

基于网络药理学及体内外验证实验探索香芹酚抑制内源性细胞凋亡途径抗糖尿病肾病的机制

赵凤萍¹,陈晓兰^{1*},王 群^{1*},
徐展翅¹,张 明²,韩 伟¹,吕冰清¹

¹贵州中医药大学药学院,贵阳 550025;²贵州省天然产物研究中心,贵阳 550014

摘要:采用网络药理学及体内外验证实验探讨香芹酚通过抑制内源性细胞凋亡途径治疗糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的作用机制。实验使用 DN 小鼠及肾小管上皮细胞(HK-2)模型考察香芹酚抗 DN 的药效作用;运用 SwissTargetPrediction 数据库预测香芹酚潜在作用靶点,将其与从 DisGeNET、GeneCards 及 OMIM 数据库中筛选得到的 DN 疾病靶点进行交集分析,获取香芹酚与疾病的共同作用靶点。借助 STRING 平台及 Cytoscape 软件对共同作用的靶点进行分析,以筛选出香芹酚发挥作用的核心靶点并验证。利用 DAVID 数据库对上述交集靶点进行 KEGG 通路富集分析及 GO 功能注释;最后通过动物模型对预测结果进行验证。药效研究显示,香芹酚能显著降低 DN 小鼠血糖(fasting blood glucose, FBG)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(serum creatinine, SCr)及 24 h 尿白蛋白(24-hour urinary albumin, 24 h-U-Alb)水平($P < 0.01$, $P < 0.05$)。细胞实验表明,香芹酚能提高高糖诱导下的 HK-2 细胞活力并抑制其凋亡。网络药理学研究显示,香芹酚发挥作用的生物学过程主要涉及信号转导、RNA 聚合酶 II 对转录的正调控、炎症反应中细胞因子产生的负调控、Janus 激酶-信号转导与转录激活因子信号通路(Janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)细胞表面受体信号通路及凋亡信号通路,可能作用于丝氨酸/苏氨酸激酶 1(serine/threonine kinase 1, AKT1)、白蛋白(albumin, ALB)、雌激素受体 1(estrogen receptor 1, ESR1)、Janus 激酶 2(Janus kinase 2, JAK2)及孕激素受体(progesterone receptor, PGR)等靶点。分子对接与 DARTS-Western blot 实验显示,香芹酚与 AKT1 结合性好,且能提高 AKT1 蛋白的酶解稳定性。Western blot 实验显示,香芹酚能抑制磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K-AKT)通路相关蛋白,下调线粒体介导的内源性细胞凋亡关键启动因子 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 及促凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤 2(B-cell lymphoma 2, BCL-2)相关 X 蛋白(BCL-2-associated X protein, BAX)的表达,上调抗凋亡蛋白 BCL-2 的表达。综上,香芹酚对 DN 具有潜在防治作用,其分子机制可能与靶向 AKT1、调控 PI3K-AKT 信号通路;抑制 Caspase 级联反应,介导内源性细胞凋亡途径密切相关。

关键词:香芹酚;糖尿病肾病;网络药理学;AKT1;PI3K-AKT 信号通路;细胞凋亡

中图分类号:R966

文献标志码:A

文章编号:1001-6880(2026)9-2034-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2026.9.017

CSTR:32307.14.1001-6880.2026.9.017

Mechanism of carvacrol against diabetic nephropathy via inhibition of the endogenous apoptosis pathway using network pharmacology and *in vivo/in vitro* validation experiments

ZHAO Feng-ping¹, CHEN Xiao-lan^{1*}, WANG Qun^{1*},
XU Zhan-chi¹, ZHANG Ming², HAN Wei¹, LYU Bing-qing¹

¹College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; ²Natural Products Research Center of Guizhou Province, Guiyang 550014, China

收稿日期:2025-11-06

接受日期:2026-03-12

基金项目:贵州省科技计划(ZK[2023]一般414);贵州省卫生健康委科学技术基金(gzkwj2024-514);贵州省基础研究计划(自然科学)面上项目(MS[2025]172);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2025-012)

*通信作者 Tel:86-015885547419; E-mail:chenxiaolan76@126.com, gywq198856@163.com

Abstract: The mechanism of carvacrol in the treatment of diabetic nephropathy (DN) by inhibiting endogenous apoptosis pathway was investigated by network pharmacology and in vivo/in vitro validation experiments. DN mice and renal tubular epithelial cells (HK-2) model were used to investigate the anti-DN effect of carvacrol. The SwissTargetPrediction database was used to predict the potential targets of carvacrol, and the intersection analysis was performed with the DN disease targets screened from the DisGeNET, GeneCards and OMIM databases to obtain the common targets of carvacrol and disease. The STRING platform and Cytoscape software were used to analyze the targets of interaction, so as to screen out the core targets of carvacrol and verify them. KEGG pathway enrichment analysis and GO function annotation were performed on the above intersection targets using the DAVID database. Finally, the prediction results were verified by animal models. Pharmacodynamic studies showed that carvacrol could significantly reduce the levels of fasting blood glucose (FBG), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr) and 24-hour urinary albumin (24 h-U-Alb) in DN mice ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Cell experiments showed that carvacrol could increase the viability of HK-2 cells induced by high glucose and inhibit its apoptosis. Network pharmacology studies have shown that the biological processes of carvacrol mainly involve signal transduction, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, negative regulation of cytokine production in inflammatory response, Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) cell surface receptor signaling pathway and apoptosis signaling pathway. It may act on serine/threonine kinase 1 (AKT1), albumin (ALB), estrogen receptor 1 (ESR1), Janus kinase 2 (JAK2) and progesterone receptor (PGR). Molecular docking and DARTS-Western blot experiments showed that carvacrol had a good binding with AKT1 and could improve the enzymatic stability of AKT1 protein. Western blot experiments showed that carvacrol could inhibit phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K-AKT) pathway-related proteins. It down-regulated the expression of Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9 and B-cell lymphoma 2 (BCL-2)-associated X protein (BAX), and up-regulated the expression of BCL-2. In summary, carvacrol has a potential preventive and therapeutic effect on DN, and its molecular mechanism may be related to targeting AKT1 and regulating PI3K-AKT signaling pathway; inhibition of Caspase cascade, mediated endogenous apoptosis pathway is closely related.

