苏叶黄连汤通过调节 EGFR－p38 MAPK 信号通路改善糖尿病肾病肾脏纤维化*

杨云华[1]，朱杰[2]，谷伟[3]，龚伟伟[3]

1. 江苏省人民医院浦口分院/南京市浦口区中心医院，江苏 南京 210017；2. 江苏卫生健康职业学院，江苏 南京 210000；
3. 南京医科大学附属南京医院，江苏 南京 210000

摘要：目的：基于网络药理学和体内外实验探讨苏叶黄连汤调节表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）－丝裂原活化蛋白激酶 p38（mtogen－activated protein kinase p38，p38 MAPK）信号通路治疗糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）的作用机制。方法：采用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）筛选苏叶黄连汤的化学成分，Pharmmapper 数据库预测作用靶点。借助 Drugbank、GeneCards 及 OMIM 数据库筛选 DN 的靶点，绘制韦恩图获取两者的交集靶点。利用 STRING 数据库构建蛋白质－蛋白质相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络，将其导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行拓扑分析，根据关联度筛选核心靶点。采用 DAVID 数据库进行基因本体（Gene Ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析。采用 400 mg·L^{-1} 晚期糖基化终末产物（advanced glycation end products，AGEs）干预 HK－2 细胞，从而诱导 DN 模型。将 HK－2 细胞分为空白组、模型组、苏叶黄连汤组（20 mg·L^{-1}），采用 ELISA 法检测细胞上清液中 Fibronectin 浓度。将 C57/BL6J 小鼠随机分为 Con 组、Mod 组及 SYHLD 组（60 mg·kg^{-1}），每组 6 只。除 Con 组外，其余小鼠腹腔注射链脲佐菌素（150 mg·kg^{-1}）建立 DN 模型，连续灌胃 15 周。采用 HE 染色和 Masson 染色观察小鼠肾脏病理形态，生化分析仪检测血清肌酐（serum creatinine，Scr）、血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）和 24 小时尿蛋白（24－hour urinary protein，UR）水平。采用 Western bolt 和 RT－PCR 检测小鼠肾脏 EGFR、p38 MAPK、Fibronectin 表达水平。结果：苏叶黄连汤活性成分 28 个，靶点 100 个；DN 靶点 1 251 个，两者的交集靶点 44 个。核心靶点包括 ALB、PPARG、MAPK1、MAPK8、MAPK14 等。KEGG 通路包括 MAPK 信号通路，GO 功能包括 MAPK 激活等。ELISA 显示，与空白组比较，模型组细胞分泌 Fibronectin 增加（$P<0.05$）；与模型组比较，苏叶黄连汤组细胞分泌 Fibronectin 减少（$P<0.05$）。与 Con 组比较，Mod 组小鼠血清 BUN、Scr 及 UR 水平升高（$P<0.05$）。与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠血清 BUN、Scr 水平降低（$P<0.05$）。HE 染色显示，Mod 组小鼠肾小管出现大量空泡与肾小管萎缩；与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠肾脏病理形态改善。Masson 染色显示，Mod 组小鼠肾脏胶原纤维增加；与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠肾脏胶原纤维减少。Western bolt 显示，与 Con 组比较，Mod 组小鼠肾脏 EGFR、p38 MAPK、Fibronectin 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）；与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠肾脏 EGFR、p38 MAPK、Fibronectin 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。RT－PCR 显示，与 Con 组比较，Mod 组小鼠肾脏 *EGFR* mRNA、*Fibronectin* mRNA 水平升高（$P<0.01$）；与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠肾脏 *EGFR* mRNA、*Fibronectin* mRNA 水平降低（$P<0.01$）。结论：苏叶黄连汤可改善 DN 肾脏纤维化，其机制可能与抑制 EGFR－p38 MAPK 信号通路有关。

关键词：苏叶黄连汤；糖尿病肾病；EGFR－p38 MAPK 信号通路；肾脏纤维化；网络药理学；小鼠
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.10.347
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)10－2206－10

Suye Huanglian Decoction Improving Diabetic Nephropathy and Renal Fibrosis by Modulating EGFR－p38 MAPK Signaling Pathway

YANG Yunhua[1]，ZHU Jie[2]，GU Wei[3]，GONG Weiwei[3]

* **基金项目**：2021 年度南京市卫生科技发展专项资金项目（ZKX21041）

1. Pukou Branch of the People's Hospital of Jiangsu Province / Pukou District Central Hospital of Nanjing, Nanjing Jiangsu China 210017; 2. Jiangsu Health Vocational College, Nanjing China 210000; 3. Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing China 210000

Abstract: Objective: To investigate the effect of Suye Huanglian Decoction on regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) - mtogen - activated protein kinase p38 (p38 MAPK) signaling pathway in the treatment of diabetic nephropathy (diabetic nephropathy, DN). Methods: The chemical components of Suye Huanglian Decoction were screened by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the target was predicted by Pharmmapper database. The targets of DN were screened by Drugbank, GeneCards and OMIM databases, and the intersection targets of the two were plotted by drawing a Wayne diagram. The protein - protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING database, which was imported into Cytoscape 3.9.1 software for topological analysis, and the core targets were screened according to the degree of association. DAVID database was used for gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. 400 mg · L^{-1} advanced glycation end products (AGEs) intervene in HK - 2 cells to induce the DN model. The HK - 2 cells were divided into blank group, model group as well as Suye Huanglian Decoction group (20 mg · L^{-1}), and the concentration of fibronectin in cells was detected by ELISA. C57/BL6J mice were randomly divided into Con group, Mod group and SYHLD group (60 mg · kg^{-1}), with 6 mice in each group. Except for the Con group, the other mice were intraperitoneally injected with streptozotocin (150 mg · kg^{-1}) to establish a DN model and were given gavage for 15 weeks. HE staining and Masson staining were used to observe the pathological morphology of the kidneys, and the levels of serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN) and 24 - hour urinary protein (UR) were detected by biochemical analyzer. Western bolt and RT - PCR were used to detect the expression levels of EGFR, p38 MAPK and Fibronectin in the kidneys of mice. Results: There were 28 active ingredients and 100 targets in Suye Huanglian Decoction. There were 1251 DN targets and 44 intersecting targets. The core targets include ALB, PPARG, MAPK1, MAPK8, MAPK14, etc. The KEGG pathway includes the MAPK signaling pathway, and the GO function includes MAPK activation, etc. ELISA showed that compared with the blank group, the secretion of Fibronectin in the model group was increased ($P < 0.05$), and compared with the model group, the secretion of Fibronectin decreased in the cells of the Suye Huanglian Decoction group ($P < 0.05$). Compared with the Con group, the serum levels of BUN, Scr and UR in the Mod group were increased ($P < 0.05$). Compared with the Mod group, the serum levels of BUN and Scr in the SYHLD group were decreased ($P < 0.05$). HE staining showed that a large number of vacuoles and tubular atrophy appeared in the renal tubules of the mice in the Mod group. Compared with the Mod group, the pathological morphology of the kidneys in the SYHLD group was improved. Masson staining showed that the kidney collagen fibers of the mice in the Mod group increased. Compared with the Mod group, the kidney collagen fibers of mice in the SYHLD group were reduced. Western bolt showed that compared with the Con group, the expression levels of EGFR, p38 MAPK and Fibronectin proteins in the kidneys of the Mod group were increased ($P < 0.01$). Compared with the Mod group, the expression levels of EGFR, p38 MAPK and Fibronectin proteins in the kidneys of mice in the SYHLD group were decreased ($P < 0.01$). RT - PCR showed that compared with the Con group, the levels of *EGFR* mRNA and *Fibronectin* mRNA in the kidneys of the Mod group were increased ($P < 0.01$). Compared with the Mod group, the levels of *EGFR* mRNA and *Fibronectin* mRNA in the kidneys of the SYHLD group were decreased ($P < 0.01$). Conclusion: Suye Huanglian Decoction can improve DN renal fibrosis, and its mechanism may be related to the inhibition of EGFR - p38 MAPK signaling pathway.

