DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.01.026

基于“肠-肾轴”的泽泻致肾损伤及在六味地黄丸配伍中的肾脏保护机制研究

王萌萌[1],方健[2,3],栾相佳[4],崔鑫[1],孟庆刚[2],王连心[1]
(1.中国中医科学院中医临床基础医学研究所,北京 100700;2.北京中医药大学,北京 100029;
3.唐山师范学院,河北 唐山 063000;4.中国中医科学院广安门医院,北京 100053)

摘要:目的 泽泻的某些成分具有肾毒性,可能通过肠道菌群导致肾脏损伤。六味地黄丸的配伍中,其他药材的药理作用可能减轻或抵消泽泻的肾毒性,从而发挥整体的肾脏保护作用。因此需要从“肠-肾轴”角度下探究泽泻致药物性肾损伤的机制及六味地黄丸复方对肾脏疾病保护性机制。方法 研究通过网络毒理学的方法,筛选泽泻致肾损伤的潜在靶点,以及通过网络药理学的方法筛选六味地黄丸保护肾损伤的潜在靶点。此外采用孟德尔随机化方法进行菌群与肾脏损伤疾病之间因果推断分析,于NCBI以及3DSNP网站查询显著单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)邻近的相关基因,最终与药物的潜在靶点构建蛋白互作网络(protein-protein interaction,PPI)探究泽泻在六味地黄丸配伍中减轻肾损伤的机制。结果 泽泻在中药系统毒理学数据库(traditional Chinese medicine system toxicology database,TCMSTD)平台筛选后获得15种毒性成分,泽泻毒性成分靶点与肠道菌群失调综合征和肾损伤的交集靶点为HSPA5,此外,在中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)共获得66种六味地黄丸的活性成分,而六味地黄丸成分靶点与肠道菌群失调综合征和肾损伤共得到共同靶点27个。通过孟德尔随机化探讨了肠道菌群致肾损伤的因果关系,揭示了Marvinbryantia(马文布赖恩特菌属)、Lachnospiraceae(紫胶螺科菌)、Porphyromonadaceae(卟啉单胞菌科)、Coprococcus1(粪球菌属1)可导致肾脏损伤(OR>1)。PPI网络中菌群显著的SNP所邻近的基因HSPA5与泽泻致肾损伤的靶点具有蛋白互作作用,表明泽泻可能通过调控这类肠道菌群导致肾损伤。通过孟德尔随机化探讨了肠道菌群与肾损伤的因果关系,在对肾脏损伤具有保护性的肠道菌群中,有15种菌群对肾脏损伤具有保护性作用(OR<1)。PPI网络中菌群显著的SNP所邻近的基因TNF degree值最高,与六味地黄丸对肾损伤起到保护性作用的靶点具有蛋白互作作用。结论 从“肠-肾轴”的角度,泽泻具有通过调控HSPA5导致药物性肾损伤的机制,但六味地黄丸通过复方配伍调控TNF反而对肾脏具有保护作用,阐明了经典名方六味地黄丸的疗效及安全性机制。

关键词:肠道菌群;孟德尔随机化;泽泻;六味地黄丸
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)01-0121-11

Exploring Renal Damage Caused by Zexie(Alismatis Rhizoma) and Its Renal Protective Mechanism in Combination of Liuwei Dihuang Pills(六味地黄丸) from Perspective of “Gut-Kidney Axis”

WANG Mengmeng[1],FANG Jian[2,3],LUAN Xiangjia[4],CUI Xin[1],MENG Qinggang[2],WANG Lianxin[1]
(1. Institute of Basic Research in Clinical Medicine,China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100700,China;
2. Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 100029,China;
3. Tangshan Normal University,Tangshan 063000,Hebei,China;
4. Guang'anmen Hospital,China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100053,China)

Abstract:*Objective* Some components of Zexie(Alismatis Rhizoma) are nephrotoxic and may cause kidney injury through intestinal flora. In the combination of Liuwei Dihuang Pills(六味地黄丸),the pharmacological effects of the other medicinal materials may reduce or offset the nephrotoxicity of Zexie(Alismatis Rhizoma),thereby exerting an overall kidney protective effect.

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFC3502004);国家自然科学基金面上项目(82174530,81973982);国家药品监督管理局项目(RS2024Z008)
作者简介:王萌萌(1996-),女,山东潍坊人,博士在读,研究方向:中成药疗效精准机制及药物警戒。
通讯作者:王连心(1979-),女,黑龙江呼兰人,研究员,博士研究生导师,博士,研究方向:中成药疗效精准机制及药物警戒。E-mail:wlxing@126.com。
孟庆刚(1964-),男,辽宁海城人,教授、主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:基于系统复杂性的中医药信息处理。E-mail:mqgangzy@126.com。

Therefore, it is necessary to explore the mechanism of drug – induced kidney injury caused by Zexie(Alismatis Rhizoma) and the protective mechanism of Liuwei Dihuang Pills on kidney disease from the perspective of the "gut – kidney axis". *Methods* In this study, the potential target of kidney injury induced by Zexie(Alismatis Rhizoma) was screened by network toxicology, and the potential target of Liuwei Dihuang Pills for protecting kidney injury was screened by network pharmacology. In addition, Mendelian randomization method was used to conduct the causal inference analysis between microbiota and kidney injury diseases. Relevant genes adjacent to significant single nucleotide polymorphisms(SNPs) were searched on NCBI and 3DSNP websites. Finally, protein – protein interaction(PPI) network was constructed with potential drug targets to explore the mechanism of reducing kidney injury caused by Zexie(Alismatis Rhizoma) combined with Liuwei Dihuang Pills. *Result* After screening on the traditional Chinese medicine system toxicology database(TCMSTD) platform, 15 toxic components were obtained, and the overlap target of toxic components of Zexie(Alismatis Rhizoma) with intestinal flora dysregulation syndrome and kidney injury was HSPA5. In addition, 66 active components of Liuwei Dihuang Pills were obtained from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform(TCMSP), and 27 common targets were obtained with intestinal flora dysregulation syndrome and kidney injury. Through Mendelian randomization, the causal relationship of intestinal flora induced kidney injury was investigated. Marvinbryantia, Lachnospiraceae, Porphyromonadaceae and Coprococcus1(OR > 1) were found to cause kidney injury. The gene HSPA5 located in the significant SNP of the flora in the PPI network had protein interaction with the target of kidney injury caused by Zexie(Alismatis Rhizoma), indicating that Zexie(Alismatis Rhizoma) may cause kidney injury by regulating such intestinal flora. The causal relationship between intestinal flora and kidney injury was investigated by Mendelian randomization. Among the intestinal flora that had protective effects on kidney injury, there were 15 types of flora that had protective effects on kidney injury(OR < 1). In the PPI network, the gene with significant bacterial SNPS had the highest TNF degree, which had protein interaction with the target of Liuwei Dihuang Pill protective effect on kidney injury. *Conclusion* From the perspective of the "gut – kidney axis", Zexie(Alismatis Rhizoma) has the mechanism of drug – induced kidney injury through regulation of HSPA5, but Liuwei Dihuang Pills have a protective effect on kidney through regulation of TNF through combination, which illustrates the efficacy and safety mechanism of Liuwei Dihuang Pills.

Keywords: intestinal flora; Mendelian randomization; Zexie(Alismatis Rhizoma); Liuwei Dihuang Pills(六味地黄丸)

肾毒素暴露占住院患者急性肾损伤发作的四分之一,其相关后果与其他病因引起的急性肾损伤同样严重[1]。急性肾损伤(acute kidney injury,AKI)是住院患者住院费用上升的主要原因之一[2-3]。而AKI除了较高的病死率外,还与慢性肾脏疾病的发展有关[4]。据报道,全球约26%的医院获得性AKI患者和18%的社区获得性AKI患者是由药物相关肾毒性引起的。而中草药主要由天然化合物组成,具有复杂的化学成分,在使用过程中其不良反应容易被忽略[5]。因此,由中药服药不当引起的肾损伤需要重点关注。而快速识别药物性肾损伤高危患者,并尽量减少中药中肾毒性药物的暴露和不适当剂量等最终消除药物的肾脏毒性是临床医生亟待解决的问题。根据"内伤脾胃,百病由生""胃为肾关门,肾衰胃不能司开合,胃无约束,任其越出",中医学理论认为"脾肾亏虚、浊毒内蕴"是肾脏损伤疾病进展的基本病机[6]。同样,Meijers在国际透析大会上提出"肠-肾轴"的概念[7],西医学认为胃肠道中蛋白质以及含氮物质经细菌发酵后累积,导致有毒终产物的累积,并且由于肠道微生物的数量和性质的改变,大量内毒素或者活菌进入血液循环,在肾脏疾病发展过程中产生炎症的不良影响[8]。