Key words: carvacrol; diabetic nephropathy; network pharmacology; AKT1; PI3K-AKT signaling pathway; apoptosis

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病常见的慢性微血管并发症,病理上可累及肾小球、肾小管、肾间质及肾血管^[1,2]。流行病学数据显示,2019 年我国成人糖尿病患病数约 1.16 亿,预计 2030 年将达 1.4 亿^[3]。DN 若未及时干预,肾损伤常呈不可逆性进展,预后不良。近年研究^[4-7]进一步揭示,其发生与糖代谢异常、糖基化终产物、炎症因子、氧化应激及细胞凋亡等机制密切相关。针对相关致病因素进行早期预防、诊断和治疗,对延缓疾病进展至关重要。

香芹酚 (carvacrol) 作为一种单萜酚类化合物,广泛分布于金樱子、牛至、百香果、佩兰等中药材中。因其分子量小、脂溶性强的特性而易于生物利用^[8,9]。本研究选择香芹酚作为研究对象,并非仅基于其广泛的抗炎、抗氧化、抗凋亡及潜在抗纤维化活性^[10,11],而是基于其药理特性与 DN 核心病理机制的深度契合。DN 的发生发展与氧化应激、细胞凋亡及纤维化等过程密切相关。前期研究已初步揭示了香芹酚在 DN 中的治疗潜力。Jamshidi 等^[12]研究发现,香芹酚能显著降低 DN 模型大鼠的血尿素氮和血肌酐水平,并改善肾脏氧化应激状态,其肾脏

保护效应与维生素 E 相当。近期,Canbaz 等^[13]进一步证实,香芹酚干预能改善肾功能与组织病理损伤,并下调促凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma 2, BCL-2) 相关 X 蛋白 (BCL-2-associated X protein, BAX) 及促纤维化基因 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 (collagen type I alpha 1 chain, COL1A1)、III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 (collagen type III alpha 1 chain, COL3A1) 的表达,同时上调抗凋亡蛋白 BCL-2 蛋白的表达。这些研究共同表明,香芹酚可通过抗氧化、抗凋亡及抗纤维化等多途径发挥肾脏保护作用。然而,其上游的核心信号转导机制,特别是香芹酚是否通过精准调控磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K-AKT) 等关键通路来抑制肾小管内源性凋亡,目前尚未被系统阐明。这一关键机制的缺失,限制了其深入开发及应用。因此,本研究旨在深入揭示香芹酚通过 PI3K-AKT 信号轴调控内源性凋亡的作用机制,为其深度开发提供理论依据。

网络药理学作为一门新兴学科,能通过整合系统生物学与生物信息学,系统阐释药物的多成分、多靶点及多通路作用机制,为药物研发与优化提供依

据^[14,15]。药物靶点的发现与验证是当前创新药物研发的核心难点,其技术主要分为化学修饰与非化学修饰两类。前者因需对药物进行结构改造而存在一定局限。药物亲和反应靶向稳定性(drug affinity responsive target stability, DARTS)属于非化学修饰方法,其原理为药物与靶蛋白结合后,可增强该蛋白对蛋白酶水解的稳定性,进而通过电泳分离实现靶点鉴定,目前已广泛应用于药物靶点的发现与验证^[16-18]。在柴胡皂苷 A 抗抑郁作用靶点鉴定中,DARTS 实验证实其与催产素受体(oxytocin receptor, OXTR)结合并增强该蛋白的稳定性^[19],体现了该技术在天然药物靶点鉴定中的有效应用。

基于此,本项目首先运用网络药理学方法,对香芹酚抗 DN 的作用靶点及相关机制展开预测分析,并基于 DN 小鼠模型,首次联合运用分子生物学、DARTS-Western blot 及分子对接技术对预测靶点及途径进行验证。以期为香芹酚的新药研发及临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞

32 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠(8 只 db/m 小鼠,24 只 db/db 小鼠),10 周龄,体重 16.3 ~ 68.9 g,所有小鼠均购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,生产许可证号:SYXK(苏)2023-0036。所有小鼠均饲养于 SPF 级动物房,环境条件控制为温度 18 ~ 25 ℃、相对湿度 50% ~ 70%,每日通风换气并定期进行环境消毒;每笼饲养 4 只,由专人负责照料,小鼠可自由摄食与饮水。本实验中所有动物操作均严格遵循国际实验动物护理与使用准则,确保动物福利与实验规范性(伦理批准号:2024115)。