Key words: Suye Huanglian Decoction; diabetic nephropathy; EGFR - p38 MAPK signaling pathway; renal fibrosis; network pharmacology; mouse

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是一种由糖尿病诱发的慢性肾脏病,其发病进程具有缓慢性和不可逆性,DN 患者是终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)的主要来源群体[1]。国际糖尿病联合会(International Diabetes Federation, IDF)最新数据显示,截至 2021 年,全球 20 ~ 79 岁成年人约有 5 亿人患糖尿病;而在确诊后的 10 ~ 20 年内,每年约有 3% 的概率发展为 DN[2]。2020 年的一项研究显示,我国约有 20% 的糖尿病患者罹患 DN,由此造成的巨大经济负担亦成为重大的公共卫生问题[3]。迄今为止,DN 的具体发病机制仍未完全阐明,且临床一线药物主要为单靶点药物,治疗效果并不理想。

中医通常从热证角度治疗 DN,早期以痰湿、实热为主[4]。苏叶黄连汤最早记载于清代名医薛雪的《湿热病篇》,该方主治湿热,临床广泛用于治疗 DN 等慢性肾脏病[5]。网络药理学是一种基于“药物 - 成分 - 靶点 - 通路”作用网络的技术,系统分

析药物对生物系统的调节作用,并注重信号通路的多途径调控机制[6-7]。中药因其多组分、多靶点的特性,与网络药理学的研究理念非常契合[8-9]。本研究采用网络药理学方法筛选苏叶黄连汤治疗 DN 的活性成分和作用靶点,并通过动物实验和细胞实验探索相关作用机制,为 DN 的临床和基础研究提供依据。

1　材料

1.1　动物与细胞　4 周龄 SPF 级雄性 C57/BL6J 小鼠 18 只,饲养于江苏卫生健康职业学院中心实验室动物房,温度(23 ± 2)℃、相对湿度(60 ± 10)%,12 h 光照/12 h 黑暗循环,自由饮水和进食。本研究经江苏卫生健康职业学院动物伦理委员会审核批准,伦理审批证号:JHVC - IACUC - 2023 - B019。

人肾近曲小管细胞 HK - 2 来源于江苏卫生健康职业学院中心实验室。

1.2　药物与试剂　紫苏叶、黄连(江苏省人民医院浦口分院草药房);低糖 DMEM 不完全细胞培养基、PBS、总 RNA 提取试剂盒(江苏凯基生物股份有限公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);CCK - 8 细胞增殖与毒性检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);纤维连接蛋白(Fibronectin)鼠抗人多克隆抗体、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)鼠抗人多克隆抗体、丝裂原活化蛋白激酶 p38(mtogen - activated protein kinase p38,p38 MAPK)鼠抗人多克隆抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab42100、ab192432、ab69537);GAPDH 抗体(沈阳万类生物科技有限公司,货号:S1732);辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG、RIPA 细胞裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司,货号:235630220407、43252220409、532214220409);qRT SuperMix for qPCR 试剂盒、SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:R123 - 04、Q411 - 05/05)。

1.3　仪器　培养箱、PCR 仪(美国赛默飞公司,型号:Forma Steri - Cult、QuantStudio™7 Flex);电泳仪、电泳电源、PCR 仪(美国 Bio - rad 公司,型号:Mini - PROTEAN® Tetra、PowerPac™ HC、T100);凝胶成像分析系统(美国 GE 医疗集团,型号:Amersham Imager 600);核酸提取仪(西安天隆科技有限公司,型号:PANA9600S);多功能酶标仪(上海美谷分子仪器公司,型号:SpectraMax iD3)。

2　方法

2.1　网络药理学研究

2.1.1　苏叶黄连汤活性成分筛选　采用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,https://old. tcmsp - e. com/tcmsp. php)检索紫苏和黄连的化学成分,并根据 ADME 原则,筛选口服生物利用度(oral bioavailablity,OB)≥30%、类药性(drug - likeness,DL)≥0. 18 的化合物作为潜在活性成分[10]。

2.1.2　苏叶黄连汤治疗 DN 的潜在靶点预测　利用 Pubchem 数据库(https://pubchem. ncbi. nlm. nih. gov)检索苏叶黄连汤活性成分的 Pubchem CID,并下载 2Dsdf 格式结构式,导入 Pharmmapper 数据库(http://www. lilab - ecust. cn/pharmmapper/)中预测相应的靶点。最后汇总每个化合物的靶点,选取 Norm Fit 值≥0. 75 的靶点作为苏叶黄连汤的潜在靶点。

以“Diabetes Nephropathy”作为关键词,在 Drugbank 数据库(https://go. drugbank. com/)、OMIM 数据库(https://www. omim. org/)及 GeneCards 数据库(https://www. genecards. org/)检索 DN 的疾病靶点。

绘制韦恩图获取苏叶黄连汤与 DN 的交集靶点,利用 Uniprot 数据库(https://www. uniprot. org/)将靶点转换为 Gene Symbol 格式,作为苏叶黄连汤治疗 DN 的潜在靶点。

2.1.3　苏叶黄连汤治疗 DN 的核心靶点筛选　将交集靶点导入 STRING 数据库(https://cn. string - db. org/),构建蛋白质 - 蛋白质相互作用(protein - protein interaction,PPI)网络,物种设定为 Homo sapiens。将 PPI 网络图导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化展示,利用 Network Analyzer 插件对节点进行拓扑分析,从而筛选苏叶黄连汤治疗 DN 的核心靶点。

2.1.4　基因本体(Gene Ontology,GO)和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)分析　将交集靶点导入 DAVID 数据库(https://david. ncifcrf. gov/summary. jsp),物种设置为 Homo sapiens,进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,并于微生信(http://www.