六味地黄丸中的泽泻具有利水渗湿的功效,性寒,可泄肾火。临床上有研究[7]表明泽泻导致药物性肾损伤,主要临床表现为血尿、水-电解质失衡,以及肾小管酸中毒;病理表现为细胞浸润、肾间质炎症和肾小管损伤[9-10]。有文献表明,晚期肾病以及实验性尿毒症大鼠容易出现肠道菌群失衡,这些微生物一旦进入淋巴循环,可能会激发微炎症反应加重肾损伤疾病,因此,泽泻导致的肾损伤可能与菌群紊乱有关[11-12]。六味地黄丸具有滋阴补肾的功效,用于治疗肾阴亏损、头晕耳鸣、腰膝酸软等症,现代药理学研究表明六味地黄丸对肾损伤具有保护作用[13],临床上也广泛应用于对肾损伤的治疗[14-15]。泽泻具有一定的肾毒性,可导致肾脏损伤,然而在六味地黄丸的配伍中,多用于肾损伤疾病的治疗,因此在"肠肾轴"的角度下对泽泻致药物性肾损伤的机制及六味地黄丸复方对肾脏疾病的保护性机制分别分析,旨在阐释经典名方六味地黄丸的疗效及安全性,并说明中药的安全性应放在系统的情境下进行阐释。

1 方法

研究设计:本研究通过网络毒理学的方法,筛选泽泻致肾损伤的潜在靶点,以及通过网络药理学的方法筛选六味地黄丸保护肾损伤的潜在靶点。此外采用孟德尔随机化方法进行菌群与肾脏损伤之间因果推断分析,选择显著的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)邻近相关基因靶点,并最终与药物的潜在靶点进行蛋白互作网络(protein-protein interaction,PPI)探究泽泻在六味地黄丸配伍中减轻肾损伤的机制。见图1。

1.1 泽泻中毒性成分和六味地黄丸成分及其相关靶点的筛选

通过中药系统毒理学数据库(traditional Chinese medicine system toxicology database,TCMSTD)平台检索泽泻的毒性化学成分在PubChem(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)数据库进行结构确认,并通过Swiss targetprediction数据库(probability >0.2)进行靶点预测。此外,通过中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)检索六味地黄丸中6味中药(熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、牡丹皮、茯苓)的化学成分,以口服利用度(oralbioavailability,OB)≥30%,同时满足类药性

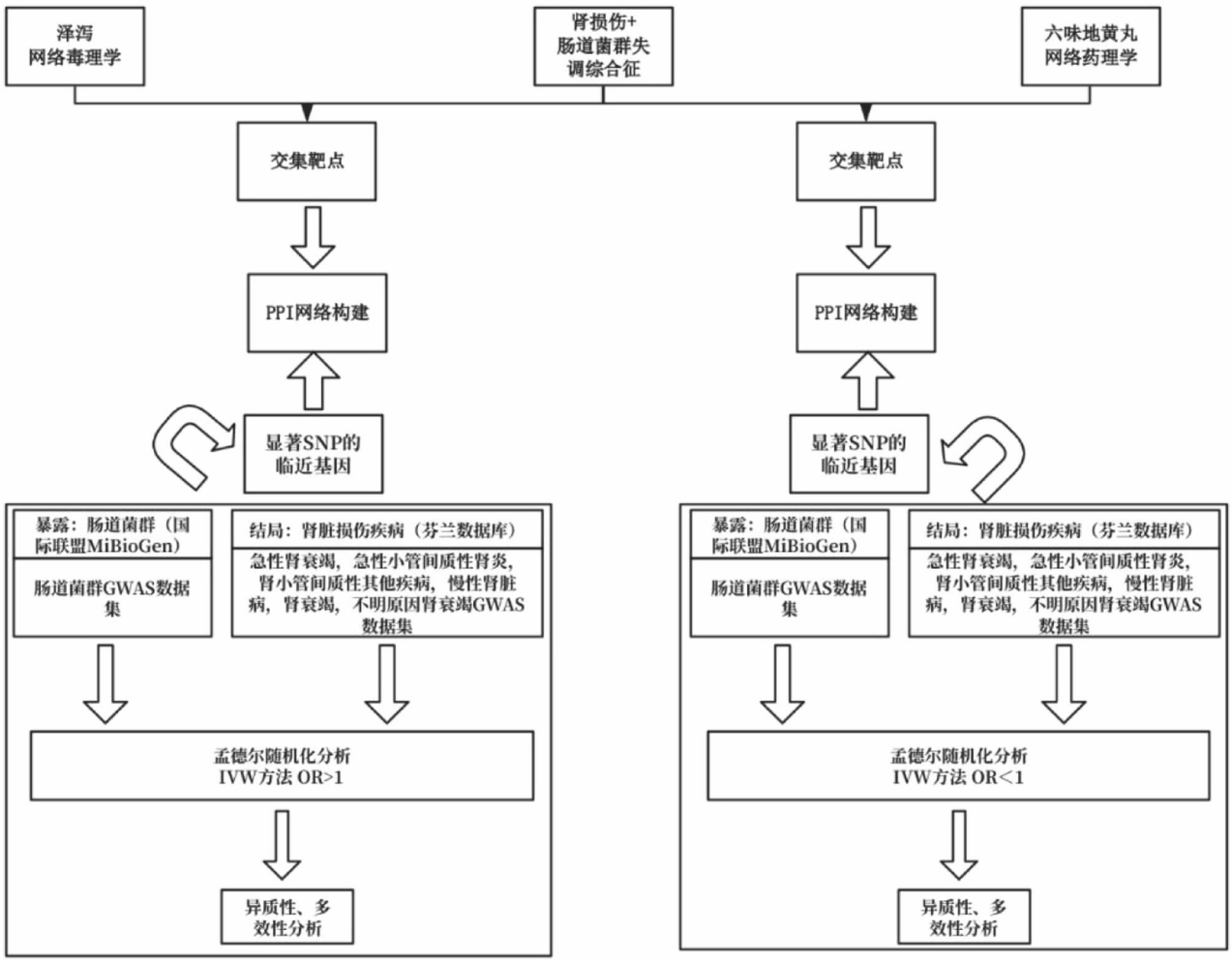


图1 研究设计方法流程

(drug - likeness, DL) ≥0.18 的2个 ADME 属性值为筛选条件，获取六味地黄丸中的活性化合物及相关靶点信息。

1.2 肾损伤及肠道菌群失调综合征相关靶点筛选

在 GeneCards 数据库、TTD 数据库检索“kidney injury”潜在靶点信息，获取相关靶点基因，将以上获得的结果合并后去重，得到肾损伤相关基因。在 GeneCards 数据库检索“gut dysbiosis syndrome”潜在靶点信息，获取相关靶点基因，将以上获得的结果合并后去重，得到肠道菌群失调综合征相关基因。

1.3 交集靶点基因的收集以及成分-靶点网络图的构建

通过 Venny 2.1.0 将“泽泻毒性靶点”“六味地黄丸药物靶点”分别和“肾损伤靶点”“肠道菌群失调综合征靶点”绘制韦恩图，取其交集靶点。并在 Cytoscape 软件中绘制“六味地黄丸-有效活性成分-靶点网络图”。

1.4 基于肠道菌群孟德尔随机化分析的数据来源

肠道菌群数据来源于国际联盟 MiBioGen 的 GWAS 数据集(https://mibiogen.gcc.rug.nl/)，该数据集是迄今为止最大的，多种族的，全基因组荟萃分析的数据集。肾损伤(包括急性肾衰竭、急性小管间质性肾炎、肾小管间质性其他疾病、慢性肾脏病、肾衰竭、不明原因肾衰竭)GWAS 数据集来源于芬兰数据库(https://www.finngen.fi/en)，数据均来自欧洲人群欧洲血统。本研究所使用的数据均来自公共数据库，并且获得了各自研究机构的伦理审查批准。

1.5 基于肠道菌群孟德尔随机化分析的工具变量筛选

选择工具变量进行分析，筛选 $P<1.0\times10^{-5}$ 并且 LD 的运行参数为 $r^2<0.01$，kb = 500，采用 IVW、MR Egger、Weighted median、Simple mode、Weighted mode 方法，其中 IVW 作为主要方法分析。

1.6 孟德尔随机化分析及敏感性分析

为评估肠道菌群与肾损伤之间因果关系的稳健性，进行敏感性分析。使用 Cochran' Q 分析计算工具变量间的差异，当 $P<0.05$ 时表示存在异质性。采用 MR-Egger 回归检测水平多效性。将等位基因与人类基因组参考序列(build 37)对齐，并去除模糊和重复的 SNP。在孟德尔随机化分析中，选择 OR 值>1 者作为致病因素，选择 OR 值<1 者作为保护因素。另外，采用反向孟德尔随机化分析评估肾损伤与肠道菌群的因果关系。采用 RStudio(4.3.1 版本)进行统计分析，Two Sample MR(版本 0.5.6)等软件包进行分析。