人肾小管上皮细胞系(HK-2)(批号:PC-H2024112919,武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 试剂

香芹酚(纯度:≥98%,批号:499-75-2,南京狄尔格医药科技有限公司);肌酐(serum creatinine, SCr)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、甘油三酯(triglycerides, TG)、尿蛋白测试盒(批号:C011-2-1、A111-1-1、C013-2-1、A110-1-1、C035-2-1,南京建成生物工程研究所);BeyoLytic™哺乳动物活性蛋白抽提试剂(批号:111822231207,上海碧云天生物技术有限公司);HRP 标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine kinase 1,

AKT1) 重组单克隆抗体、PI3K 多克隆抗体、BAX 多克隆抗体、BCL-2 单克隆抗体、Cleaved Caspase-3 多克隆抗体、p-AKT 重组单克隆抗体、AKT 多克隆抗体(批号:SA00001-1、SA00001-2, 80816-1-RR、27921-1-AP、50599-2-Ig、68103-1-Ig、25128-1-AP、80455-1-RR、10176-2-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);p-PI3K 多克隆抗体、Cleaved Caspase-9 多克隆抗体(批号:CSB-PA000712、CSB-PA000010,武汉华美生物工程有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒、 β -actin 兔多克隆抗体、10 × TBST 缓冲液、5 × 蛋白上样缓冲液(批号:CR2412054、AC230205001、2511G007、240011017,武汉塞维尔生物科技有限公司);CCK-8 试剂盒(批号:P25051500041,上海陶术生物科技股份有限公司);链霉蛋白酶(批号:S10014,上海源叶生物科技股份有限公司);PBS 缓冲液(批号:PB180327,普诺赛生命科技有限公司);青链霉素混合液、Annexin V-APC 双染细胞凋亡检测试剂盒、胰蛋白酶消化液、DMEM 培养基(批号:2230520002、G1510-100T、G4001、G4552,武汉赛维尔生物科技有限公司);D-甘露醇、D-无水葡萄糖(纯度均大于 96%,批号:3221114001、2231121003,索莱宝生物科技股份有限公司)。

1.3 仪器

Cobas C501 全自动生化分析仪(瑞士 Roche Diagnostics 公司);三诺 GA-3 血糖仪(长沙三诺生物传感技术有限公司);ChemiDoo™免染蛋白印迹系统(美国 Bio-Rad 公司);GBOXChemiXL1.4 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);Trans-Blot Turbo 蛋白快速转印仪(美国 Bio-Rad 公司);Biomate 3S 核酸蛋白紫外检测仪(美国 Thermo 公司);PowerPac-Basic 电泳仪(美国 Thermo 公司);WIX-miniBRO4 迷你垂直电泳槽(北京韦克斯科技有限公司);Multiskan FC 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);H2050R 高速冷冻离心机(长沙湘仪集团)。

1.4 动物药效研究

1.4.1 动物分组与给药

取 12 周龄 db/db 小鼠,以测定空腹血糖值 > 11.1 mmol/L,尿蛋白 > 30 mg/d,视为模型成功^[20,21]。以 12 周龄 8 只 db/m 小鼠为对照(control, Con)组,同周龄 24 只 db/db 小鼠分为:模型(model, Mod)组、香芹酚高剂量组(carvacrol high-dose group, Car-H;20 mg/kg)、香芹酚低剂量组(carvacrol low-dose group, Car-L;10 mg/kg),每组 8 只。

给药组小鼠每日于固定时间经灌胃给予香芹酚 1 次,连续干预 12 周;Con 组与 Mod 组则在相同时间,灌胃等量生理盐水,并每 2 周随机测量小鼠空腹血糖。

1.4.2 各组小鼠生化指标的检测

实验期间对各组小鼠进行持续观察,包括精神活跃度、毛发色泽与顺滑度、摄食行为及排泄特征等。末次给药后,采用代谢笼对小鼠进行 24 h 尿液收集,期间实施禁食不禁水处理。收集的尿液样本经 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清,参照尿蛋白检测试剂盒操作说明测定尿总蛋白含量。使用血糖仪采集小鼠尾静脉血检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),于腹动脉取血,血样经 3 000 r/min 离心 10 min 后,备用。随后,处死实验动物,摘取双肾并剥离肾被膜,其中右肾用于后续组织病理学检查,左肾分装后,置于-20 ℃保存备用。血样通过全自动生化分析仪检测 TG、TC、BUN 及 SCr 等生化指标的水平。

1.4.3 肾组织病理学观察

各组小鼠连续给药 12 周后,取“1.4.2”项下 Con 组、Mod 组及 Car-H 组、Car-L 组小鼠右肾,肾组织先经梯度乙醇溶液进行脱水处理,依次完成脱水、二甲苯透明及浸蜡步骤后,将组织包裹在石蜡块中。使用切片机将石蜡包埋的肾组织切成 4 μm 厚度的薄片,随后将切片置于 40 ℃水浴锅中展平,捞出,放入 60 ℃烤箱内烤片 3 h。切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇处理后,蒸馏水浸洗 5 min,分别采用进行 HE 染色和 Masson 染色。水洗后,切片依次经 95% 乙醇与无水乙醇脱水、二甲苯透明,风干后以中性树胶封片,置于显微镜下观察。