bioinformatics. com. cn/)平台对 GO 和 KEGG 结果进行可视化处理。

2.1.5　“药物－成分－靶点－通路”网络构建　将药物与其对应的活性成分、核心靶点及 KEGG 通路导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建“药物－成分－靶点－通路”网络,并进行可视化分析。

2.2　细胞实验研究

2.2.1　细胞培养与接种　将 HK－2 细胞于 25 cm^2 细胞培养瓶中复苏,放置于含 5% CO_2、37 ℃的培养箱,用含 10% 胎牛血清和 1% 青－链霉素双抗(100×)的 DMEM 低糖培养液进行培养。当于倒置显微镜下观察细胞密度达到 80% 时,用含 EDTA 的胰酶消化液消化 1.5 min,按照 1∶3 的比例进行传代。

2.2.2　苏叶黄连汤冻干粉制备　取紫苏叶 90 g 和黄连 120 g,置于砂锅内加水煎煮,过滤药液倒入旋转蒸发仪内浓缩,之后在冷冻干燥机内冻干,得到 190.47 g 冻干粉,精细研磨后溶于 PBS,供后续细胞实验和动物实验使用。

2.2.3　终末期糖基化产物(advanced glycation end products,AGEs)制备　将 100 mg BSA 粉末、90 mg D－葡萄糖及 1 mmol·L^{-1} 叠氮化钠溶于 10 mL 0.4 mol·L^{-1} PBS 中,测定 pH 值为 7.4,37 ℃避光孵育 14 d。采用 PBS 透析所得制剂,以消除未反应的 D－葡萄糖。纯 PBS、BSA 溶液、D－葡萄糖溶液以及 BSA 与 D－葡萄糖的 PBS 溶液均在相同条件下孵育。通过酶标仪检测荧光(λ_{ex}:370 nm,λ_{em}:400～500 nm)证实 AGEs 制备成功[11]。

2.2.4　AGEs 和苏叶黄连汤冻干粉干预 HK－2 细胞的安全剂量检测　取对数生长期的 HK－2 细胞,以每孔 5 000 个接种至 96 孔板,待充分融合后,弃去培养液。以不同浓度 AGEs(0、1、10、100、200、400、800 mg·L^{-1})或苏叶黄连汤冻干粉(0、10、20、40 mg·L^{-1})干预 HK－2 细胞 72 h,弃去培养液,每孔加入 100 μL DMEM 培养基和 10 μL CCK－8 溶液,避光培养 4 h 后于 450 nm 波长处检测各孔的光密度值。

2.2.5　ELISA 法检测各组 HK－2 细胞上清液中 Fibronectin 浓度　取对数生长期的 HK－2 细胞,消化后以每孔 5 000 个接种至 96 孔板,待充分融合后,弃去培养液。将 HK－2 细胞分为空白组、模型组(400 mg·L^{-1} AGEs)、苏叶黄连汤组(400 mg·L^{-1} AGEs＋20 mg·L^{-1}苏叶黄连汤冻干粉),培养 72 h 后弃去培养液,显微镜下观察各组细胞形态,ELISA 法检测上清液中 Fibronectin 浓度。

2.3　动物实验研究

2.3.1　分组、造模及给药　18 只 C57/BL6J 小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为对照组(Con 组)、模型组(Mod 组)及苏叶黄连汤组(SYHLD 组)。其中,Mod 组和 SYHLD 组小鼠腹腔注射链脲佐菌素(150 mg·kg^{-1}),Con 组小鼠腹腔注射等剂量柠檬酸钠溶液。1 周后小鼠剪尾检测血糖,若血糖高于 16.7 mmol·L^{-1} 视为Ⅰ型 DN 模型建立成功。随后,SYHLD 组小鼠灌胃苏叶黄连汤(60 mg·kg^{-1}),Con 组和 Mod 组小鼠灌胃等体积纯水,连续 15 周。

2.3.2　样本收集和检测　末次灌胃后,麻醉小鼠,目内眦取血,离心取血清,采用生化分析仪检测血清肌酐(serum creatinine,Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)及 24 小时尿蛋白(24－hour urinary protein,UR)水平;取小鼠左右肾脏,左侧浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定,用于 HE 染色和 Masson 染色,右侧冻存于－80 ℃冰箱,用于 RT－PCR 与 Western bolt 检测。

2.3.3　Western bolt 实验　取冻存的新鲜肾脏组织,PBS 清洗 2 次后,加入含 1 mmol·L^{-1} PMSF 的 RIPA 裂解液(每 10 mg 组织加入 100 μL RIPA 裂解液),组织研磨仪研磨 5 min 后,于冰上裂解 30 min,BCA 法蛋白定量后加入上样缓冲液并于 100 ℃恒温金属浴变性 10 min。取 30 μg 蛋白质加样于 10% SDS－PAGE 凝胶,恒压电泳(80 V－30 min、120 V－55 min)后将目标蛋白转移至 PVDF 膜。使用 5% BSA 室温摇床孵育 2 h 后,加入一抗(1∶1 000)4 ℃孵育过夜。次日使用 TBST 清洗后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶2 000)常温孵育 2 h,清洗后使用 ECL 发光液于凝胶成像系统中成像并拍照。

2.3.4　RT－PCR 实验　取冻存的新鲜肾脏组织,无菌无核酶水清洗 2 次,研磨仪研磨后使用全 RNA 提取试剂盒和核酸提取仪提取总 RNA。1 μg 总 RNA 加入 4 μL 5×qRT SuperMix 溶解,无核酶水补充至 20 μL 后于逆转录仪内逆转录为 cDNA,程序为 50 ℃－15 min,85 ℃－2 min。使用 SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行基因扩增,95 ℃预变性 10 min,95 ℃预变性 15 s,60 ℃预变性 60 s,40 个循环。以 *GAPDH* 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目

的基因的相对表达量。引物来源于南京诺唯赞生物科技股份有限公司，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因	正向引物(5′－3′)	反向引物(5′－3′)
EGFR	GCCATCTGGGCCAAAGATACC	GTCTTCGCATGAATAGGCCAAT
p38 MAPK	CTGACCGACGACCACGTTC	CTTCGTTCACAGCTAGGTTGC
Fibronectin	ATGTGGACCCCTCCTGATAGT	GCCCAGTGATTTCAGCAAAGG
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA

2.4　统计学方法　采用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行统计分析和绘图，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。若数据服从正态分布，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 t 检验；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　网络药理学研究结果