1.7 构建 PPI 网络

基于网络毒理学，筛选泽泻与肠道菌群综合征以及肾损伤的靶点。通过孟德尔分析获得肠道菌群与肾损伤疾病阳性显著的 SNP，输入 NCBI 网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

以及3DSNP(https://omic.tech/3dsnpv2/)查询邻近的相关的基因靶点。将两者构建PPI网络图。

2 结果

2.1 泽泻中毒性成分和六味地黄丸成分及其相关靶点

泽泻在TCMSTD平台筛选后获得15种毒性成分,将其毒性成分输入Swiss targetprediction数据库检索得到预测靶标16个。此外,在TCMSP平台经ADME筛选后获得六味地黄丸中活性成分及相关靶点,熟地黄2种、山药17种、山茱萸20种、泽泻9种、牡丹皮9种、茯苓15种活性成分,合并后删除重复值共获得66种六味地黄丸的活性成分。将其活性成分输入TCMSP平台检索得到经uniprot规范后的靶标1027个。

2.2 疾病靶点数据收集与筛选

肾损伤相关靶点的获取通过GeneCards数据库检索获得肾损伤潜在靶点10 308个,在TTD数据库检索获得潜在靶点6个,合并后去重最终获得4264个靶点。肠道菌群失调综合征相关靶点的获取通过GeneCards数据库检索获得肠道菌群失调综合征潜在靶点254个,去重最终获得254个靶点。

2.3 构建六味地黄丸方交集靶点以及中药-成分-靶点网络图

绘制泽泻毒性成分靶点以及六味地黄丸成分靶点与2种疾病靶点的韦恩图,泽泻毒性成分靶点与肠道菌群失调综合征和肾损伤的交集靶点只有HSPA5,而六味地黄丸成分靶点与肠道菌群失调综合征和肾损伤共得到共同靶点27个(插页X图2)。六味地黄丸成分与靶点的网络构建分析中药-成分-靶点网络图如插页X图3。网络包含91个节点(6个中药、58个活性成分及27个疾病潜在靶点)和301条边。

2.4 孟德尔随机化分析

2.4.1 数据来源及孟德尔随机化分析 从大规模GWAS中鉴定出14 550个(位点全基因组显著性水平,$P<1\times10^{-5}$)作为工具变量。它包含211个细菌性状,包括门、纲、目、科、属5个生物学分类。系统收集效应等位基因的效应等位基因、其他等位基因、beta、SE、P值等主要信息,进行进一步分析。

在导致6种肾损伤(急性肾衰竭、急性小管间质性肾炎、肾小管间质疾病、肾衰竭、慢性肾脏病、不明原因的肾衰竭)疾病的肠道菌群孟德尔随机化分析中(OR值>1),IVW方法作为主要方法进行分析,其P值显著性用环状热图呈现(插页XI图4),其OR值($P<0.05$)呈现的结果见表1。

在与6种肾损伤(急性肾衰竭、急性小管间质性肾炎、肾小管间质疾病、肾衰竭、慢性肾脏病、不明原因的肾衰竭)的疾病起保护性作用的菌群孟德尔随机化分析中(OR<1),IVW方法作为主要方法进行分析,其P值显著性用环状热图呈现(插页XI图5),其OR值($P<0.05$)呈现的结果如表2。

2.4.2 森林图构建 选择其中加权中值法与IVW方法均有显著性意义的菌群与肾脏疾病的绘制森林图(OR>1)(插页XII图6)。在genus. Marvinbryantia. id. 2005(马文布赖恩特菌属)与genus. LachnospiraceaeUCG010. id. 11330(紫胶螺科菌属)中,肠道菌群与急性小管间质性肾炎的OR>1,且IVW方法与加权中值法的$P<0.05$,因此,说明这两种菌群是造成急性小管间质性肾炎的危险因素。此外,genus. Marvinbryantia. id. 2005(马文布赖恩特菌属)同样对肾小管间质疾病有因果关系(均OR>1,$P<0.05$)。family. Porphyromonadaceae. id. 943(卟啉单胞菌科)与genus. Coprococcus1. id. 11301(粪球菌属1)这两种菌群分别对慢性肾脏病以及不明原因的肾衰竭有危害作用。

表1 菌群导致肾脏疾病孟德尔随机化分析中IVW方法的OR值($P<0.05$)

菌群	疾病	方法	SNP数量	P值	OR_CI
genus. RuminococcaceaeUCG013. id. 11370	AKF	IVW	11	0.019	1.262(1.039-1.532)
genus. Erysipelatoclostridium. id. 11381	AKF	IVW	15	0.039	1.160(1.008-1.336)
order. Rhodospirillales. id. 2667	ATI	IVW	14	0.050	1.077(1-1.160)
genus. Marvinbryantia. id. 2005	ATI	IVW	10	0.037	1.136(1.008-1.280)
genus. LachnospiraceaeUCG010. id. 11330	ATI	IVW	10	0.007	1.148(1.038-1.269)
genus. Anaerofilum. id. 2053	ATI	IVW	10	0.019	1.075(1.012-1.143)
class. Alphaproteobacteria. id. 2379	ATI	IVW	7	0.011	1.131(1.028-1.244)
genus. Marvinbryantia. id. 2005	RTI	IVW	10	0.019	1.098(1.016-1.187)
genus. Allisonella. id. 2174	RTI	IVW	8	0.048	1.045(1-1.092)
genus. unknowngenus. id. 1000005479	CKD	IVW	8	0.035	1.151(1.010-1.313)
genus. Oxalobacter. id. 2978	CKD	IVW	11	0.041	1.102(1.004-1.209)
genus. Dorea. id. 1997	CKD	IVW	11	0.026	1.197(1.022-1.401)
genus. Desulfovibrio. id. 3173	CKD	IVW	11	0.020	1.163(1.024-1.321)
genus. Butyrivibrio. id. 1993	CKD	IVW	15	0.022	1.102(1.014-1.197)
family. Porphyromonadaceae. id. 943	CKD	IVW	10	0.003	1.335(1.107-1.610)
family. BacteroidalesS24. 7group. id. 11173	CKD	IVW	8	0.035	1.151(1.010-1.313)
genus. Oxalobacter. id. 2978	KF	IVW	11	0.031	1.103(1.009-1.205)
genus. Catenibacterium. id. 2153	KF	IVW	4	0.042	1.113(1.004-1.233)
family. Porphyromonadaceae. id. 943	KF	IVW	10	0.021	1.197(1.028-1.394)
genus. Eisenbergiella. id. 11304	UKF	IVW	11	0.026	1.228(1.025-1.471)
genus. Coprococcus1. id. 11301	UKF	IVW	12	0.001	1.585(1.209-2.077)
genus. Anaerostipes. id. 1991	UKF	IVW	13	0.023	1.407(1.049-1.888)

注:AKF.急性肾衰竭;ATI.急性小管间质性肾炎;RTI.肾小管间质疾病;CKD.慢性肾脏病;KF.肾衰竭;UKF.不明原因肾衰竭。

选择其中加权中值法与IVW方法均有显著性意义的菌群与肾脏疾病绘制森林图(OR<1)(插页XIII图7)。在急性肾衰竭中,order. Pasteurellales. id. 3688(巴氏杆菌目)、genus. RuminococcaceaeUCG005. id. 11363(瘤胃梭菌属)、genus. Haemophilus. id. 3698(嗜血杆菌属)、genus. Flavonifractor. id. 2059(黄曲霉属)、genus. Dialister. id. 2183(戴阿利斯特杆菌属)、family. Pasteurellaceae. id. 3689(巴斯德氏菌科)这6个菌群其OR<1,因此是对急性肾衰竭具有保护性因素的肠道菌群。genus. RuminococcaceaeUCG010. id. 11367(瘤胃梭菌属)、family. Prevotellaceae. id. 960(普雷沃氏菌)的OR<1则与肾小管间质疾病则具有因果作用;genus. ErysipelotrichaceaeUCG003. id. 11384(丹毒菌属)和genus. RuminococcaceaeUCG010. id. 11367(瘤胃梭菌属)分别与慢性肾脏病以及肾衰竭保护性的因果关联,最后,order. MollicutesRF9. id. 11579(柔膜菌目)、genus. unknowngenus. id. 1000005472、genus. Faecalibacterium. id. 2057(粪杆菌属)、family. unknownfamily. id. 1000005471、family. Defluviitaleaceae. id. 1924(苜蓿菌科)则是肠道菌群对于不明原因的肾衰竭具有保护性作用。

2.4.3 孟德尔随机化敏感性分析 森林图中加权中值法和IVW方法均显著的肠道菌群与6种肾损伤疾病孟德尔随机化分析异质性与多效性结果如表3(OR>1)以及表4(OR<1),其异质性与多效性均>0.05,说明孟德尔随机化无显著的异质性。