1.5 细胞药效研究

1.5.1 香芹酚给药浓度的筛选

HK-2 细胞使用 DMEM 培养基,置于 37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中培养。将 HK-2 细胞以 3 × 10⁵ 个/孔的密度,接种在 96 孔细胞培养板中。待细胞生长密度达到 80% ~ 90%,给予不同浓度的香芹酚(0、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2 μmol/L)干预 24 h 后,PBS 漂洗 3 次,每孔加入含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基 100 μL,37 ℃孵育 60 min,酶标仪在 450 nm 波长下测定各组吸光度(A),根据公式(1)计算细胞存活率(R)。

$$R = [(A_S - A_B) / (A_C - A_B)] \times 100\% \quad (1)$$

式中,A_S:实验孔的吸光度;A_C:对照孔的吸光

度;A_B:空白孔的吸光度。

1.5.2 CCK-8 法检测细胞存活率

采用 40 mmol/L 高糖培养基干预 HK-2 细胞 24 h,制备 DN 细胞模型。将 HK-2 细胞随机分为:Con 组、甘露醇(mannitol, Man)组、Mod 组、Car-L 组(3.2 μmol/L)、Car-M 组(6.4 μmol/L)、Car-H 组(12.8 μmol/L)。将细胞接种在 96 孔板上,待细胞生长密度达到 80% ~ 90% 后,Con 组给予 DMEM 培养基,其他组给予高糖培养基(40 mmol/L)处理 24 h。随后,给药组给予相应浓度的香芹酚干预 24 h,PBS 漂洗 2 次,加入 CCK-8 试剂 10 μL,测定吸光度(A),根据公式(1)计算各组细胞存活率(R),并采用显微镜观察各组细胞形态。

1.5.3 流式细胞术检测细胞凋亡率

分组与给药方式同“1.5.2”项下,并设置空白组作为基线对照,包括校准荧光本底、优化仪器参数和排除非特异性干扰的作用。各组细胞胰酶消化后,收集细胞,250 × g 离心 5 min,吸弃上清,取细胞沉淀。用 500 μL 的 Binding Buffer 重悬细胞后,加入 5 μL Annexin V-APC 轻轻吹匀,再加入 5 μL 的 PI 混匀;避光室温反应 15 min,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.6 网络药理学研究

1.6.1 香芹酚潜在作用靶点预测

为系统挖掘香芹酚(carvacrol)的潜在作用靶点信息。首先,通过 PubChem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)以英文名称“carvacrol”为检索词进行检索,获取香芹酚的标准化化学结构信息,并提取其正确结构的“SMILES”号:“CC1=C(C=C(C=C1)C(C)C)O”。将香芹酚的“SMILES”导入 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)进行作用靶点的预测分析。

1.6.2 DN 的疾病相关靶点预测

以“diabetic nephropathy”为核心检索词,从 DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)及 OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>)中进行系统检索,筛选与 DN 相关的靶点,剔除重复靶点,并统一基因命名格式,最终获得 DN 的核心相关靶点。

1.6.3 蛋白质相互作用网络构建

将前期预测获得的香芹酚作用靶点数据集,与 DN 相关核心靶点集合共同导入 Venny 2.1 在线工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)中

取交集,获得香芹酚干预 DN 的潜在关键作用靶点。为深入解析香芹酚治疗 DN 预测靶点间的调控联系,将取交集获得的潜在靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 中建立蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络。物种设置为“Homo sapiens”,并设定相互作用评分阈值 (minimum required interaction score) ≥ 0.9 以保障数据的高置信度,同时剔除无相互作用的游离蛋白。以 TSV 格式导出结果,并导入 Cytoscape 3.6.0 软件进行可视化呈现及拓扑参数分析,结果按度值 (degree) 进行排序,确定香芹酚治疗 DN 的核心靶点。

1.6.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

将筛选获得的交集靶点数据集导入 DAVID 数据库进行功能富集分析。通过 GO 功能注释分析,从生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 以及分子功能 (molecular function, MF) 等 3 个维度,系统解析核心靶点参与的生物学活动及功能特征。通过 KEGG 通路富集分析挖掘靶点富集的信号通路网络。对富集结果按“*P*-Value”及“Count”值进行排序。筛选 $P < 0.05$ 的条目,将 BP、CC 及 MF 分析结果前 10 条,KEGG 前 15 条通路进行可视化展示。

1.6.5 分子对接研究

首先,通过 PubChem 数据库检索并获取香芹酚的 SDF 格式结构文件,借助 OpenBabel 软件将其转换为 mol2 格式的配体文件。随后,从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 AKT1 (PDB 号: 1UNR) 的三维结构文件,利用 PyMOL-2.1.0 软件对蛋白结构进行预处理,移除结晶水及冗余小分子配体,以优化蛋白的结合口袋结构。通过 AutoDock Tools-1.5.6 软件进行加氢修饰与电荷前处理,保存为 pdbqt 格式受体文件。以优化后的靶蛋白为受体、香芹酚为配体,使用 PyRx 软件的 Vina-2.0 程序进行分子对接模拟,计算配体与受体的结合能并导出对接结果。采用 PyMOL 软件 (<https://pymol.org/2/>) 对最优对接构象进行可视化分析,评估两者相互作用模式。其中,结合能 (kcal/mol) 反映配体-受体结合能力,数值越低表明两者结合稳定性越高。

