO) level ($n = 6$); B: The expression of nuclear p65 in renal tissue, and Lamin B1 was used as a loading control. The quantitative densitometric analysis of p65 was shown right ($n = 3$); C: Renal mRNA expression of IL-6, COX-2, TNF- α , IL-1 β and iNOS ($n = 3$); D: Immunohistochemistry stain for F4/80 infiltration (left), the black box indicates the site of glomerular lesion. Quantification of the area of F4/80 (right). Mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Dox group

平的降低 ($P < 0.05$, 图 7D), 并且 ApL 还可以促进 Nrf2 下游相关基因 Gclm、Gclc、Gstm1、Sod1、Ho-1 及 Gstp1 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, 图 7E)。

7 ApL 主要成分的体外实验验证

上述结果表明, ApL 可能通过对 NF- κ B 信号通路的抑制和对 Nrf2 信号通路的激活来改善 CGN 小鼠的肾损伤。为了进一步明确 ApL 的主要活性成分, 在体外进行了抗炎和抗氧化活性的验证。结果显示, 与过表达 ARE 启动子区域结合荧光素酶序列的 L-02 细胞共同孵育 24 h 后, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 23-乙酰泽泻醇 B (ABA)、24-乙酰泽泻醇 A (AAA) 和 23-乙酰泽泻醇 C (ACA) 可以诱导 Nrf2 核转位的激活 ($P < 0.05$, 图 8A)。同时在 LPS (30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 刺激 RAW264.7 细胞后, 检测 IL-1 β 和 iNOS 的 mRNA 表达发现, AAA (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、ABA (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、ACA (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均能降低由 LPS 诱导升高的 IL-1 β 和 iNOS mRNA 表达 ($P < 0.05$, 图 8B)。

讨论

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 已成为继心脑血管疾病、糖尿病和恶性肿瘤之后各国公认的

威胁人类健康的世界性难题, 在我国成年人中的发病率为 8%~16%, 具有起病隐匿、增长率高特点^[12-14]。CGN 是以肾小球病变为主的一类慢性肾脏病, 是 CKD 的主要病因之一^[15], 研究显示, 我国 40 岁以上人群 CGN 的发病率接近 10%, 并呈不断增长趋势^[16]。

在中医药理论体系中, 根据 CGN 的发病特点及症状体征将其归于“肾风”、“水肿”、“虚劳”、“尿浊”、“尿血”、“腰痛”等病症范畴, 以湿热、瘀血等为主要临床表现^[17]。已有研究发现利水渗湿类中药及复方可以明显减轻 CGN 临床症状, 改善肾功能, 如当归芍药散可以有效改善 CGN 患者的临床症状及肾功能损伤^[18]; 益肾通络汤能够通过降低 TNF- α 、IL-6、IL-17 和 IFN- γ 水平, 减轻炎症损伤, 从而改善肾损伤^[19]。

ApL 为传统的利水渗湿药, 在临床上常被用于治疗水肿、尿少、高脂血症等疾病^[20]。药理研究发现, ApL 的乙酸乙酯提取物可通过抑制肾组织内草酸钙晶体的形成, 减少肾间 α 胰蛋白酶抑制物的表达, 来抑制尿结石的形成^[21]。Chen^[22] 发现 ApL 的三萜类化合物可以通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥减轻肾损伤作用。但关于 ApL 水提物对慢性肾炎是否有改善作用及其治疗机制尚不明确。本研究通过 SCr、BUN、