表2 肠道菌群对肾脏疾病具有保护性作用中IVW方法的OR值($P<0.05$)

菌群	肾脏疾病	方法	SNP数目	P值	OR_CI
phylum. Firmicutes. id. 1672	AKF	IVW	15	0.009	0.797(0.673-0.944)
order. Pasteurellales. id. 3688	AKF	IVW	14	0.021	0.867(0.768-0.978)
genus. RuminococcaceaeUCG010. id. 11367	AKF	IVW	6	0.015	0.754(0.601-0.947)
genus. RuminococcaceaeUCG005. id. 11363	AKF	IVW	14	0.017	0.824(0.702-0.967)
genus. Haemophilus. id. 3698	AKF	IVW	9	0.016	0.836(0.722-0.967)
genus. Flavonifractor. id. 2059	AKF	IVW	5	0.006	0.697(0.538-0.902)
genus. ErysipelotrichaceaeUCG003. id. 11384	AKF	IVW	17	0.038	0.856(0.739-0.992)
genus. Dialister. id. 2183	AKF	IVW	12	0.008	0.777(0.646-0.935)
genus. Coprococcus2. id. 11302	AKF	IVW	9	0.050	0.828(0.685-1)
family. Pasteurellaceae. id. 3689	AKF	IVW	14	0.021	0.867(0.768-0.978)
genus. Gordonibacter. id. 821	ATI	IVW	11	0.024	0.944(0.898-0.993)
genus. Actinomyces. id. 423	ATI	IVW	7	0.021	0.907(0.834-0.985)
genus. RuminococcaceaeUCG010. id. 11367	RTI	IVW	6	0.016	0.892(0.813-0.979)
genus. Olsenella. id. 822	RTI	IVW	11	0.041	0.959(0.922-0.998)
genus. LachnospiraceaeNK4A136group. id. 11319	RTI	IVW	15	0.032	0.934(0.878-0.994)
genus. Haemophilus. id. 3698	RTI	IVW	9	0.045	0.940(0.886-0.999)
genus. Clostridiumsensustricto1. id. 1873	RTI	IVW	7	0.026	0.910(0.837-0.989)
genus. Clostridiuminnocuumgroup. id. 14397	RTI	IVW	8	0.035	0.949(0.904-0.996)
family. Prevotellaceae. id. 960	RTI	IVW	16	0.030	0.923(0.859-0.992)
genus. Lachnospira. id. 2004	CKD	IVW	6	0.010	0.732(0.577-0.929)
genus. ErysipelotrichaceaeUCG003. id. 11384	CKD	IVW	17	0.010	0.857(0.761-0.964)
family. Defluviitaleaceae. id. 1924	CKD	IVW	11	0.043	0.882(0.782-0.996)
genus. RuminococcaceaeUCG010. id. 11367	KF	IVW	6	0.024	0.843(0.727-0.977)
genus. Romboutsia. id. 11347	KF	IVW	14	0.036	0.891(0.799-0.992)
genus. LachnospiraceaeNC2004group. id. 11316	KF	IVW	9	0.046	0.910(0.830-0.998)
genus. Lachnospira. id. 2004	KF	IVW	6	0.036	0.813(0.669-0.986)
genus. ErysipelotrichaceaeUCG003. id. 11384	KF	IVW	17	0.029	0.898(0.816-0.989)
order. MollicutesRF9. id. 11579	UKF	IVW	14	0.041	0.805(0.654-0.991)
genus. unknowngenus. id. 1000005472	UKF	IVW	14	0.041	0.805(0.654-0.991)
genus. Faecalibacterium. id. 2057	UKF	IVW	10	0.032	0.755(0.584-0.977)
genus. Eubacteriumxylanophilumgroup. id. 14375	UKF	IVW	9	0.030	0.736(0.557-0.971)
family. unknownfamily. id. 1000005471	UKF	IVW	14	0.041	0.805(0.654-0.991)
family. Defluviitaleaceae. id. 1924	UKF	IVW	11	0.029	0.779(0.622-0.975)
family. Clostridiaceae1. id. 1869	UKF	IVW	10	0.028	0.723(0.541-0.966)

注:AKF.急性肾衰竭;ATI.急性小管间质性肾炎;RTI.肾小管间质疾病;CKD.慢性肾脏病;KF.肾衰竭;UKF.不明原因肾衰竭。

表3 肠道菌群导致肾脏疾病的孟德尔随机化分析的多效性以及异质性检验结果

菌群	疾病	多效性Pvalue	方法	Q_pval
genus. Marvinbryantia. id. 2005	ATI	0.695	MR Egger	0.093
			IVW	0.127
genus. LachnospiraceaeUCG010. id. 11330	ATI	0.767	MR Egger	0.578
			IVW	0.667
genus. Marvinbryantia. id. 2005	RTI	0.633	MR Egger	0.551
			IVW	0.626
family. Porphyromonadaceae. id. 943	CKD	0.364	MR Egger	0.485
			IVW	0.493
genus. Coprococcus1. id. 11301	UKF	0.963	MR Egger	0.852
			IVW	0.901

注:ATI.急性小管间质性肾炎;RTI.肾小管间质疾病;CKD.慢性肾脏病;UKF.不明原因肾衰竭。

表4 肠道菌群对肾脏疾病保护性作用的孟德尔随机化分析多效性以及异质性检验结果

菌群	肾脏疾病	多效性Pval	方法	Q_pval
order. Pasteurellales. id. 3688	AKF	0.942	MR Egger	0.429
			IVW	0.510
genus. RuminococcaceaeUCG005. id. 11363	AKF	0.984	MR Egger	0.680
			IVW	0.753
genus. Haemophilus. id. 3698	AKF	0.589	MR Egger	0.872
			IVW	0.902
genus. Flavonifractor. id. 2059	AKF	0.358	MR Egger	0.344
			IVW	0.328
genus. Dialister. id. 2183	AKF	0.836	MR Egger	0.225
			IVW	0.291
family. Pasteurellaceae. id. 3689	AKF	0.942	MR Egger	0.429
			IVW	0.510
genus. RuminococcaceaeUCG010. id. 11367	RTI	0.673	MR Egger	0.323
			IVW	0.427
family. Prevotellaceae. id. 960	RTI	0.574	MR Egger	0.214
			IVW	0.249
genus. ErysipelotrichaceaeUCG003. id. 11384	CKD	0.701	MR Egger	0.640
			IVW	0.697
genus. RuminococcaceaeUCG010. id. 11367	KF	0.414	MR Egger	0.784
			IVW	0.767
order. MollicutesRF9. id. 11579	UKF	0.756	MR Egger	0.503
			IVW	0.577
genus. unknowngenus. id. 1000005472	UKF	0.756	MR Egger	0.503
			IVW	0.577
genus. Faecalibacterium. id. 2057	UKF	0.835	MR Egger	0.355
			IVW	0.446
family. unknownfamily. id. 1000005471	UKF	0.756	MR Egger	0.503
			IVW	0.577
family. Defluviitaleaceae. id. 1924	UKF	0.89	MR Egger	0.375
			IVW	0.465

注:AKF.急性肾衰竭;RTI.肾小管间质疾病;CKD.慢性肾脏病;KF.肾衰竭;UKF.不明原因肾衰竭。

2.5 PPI网络构建

插页Ⅻ图8PPI网络图显示,药物靶点与肠道菌群的靶点相互作用,PPI网络中菌群显著的SNP所邻近的基因HSPA5与泽泻致肾损伤的靶点具有蛋白互作作用,而在六味地黄丸的肠道菌群肾损伤保护性的PPI网络中,TNF degree值为28,表明六味地黄丸通过调控TNF水平,进而调节肠道菌群,以此达到保护肾功能的效果。

3 讨论

目前评估肠道菌群与失调与肾脏疾病的关系较多集中在慢性肾脏病领域,对其他的肾脏疾病研究较少[16],本研究探讨211种肠道菌群与6种肾脏疾病的关系。基于网络毒理学与肠道菌群孟德尔随机化分析,通过筛选泽泻化合物及肾损伤靶点,定位了其中的核心靶点。并通过孟德尔随机化探讨了肠道菌群与肾损伤的因果关系,揭示了Marvinbryantia(马文布赖恩特菌属)、Lachnospiraceae(紫胶螺科菌)、Porphyromonadaceae(卟啉单胞菌科)、Coprococcus1(粪球菌属1)可导致肾脏损伤。PPI网络中菌群显著的SNP所邻近的基因HSPA5与泽泻致肾损伤的靶点具有蛋白互作作用,表明泽泻可能通过肠道菌群导致肾损伤。基于网络药理学与肠道菌群孟德尔随机化分析,六