1.7 香芹酚对关键作用靶点的考察

1.7.1 DARTS-Western blot 实验

细胞蛋白按照 M-PER™ 试剂说明书进行提取,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的提取缓冲溶液 1 mL,冰上孵育 10 min,涡旋 5 min,以 12 000 r/

min 离心 15 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白样品上清液稀释成 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,平均分为 2 份,每份 20 μL ,作为空白溶剂处理对照组和给药孵育组。给药孵育组蛋白提取液中分别加入 2 μL 浓度为 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的香芹酚,对照组加入等量的 DMSO 溶液。混匀、室温孵育 60 min 后,加入 2 μL 浓度为 0% 或 0.02% 的链霉蛋白酶溶液,对照组加入等量的 DMSO 溶液。混匀、25 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 15 min 后,取蛋白样品与 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混匀,煮沸 10 min 变性后,采用靶蛋白的抗体经 Western blot 实验对靶蛋白进行相对定量,通过对比给药孵育组与对照组中“靶蛋白”表达量的差异,进一步验证香芹酚与靶蛋白的结合。

1.7.2 Western blot 检测肾脏组织中 PI3K-AKT 通路蛋白及凋亡蛋白的表达

取 Con 组、Mod 组及 Car-H 组小鼠各 3 只,取左肾组织碎片适量,加入 1 mL 组织蛋白裂解液 (RIPA : PMSF = 100:1),冰浴匀浆、裂解,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 $\times g$ 的条件下离心 15 min,收集上清液为总蛋白提取液,采用 BCA 法测定蛋白浓度并将各组浓度校准至一致后,按 1:5 比例与 1 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 使蛋白质变性。依据目标蛋白分子量配制 SDS-PAGE 凝胶。进行上样、电泳及转膜操作后,用脱脂牛奶对膜进行封闭处理,加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 缓冲液洗涤后加入二抗在室温下孵育 2 h,再次用 TBST 缓冲液洗涤去除未结合抗体。滴加 ECL Plus 化学发光液反应后,于凝胶成像系统中曝光采集图像,使用 Image J 软件分析条带灰度值并计算目的蛋白相对表达量。

1.8 统计方法

本实验数据采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物药效结果

2.1.1 香芹酚对 DN 小鼠生化指标检测的影响

实验结果表明,Con 组小鼠整体精神状态佳,摄食、饮水及排泄功能均正常,被毛光滑有光泽,体重呈现渐进性增长趋势 (见图 1)。Mod 组小鼠表现出典型的“三多一少”症状,伴随体重降低,同时出现毛发色泽暗沉、分布稀疏及精神萎靡等。如图 2 所示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠的 FBG、TG、TC、SCr、

BUN 及 24 h-U-Alb 水平均显著升高;与 Mod 组对比,香芹酚给药组 FBG、SCr、BUN 及 24 h-U-Alb 显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),且呈现一定剂量依赖性。

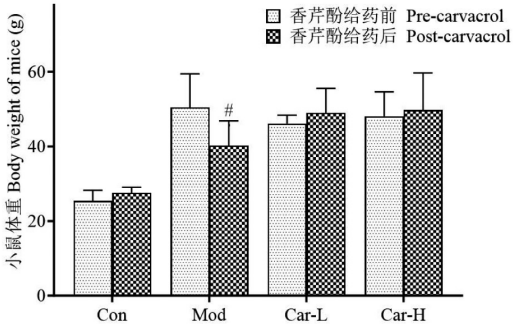


图1 香芹酚对 DN 小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of carvacrol on body weight of DN mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注:与 Con 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与 Mod 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,下同。Note: Compared with Con group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with Mod group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

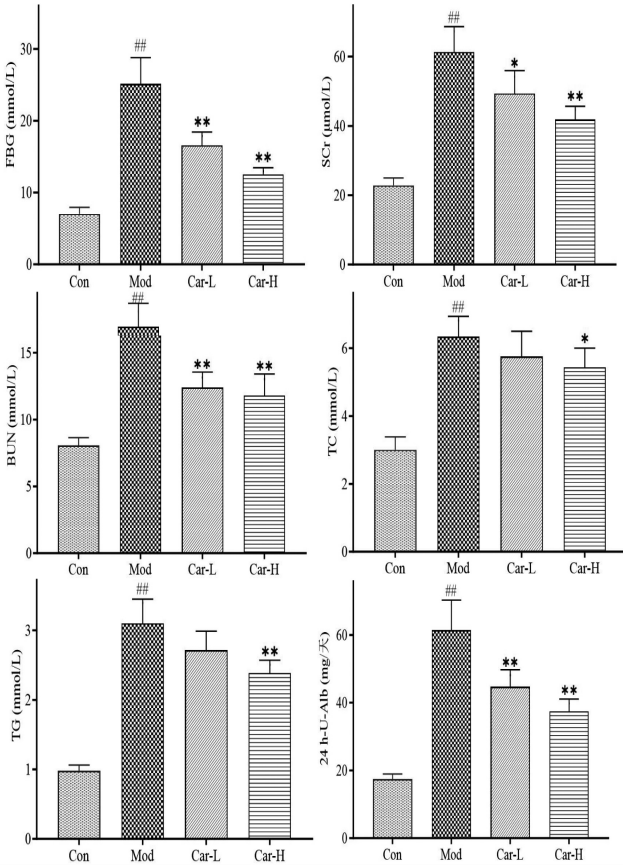


图2 香芹酚对 DN 小鼠生化指标检测的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of carvacrol on biochemical indexes in DN mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.1.2 香芹酚对 DN 小鼠肾组织形态学的影响

