卓越医见：中药药理学与疾病 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003867

基于网络药理学探讨脉络宁治疗急性肾损伤的作用机制

严嘉敏[1]，谢乐意[1]，陈柏年[2]，范健辉[1]，李　傲[3]
（1.广东医科大学附属医院麻醉科，湛江　524001；2.广东医科大学附属医院呼吸内科，湛江　524001；
3.广东医科大学附属医院临床研究实验中心，湛江　524001）

【摘　要】目的：通过网络药理学方法，探讨脉络宁（mailuoning，MLN）对顺铂（cisplatin，CP）诱导的急性肾损伤（acute kidney injury，AKI）的保护作用，并分析其与抗凋亡途径相关的作用机制。**方法：**通过网络药理学筛选MLN活性成分及AKI相关靶点：基于TCMSP和ETCM 2.0数据库获取MLN活性成分，利用Swiss Target Prediction预测成分靶点，结合GeneCards筛选AKI疾病靶点，取交集后通过STRING数据库构建蛋白-蛋白互作（protein-protein interaction，PPI）网络，Cytoscape拓扑分析筛选核心靶点，并对其进行基因本体（gene ontology，GO）功能注释及京都基因与基因组百科全书（kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析。动物实验：40只小鼠随机分为溶剂对照、MLN毒性对照、CP模型及CP+MLN组。MLN组以15 mL/（kg·d）腹腔注射MLN连续10 d；CP模型与CP+MLN组于第7天单次腹腔注射CP（20 mg/kg）。CP干预3 d后检测血浆尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）及肌酐（creatinine，Cre）水平，苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色评估肾组织病理损伤，Western blot检测肾组织中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白（neutrophil gelatinase-associated lipocalin，NGAL）及凋亡相关蛋白表达。**结果：**网络药理学筛选得到104种MLN活性成分及224个作用靶点，AKI靶点2 465个，交集靶点117个，其中17个被认定为核心靶点。通过KEGG和GO分析发现，凋亡相关信号转导通路可能是MLN防治AKI的重要作用通路。动物实验结果证实成功构建了CP诱导的小鼠AKI模型，与CP模型组相比，MLN处理明显降低了血浆中BUN和Cre水平（$P<0.05$），抑制了肾脏NGAL蛋白表达（$P<0.05$），同时缓解了肾组织的病理学损伤。此外，MLN明显降低了AKI模型小鼠肾组织中p-P53（ser 15）、cleaved caspase-3蛋白的表达及Bax/Bcl-2蛋白表达量的相对比值（$P<0.05$），同时上调蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）磷酸化水平（$P<0.05$）。**结论：**MLN对CP诱导的小鼠AKI具有保护作用，其作用机制可能与其抗凋亡特性相关。

【关键词】网络药理学；脉络宁；顺铂；急性肾损伤；抗凋亡
【中图分类号】R285　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2025-04-12

Investigation on the mechanism of action of Mailuoning in the treatment of acute kidney injury using network pharmacology

Yan Jiamin[1], Xie Leyi[1], Chen Bonian[2], Fan Jianhui[1], Li Ao[3]
(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University; 2. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University; 3.Clinical Research Laboratory Center of Affiliated Hospital of Guangdong Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the protective effects of Mailuoning (MLN) against cisplatin (CP)-induced acute kidney injury (AKI) utilizing network pharmacology and to analyze the underlying mechanism of action related to anti-apoptotic pathways. ***Methods*:** Active components of MLN and targets related to AKI were identified using network pharmacology. The active components of MLN were sourced from the TCMSP and ETCM 2.0 databases. The targets of components were predicted using the Swiss Target Prediction tool, and subsequently the targets related to AKI were retrieved from the GeneCards database to identify intersecting targets. A protein-protein interaction network was constructed using the STRING database, and a topological analysis was performed using Cytoscape to identify core targets. Gene Ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were conducted on these core targets. For the animal experiments, forty mice were randomly assigned to four groups: solvent control, MLN toxicity control, CP model, and CP+MLN groups. The MLN group received intraperitoneal injections of MLN at a dose of 15 mL/(kg·d) for ten consecutive days. The CP model and CP+MLN groups were administered a single intraperitoneal injection of CP at 20 mg/kg on day 7. Three days after the CP treatment, plasma levels of blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cre) were measured. The pathological injury of kidney tissues was assessed using hematoxylin-eosin staining. Western blot analysis was utilized to determine the expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and apoptosis-related proteins in kid-

作者介绍：严嘉敏，Email：jm_yim@163.com，
研究方向：中医药防治肾损伤。
通信作者：李　傲，Email：ao_livip@sina.com。
基金项目：广东省基础与应用基础研究基金资助项目（编号：2022A1515010097）；广东医科大学附属医院高层次人才科研启动资助项目（编号：GCC2020009）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250522.1623.008（2025-05-23）

ney tissues. ***Results***: A total of 104 active components of MLN and 224 targets were identified using network pharmacology, and 2 465 targets were identified to be related to AKI, resulting in 117 intersecting targets, of which, 17 targets were classified as core targets. KEGG and GO analyses indicated that the apoptosis-related signal transduction pathway might be a crucial pathway through which MLN provided protective effects against AKI. The results of animal experiments confirmed the successful establishment of CP-induced AKI models in mice. Compared with the CP model group, MLN treatment significantly reduced plasma levels of BUN and Cre ($P<0.05$), inhibited NGAL protein expression in the kidneys ($P<0.05$), and improved the pathological injury observed in kidney tissues. Furthermore, MLN markedly reduced the expression levels of p-P53 (ser 15) and cleaved caspase-3 proteins, as well as the Bax/Bcl-2 ratio in kidney tissues of AKI model mice ($P<0.05$), while upregulating protein kinase B phosphorylation levels ($P<0.05$). ***Conclusion***: MLN demonstrates protective effects against CP-induced AKI in mice, potentially through mechanisms related to its anti-apoptotic properties.

【Key words】network pharmacology; Mailuoning; cisplatin; acute kidney injury; anti-apoptosis

急性肾损伤（acute kidney injury, AKI）是一种常见的临床综合征，表现为肾功能的急剧下降，可能导致严重的健康后果[1]。顺铂（cisplatin, CP）是一种广谱抗肿瘤药物，被广泛用于多种实体瘤的治疗，如膀胱癌、肺癌、卵巢癌和睾丸癌等[2]。然而，CP在临床应用中常伴随严重的肾毒性。研究发现，约30%的癌症患者接受CP治疗时会出现AKI，这种反应不仅影响患者的生活质量，还对治疗效果产生负面影响[3]。目前，CP引起的AKI还缺乏有效的治疗药物。