味地黄丸对肾损伤具有保护性作用。定位了其中的核心靶点以及相关通路。通过孟德尔随机化探讨了肠道菌群与肾损伤的因果关系,在对肾脏损伤具有保护性的肠道菌群中,有15种菌群对肾脏损伤具有保护性作用。PPI网络中菌群显著的SNP所邻近的基因TNF与六味地黄丸对肾损伤起到保护性作用的靶点具有蛋白互作作用,表明六味地黄丸可能通过该靶点调控肠道菌群治疗肾损伤。

人类胃肠道包含超过100万亿微生物,形成了一个丰富多样的微生物群落。细菌是微生物的一种,在门、纲、目、科、属和种的水平上分类[17]。肠道菌群组成变化很大,在生理状态下保持动态平衡。然而,肠道菌群的变化往往是肠道和导致肠外疾病的重要原因之一[18]。肠道生态失调是一个促进肾脏疾病进展因素[19]。肠道微生物群的失调可能是炎症导致的结果,肠道微生物群的失调和肾脏损伤有关,有研究表明阿霉素诱导小鼠在病理学上出现蛋白尿并出现肾脏损伤,并且白细胞介素(interleukin,IL)-2升高,其中的Marvinbryantia(马文布赖恩特菌属)丰度升高[20],而本研究则发现Marvinbryantia导致急性小管间质性肾炎与肾小管间质疾病,并且Marvinbryantia可能导致进一步的肾脏损伤。此外,有研究表明Lachnospiraceae(紫胶螺科菌)是慢性肾脏病的核心微生物群,并且和慢性肾脏病的发展阶段高度相关[21]。同时有研究表明Lachnospiraceae(紫胶螺科菌)是肾功能减退时eGFR水平的标志物[22]。而本研究表明Lachnospiraceae(紫胶螺科菌)可导致急性小管间质性肾炎,可能进一步导致肾损伤,因此我们需要对肠道中Lachnospiraceae(紫胶螺科菌)的升高提高警戒。本研究还发现Porphyromonadaceae(卟啉单胞菌科)可导致慢性肾脏病,Coprococcus1(粪球菌属1)可导致不明原因的肾衰竭,但是并未有相关研究报道,因此我们需要更多的基础类及实验类研究作为支持。据研究表明,肠道菌群导致肾损伤的机制主要为细胞免疫炎症反应,肠源性尿毒素堆积,短链脂肪酸合成减少。调整肠道菌群功能则可缓解肾损伤[23]。经研究表明泽泻成分泽泻醇A和2,3-乙酰泽泻醇B的含量可调整肠道菌群的结构以及丰度[24]。研究发现不同剂量泽泻提取物的小鼠给药组中细胞的簇集蛋白(clusterin,CLU)、肾损伤分子-1(kidney injury molecule-1,Kim-1)、三叶因子3蛋白和mRNA水平明显升高,表明萜类是泽泻的主要毒性物质基础[9]。三叶因子(TFF-3)是一种小分子的多肽,表达于肠道和肾脏组织,但是越来越多的报道显示,高含量的TFF-3与肾损伤有关[25-27]。并且菌群失调可导致TFF-3异常[28]。此外,俞悦[29]研究泽泻根对大鼠的肾毒性,发现马尿酸、苯乙尿酸、肌酐以及胆酸等生物标志物的水平发生变化,结果表明肾损伤的机制可能与肠道菌群代谢及一系列代谢途径紊乱有关。综上,泽泻可能通过导致菌群紊乱导致肾损伤。此外,在一项马兜铃酸Ⅰ(AAⅠ)诱导的小鼠模型研究中发现,枢纽基因中的HSPA5与纤维化密切相关,进行调控可治疗肾脏损伤疾病,而本研究显示HSPA5可能与肠道菌群介导的肾损伤有关[30]。

Meijers等首次提出"肠-肾轴"的概念,即肠道和肾脏在病理上有一定的联系,六味地黄丸具有健脾益气、补肾固本等治疗功效,可改善肠道微生态,并调节机体免疫,治疗肾脏有关疾病[31]。有研究表明Clostridium butyricum(LCs)可富集益生菌例如Ruminococcaceae(瘤胃梭菌属)恢复肠道微生物群组成,从而对顺铂诱导的肾毒性具有保护作用[17],三黄益肾胶囊可增加Ruminococcaceae(瘤胃梭菌属)的丰度并缓解糖尿病肾病[32]。合生元疗法(益生菌前和益生菌)可改变粪便微生物群,特别是Ruminococcaceae(瘤胃球菌科)的消耗,改变肾衰竭的肠道微生物群并降低微生物组产生的尿毒症毒素(IS和PCS)血清浓度[33],本研究同样显示Ruminococcaceae(瘤胃梭菌属)对肾衰竭与肾小管间质疾病肾衰竭具有保护作用。Prevotellaceae(普雷沃氏菌)作为一种有益菌,有研究证明在服用抗纤灵方中,有益菌[Prevotellaceae(普雷沃氏菌)]丰度增加,从而对肾纤维化进行保护[34]。并且Prevotellaceae(普雷沃氏菌)在CKD以及ESRD患者中丰度较低[35],因此也证明了Prevotellaceae(普雷沃氏菌)对于肾损伤疾病是一种保护性肠菌。同时我们的研究也证明了该菌是肾小管间质疾病的保护性因素。有研究表明,高尿酸血症常伴有肾脏损伤,菊苣在通过调节菌群[增加益生菌菌群Erysipelotrichaceae(丹毒菌属)]失衡来改善高尿酸血症[36],同样有研究证明低蛋白饮食加α-酮酸可影响肠道微生物组[增加益生菌菌群Erysipelotrichaceae(丹毒菌科)]在小鼠延缓5/6肾切除所致CKD肾功能衰竭方面有着良好的效果。与我们的研究结果Erysipelotrichaceae(丹毒菌科)是慢性肾脏病的保护性因素相符合。有研究表明Faecalibacterium(粪杆菌属)属的prausnitzii是一种有益菌,其产生的丁酸盐对肾脏的有益作用是通过GPR(G蛋白偶联受体)-43实现的[37],本研究结果表明该菌是不明原因肾损伤的保护性因素,与之前的研究相符合。六味地黄丸可通过调控鞘氨醇、植物鞘氨醇、鞘磷脂、花生四烯酸从而达到治疗肾损伤的目的[13]。本研究显示,六味地黄丸的肠道菌群肾损伤保护性的PPI网络中TNF degree值为28,表明六味地黄丸通过调控TNF及其相关的基因治疗肾脏损伤,同样有研究支持可通过调控TNF减轻肾损伤[38-39]。

4 结论

从"肠-肾轴"的角度,泽泻具有通过调控HSPA5导致药物性肾损伤的机制,但六味地黄丸通过复方配伍通过调控TNF反而对肾脏具有保护作用,阐明了经典名方六味地黄丸的疗效及安全性机制。

参考文献

[1] KANE-GILL S L,SMITHBURGER P L,KASHANI K,et al. Clinical relevance and predictive value of damage biomarkers of drug-induced kidney injury[J]. Drug Saf,2017,40(11):1049-1074.

[2] NISULA S,KAUKONEN K M,VAARA S T,et al. Incidence,risk factors and 90-day mortality of patients with acute kidney injury in Finnish intensive care units:the FINNAKI study[J]. Intensive Care Med,2013,39(3):420-428.

[3] KERR M,BEDFORD M,MATTHEWS B,et al. The economic impact of acute kidney injury in England[J]. Nephrol Dial Transplant,2014,29(7):1362-1368.

[4] CHAWLA L S,EGGERS P W,STAR R A,et al. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes[J]. N Engl J Med,2014,371(1):58-66.

[5] YANG B,XIE Y,GUO M J,et al. Nephrotoxicity and Chinese herbal medicine[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2018,13(10):1605-1611.