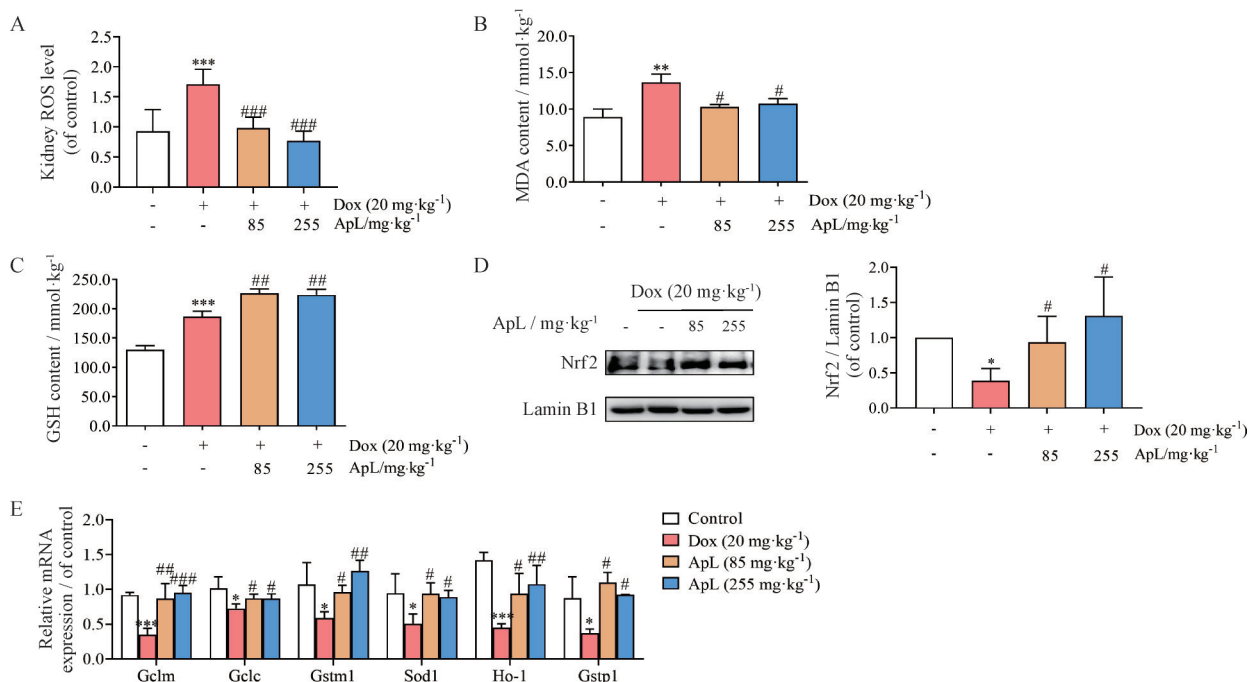


Figure 7 ApL promoted the activation of Nrf2 signaling pathway in kidney tissue of CGN mice. A: Renal reactive oxygen species (ROS) level ($n = 5$); B: Renal malondialdehyde (MDA) content ($n = 5$); C: Renal GSH content ($n = 5$); D: The expression of nuclear Nrf2 in renal tissue, and Lamin B1 was used as a loading control. The quantitative densitometric analysis of Nrf2 was shown right ($n = 3$); E: Renal mRNA expression of Gclm, Gclc, Gstml, Sod1, Ho-1 and Gstp1 ($n = 3$). Mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Dox group

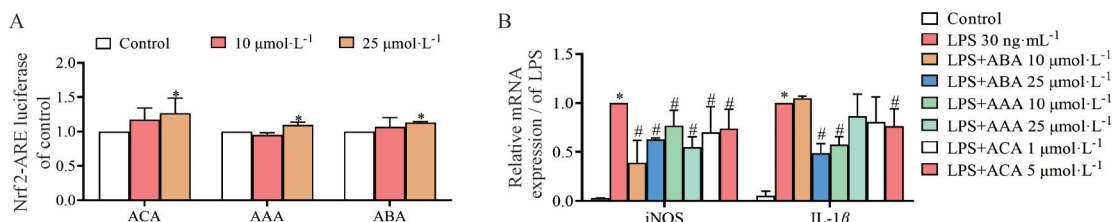


Figure 8 *In vitro* analysis of the anti-inflammatory and antioxidant activity. A: The Nrf2-ARE luciferase activity; B: Cellular mRNA expression of IL-1 β and iNOS in RAW264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS). $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LPS group. ARE: Antioxidant response element; AAA: Alisol A monoacetate; ABA: Alisol B monoacetate; ACA: Alisol C monoacetate