3.1.1　苏叶黄连汤活性成分　通过 TCMSP 数据库检测到苏叶黄连汤活性成分 376 个，进一步筛选得到主要活性成分 28 个，见表 2。

表 2　苏叶黄连汤主要活性成分信息表

编号	InChIKey	名称	OB/%	DL
SY－1	PFTAWBLQPZVEMU－DZGCQCFKSA－N	儿茶素	54.83	0.24
SY－2	ZNWVDIROEWRDJT－DARPEHSRSA－N	cyanin	47.42	0.76
SY－3	JYYFMIOPGOFNPK－AGRJPVHOSA－N	亚麻酸乙酯	46.10	0.20
SY－4	HOBAELRKJCKHQD－QNEBEIHSSA－N	顺式－8,11,14－二十碳三烯酸	44.11	0.20
SY－5	BJQHLKABXJIVAM－WOJBJXKFSA－N	邻苯二甲酸二辛酯	43.59	0.35
SY－6	LYJBOZQOTBMZJF－XYFZXANASA－N	eugenyl－β－D－glucopyranoside(cirtrusinc)	40.52	0.23
SY－7	GWJCFAOQCNNFAM－ZDVGBALWSA－N	顺－11,14－二十碳二烯酸甲酯	39.67	0.23
SY－8	HVYWMOMLDIMFJA－DPAQBDIFSA－N	胆甾醇	37.87	0.68
SY－9	OENHQHLEOONYIE－JLTXGRSLSA－N	β－胡萝卜素	37.18	0.58
SY－10	KZJWDPNRJALLNS－VJSFXXLFSA－N	β－谷甾醇	36.91	0.75
SY－11	KZJWDPNRJALLNS－FBZNIEFRSA－N	γ－谷甾醇	36.91	0.75
SY－12	IQPNAANSBPBGFQ－UHFFFAOYSA－N	木犀草素	36.16	0.25
SY－13	YYGNTYWPHWGJRM－AAJYLUCBSA－N	角鲨烯	33.55	0.42
SY－14	BITHHVVYSMSWAG－KTKRTIGZSA－N	顺式－11－二十碳烯酸	30.70	0.20
HL－1	ODJLBQGVINUMMR－SOYWKHEQSA－N	corchoroside A 苷元	104.95	0.78
HL－2	MAYJEFRPIKEYBL－OASIGRBWSA－N	N－反式阿魏酰酪胺	86.71	0.26
HL－3	DJDOMQTVQYDGJL－UHFFFAOYSA－N	黄藤素	64.60	0.65
HL－4	VHFXPBHLQOPQHJ－ABBQYLIMSA－N	广玉兰内酯	63.71	0.19
HL－5	VZTUIEROBZXUFA－MRXNPFEDSA－N	L－四氢小檗碱	55.37	0.77
HL－6	REFJWTPEDVJJIY－UHFFFAOYSA－N	槲皮素	46.43	0.28
HL－7	NYVARXJCEOLWKL－UHFFFAOYSA－N	甲基黄连碱	45.83	0.87
HL－8	MAYJEFRPIKEYBL－OASIGRBWSA－N	黄柏酮	43.29	0.77
HL－9	XXMJRBRPNZVNJR－UHFFFAOYSA－N	表小檗碱	43.09	0.78
HL－10	OJDYKDYYXBXBIX－UHFFFAOYSA－N	黄连素	36.86	0.78
HL－11	ZHYQCBCBTQWPLC－UHFFFAOYSA－N	8－氧化小檗碱	36.68	0.82
HL－12	VRYRNVUINYKGJK－UHFFFAOYSA－N	小檗红碱	35.74	0.73
HL－13	DJTVMANCSQLMCX－ZEQRLZLVSA－N	palmidin A	35.36	0.65
HL－14	RMOPHAINWJSBTC－UHFFFAOYSA－N	黄连碱	30.67	0.86

3.1.2　苏叶黄连汤治疗 DN 的潜在靶点　苏叶黄连汤活性成分的靶点 8 397 个，Norm Fit 值 > 0.75 的靶点 732 个，其中紫苏叶 456 个，黄连 276 个，删除重复值后得到 100 个靶点。

以“Diabetes Nephropathy”为关键词检索后，Drugbank 数据库得到 20 399 个靶点，OMIM 数据库得到 253 个靶点，GeneCards 数据库得到 1 063 个靶点，合并删除重复值后共得到 1 251 个 DN 相关靶点。

利用微生信网站将活性成分靶点与疾病靶点取交集，共得到 44 个苏叶黄连汤治疗 DN 的潜在靶点，见图 1。

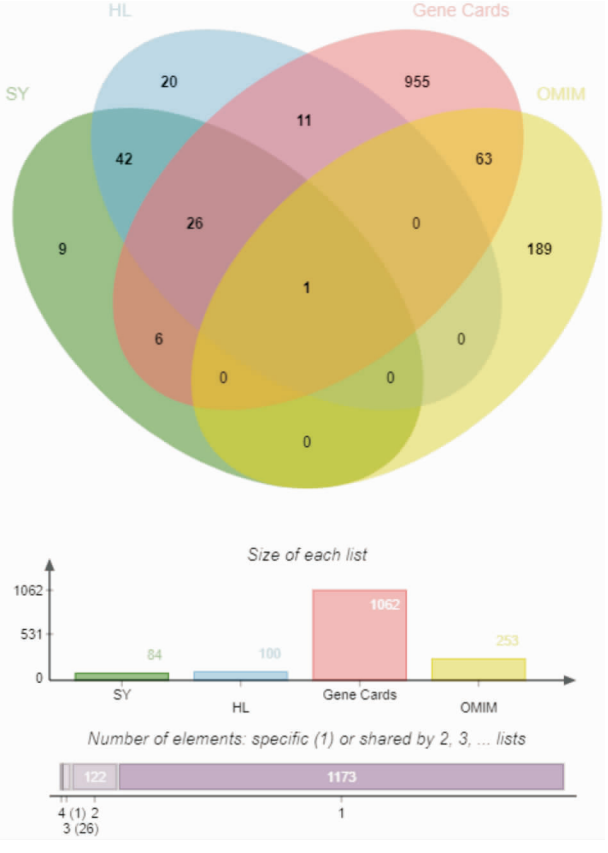


图 1　苏叶黄连汤治疗 DN 潜在靶点韦恩图

3.1.3　苏叶黄连汤治疗 DN 的核心靶点　将 44 个交集靶点导入 STRING 数据库，获取 PPI 网络图，并下载相关的 csv 格式文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件中进行拓扑分析，见图 2。该网络包括 44 个节点和 256 条边，平均度值为 113.8，平均聚类系数为 0.685，说明各靶点之间关联性很强。利用 Cytoscape 3.9.1 软件的 Network Analyzer 插件对各个节点进行关联度分析，关联度较大的节点颜色深且节点宽，得到核心靶点包括 ALB、PPARG、MAPK1、MAPK8、MAPK14、ESR1、EGRF 及 CASP3，其中 MAPK 信号级联通路相关基因较为重要。