[6] 裴明,杨洪涛. 从肠道微生态看中医肾病学的发展机遇[J]. 中华中医药杂志,2019,34(6):2336-2341.
[7] MEIJERS B K I,EVENEPOEL P. The gut-kidney axis:indoxyl sulfate,p-cresyl sulfate and CKD progression[J]. Nephrol Dial Transplant,2011,26(3):759-761.
[8] 桑永浩,宋立群,负捷,等. 基于"肠肾轴"理论探讨通腑泄浊灌肠方治疗 CKD 3~4 期患者的临床疗效及对 NLR 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(21):227-233.
[9] 汪春飞,马良,封亮,等. 基于 HK-2 细胞的泽泻萜类组分体外肾毒性评价及其诱导细胞凋亡作用的探究[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):490-497.
[10] 张淑敏,仇慧鑫,舒乐新,等. 泽泻毒性的古今认识和减毒策略的研究进展[J]. 中草药,2024,55(4):1407-1414.
[11] WANG F Q,JIANG H L,SHI K H,et al. Gut bacterial translocation is associated with microinflammation in end-stage renal disease patients[J]. Nephrology (Carlton),2012,17(8):733-738.
[12] 邓红,吴纯启,江涛,等. 肠道微生物组及其在中药药理毒理研究中的应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(9):975-982.
[13] 王曦烨,李丹,于佳琪,等. 中成药六味地黄丸对急性肾损伤保护作用的研究[J]. 分析测试学报,2017,36(5):621-626.
[14] 燕飞. 当归补血汤合六味地黄丸对高血压肝肾阴虚证早期肾损伤的防治[J]. 湖北中医杂志,2019,41(2):6-8.
[15] 董月桂,易健,刘柏炎. 六味地黄丸联合奥美沙坦酯片治疗高血压病早期肾损伤 34 例[J]. 湖南中医杂志,2021,37(8):45-47.
[16] CHOU Y T,KAN W C,SHIAO C C. Acute kidney injury and gut dysbiosis:a narrative review focus on pathophysiology and treatment[J]. Int J Mol Sci,2022,23(7):3658-3661.
[17] HSIAO Y P,CHEN H L,TSAI J N,et al. Administration of Lactobacillus reuteri combined with Clostridium butyricum attenuates cisplatin-induced renal damage by gut microbiota reconstitution,increasing butyric acid production,and suppressing renal inflammation[J]. Nutrients,2021,13(8):2792-2799.
[18] IKEE R,SASAKI N,YASUDA T,et al. Chronic kidney disease,gut dysbiosis,and constipation:a burdensome triplet[J]. Microorganisms,2020,8(12):1862-1867.
[19] CAO C J,ZHU H,YAO Y,et al. Gut dysbiosis and kidney diseases[J]. Front Med (Lausanne),2022,9:829349.
[20] JIANG Q,HE X W,ZOU Y T,et al. Altered gut microbiome promotes proteinuria in mice induced by Adriamycin[J]. AMB Express,2018,8(1):31-36.
[21] WU I W,CHAN-YU L,CHANG L C,et al. Gut microbiota as diagnostic tools for mirroring disease progression and circulating nephrotoxin levels in chronic kidney disease:discovery and validation study[J]. Int J Biol Sci,2020,16(3):420-434.
[22] BARRIOS C,BEAUMONT M,PALLISTER T,et al. Gut-microbiota-metabolite axis in early renal function decline[J]. PLoS One,2015,10(8):e0134311.
[23] 郭银凤,宋志霞,吴恒兰. 肠道菌群及其代谢产物在急性肾损伤中的作用及机制研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2022,23(8):750-752.
[24] 朱博冉. 基于"心与小肠相表里"理论泽泻饮通过调节肠道微生态抗动脉粥样硬化的研究[D]. 南京:南京中医药大学,2021.
[25] DU T Y,LUO H M,QIN H C,et al. Circulating serum trefoil factor 3 (TFF3) is dramatically increased in chronic kidney disease[J]. PLoS One,2013,8(11):e80271.
[26] ASTOR B C,KÖTTGEN A,HWANG S J,et al. Trefoil factor 3 predicts incident chronic kidney disease:a case-control study nested within the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study[J]. Am J Nephrol,2011,34(4):291-297.
[27] OLIVO-MARTÍNEZ Y,BOSCH M,BADIA J,et al. Modulation of the intestinal barrier integrity and repair by microbiota extracellular vesicles through the differential regulation of trefoil factor 3 in LS174T goblet cells[J]. Nutrients,2023,15(11):2437-2440.
[28] ZAHRAN S A,MANSOUR S M,ALI A E,et al. Sunset Yellow dye effects on gut microbiota,intestinal integrity,and the induction of inflammasomopathy with pyroptotic signaling in male Wistar rats[J]. Food Chem Toxicol,2024,187:114585.
[29] 俞悦. 泽泻肾毒性代谢组学与其特征成分泽泻醇 A 的药动学研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2012.
[30] 赵思,何伟明,张傲雪,等. 基于转录组学探讨益肾清利活血方对马兜铃酸Ⅰ诱导肾损伤的作用机制[J]. 中医药信息,2024,41(3):1-8.
[31] 陶嘉茵,王珍,王耀献. 基于"肠肾轴"探讨"脾为之卫"理论在过敏性紫癜性肾炎治疗中的应用[J]. 中医学报,2024,39(6):1195-1199.
[32] SU X H,YU W X,LIU A R,et al. San-Huang-yi-Shen capsule ameliorates diabetic nephropathy in rats through modulating the gut microbiota and overall metabolism[J]. Front Pharmacol,2022,12:808867.
[33] ROSSI M,JOHNSON D W,MORRISON M,et al. Synbiotics easing renal failure by improving gut microbiology (SYNERGY):a randomized trial[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2016,11(2):223-231.
[34] TAO P Y,LIU H Y,HOU G J,et al. Kangxianling formula attenuates renal fibrosis by regulating gut microbiota[J]. Eur J Med Res,2024,29(1):183-186.
[35] ZHAO J,NING X X,LIU B J,et al. Specific alterations in gut microbiota in patients with chronic kidney disease:an updated systematic review[J]. Ren Fail,2021,43(1):102-112.
[36] BIAN M,WANG J,WANG Y,et al. Chicory ameliorates hyperuricemia via modulating gut microbiota and alleviating LPS/TLR4 axis in quail[J]. Biomed Pharmacother,2020,131:110719.
[37] LI H B,XU M L,XU X D,et al. Faecalibacterium prausnitzii attenuates CKD via butyrate-renal GPR43 axis[J]. Circ Res,2022,131(9):120-134.
[38] ELTAHIR H M,ELBADAWY H M,ALALAWI A,et al. Alpha-Mangostin ameliorates acute kidney injury via modifying levels of circulating TNF-α and IL-6 in glycerol-induced rhabdomyolysis animal model[J]. Acta Biochim Pol,2023,70(2):277-284.
[39] HU W X,ZHAO J,HU Y X,et al. Huangqi Jiuni decoction prevents acute kidney injury induced by severe burns by inhibiting activation of the TNF/NF-κB pathway[J]. J Ethnopharmacol,2024,320:117344.