ALB、尿 ACR 及肾脏病理切片的结果发现, ApL 可以改善 Dox 诱导的肾脏损伤, 网络药理学结果发现, ApL 可能是通过多靶点、多通路来发挥改善 CGN 的作用。

NF- κ B 信号通路已被发现在肾小球肾炎的发病机制中发挥重要作用^[23], 如诱导肾组织中 NF- κ B 活化会使 24 h 蛋白尿含量升高, 加剧肾功能损伤^[24]。NF- κ B 是一个多效转录因子, 可调控多种细胞过程, 在炎症反应过程中发挥着重要作用, NF- κ B 的激活使促炎因子及趋化因子表达上调^[25], 有研究指出在其他疾病中泽泻醇提取物及泽泻主要活性成分被发现可以通过抑制 NF- κ B 核转位, 从而降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎因子的表达^[26,27]。本研究的靶点预测及通路分析结果

提示, 泽泻可通过作用于 NFKB1 (NF- κ B)、TNF、IL1B (IL-1 β)、NOS2 (iNOS) 等靶点参与 NF- κ B 信号通路, 因此对 p65 的核转位及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS 等基因表达进行检测, 结果也发现, ApL 水提取物可以减少 NF- κ B 核转位, 并减少炎症因子的基因表达。

此外, 网络药理学富集结果提示 ApL 活性成分可能参与调节多个氧化应激相关的生物过程改善 CGN, 且靶点预测结果中发现谷胱甘肽转移酶 (GSTP1) 与氧化应激反应密切相关, GSTP1 是 Nrf2 的重要下游因子^[28]。目前, 氧化应激被认为在慢性肾病的发病机制中起着核心作用^[29]。Nrf2 是细胞防御系统的主要调控者, 参与多个氧化应激相关基因的调控, 包括抗氧化蛋

白和解毒酶等, 是重要的抗氧化分子^[30]。已有研究表明, 对 Nrf2 的激活可以减轻氧化应激损伤并抑制炎症反应的发生, 从而抑制肾脏疾病的发展^[31,32]。本研究结果发现, ApL 水提物可以通过激活 Nrf2 抗氧化系统减轻 CGN 小鼠肾脏氧化应激损伤, 从而改善肾损伤。

同时, 泽泻的有效成分也被报道具有一定的抗炎和抗氧化的药理作用, 其中 24-乙酰泽泻醇 A 是一种从泽泻中分离出来的天然三萜类化合物, 被发现可通过调节 AMPK/mTOR 通路, 降低 ROS 及炎症因子的表达^[33]。泽泻醇 A 被报道能够通过阻断 NF- κ B 的活化, 抑制炎症细胞因子的产生^[34]。23-乙酰泽泻醇 C 可通过干扰 NF- κ B 信号通路, 降低血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子表达^[35]。23-乙酰泽泻醇 B 能够降低血清中 IL-12 和 IFN- γ 的水平改善炎症反应^[36], 并且可以通过激活 Nrf2 减轻氧化应激损伤^[37]。根据文献得知, 23-乙酰泽泻醇 B、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 C、泽泻醇 A 和泽泻醇 C 在 ApL 中含量较高^[38], 且 23-乙酰泽泻醇 B 和 23-乙酰泽泻醇 C 为药典中规定成分^[4], 因此本研究检测了 23-乙酰泽泻醇 B、24-乙酰泽泻醇 A 和 23-乙酰泽泻醇 C 抗炎和抗氧化的活性, 结果表明以上 3 个关键化学成分具有显著的抗炎和抗氧化活性, 因此推测 23-乙酰泽泻醇 B、24-乙酰泽泻醇 A 和 23-乙酰泽泻醇 C 可能为 ApL 发挥作用的关键药效物质基础。

综上所述, 本研究通过网络药理学结合实验验证发现 ApL 改善 CGN 的主要作用机制可能是对 NF- κ B 信号通路的抑制和对 Nrf2 信号通路的激活, 并发现 ApL 中发挥活性的主要成分可能是 24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B 和 23-乙酰泽泻醇 C。该研究为 ApL 治疗 CGN 的临床应用提供了更多参考依据。