各组小鼠 Masson 染色主要用于检测肾组织纤维化病变,结果见图 3。胶原纤维呈蓝色(或蓝绿色),肌纤维、胞质等呈红色。Con 组小鼠肾组织肾

小球、肾小管结构清晰,肾间质无明显纤维化病变;Mod 组小鼠肾组织中胶原纤维(呈蓝色)呈现异常增多,肾间质纤维化病变显著。相较于 Mod 组,经香芹酚干预的给药组小鼠,肾组织纤维化病变明显

减轻。各组小鼠 HE 染色,细胞核呈蓝色,细胞质和细胞外基质呈红色,结果见图 3。Con 组小鼠肾组织肾小球形态规则、轮廓清晰;肾小管上皮细胞排列整齐、肾小管管腔大小均匀,无明显扩张或狭窄。Mod

组小鼠肾组织肾小球形态轮廓不规则、体积异常增大、小球系膜基质增宽;肾小管管腔不规整、管腔扩张。与 Mod 组比较,香芹酚给药组小鼠肾组织损伤程度明显减轻。

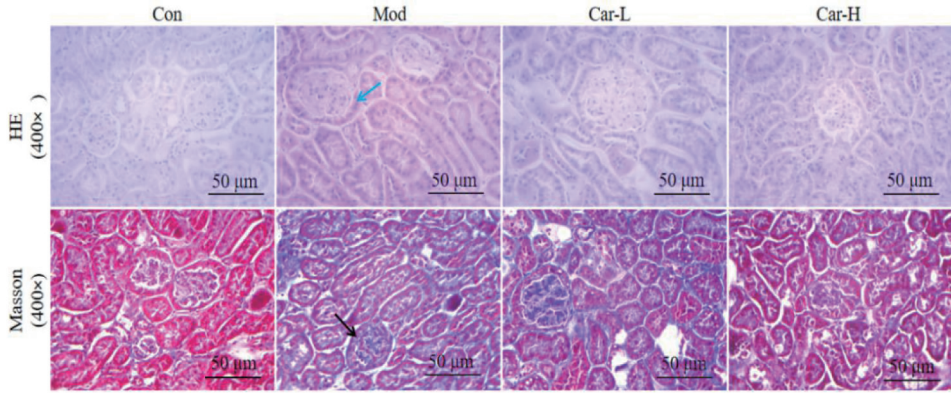


图 3 香芹酚对 DN 小鼠肾组织病理学的影响(400 ×)

Fig. 3 Effect of carvacrol on the histopathology of renal tissues in DN mice (400 ×)

注:蓝色箭头指示肾小球系膜基质增生;黑色箭头指示肾组织纤维化病变。Note:Blue arrows indicate glomerular mesangial matrix hyperplasia; black arrows indicate fibrosis of renal tissue.

2.2 细胞实验结果

2.2.1 香芹酚对 HK-2 细胞存活率及细胞形态的影响

当香芹酚给药剂量为 0.8 ~51.2 μmol/L 时,对 HK-2 细胞无毒副作用。当香芹酚给药剂量大于 12.8 μmol/L 时,细胞存活率呈下降趋势,故选择 3.2、6.4、12.8 μmol/L 作为后续实验 Car-L 组、Car-M 组、Car-H 组,结果见图 4。CCK-8 实验结果见图 4。与 Con 组比较,Mod 组细胞活性显著降低 ($P < 0.01$);Man 组无统计学差异 ($P > 0.05$),表明高渗环境对 HK-2 细胞活力无显著影响。与 Mod 组比较,香芹酚给药各组细胞活性均显著升高 ($P < 0.01$)。香芹酚能显著增强 HK-2 模型细胞的细胞

活性,且呈现出明显的剂量依赖性。采用倒置显微镜观察各组细胞形态,结果见图 5。Con 组细胞呈椭圆形或圆形,细胞间连接致密且分布均一;Mod 组部分细胞形态出现显著异常,表现为长梭状,细胞间隙明显增宽,且细胞数量有所减少;经 3.2、6.4 及 12.8 μmol/L 剂量的香芹酚处理后,各给药组细胞形态逐步趋近正常,细胞数量较 Mod 组显著增多。

2.2.2 香芹酚对 HK-2 细胞凋亡率的影响

流式细胞法检测细胞凋亡率结果见图 6。与 Con 组比,高糖处理组 HK-2 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。与 Mod 组比,香芹酚各给药剂量组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$)。香芹酚能显著抑制高糖处理的 HK-2 细胞凋亡。