在中医学上，CP所致的肾毒性损伤被归类于“药毒”范畴。临床上，治疗的基本原则是扶正祛邪，同时采用活血化瘀、补益脾肾、利水解毒等方法[4]。其中，活血化瘀的中药不仅通过调节血液流变学和改善微循环障碍，来减轻肾脏损伤；它们所含的活性成分还可以减少氧化应激和炎症反应，从而降低肾小管细胞的损伤和凋亡[5-7]。脉络宁（mailuoning, MLN）是一种改良自传统中药方“四妙勇安汤”的中药复方注射剂。该注射液由金银花、玄参、石斛和牛膝4味中药组成，具有清热养阴和活血化瘀的功效，主要用于治疗各种血瘀证，包括血栓闭塞性脉管炎、静脉血栓形成、动脉硬化闭塞症和脑血栓形成。此外，MLN已被证实有助于慢性肾小球肾炎患者的肾功能恢复[8-11]。研究发现，MLN具有抑制凋亡和氧化应激的作用，能激活蛋白激酶B（protein kinase B, AKT）信号通路，从而明显降低内皮细胞凋亡。此外，MLN通过其有效成分咖啡酸发挥抗血小板作用，减少血管内的血栓形成[12-13]。然而，尚不清楚MLN是否能改善CP引起的AKI。本研究采用网络药理学方法，筛选MLN治疗AKI作用的相关靶点和通路，并构建CP诱导的小鼠AKI模型进行初步验证，为MLN临床治疗AKI提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品与试剂 MLN注射液（批号：20240409，国药准字：Z32021102）购自金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂；CP购自上海毕得医药科技股份有限公司，肌酐（creatinine, Cre）和尿素氮（blood urea nitrogen, BUN）试剂盒购自南京建成生物工程研究所；中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白（neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL）抗体购自泰州佰嘉生物科技有限公司，Bcl-2抗体购自碧云天公司，裂解形式caspase-3（cleaved caspase-3）和p-P53（ser 15）抗体购自Cell Signaling Technology公司，Bax抗体购自合肥善本生物科技有限公司，p-AKT（Thr 308）抗体购自巴傲得生物科技有限公司，AKT抗体购自华安生物科技有限公司。

1.1.2 仪器 LUKYM-Ⅱ组织研磨器购自广州露卡测序仪器有限公司，HistoCore Arcadia包埋机和CM1850UV切片机购自徕卡仪器公司，PALM MicroBeam组织病理图像拍摄购自ZEISS公司，Hesper化学发光成像系统购自莫纳生物科技有限公司。

1.1.3 动物 SPF级C57BL/6小鼠40只（雄性，6~8周，18~21 g），购自江苏华创信诺医药科技有限公司，生产许可证号：SCXK（苏）2020-0009，实验动物饲养于广东医科大学附属医院实验动物中心的屏障系统内。饲养条件为温度20 ℃~25 ℃，相对湿度（70±10）%，12 h光/暗周期循环，自由进食及饮水，适应7 d后进行实验。本研究得到广东医科大学实验动物伦理委员会的审查批准（批准号：GDY2102346）。

1.2 实验方法

1.2.1 MLN化学成分与潜在靶点的筛选 利用TCMSP数据库（https://www.tcmsp-e.com/tcmsp.php）和ETCM 2.0数据库（http://www.tcmip.cn/ETCM2/front/#/），以“金银花、玄参、石斛及牛膝”为关键词检索获得活性成分，在TCMSP数据库中按照口服生物利用度（oral bioavailability, OB）≥30%和类药性（drug likeness, DL）≥0.18为标准进行筛选。在ETCM数据库中筛选出QED得分>0.67的化合物。通过Pubchem数据库检索所含成分对应的SMILES号，借助Swiss Target Prediction（http://swisstargetprediction.ch/index.php）数据库进行靶点预测，获得MLN活性成分合集及对应靶点合集。

1.2.2 构建药物与有效成分关系的网络图 本研究采用Cytoscape3.8.2版本，将1.2.1筛选得到的药物活性成分及靶点导入构建药物-有效成分网络图。

1.2.3 AKI疾病相关靶点及药物-疾病共同靶点获取 利用疾病数据库GeneCards（https://www.genecards.org/），以“acute kidney injury”为关键词检索，对AKI的靶点进行收集，汇总后去除重复信息，获得AKI相关作用靶点。使用在线绘制韦恩图工具（https://www.bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn/）绘制MLN活性成分对应的靶点和疾病靶点韦恩图，得到MLN和AKI的共同靶点。

1.2.4 药物-活性成分-共有靶点网络图 为了可视化和阐明化合物、途径和靶标之间的复杂关联，利用Cytoscape3.8.2软件构建“药物-活性成分-共有靶点”网络，每个节点分别代表“药物、活性成分和共有靶点”。

1.2.5 核心靶点-非核心靶点网络图构建及枢纽基因筛选 将MLN和AKI共同靶点导入STRING数据库进行分析，蛋白种类设置为“Homo sapiens”，最低相互作用阈值设为“high confidence（0.900）”，获得蛋白质相互作用关系，保留所构建的蛋白-蛋白互作（protein-protein interaction，PPI）网络图，并以tsv文件格式导出后，利用Cytoscape3.8.2软件构建核心靶点-非核心靶点网络图。随后，用Cytoscape3.8.2中的CytoHubba插件识别枢纽基因。此外，使用Cytoscape3.8.2中的MCODE插件进一步细化PPI网络图，从中获得核心网络用于后续分析，以degree=2，k-core=2，node score=0.2，max depth=100为参数设置[14]。利用Cytoscape3.8.2软件中的插件CytoNCA，以半数度中心性（degree centrality，DC），接近中心性（closeness centrality，CC）和中介中心性（betweenness centrality，BC）作为第1次筛选条件，以≥2倍的中值DC作为第2次筛选条件，通过2次筛选，最终获得核心靶点。

1.2.6 基因本体（gene ontology，GO）和KEGG分析 利用R软件Bioconductor包对交集靶点进行GO分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路分析。最后，将分析得到的靶点和信号通路相对应，运用Cytoscape3.8.2软件构建靶点-信号通路网络模型。

1.2.7 造模及给药方法 称量小鼠体质量，将40只SPF级雄性C57BL/6按照每组10只，随机分为4组：溶剂对照组（vehicle control）、MLN毒性对照组（MLN toxicity control）、CP模型组（CP model）和CP+MLN组。小鼠每日腹腔注射给予15 mL/kg的MLN[15]，溶剂对照组和CP模型组给予同等剂量的生理盐水，连续10 d，1次/d。给药第7天，禁食不禁水12 h后，CP模型组和CP+MLN组通过腹腔注射20 mg/kg CP来制备AKI模型。小鼠造模剂量及实验方案参考文献[16-18]的方法，略有修改。

1.2.8 血浆肾功能检测 造模第3天，禁食不禁水12 h，末次给药1 h后，各组小鼠经戊巴比妥麻醉后，进行眶后静脉丛取血，用肝素抗凝管收集血样，4 ℃，转速3 000 r/min，离心15 min，收集血浆，严格按照试剂盒说明书所述方法检测血浆中血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、血肌酐（creatinine，Cre）水平。

1.2.9 肾脏病理组织检测 取各组肾组织样本置于4%多聚甲醛溶液固定后，依次经梯度乙醇脱水处理，常规石蜡包埋，制备切片。采用HE染色法对切片进行染色，光镜下随机选取区域进行拍照，以客观评估肾脏组织的损伤程度。对肾脏病理损伤程度按照以下标准进行评分：0分，正常肾组织；1分，肾小管受损范围<25%；2分，肾小管受损范围25%~50%；3分，肾小管受损范围50%~75%；4分，肾小管受损范围>75%[19]。