作者贡献: 仇之淼负责完成网络药理学预测、动物实验、指标检测与论文撰写; 陆宾协助数据分析与动物实验; 卫梦娟指导研究思路、研究方法, 撰写并修订文章; 季莉莉指导研究思路, 设计研究方法。

利益冲突: 全体作者声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides [J]. *Lancet*, 2016, 387: 2036-2048.
- [2] Qin XJ, Gao JR, Xu XJ, et al. LncRNAs expression in adriamycin-induced rats reveals the potential role of lncRNAs contributing to chronic glomerulonephritis pathogenesis [J]. *Gene*, 2019, 687: 90-98.
- [3] Hernandez T, Mayadas TN. The changing landscape of renal inflammation [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22: 151-163.
- [4] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典)[S]. 2020 ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 239.
- [5] Chen DQ, Feng YL, Tian T, et al. Diuretic and anti-diuretic activities of fractions of *Alismatis rhizoma* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 157: 114-118.
- [6] Zhang CL, Liu CS. Clinical observation on the treatment of chronic glomerulonephritis with dampness and blood stasis by Danggui Shaoyao powder [J]. *Guangming J Chin Med (光明中医)*, 2019, 34: 80-82.
- [7] Yang J, Shen SH, Liu JJ, et al. Clinical efficacy of Wuling powder in the treatment of chronic glomerulonephritis patients with lung-kidney Qi deficiency evidence and the effect on inflammatory factors [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2021, 32: 1386-1390.
- [8] Sun YW, Zhu L, Li YJ, et al. Pharmacological effects and application of Liuwei Dihuang Pill in the treatment of liver and kidney yin deficiency [J]. *Chin J Mod Drug Appl (中国现代药物应用)*, 2019, 13: 111-112.
- [9] Li S, Jin SN, Song CW, et al. The metabolic change of serum lysophosphatidylcholines involved in the lipid lowering effect of triterpenes from *Alismatis rhizoma* on high-fat diet induced hyperlipidemia mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 177: 10-18.
- [10] Tao XL, Fan F, Hoffmann V, et al. Therapeutic impact of the ethyl acetate extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F on nephritis in NZB/W F1 mice [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8: R24.
- [11] Zhang YW, Li Q, Lv CX, et al. Simultaneous determination of four active components in *Alisma orientale* (Sam.) Juz. by HPLC-DAD using a single reference standard [J]. *J Pharm Anal*, 2015, 5: 85-92.
- [12] Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives [J]. *Lancet*, 2013, 382: 260-272.
- [13] Pitt B, Anker SD, Böhm M, et al. Rationale and design of MinerAlocorticoid Receptor antagonist Tolerability Study-Heart Failure (ARTS-HF): a randomized study of finerenone vs eplerenone in patients who have worsening chronic heart failure with diabetes and/or chronic kidney disease [J]. *Eur J Heart Fail*, 2015, 17: 224-232.
- [14] 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.
- [15] Zhang LX, Long JY, Jiang WS, et al. Trends in chronic kidney disease in China [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375: 905-906.
- [16] Sai XY, Sun YF. Prevalence of chronic kidney disease in China [J]. *Lancet*, 2012, 380: 214.
- [17] Liu Y, Li W. Study on the Chinese medicine pathogenesis and microscopic identification of chronic glomerulonephritis [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学*