基于“肠－肾轴”的泽泻致肾损伤及在六味地黄丸配伍中的肾脏保护机制研究

（正文见 121－127 页）

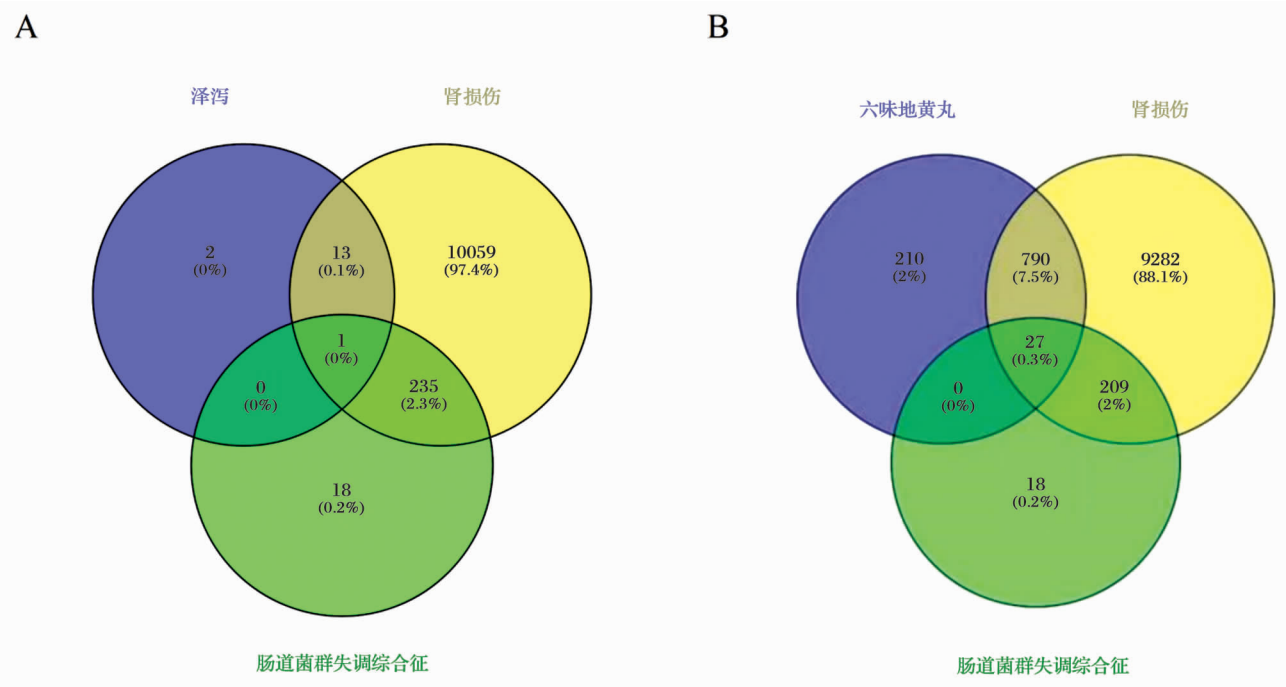


图 2　泽泻（A）毒性成分靶点和六味地黄丸（B）成分靶点与肾损伤以及肠道菌群失调综合征交集靶点韦恩图

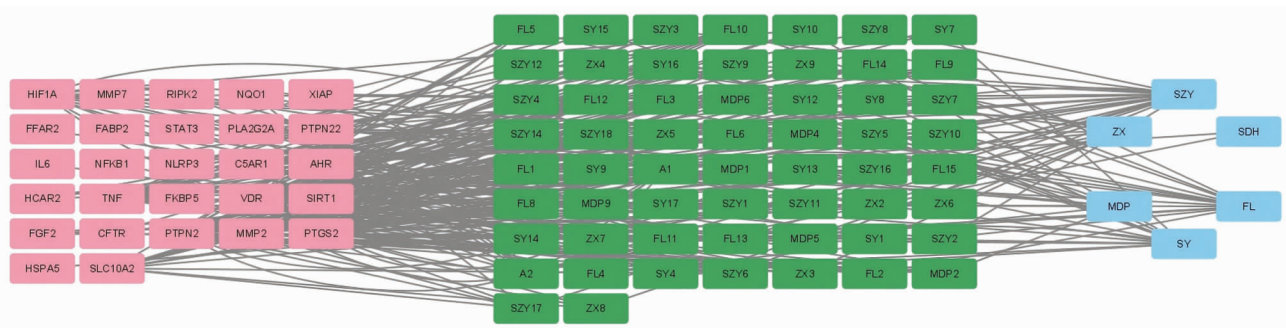
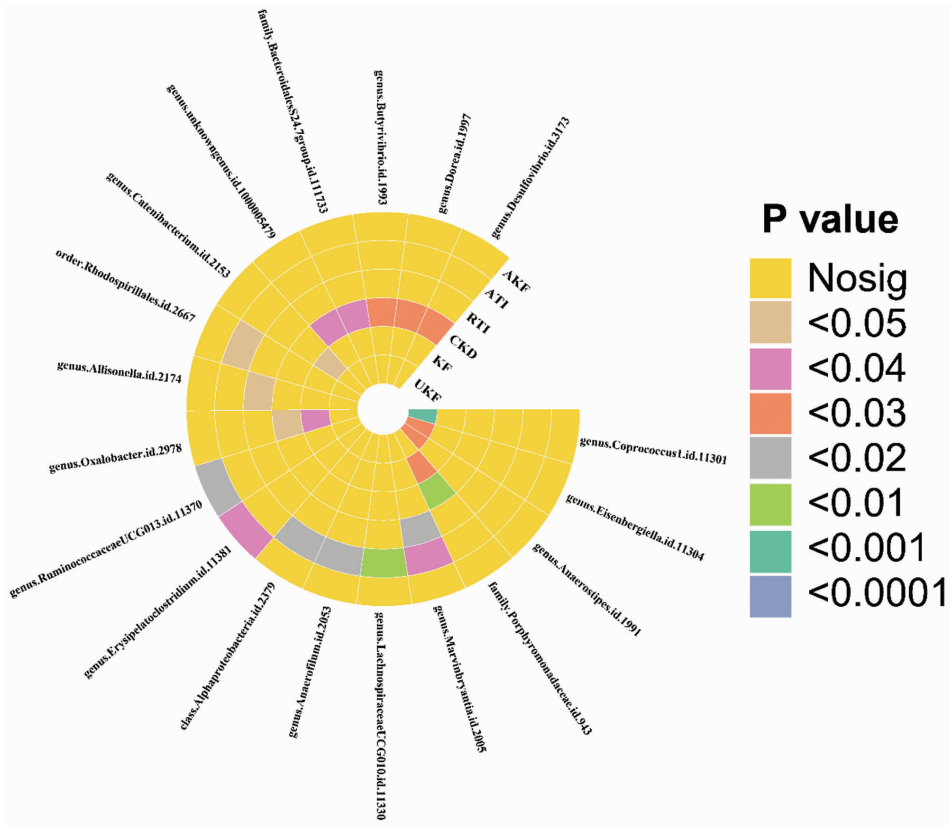
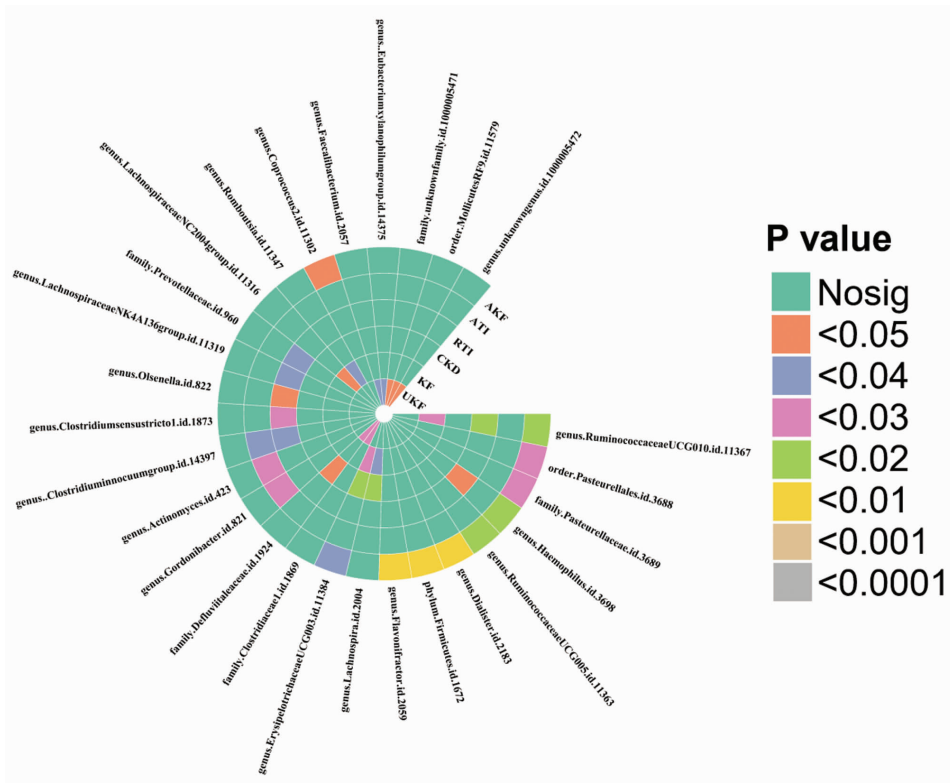


图 3　六味地黄丸与肾损伤以及肠道菌群失调综合征药物－成分－靶点图



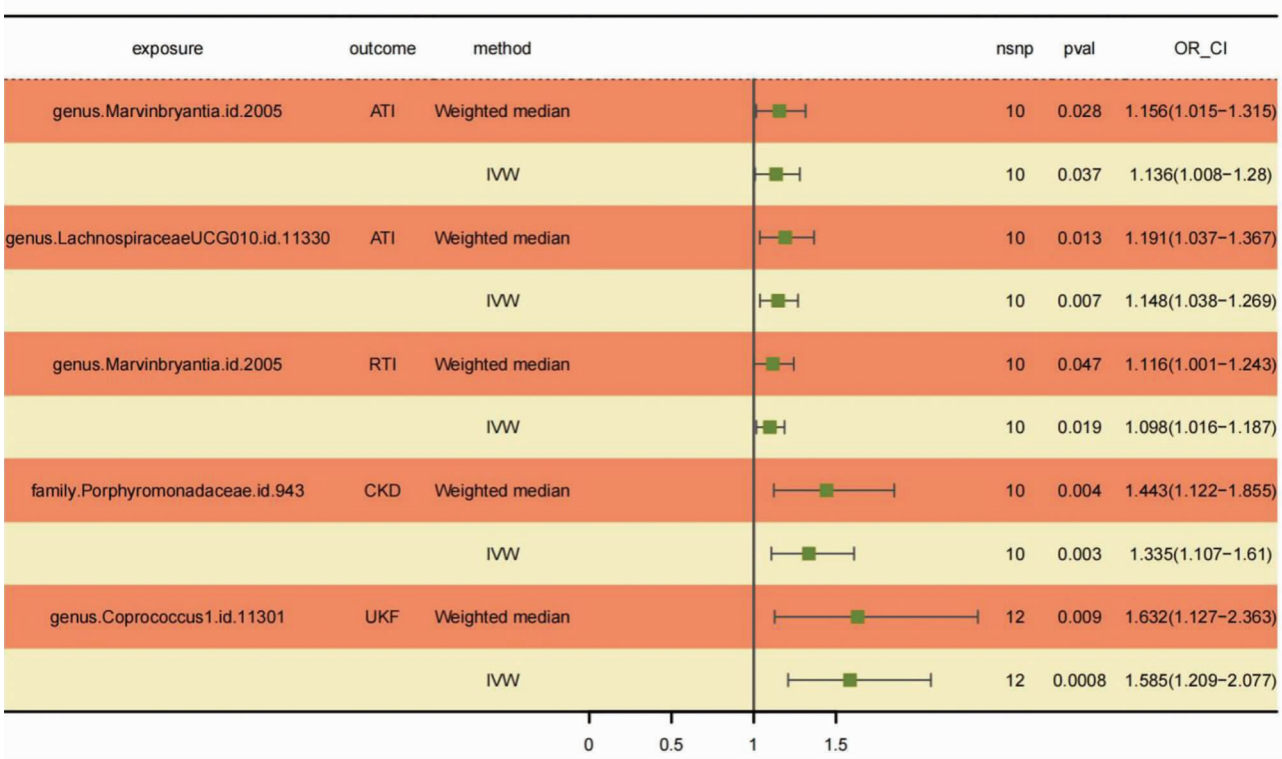
注：AKF. 急性肾衰竭；ATI. 急性小管间质性肾炎；RTI. 肾小管间质疾病；CKD. 慢性肾脏病；KF. 肾衰竭；UKF. 不明原因肾衰竭。