3.1.4　GO 和 KEGG 富集分析　KEGG 通路主要包括 MAPK 信号通路、IL－17 信号通路、FoxO 信号通路等，见图 3。GO 功能分析中，生物过程（biological process，BP）主要包括信号转导、凋亡调控等；细胞组分（cellular component，CC）主要包括细胞外基质、细胞质等；分子功能（molecular function，MF）主要包括 MAPK 激活、酶结合、丝氨酸/苏氨酸激酶活性等，见图 4。

3.1.5　“药物－成分－靶点－通路”网络　利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“药物－成分－靶点－通路”网络，见图 5。其中，三角形节点表示 2 种中药，菱形节点表示活性成分，蓝色长方形节点表示核心靶点，黄色椭圆形节点表示 KEGG 通路，节点的透明度表示其度值。结合图 2、图 3 及图 5 的结果，选取 KEGG 分析中富集程度较高的 EGFR－MAPK 信号通路进行后续验证。

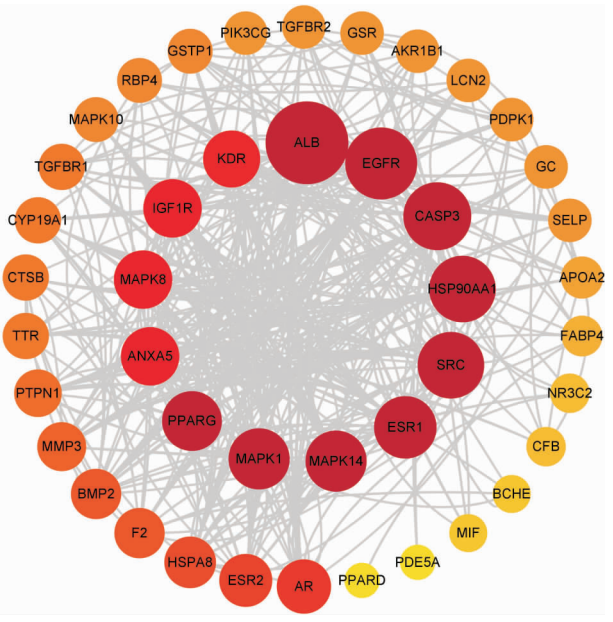


图 2　苏叶黄连汤治疗 DN 潜在靶点的 PPI 网络图

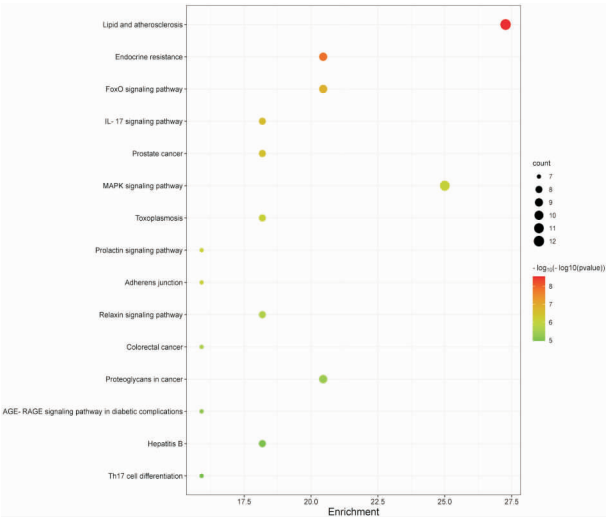


图 3　KEGG 通路气泡图

3.2　细胞实验结果

3.2.1　AGEs、苏叶黄连汤冻干粉的剂量与安全性评价　采用 CCK－8 法检测不同浓度 AGEs 或苏叶黄连汤冻干粉对 HK－2 细胞增殖与毒性的影响，结果显示 AGEs 浓度为 800 mg·L^{-1}时具有显著的细胞毒性，苏叶黄连汤冻干粉浓度为 20 mg·L^{-1}及以下时无细胞毒性，见图 6。因此，选取 400 mg·L^{-1} AGEs 干预 HK－2 细胞诱导 DN 模型，20 mg·L^{-1}苏叶黄连汤冻干粉进行治疗。

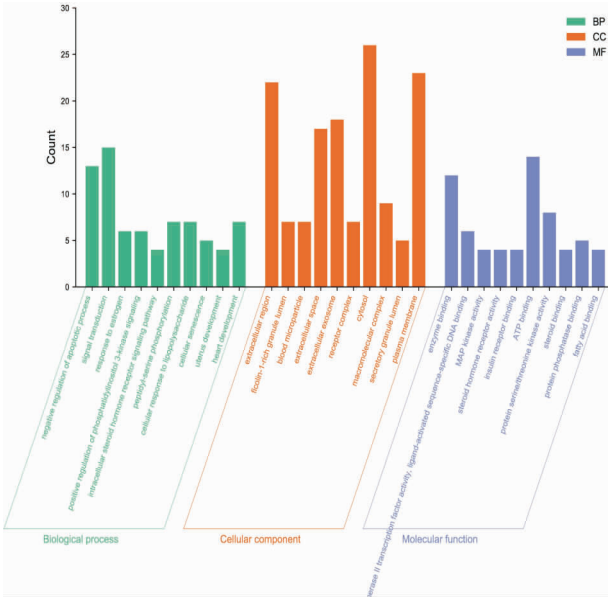


图 4　GO 分析柱状图

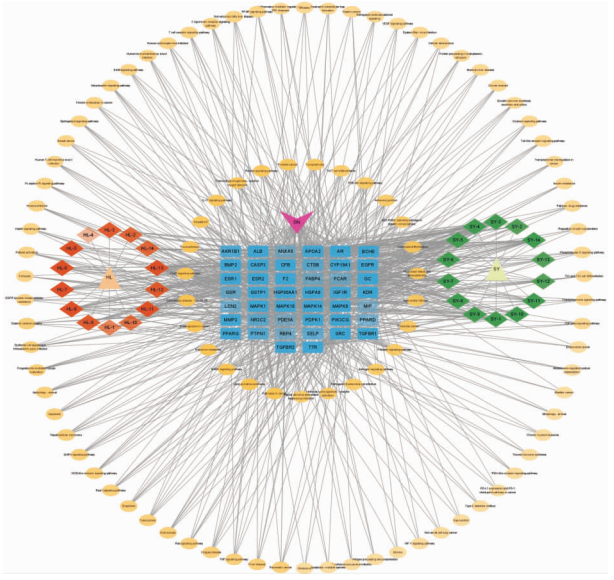
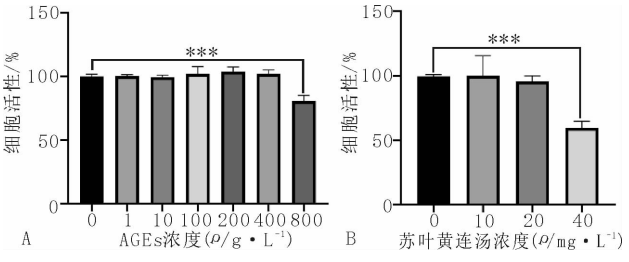