- 技术-中医药现代化), 2019, 21: 1062-1067.
- [18] Su HW. Clinical efficacy of Danggui Shaoyao powder in treating patients with chronic glomerulonephritis with dampness and stasis evidence [J]. Clin J Chin Med (中医临床研究), 2020, 12: 133-135.
- [19] Song JY, Lv YH, Wang CJ, et al. Clinical efficacy of Yishentongluo decoction in the treatment of chronic glomerulonephritis with evidence of Qi deficiency and blood stasis in the spleen and kidney [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 93-98.
- [20] Huang CL, Feng GW, Xu YH, et al. Advances in studies on chemical compositions of *Alismatis Rhizoma* and their biological activities [J]. Guangdong Chem Ind (广东化工), 2021, 48: 106-108.
- [21] Cao GZ, Liu JH, Zhou SW, et al. Effect of *Alisma orientalis* extract on renal stone formation and the expression of inter-alpha-trypsin inhibitor in rat urolithiasis model [J]. Chin J Exp Surg (中华实验外科杂志), 2004, 3: 40-42.
- [22] Chen H. Effective Constituents and Mechanism of *Alismatis Rhizoma* against Renal Fibrosis (泽泻抗肾纤维化的物质基础及其作用机制研究) [D]. Shaanxi: Northwest University, 2019.
- [23] Song N, Thaiss F, Guo LL, et al. NF- κ B and kidney injury [J]. Front Immunol, 2019, 10: 815.
- [24] Fattori V, Borghi SM, Guazelli CFS, et al. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF- κ B activation in mice [J]. Pharmacol Res, 2017, 120: 10-22.
- [25] Prince PD, Fischerman L, Toblli JE, et al. LPS-induced renal inflammation is prevented by (-)-epicatechin in rats [J]. Redox Biol, 2017, 11: 342-349.
- [26] Choi J, Ahn SS, Lim Y, et al. Inhibitory effect of *Alisma canaliculatum* ethanolic extract on NF- κ B-dependent CXCR3 and CXCL10 expression in TNF α -exposed MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 2607.
- [27] Bi XX, Wang P, Ma QJ, et al. Anti-inflammatory activities and liver protection of alisol F and 25-anhydroalisol F through the inhibition of MAPK, STAT3, and NF- κ B activation *in vitro* and *in vivo* [J]. Molecules, 2017, 22: 951.
- [28] Fang Y, Ye J, Zhao B, et al. Formononetin ameliorates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy *via* the KEAP1-NRF2-GSTP1 axis [J]. Redox Biol, 2020, 36: 101677.
- [29] Okamura DM, Pennathur S. The balance of powers: redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury [J]. Redox Biol, 2015, 6: 495-504.
- [30] Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update [J]. Med Res Rev, 2016, 36: 924-963.
- [31] Aminzadeh MA, Reisman SA, Vaziri ND, et al. The synthetic triterpenoid RTA dh404 (CDDO-dhTFEA) restores endothelial function impaired by reduced Nrf2 activity in chronic kidney disease [J]. Redox Biol, 2013, 1: 527-531.
- [32] Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, et al. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease [J]. Kidney Int, 2013, 83: 1029-1041.
- [33] Wu CQ, Jing MH, Yang LJ, et al. Alisol A 24-acetate ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting oxidative stress and stimulating autophagy through the AMPK/mTOR pathway [J]. Chem Biol Interact, 2018, 291: 111-119.
- [34] Wang K, Zhang BB, Song DZ, et al. Alisol A alleviates arterial plaque by activating AMPK/SIRT1 signaling pathway in ApoE-deficient mice [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 580073.
- [35] Jia XK, Zhu HC, Li GP, et al. Anti-osteoporotic effects of alisol C 23-acetate *via* osteoclastogenesis inhibition [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 137: 111321.
- [36] Sun YT, Long J, Chen WK, et al. Alisol B 23-acetate, a new promoter for cholesterol efflux from dendritic cells, alleviates dyslipidemia and inflammation in advanced atherosclerotic mice [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 99: 107956.
- [37] Chen L, Chen DQ, Wang M, et al. Role of RAS/Wnt/ β -catenin axis activation in the pathogenesis of podocyte injury and tubulointerstitial nephropathy [J]. Chem Biol Interact, 2017, 273: 56-72.
- [38] Tian SS, Zhao XM, Liu SS, et al. Regional differences analysis of *Alismatis Rhizoma* based on UPLC characteristic chromatogram and determination of eight terpenoids [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 1545-1557.