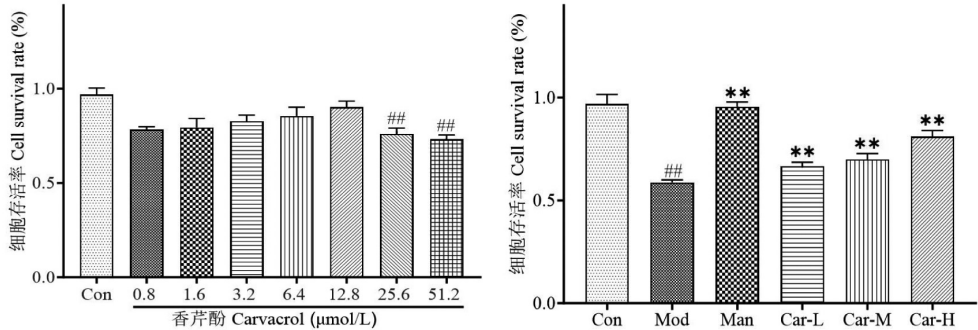


图 4 不同浓度香芹酚对 HK-2 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effects of different concentrations of carvacrol on the survival rate of HK-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

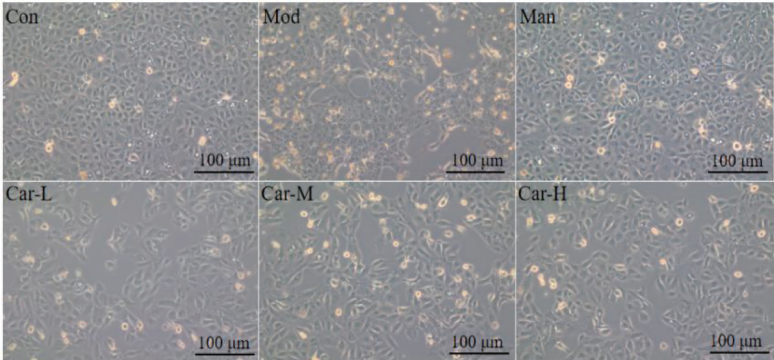


图5 香芹酚对 HK-2 细胞形态的影响(200 ×)

Fig. 5 Effect of carvacrol on the morphology of HK-2 cells (200 ×)

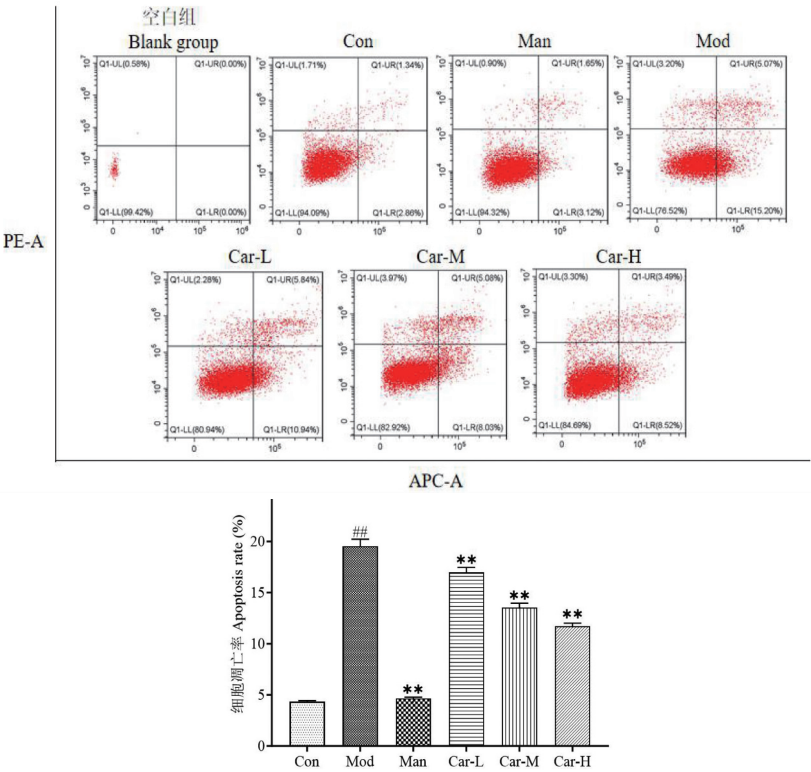


图6 香芹酚对 HK-2 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of carvacrol on apoptosis rate of HK-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 网络药理学研究结果

2.3.1 香芹酚潜在作用靶点筛选及与 DN 交集靶点获取

通过 SwissTargetPrediction 数据库得到香芹酚潜在作用靶点 106 个。经过 DisGeNET、GeneCards 及 OMIM 数据库,剔除重复靶点后,共获得 1 480 个与 DN 相关靶点。将香芹酚潜在作用靶点 106 个靶点与 1 480 个疾病靶点取交集,获得交集靶点 23 个,结果见图 7。