1.2.10 免疫印迹法检测小鼠肾组织相关蛋白表达情况 取各组小鼠肾组织，提取肾组织总蛋白，BCA蛋白定量后进行电泳、转膜，5%脱脂奶粉室温封闭1 h，在4 ℃孵育一抗（稀释比例：1∶1 000）过夜，室温孵育二抗（稀释比例：1∶10 000）1 h，膜洗涤后使用凝胶成像仪显影、拍照，采用Image J软件分析蛋白条带灰度值。

1.3 统计学方法

所有数据采用Origin version 8.0进行统计学分析。数据正态性检验通过Shapiro-Wilk检验进行评估，符合正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；非正态性分布的计量资料则采用中位数（四分位间距）[M_d（P_{25}，P_{75}）]表示。对于正态分布数据，采用单因素方差分析，当组间差异有统计学意义（P<0.05）时，则使用Tukey多重比较检验进行事后分析；非正态分布数据采用Kruskal-Wallis检验，若检验结果显示差异有统计学意义（P<0.05），则通过Dunn多重比较检验进行组间两两比较。检验水准α=0.05。

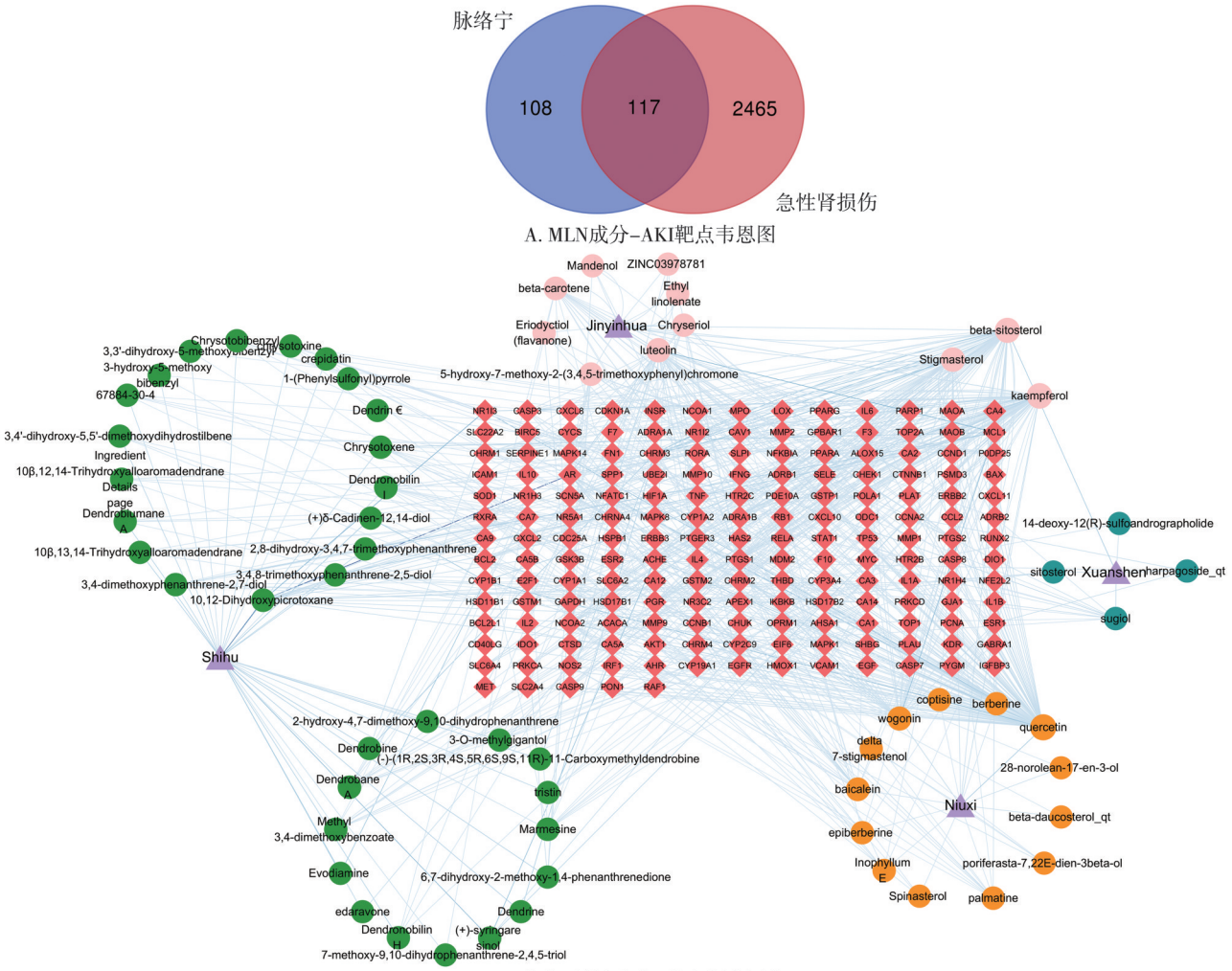
2 结 果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 MLN活性成分的筛选 通过TCMSP和ETCM 2.0平台数据挖掘，分别以OB≥30%，DL≥0.18和QED得分>0.67作为筛选条件，筛选出与4味中药相关的104个活性成分，共获得活性成分对应的靶点940个，删除重复靶点后最终获得224个活性成分对应靶点。

2.1.2 MLN与AKI的共同靶点及网络构建分析 通过GeneCards数据库共检索到2 465个与AKI相关的靶点基因，将AKI相关及MLN活性成分对应的靶点输入在线绘制韦恩图工具，绘制韦恩图，取其交集后，共发现117个潜在治疗靶点与MLN靶点和AKI相关基因相交（图1A）。将2.1.1和2.1.2收集到的数据导入Cytoscape3.8.2构建中药-活性成分-共有靶点网络图（图1B）。网络包含183个节点和764条边，其中4个三角形节点表示MLN的4个中药材，62个圆形和箭头节点表示MLN活性成分，117个菱形节点表示MLN和AKI共有的靶点基因，该网络结果表明，每个靶点都受到多种活性成分的影响，每个活性成分都能作用于多个蛋白质靶点。因此，推测MLN可能通过多组分和多靶点在AKI中发挥肾保护作用。

2.1.3 PPI网络的构建与核心成分的筛选 将前面得到的117个交集靶点输入STRING数据库，将最低互作阈值设定为0.9，得到1个107个节点、397条连线的PPI网络图，将其导入Cytoscape3.8.2中构建核心和非核心靶标网络（图2A）。随后，通过Cytoscape中CytoHubba插件中MCC算法，对PPI数据进行分析，计算出排名前10位的基因作为枢纽基因（图



A. MLN成分–AKI靶点韦恩图

B. 中药–活性成分–共有靶点网络

注：三角形代表中药材；圆形代表有效活性成分；V形代表其他活性成分；菱形代表MLN与AKI共有靶点；各活性成分节点按度值大小进行排序，每个节点的度值由颜色强度和大小表示，颜色越深，体积越大，代表节点在网络中发挥的作用越重要；边在网络中的颜色越深，代表节点间的交互作用越强