图 4　菌群导致肾脏疾病孟德尔随机化分析中 IVW 方法 P 值显著性环状热图



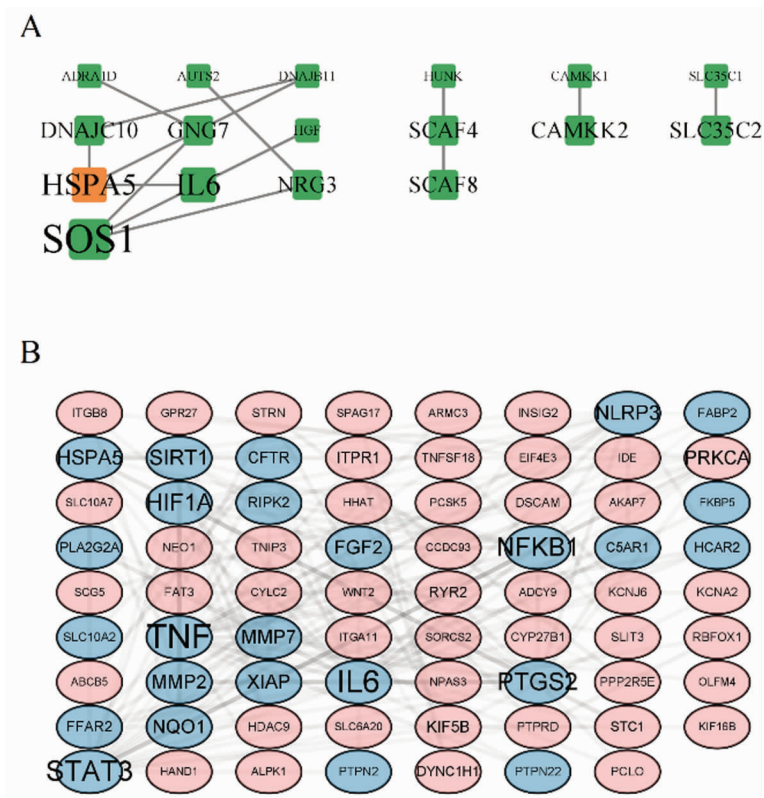
注：AKF. 急性肾衰竭；ATI. 急性小管间质性肾炎；RTI. 肾小管间质疾病；CKD. 慢性肾脏病；KF. 肾衰竭；UKF. 不明原因肾衰竭。

图 5　肠道菌群对肾脏疾病具有保护性作用中 IVW 方法 P 值显著性环状热图



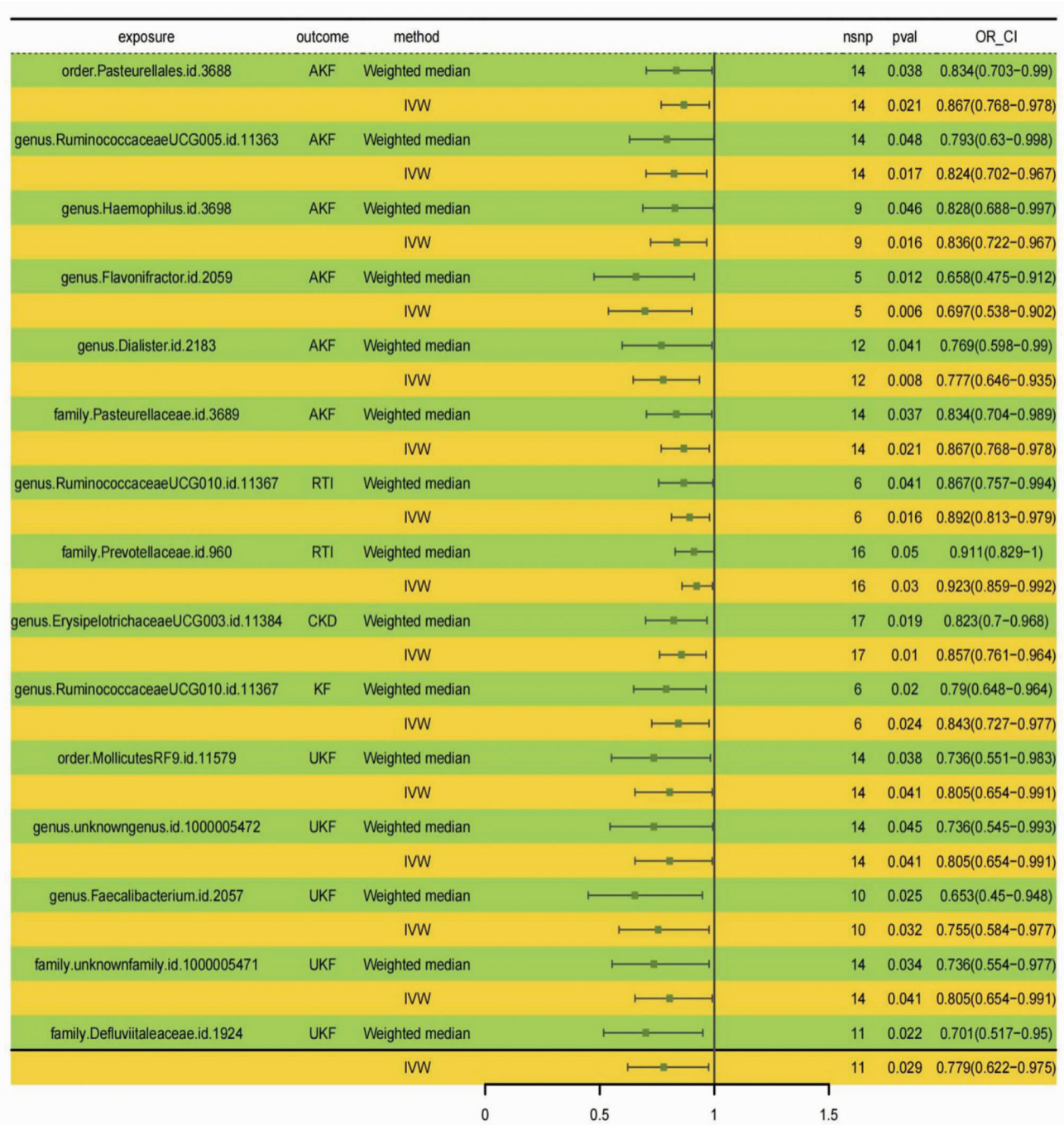
注：ATI. 急性小管间质性肾炎；RTI. 肾小管间质疾病；CKD. 慢性肾脏病；UKF. 不明原因肾衰竭。

图 6 肠道菌群导致肾脏疾病的森林图



注：A 中橙色代表泽泻致肾损伤的靶点基因（交集基因），绿色代表经肠道菌群 SNP 筛选的临近基因以及相关拓扑连接基因；B 中蓝色代表六味地黄丸保护肾脏的基因（交集基因），粉色表示经肠道菌群 SNP 筛选的临近基因。

图 8 泽泻（A）网络毒理学和六味地黄丸（B）网络药理学分析得到的靶点与孟德尔随机化分析得到的靶点 PPI 网络图



注：AKF. 急性肾衰竭；RTI. 肾小管间质疾病；CKD. 慢性肾脏病；KF. 肾衰竭；UKF. 不明原因肾衰竭。

图7 肠道菌群对肾脏疾病具有保护性作用的森林图