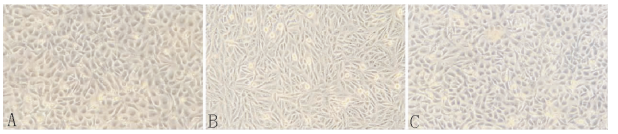
图 5　“药物－成分－靶点－通路”网络图



注：A：AGEs 干预 HK－2 细胞活性比较；B：苏叶黄连汤冻干粉干预 HK－2 细胞活性比较；$n=6$，$***P<0.001$。

图 6　不同质量浓度 AGEs 或苏叶黄连汤冻干粉干预 HK－2 细胞活性比较

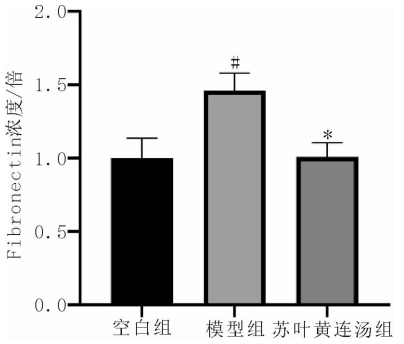
3.2.2　苏叶黄连汤对 AGEs 诱导的 HK－2 细胞形态的影响　空白组 HK－2 细胞呈鹅卵石状。AGEs 诱导 72 h 后，模型组 HK－2 细胞变长，趋于梭形，向成纤维细胞转变。苏叶黄连汤组细胞形态趋向于正常的肾脏上皮细胞，见图 7。



注：A：空白组；B：模型组；C：苏叶黄连汤组。

图 7　各组 HK－2 细胞形态图（200×）

3.2.3　苏叶黄连汤对 HK－2 细胞分泌 Fibronectin 的影响　正常状态下，HK－2 细胞分泌 Fibronectin 较少。AGEs 诱导 72 h 后，与空白组比较，模型组细胞分泌 Fibronectin 增加（$P<0.05$），表明 AGEs 可诱导肾小管上皮细胞纤维化。与模型组比较，苏叶黄连汤组细胞分泌 Fibronectin 减少（$P<0.05$），见图 8。



注：与空白组比较，#$P<0.05$；与模型组比较，*$P<0.05$；纵坐标表示与空白组的比值。

图 8　各组 HK－2 细胞分泌 Fibronectin 比较

3.3　动物实验结果

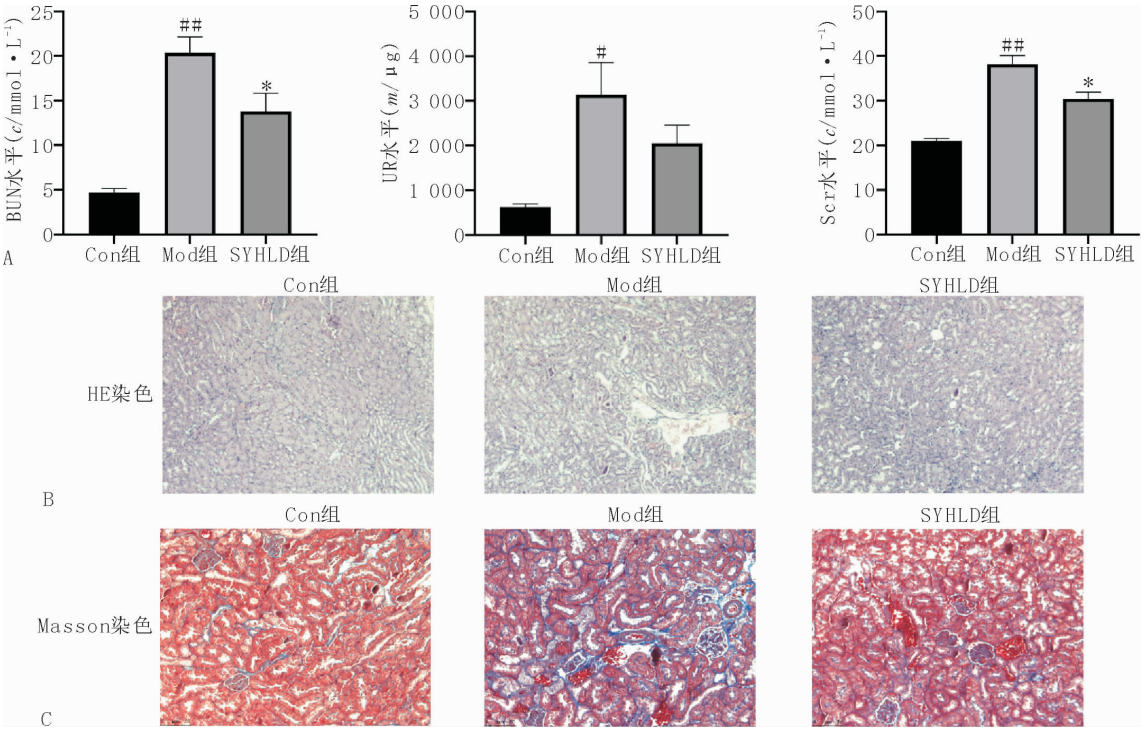
3.3.1　苏叶黄连汤对小鼠肾功能的影响　与 Con 组比较，Mod 组小鼠血清 BUN、Scr 及 UR 水平升高（$P<0.05$）。与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠血清 BUN、Scr 水平降低（$P<0.05$），见图 9A。

HE 染色显示，Mod 组小鼠肾小管出现大量空泡与肾小管萎缩；与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠肾脏病理形态改善，见图 9B。

Masson 染色显示，Mod 组小鼠肾脏胶原纤维增加；与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠肾脏胶原纤维减少，见图 9C。