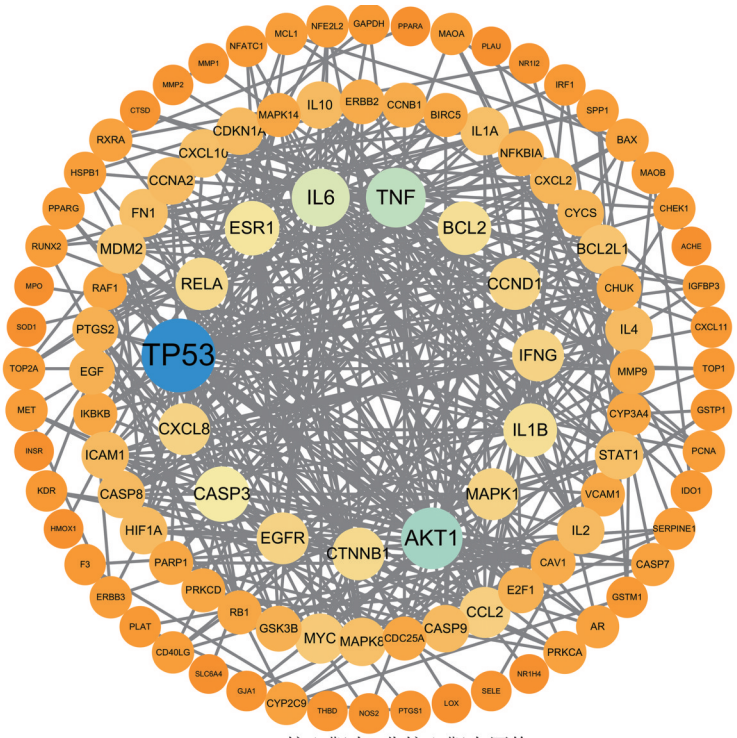
图1　MLN成分和AKI靶点交集韦恩图与网络构建

2B）。此外，使用Cytoscape中MCODE插件进行聚类分析，构建高度连接的子网络，并将靶点分配成4组（图2C）。利用Cytoscape3.8.2软件中CytoNCA插件，进行DC、BC、CC数据分析，并分别计算其中位数，并以此为筛选条件进行第一次核心靶点筛选，然后以第1次筛选结果中2倍DC作为筛选条件再次筛选，得到17个核心靶点，结果提示MLN缓解AKI作用与肿瘤蛋白53（tumor protein 53，TP53）、白细胞介素6（interleukin 6，IL-6）、AKT1、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、雌激素受体1（estrogen receptor 1，ESR1）、半胱天冬酶3（caspase-3）、B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma 2，Bcl-2）等靶点密切相关（图2D）。

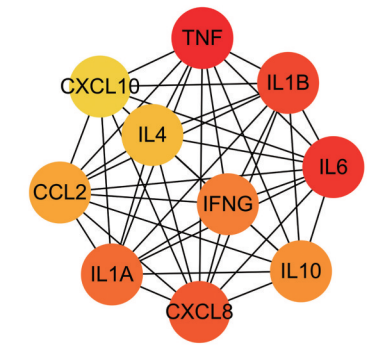
2.1.4　GO、KEGG通路富集分析和靶点–信号通路网络图的构建　使用R软件对核心靶点进行GO富集分析，共获得2 993条生物信息，MLN治疗AKI与2 097个生物过程（biological process，BP）、55个细胞组成（cellular component，CC）和141个分子功能（molecular function，MF）相关（$P<0.05$），对前20项进行可视化。BP主要包括对脂多糖的应答、凋亡信号通路的调控和对外源性刺激的反应等方面；CC主要表现在脂筏、Bcl-2家族蛋白复合体和膜微域等位置；MF主要包括DNA结合转录因子结合、RNA聚合酶Ⅱ特异性DNA结合转录因子结合和转录共调节因子结合等方面（图3A）。采用KEGG通路富集分析来确定AKI处理中MLN明显改变的通路，结果显示有175条信号通路明显富集，并对前20项进行可视化。结果表明，MLN在AKI治疗中的主要药理机制可能与脂质和动脉粥样硬化信号通路、凋亡信号通路、PI3K-AKT信号通路、TNF信号通路等有关（图3B）。将排名前20的KEGG信号通路及相对应的靶点导入Cytoscape3.8.2软件中，构建了1个包含102个节点和498条边的靶点–信号通路网络（图3C），提示MLN活性成分通过多靶点、多途径治疗AKI。

2.2　*动物实验结果*

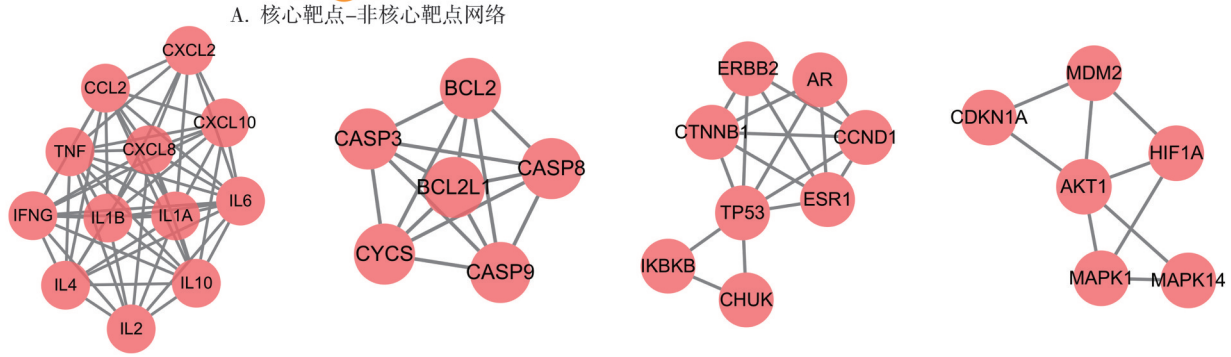
2.2.1　MLN对小鼠肾组织病理变化的影响　HE染色结果显示，溶剂对照组和MLN毒性对照组小鼠肾组织结构完整，肾小管排列有序（图4A）；CP模型组小鼠肾组织可见明显肾



A. 核心靶点–非核心靶点网络



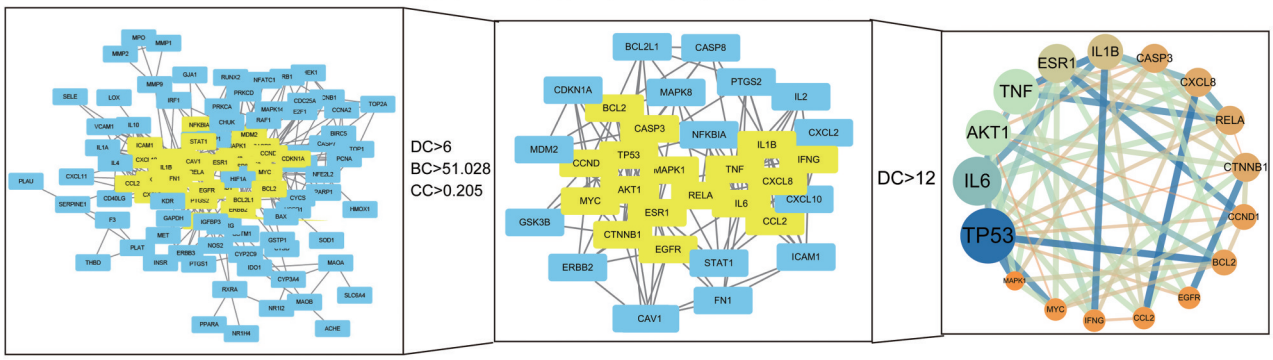
B. 使用CytoHubba插件进行枢纽基因筛选



簇1　　簇2　　簇3　　簇4

12个节点和59条边　　6个节点和15条边　　8个节点和17条边　　6个节点和9条边

C. 使用MCODE插件进行基于聚类分析的PPI网络

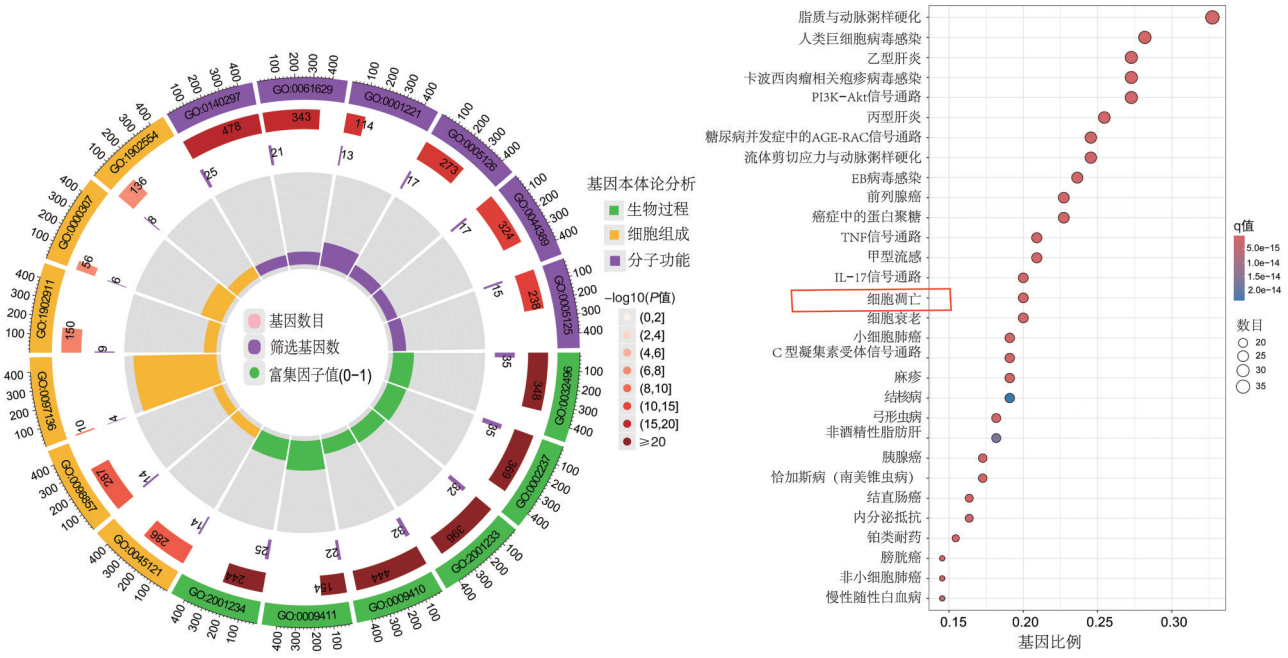


D. 利用cytoNCA插件进行核心靶点筛选

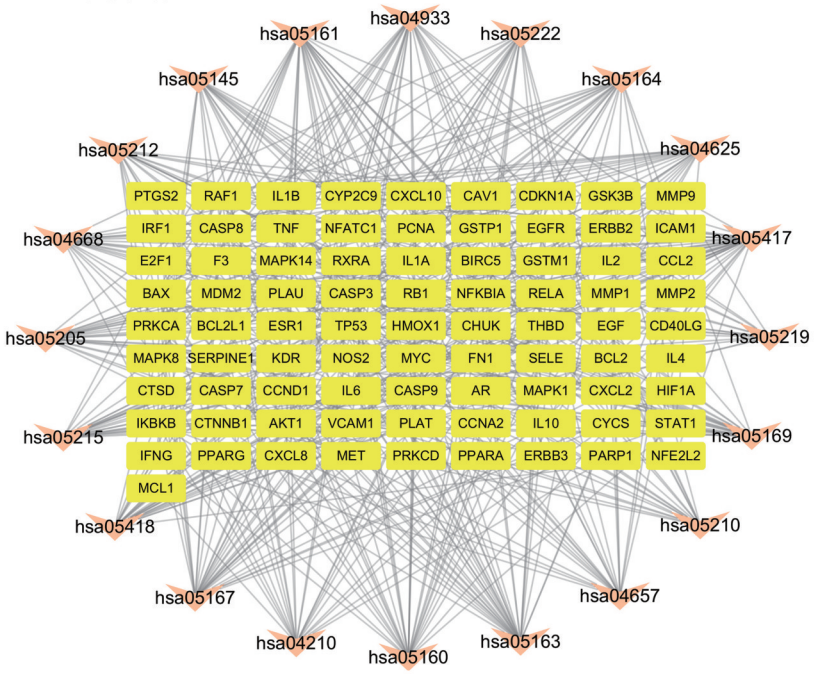
图2　PPI网络分析及核心靶点筛选

小管上皮细胞肿胀和脱落，同时肾小管腔内伴有管型形成，而肾小球形态没有明显变化，肾损伤评分明显增加（图4B）。与模型组相比，MLN处理后，肾脏损伤程度明显改善，肾损伤评分明显降低（χ^2=14.358，P<0.05）。