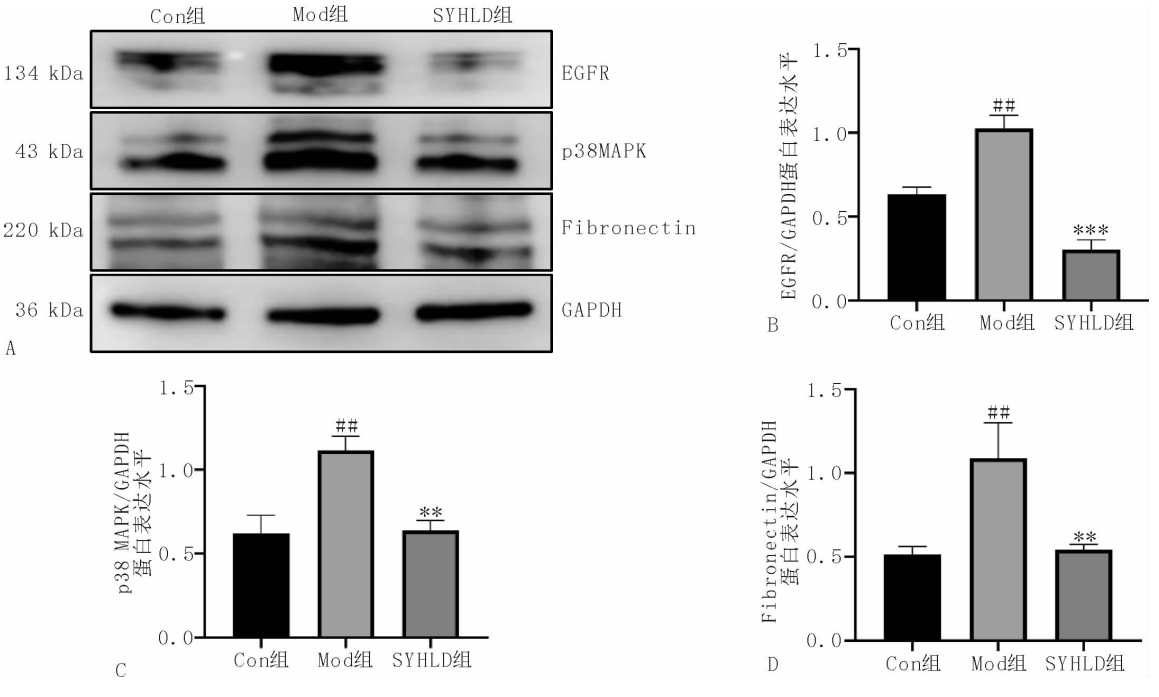
3.3.2　苏叶黄连汤对小鼠肾脏 EGFR－p38 MAPK 信号通路的影响　Western bolt 显示，与 Con 组比较，Mod 组小鼠肾脏 EGFR、p38 MAPK、Fibronectin 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠肾脏 EGFR、p38 MAPK、Fibronectin 蛋白表达水平降低（$P<0.01$），见图 10。

RT－PCR 显示，与 Con 组比较，Mod 组小鼠肾脏 *EGFR* mRNA、*Fibronectin* mRNA 表达水平升高（$P<0.01$）。与 Mod 组比较，SYHLD 组小鼠肾脏 *EGFR* mRNA、*Fibronectin* mRNA 表达水平降低（$P<0.01$），见图 11。



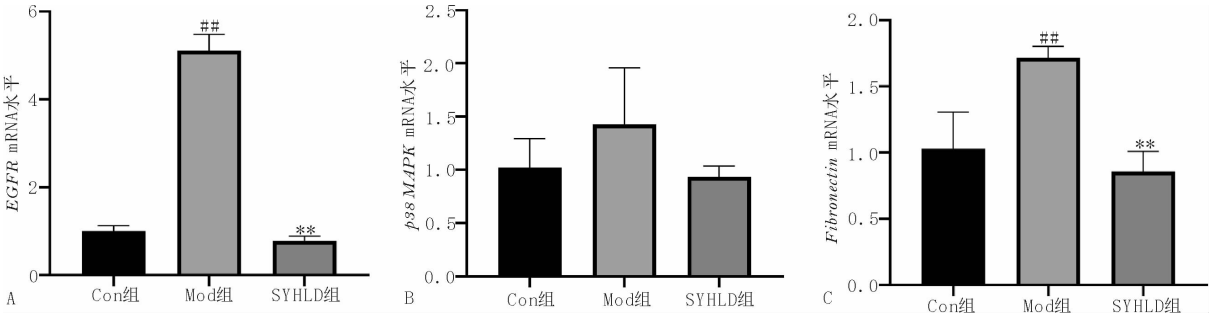
注：A：血清 BUN、Scr 及 UR 水平比较；B：肾脏 HE 染色图；C：肾脏 Masson 染色图；$n=3$；与 Con 组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与 Mod 组比较，*$P<0.05$。

图 9　各组小鼠肾功能相关指标与肾脏病理形态



注：A：EGFR、p38 MAPK、Fibronectin 蛋白条带图；B：EGFR 蛋白表达水平比较；C：p38 MAPK 蛋白表达水平比较；D：Fibronectin 蛋白表达水平比较；$n=3$，与 Con 组比较，##$P<0.01$；与 Mod 组比较，**$P<0.01$，***$P<0.001$。

图 10　各组小鼠肾脏 EGFR、p38 MAPK、Fibronectin 蛋白表达水平比较



注：A：*EGFR* mRNA 水平比较；B：*p38 MAPK* mRNA 水平比较；C：*Fibronectin* mRNA 水平比较；$n=3$，与 Con 组比较，##$P<0.01$；与 Mod 组比较，**$P<0.01$。

图 11　各组小鼠肾脏 *EGFR*、*p38 MAPK*、*Fibronectin* 基因表达水平比较

4　讨论

苏叶黄连汤首载于薛雪《湿热病篇》，后被王孟英收录于《温热经纬》，具有清热燥湿、和胃止呕的功效，主治湿热症[4]，多用于肺胃不和、胃热移肺、呕恶不止等症。该方由黄连和紫苏叶组成，黄连清湿热为君，紫苏叶通肺胃为臣。现代中医临床中，苏叶黄连汤也是治疗慢性肾衰竭、慢性肾脏病的常用方剂[12]。冯骥骋等[13]研究发现，加味苏叶黄连汤能延缓脾肾气虚、湿浊瘀阻型慢性肾功能衰竭的病程进展。肖振卫等[14]创立了一种治疗慢性肾衰竭的中药方剂，该方由苏叶黄连汤配伍麸炒枳实、莪术等药组成，在降低血肌酐、改善慢性肾衰竭症状、提高患者生活质量等方面疗效显著。

传统中药方剂具有多靶点、多成分的特性，一直是中医药研究领域的焦点。2007 年，药理学家 Andrew L. Hopkins 提出“网络药理学”的概念。该方法从药物的组分延伸，通过靶点搜集和数据分析，形成一个全面、系统的网络，从而深入探究药物的作用机制。网络药理学的整体性和系统性特点使其成为研究中药与中药方剂作用机制的理想工具，且已得到广泛应用[15]。王泽鹏等[16]研究发现，苏叶黄连汤治疗慢性肾衰竭的核心靶点为 EGFR。在 DN 进程中，终末期糖基化产物介导的糖化应激会引起 EGFR 的过表达。EGFR 信号的激活可诱导肾小管发生“上皮－间质转化”[17]，进而发展为肾小管间质纤维化，最终导致终末期肾脏病[18]。EGFR 通过激活 p38 MAPK 和 JNK 通路，启动下游基因转录，诱导细胞外基质（extracellular matrix，ECM）沉积[19-20]。另外，EGFR 可直接诱发 ECM 沉积从而介导肾脏纤维化[21]。本研究选择 EGFR－p38 MAPK 通路进行体内实验验证，研究结果与网络药理学的预测结果一致。