2.2.2　MLN对CP诱导的AKI模型小鼠肾功能的影响　BUN和Cre是传统的AKI检测指标，但它们在早期诊断中的敏感性和特异性较低；NGAL作为一种较新的生物标志物，在AKI的早期检测中显示出更高的敏感性和特异性[20]。如图4C~F



A. GO功能分析　　B. KEGG通路富集分析



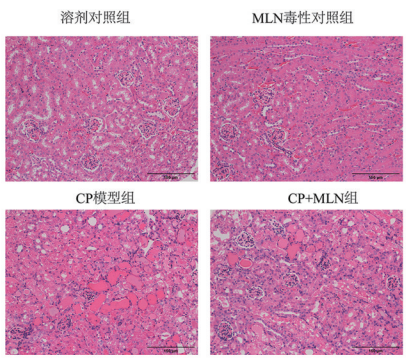
C. 靶点-信号通路网络

图3　GO和KEGG富集分析及信号通路-靶点网络的构建

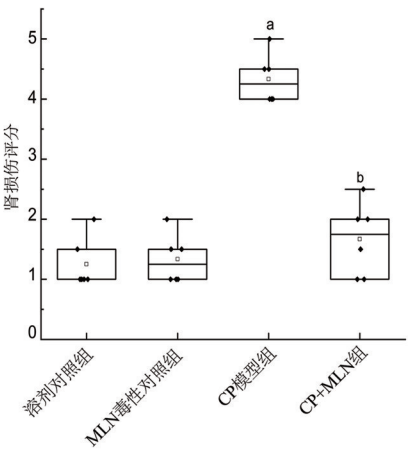
显示，与溶剂对照组相比，单用MLN处理后，小鼠血浆中Cre和BUN及肾组织中NGAL表达水平无明显改变。与溶剂对照组相比，AKI模型组小鼠血浆中Cre和BUN水平明显增加（χ^2=14.924、1.621，均P<0.05），小鼠肾组织损伤标志物蛋白NGAL表达也明显升高（F=51.918，P<0.05）；与模型组比较，MLN处理能明显降低AKI模型小鼠血浆中Cre和BUN水平，同时降低小鼠肾组织中NGAL蛋白表达水平（F=29.834，P<0.05），提示MLN可以有效保护CP损伤后小鼠的肾功能。

2.2.3　MLN通过抗凋亡途径减轻CP诱导的肾小管损伤　CP诱导的AKI核心机制涉及肾小管上皮细胞凋亡，CP可能通过激活P53信号，P53可以通过抑制AKT信号通路，上调Bax/Bcl-2比率，导致线粒体途径凋亡级联反应启动，活化的caspase-3进一步切割关键细胞结构蛋白，最终引发肾小管上皮细胞不可逆性凋亡和肾功能损伤[21-23]。因此，本研究通过Western blot法，对调控凋亡的相关蛋白Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、p-P53（ser 15）、p-AKT（Thr 308）和AKT蛋白表达水平进行检测（图4E，G~J）。结果发现，溶剂对照组和MLN毒性对照组仅表达少量p-P53（ser 15）、Bax和cleaved caspase-3，同时有较高的Bcl-2和p-AKT（Thr 308）蛋白表达；与溶剂对照组相比，CP模型组p-P53（ser 15）、Bax

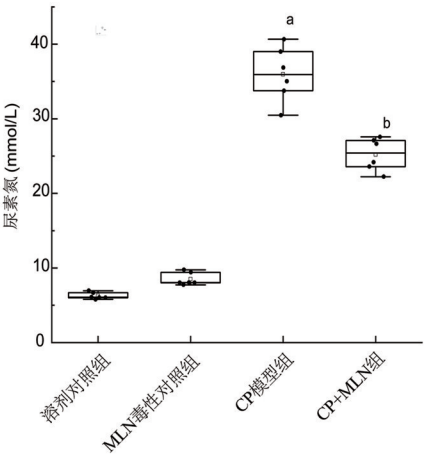
和 cleaved caspase-3 的表达水平明显升高（F=263.312、178.517、60.621，P<0.05），Bax/Bcl-2 蛋白表达量相对比值也明显升高（F=324.212，P<0.05），AKT 磷酸化水平明显降低（F=56.714，P<0.05）；经 MLN 处理后，可明显降低 CP 模型组 p-P53（ser 15）、cleaved caspase-3 的表达水平，同时降低 Bax/Bcl-2 蛋白表达量的相对比值（F=33.454，P<0.05）；此外，与 CP 模型组相比，MLN 处理还可以上调 CP 诱导减少的 AKT 磷酸化水平（F=45.337，P<0.05）。上述结果提示，MLN 通过抑制小鼠肾小管上皮细胞凋亡信号途径，发挥其改善 CP 诱导的 AKI 作用。



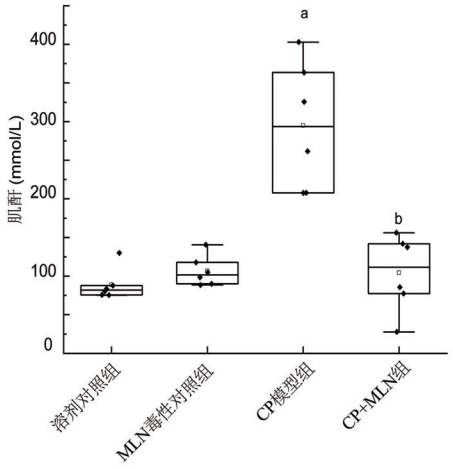
A. 小鼠肾组织的HE染色



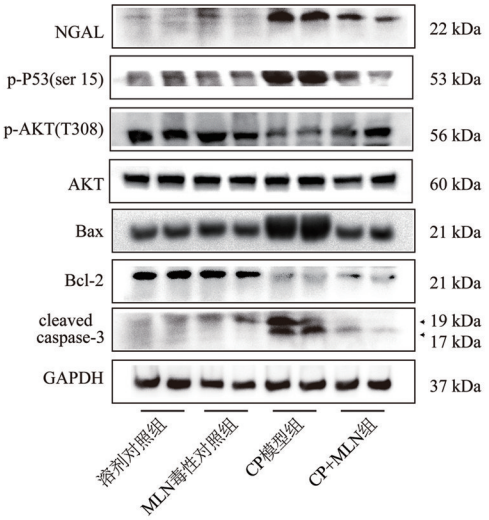
B. 肾损伤评分



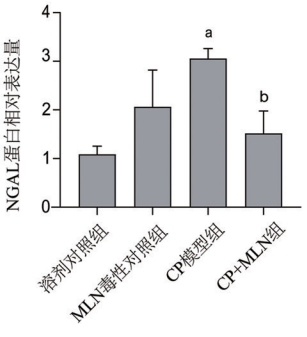
C. 小鼠血浆BUN水平



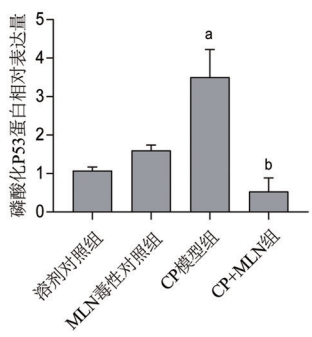
D. 小鼠血浆Cre水平



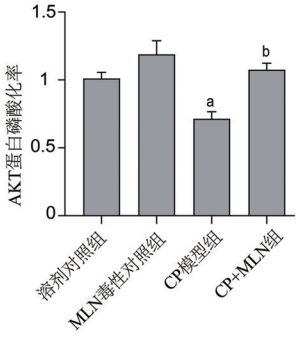
E. 小鼠NGAL和抗凋亡途径相关蛋白的Western blot法检测结果



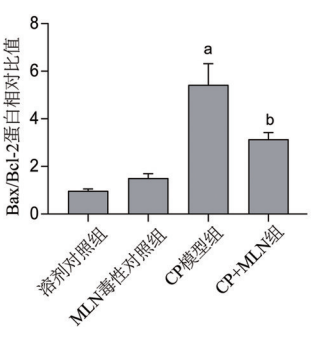
F. NGAL蛋白相对表达量



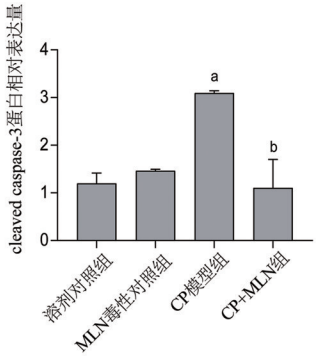
G. 磷酸化P53蛋白相对表达量



H. AKT蛋白磷酸化率



I. Bax/Bcl-2蛋白相对比值



J. cleaved caspase-3蛋白相对表达量

注：a，与溶剂对照组比较，P<0.05；b，与 CP 模型组比较，P<0.05；标尺=150 μm

图 4　MLN 对 CP 诱导的肾小管损伤和细胞凋亡关键蛋白的影响（n=6）

3 讨 论

中药复方作为传统医学的重要组成部分，其多成分和多靶点的特点使其在治疗复杂疾病中展现出独特优势。然而，作用机制和物质基础的复杂性增加了中药复方研究的难度。随着现代药理学和系统生物学的发展，越来越多的研究关注中药复方的网络药理学研究。通过构建药物-靶点-疾病的网络，研究者能够更深入地理解中药复方的作用机制。本研究基于网络药理学方法，系统解析了MLN缓解CP诱导AKI的多靶点防治机制。通过成分-靶点-通路多层次分析，筛选出MLN的多个核心药效成分：没食子酸乙酯（ethyl gallate）、β-谷甾醇（β-sitosterol）、异鼠李素（isorhamnetin）、原花青素B1（procyanidin B1）、槲皮素（quercetin）、木犀草素（luteolin）、山柰酚（kaempferol）、汉黄芩素（wogonin）、β-胡萝卜素（beta-carotene）、豆甾醇（stigmasterol）、黄芩素（baicalein）、金圣草黄素（Chryseriol）、小檗碱（berberine）和石斛碱（dendrobane A），其作用靶点群明显富集于P53、IL-6、AKT1、TNF、ESR1、caspase-3及Bcl-2等关键分子。机制上，MLN可能通过协同调控脂质代谢与动脉粥样硬化通路、凋亡通路、PI3K-AKT信号通路及TNF信号通路发挥肾脏保护作用。

为进一步考察网络药理学预测MLN靶点和通路的可靠性，本研究通过CP诱导的小鼠AKI模型开展实验。研究结果显示，MLN能够降低血浆Scr和BUN水平，明显改善CP诱导的肾脏病理变化和肾功能。Western blot分析结果表明，MLN干预组的P53 Ser15位点磷酸化水平降低，同时抗凋亡蛋白Bcl-2的表达上调，而促凋亡蛋白Bax的表达下调，cleaved caspase-3的表达也明显减少，这表明MLN通过靶向调控“P53-Bcl-2/Bax-caspase-3”凋亡信号轴，阻断线粒体依赖性凋亡通路，从而减轻CP诱导的肾小管损伤。

CP引发的AKI背后的核心病理机制可能涉及三重伤害级联反应：①氧化应激失衡，CP代谢产物诱导线粒体活性氧（reactive oxygen species，ROS）的骤增，直接损害肾小管上皮细胞的膜结构和DNA完整性；②炎症级联放大，ROS激活NF-κB信号通路，驱动促炎因子如TNF-α和IL-6的释放，促进中性粒细胞浸润及肾间质纤维化；③凋亡激活，CP上调促凋亡蛋白Bax/caspase-3，并抑制Bcl-2，从而启动线粒体依赖的凋亡途径[24-25]。值得注意的是，MLN筛选识别的关键靶点和通路有效覆盖了上述病理过程。例如，P53/Bcl2/caspase-3轴调控细胞凋亡和细胞周期停滞；AKT1/IL-6/TNF网络介导炎症信号转导；PI3K-AKT通路则参与维持氧化还原稳态。这一发现与CP诱导的AKI的分子病理特征紧密相关，提示MLN可能整合抗氧化、抗炎和抗凋亡通路，以建立一个多维的肾脏保护网络。

值得注意的是，有研究通过系统药理学分析，揭示了MLN的药理作用可能通过Toll样受体4（toll-like receptor 4，TLR4）/核因子κB（nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells，NF-κB）信号轴介导[14]。实验验证进一步证实，MLN能够明显下调脂多糖诱导的TLR4及其衔接蛋白髓样分化因子88（myeloid differentiation primary response 88，MyD88）的表达水平，同时通过双重调控机制：①抑制核因子κB抑制因子α（inhibitor of nuclear factor kappa-B alpha，IκBα）磷酸化；②阻断NF-κB p65亚基的磷酸化及核转位过程，最终实现NF-κB信号通路的失活，进而减少炎症介质释放并缓解急性肺损伤病理进程。近期，有研究整合网络药理学与血栓闭塞性脉管炎大鼠模型（月桂酸钠联合双氢睾酮诱导），发现MLN通过双重通路抑制机制发挥血管保护作用：①抑制先天免疫应答的cGAS-STING-IRF3通路（cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes-interferon regulatory factor 3）；②调控TLR4-MAPK（mitogen-activated protein kinase）-NF-κB级联反应[26]。通过上述通路的抑制作用，可进一步降低促炎细胞因子IL-1β和TNF-α的分泌水平，调节凝血-纤溶系统平衡（抑制纤溶酶原激活物抑制剂-1和组织因子表达），同时抑制内皮细胞活化标志物细胞间黏附分子-1（intercellular adhesion molecule-1，ICAM-1）的表达。在后续研究中，拟利用已建立的AKI小鼠模型，重点探究MLN是否通过协同调控cGAS-STING-IRF3与MAPK-NF-κB两条关键通路，实现多靶点、多通路的肾脏保护效应，这或将为MLN缓解AKI提供新的机制解释。

参 考 文 献

[1] Raji-Amirhasani A，Khaksari M，Mahani FD，et al. Activators of SIRT1 in the kidney and protective effects of SIRT1 during acute kidney injury（AKI）（effect of SIRT1 activators on acute kidney injury）[J]. Clin Exp Nephrol，2021，25（8）：807-821.

[2] Wang D，Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs[J]. Nat Rev Drug Discov，2005，4（4）：307-320.

[3] Hamroun A，Lenain R，Bigna JJ，et al. Prevention of cisplatin-induced acute kidney injury：a systematic review and meta-analysis[J]. Drugs，2019，79（14）：1567-1582.