苏叶黄连汤治疗 DN 的活性成分主要包括紫苏中的木犀草素、β－胡萝卜素、β－谷甾醇等，黄连中的小檗碱、小檗红碱、槲皮素等。钟轩等[22]研究发现，木犀草素可通过抑制结缔组织生长因子（connective tissue growth factor，CTGF）/EGFR 通路的激活，从而抑制人结肠癌细胞 LOVO 增殖并促进其凋亡。木犀草素可降低长期高血糖诱发的肾脏毒性，延缓肾小球硬化，具有显著的肾保护作用[23]。薛剑等[24]研究发现，紫苏提取物对糖尿病肾脏损伤具有抑制作用。有研究报道，黄连中的重要活性成分小檗碱对糖尿病具有治疗作用[25]。王俊雄[26]研究发现，小檗碱可通过抑制 EGFR 激活，从而抑制胃癌移植瘤生长。陈赓等[27]研究发现，小檗碱通过抑制 p38 MAPK/ERK 通路激活，减少阴茎海绵体细胞凋亡，从而改善糖尿病大鼠阴茎海绵体纤维化并增强勃起功能。

综上所述，苏叶黄连汤可改善 DN 肾脏纤维化，其机制可能与抑制 EGFR－p38 MAPK 信号通路有关。

参考文献：

[1] KOYE D N，MAGLIANO D J，NELSON R G，et al. The global epidemiology of diabetes and kidney disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis，2018，25(2)：121－132.

[2] SUN H，SAEEDI P，KARURANGA S，et al. IDF Diabetes atlas：global，regional and country－level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract，2022，183：109119.

[3] ZHANG X X，KONG J，YUN K. Prevalence of diabetic nephropathy among patients with type 2 diabetes mellitus in China：a meta－analysis of observational studies[J]. J Diabetes Res，2020，2020：2315607.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020.

[5]周鸿飞,吕沛宛. 乌梅丸和加味乌梅汤的方义探讨及临床应用[J]. 中华中医药杂志,2018,33(8):3406 - 3408.
[6]周文霞,程肖蕊,张永祥. 网络药理学:认识药物及发现药物的新理念[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2012,26(1):4 - 9.
[7]NOGALES C, MAMDOUH Z M, LIST M, et al. Network pharmacology:curing causal mechanisms instead of treating symptoms[J]. Trends Pharmacol Sci,2022,43(2):136 - 150.
[8]高世勇,李婉秋,王帅,等. 基于网络药理学的小陷胸汤治疗大肠癌的机制研究[J]. 中草药,2022,53(3):773 - 782.
[9]HOPKINS A L. Network pharmacology:the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol,2008,4(11):682 - 690.
[10]徐三彬,倪建俐,麻志恒,等. 基于网络药理学研究化痰祛瘀方对自发性高血压大鼠早期肾损害的作用机制[J]. 世界中西医结合杂志,2022,17(8):1558 - 1561.
[11]NISHAD R,MESHRAM P,SINGH A K,et al. Activation of Notch1 signaling in podocytes by glucose - derived AGEs contributes to proteinuria[J]. BMJ Open Diabetes Res Care,2020,8(1):e001203.
[12]杨亚淅,王瑞,钱程程,等. 乌梅化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测[J]. 中成药,2023,45(5):1583 - 1588.
[13]冯骥骋,邵和平. 加味苏叶黄连汤治疗慢性肾功能衰竭的体会[J]. 中国社区医师(医学专业),2010,12(16):131.
[14]肖振卫,董美辰,朱羽硕,等. 一种用于治疗慢性肾衰竭的中药组合物:CN113304234B[P]. 2022 - 05 - 06.
[15]LI X,QIN X M,TIAN J S,et al. Integrated network pharmacology and metabolomics to dissect the combination mechanisms of Bupleurum chinense DC - Paeonia lactiflora Pall herb pair for treating depression[J]. J Ethnopharmacol,2021,264:113281.
[16]王泽鹏,张法荣. 基于网络药理学的苏叶黄连汤治疗慢性肾衰竭机制研究[J]. 山东中医药大学学报,2021,45(2):209 - 216.
[17]NILSSON M B,SUN H Y,ROBICHAUX J,et al. A YAP/FOXM1 axis mediates EMT - associated EGFR inhibitor resistance and increased expression of spindle assembly checkpoint components[J]. Sci Transl Med, 2020, 12(559):eaaz4589.
[18]WU H J,SHI Y H,DENG X N,et al. Inhibition of c - Src/p38 MAPK pathway ameliorates renal tubular epithelial cells apoptosis in db/db mice[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015,417:27 - 35.
[19]HIYAMA A,GOGATE S S,GAJGHATE S,et al. BMP - 2 and TGF - beta stimulate expression of beta1,3 - glucuronosyl transferase 1 (GlcAT - 1) in nucleus pulposus cells through AP1,TonEBP,and Sp1:role of MAPKs[J]. J Bone Miner Res,2010,25(5):1179 - 1190.
[20]XIE R J,LI B F,JIA L E,et al. Identification of core genes and pathways in melanoma metastasis via bioinformatics analysis[J]. Int J Mol Sci,2022,23(2):794.
[21]HAY E,LEMONNIER J,FROMIGUE O,et al. Bone morphogenetic protein - 2 promotes osteoblast apoptosis through a smad - independent,protein kinase C - dependent signaling pathway[J]. J Biol Chem,2001,276(31):29028 - 29036.
[22]钟轩,王红钰,高建超,等. 木犀草素通过 CTGF/EGFR 通路对人结肠癌细胞 LoVo 增殖和凋亡的影响[J]. 中南医学科学杂志,2022,50(4):486 - 490.
[23]XIONG C,WU Q L,FANG M L,et al. Protective effects of luteolin on nephrotoxicity induced by long - term hyperglycaemia in rats[J]. J Int Med Res, 2020, 48(4):300060520903642.
[24]薛剑,乔晨. 紫苏叶提取物通过 AMPK/mTOR 自噬信号通路改善糖尿病肾病大鼠肾脏损伤研究[J]. 中医药学报,2023,51(9):18 - 22.
[25]檀华敏. 盐酸小檗碱治疗糖尿病 5 例[J]. 医药导报,1996,15(6):297.
[26]王俊雄. 小檗碱抑制 EGFR/STAT3 通路增加胃癌 EGFR 抑制剂敏感性的机制研究[D]. 北京:首都医科大学,2017.
[27]陈赓,王健,钱小凤,等. 小檗碱通过 p38 MAPK/ERK 通路抑制阴茎海绵体细胞凋亡以增强糖尿病大鼠勃起功能[J]. 解剖学研究,2022,44(4):313 - 319.

收稿日期:2025 - 05 - 15
作者简介:杨云华(1980 -),男,河南鲁山人,医学硕士,研究方向:中医内科学。
通信作者:龚伟伟,女,医学博士,教授,博士研究生导师,研究方向:中医内科学。E - mail:andygdw@126.com
编辑:刘凯歌