[4] 朱媛媛，杨梦霞，李新民. 中药预防顺铂肾毒性的Meta分析[J]. 中国中医药现代远程教育，2019，17(10)：60-63.
Zhu YY，Yang MX，Li XM. Meta analysis on Chinese medicine in the prevention of cisplatin-induced renal toxicity[J]. Chin Med Mod Distance Educ China，2019，17(10)：60-63.
[5] 陈 坚，湛苑聆. 活血化瘀方对急性肾损伤患者肾功能的改善作用[J]. 中国卫生标准管理，2021，12(6)：125-127.
Chen J，Zhan YL. Application Effect of Chinese medicine for promoting blood circulation and removing blood stasis in patients with acute kidney injury and its improvement on renal function indexes[J]. China Health Standard Management，2021，12(6)：125-127.
[6] 崔向君，陈加敏，孔 立，等. 中医药治疗脓毒症相关急性肾损伤的研究进展[J]. 中国中医急症，2024，33(9)：1685-1688.
Cui XJ，Chen JM，Kong L，et al. Research progress on traditional Chinese medicine in the treatment of sepsis-associated acute kidney injury [J]. Journal of Emergency Medicine in TCM，2024，33(9)：1685-1688.
[7] 董玉岗，汪 妍，韩 燕. 活血化瘀解毒方对重症胰腺炎合并急性肾损伤大鼠相关炎症因子、Bax及Bcl-2表达的影响[J]. 中国中医急症，2021，30(7)：1174-1178.
Dong YG，Wang Y，Han Y. Effect of Huoxue Huayu Jiedu decoction on expression of related inflammatory factors，Bax and Bcl-2 in rats with severe pancreatitis and acute kidney injury[J]. Journal of Emergency Medicine in TCM，2021，30(7)：1174-1178.
[8] 李语玲，杨 静. 脉络宁注射液对下肢动脉硬化闭塞症大鼠血管内皮功能及NF-κB介导炎症反应的影响[J]. 中南药学，2020，18(10)：1677-1680.
Li YL，Yang J. Effect of Mailuoning injection on vascular endothelial function and inflammatory response mediated by NF-κB in rats with lower extremity arteriosclerosis obliterans[J]. Cent South Pharm，2020，18(10)：1677-1680.
[9] 张淑波，张 玲，祝 亮，等. 脉络宁注射液联合贝那普利治疗慢性肾小球肾炎临床观察[J]. 中华中医药学刊，2017，35(11)：2950-2952.
Zhang SB，Zhang L，Zhu L，et al. Clinical observation of mailuoning injection combined with benazepril in treatment of chronic glomerulonephritis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med，2017，35(11)：2950-2952.
[10] 邱 欣，唐银霏，陈新政，等. 脉络宁注射液联合环磷酰胺对慢性肾小球肾炎患者血液流变学、肾功能、PAI-1及t-PA的影响[J]. 长春中医药大学学报，2019，35(2)：267-269.
Qiu X，Tang YF，Chen XZ，et al. Effect of mailuoning injection combined with cyclophosphamide on blood rheology，renal function，PAI-1 and t-PA in patients with chronic glomerulonephritis[J]. J Changchun Univ Chin Med，2019，35(2)：267-269.
[11] 陈翠强，陈兴强，陈 洁，等. 脉络宁颗粒联合贝那普利治疗慢性肾小球肾炎的疗效及对外周血IL-4、IL-10、INF-γ、TAFI的影响[J]. 中药材，2020，43(2)：486-489.
Chen CQ，Chen XQ，Chen J，et al. Effect of Mailuoning Granule combined with Benazepril on chronic glomerulonephritis and its influence on IL-4，IL-10，INF-γ and TAFI in peripheral blood[J]. J Chin Med Mater，2020，43(2)：486-489.
[12] 何秀芳，谭诚成，李圣永. 脉络宁注射液通过Akt信号通路降低Hcy诱导的ECV304细胞损伤的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2022，20(6)：1003-1007.
He XF，Tan CC，Li SY. Effects of mailuoning injection on ECV304 cell injury induced by hcy through Akt signal pathway[J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis，2022，20(6)：1003-1007.
[13] Ren D，Shen ZY，Qin LP，et al. Pharmacology，phytochemistry，and traditional uses of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl[J]. J Ethnopharmacol，2021，269：113688.
[14] Wang Y，Yuan Y，Wang WT，et al. Mechanisms underlying the therapeutic effects of Qingfeiyin in treating acute lung injury based on GEO datasets，network pharmacology and molecular docking[J]. Comput Biol Med，2022，145：105454.
[15] Miao JQ，Shen J，Yan CQ，et al. The protective effects of Mai-Luo-Ning injection against LPS-induced acute lung injury *via* the TLR4/NF-κB signalling pathway[J]. Phytomedicine，2022，104：154290.
[16] Kim JY，Jo J，Leem J，et al. Kahweol ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury through pleiotropic effects in mice[J]. Biomedicines，2020，8(12)：572.
[17] Hu JQ，Gu WJ，Ma N，et al. Leonurine alleviates ferroptosis in cisplatin-induced acute kidney injury by activating the Nrf2 signalling pathway[J]. Br J Pharmacol，2022，179(15)：3991-4009.
[18] Zhang YP，Chen YE，Li BX，et al. The effect of monotropein on alleviating cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting oxidative damage，inflammation and apoptosis[J]. Biomed Pharmacother，2020，129：110408.
[19] 武周游，李 婷，张腾伟，等. miR-370-3p/SESN2调控脂多糖诱导的小鼠肺泡上皮细胞凋亡的机制研究[J]. 重庆医科大学学报，2024，49(9)：1121-1128.
Wu ZY，Li T，Zhang TW，et al. Mechanism of miR-370-3p/SESN2 regulating lipopolysaccharide-induced apoptosis of mouse alveolar epithelial cells[J]. J Chongqing Med Univ，2024，49(9)：1121-1128.
[20] Palm CA，Segev G，Cowgill LD，et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker for identification of acute kidney injury and recovery in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity[J]. J Vet Intern Med，2016，30(1)：200-205.
[21] Jiang M，Wang CY，Huang S，et al. Cisplatin-induced apoptosis in p53-deficient renal cells *via* the intrinsic mitochondrial pathway[J]. Am J Physiol Renal Physiol，2009，296(5)：983-993.
[22] Miao NJ，Wang B，Xu D，et al. Caspase-11 promotes cisplatin-induced renal tubular apoptosis through a caspase-3-dependent pathway[J]. Am J Physiol Renal Physiol，2018，314(2)：269-279.
[23] Zhu H，Jiang WJ，Zhao HZ，et al. PSTPIP2 inhibits cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing apoptosis of renal tubular epithelial cells[J]. Cell Death Dis，2020，11(12)：1057.
[24] Zhu SQ，Huo LL，Zeng J，et al. Differentiated management of ROS level in tumor and kidney to alleviate *Cis*-platinum induced acute kidney injury with improved efficacy[J]. J Nanobiotechnology，2024，22(1)：436.
[25] Zhou M，Dai YP，Ma Y，et al. Protective effects of liquiritigenin against cisplatin-induced nephrotoxicity *via* NRF2/SIRT3-mediated improvement of mitochondrial function[J]. Molecules，2022，27(12)：3823.
[26] Fan LL，Tang K，Li J，et al. Mailuoning oral liquid ameliorates vasculitis in thromboangiitis obliterans rats *via* inactivating cGAS-STING-IRF3 and TLR4-MAPKs/NF-κB signaling pathways[J]. J Ethnopharmacol，2025，337(Pt 1)：118707.

（责任编辑：曾 玲）

本文引用格式：
严嘉敏，谢乐意，陈柏年，等. 基于网络药理学探讨脉络宁治疗急性肾损伤的作用机制[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(7)：870-878.