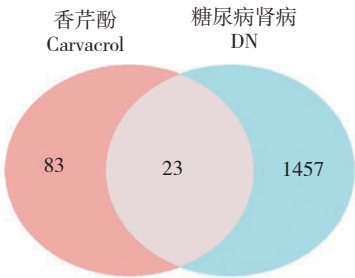


图7 香芹酚与 DN 交集靶点

Fig. 7 Intersection targets between carvacrol and DN

2.3.2 香芹酚治疗 DN 关键靶点的 PPI 网络分析

将 23 个潜在靶点上传到 STRING 平台,获得包括 23 个节点和 65 条边的 PPI 网络,结果如图 8A 所示。将结果的 TSV 格式导入 Cytoscape 3.6.0 软件进行分析,根据 degree 值,从大到小进行排序,筛选出排名前 5 的核心靶点,即丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1, AKT1)、白蛋白(albumin, ALB)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、Ja-

nus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)、孕激素受体 (progesterone receptor, PGR); degree 值分别为 15, 13, 11, 9, 8。关键靶点网络图见图 8B, 其中 degree 值越大,则节点颜色越深。进一步对所有靶点进行中介中心性 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC) 值排序,重点选择在 3 个值中均排第一位的 AKT1 进行考察。

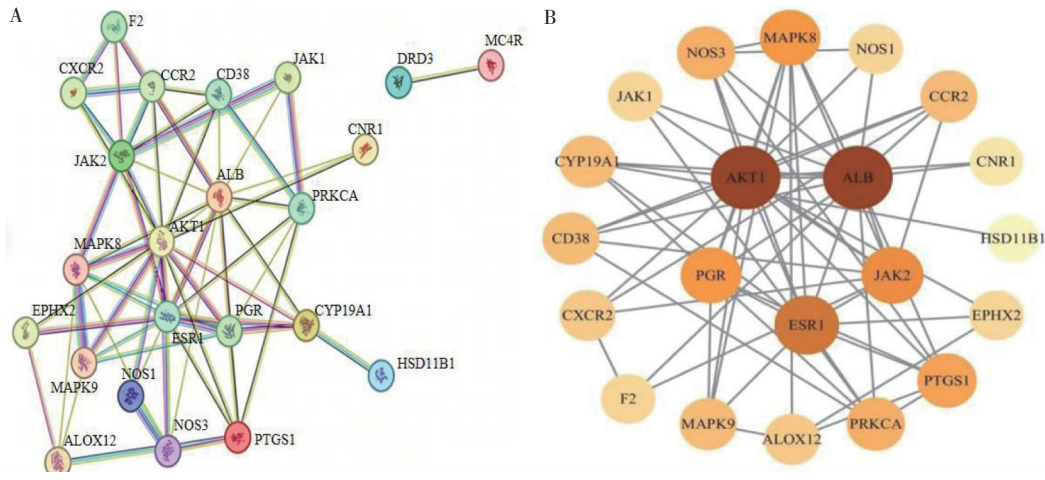


图 8 香芹酚治疗 DN 关键靶点的 PPI 网络

Fig. 8 PPI network of key targets for carvacrol in the treatment of DN

2.3.3 香芹酚治疗 DN 的 GO 及 KEGG 富集分析

将 23 个交集靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 富集分析,分别筛选 $P < 0.001$,并按“Count”值由高到低排列,选取排名前 10 的生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 及分子功能 (molecular function, MF) 进行可视化展示,如图 9A 所示。BP 主要涉及信号转导 (signal transduction)、炎症反应中细胞因子产生的负调控 (negative regulation of inflammatory cytokine production)、RNA 聚合酶 II 对转录的正调控 (positive regulation of transcription by RNA polymerase II)、JAK-STAT 的细胞表面受体信号通路 (cell surface receptor signaling pathway via JAK-STAT) 及凋亡信号通路 (apoptosis signaling pathways); CC 主要涉及细胞膜 (membrane)、细胞质基质 (cytosol)、核质 (nucleoplasm)、细胞外分泌体 (extracellular exosome)、细胞骨架 (cytoskeleton); MF 主要涉及蛋白质结合 (identical protein binding)、ATP 结合 (ATP binding)、钙调蛋白结合 (calmodulin binding)、NADP 结合 (NADP binding) 及激酶活性 (kinase activity) 等。

通过 DAVID 数据库富集得到 89 条 KEGG 富集

通路,筛选 $P < 0.001$ 的通路,按“Count”值进行排序后,筛选出排名前 15 的通路,采用可视化方法呈现结果,如图 9B 所示。所预测的香芹酚抗 DN 主要涉及激素信号传导 (hormone signaling)、PI3K-AKT 信号通路 (PI3K-AKT signaling pathway)、相关疱疹病毒感染 (kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、糖尿病性心肌病 (diabetic cardiomyopathy) 及 Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway) 等。鉴于香芹酚抗 DN 的生物过程显著富集到凋亡信号通路,KEGG 富集得到的 PI3K-AKT 通路 与 凋 亡 调 控 密 切 相 关。AKT1 是 PI3K-AKT 通路中的关键节点。结合细胞药效实验显示,香芹酚能显著抑制 HK-2 细胞凋亡。故本实验选择对凋亡途径及相关通路 PI3K-AKT 及关键靶点 AKT1 进行进一步验证。

2.3.4 分子对接结果

香芹酚与核心靶点 AKT1 的结合能分别为 -5.8 kcal/mol, 小于 -5.0 kcal/mol, 结果表明香芹酚与 AKT1 存在良好的结合能力^[22]。通过 Pymol 软件对分子对接结果进行可视化 (见图 10)。结果显示,香芹酚可与 AKT1 蛋白周围的多个氨基酸残基通过氢键等分子间作用力稳定结合,形成稳定构象。

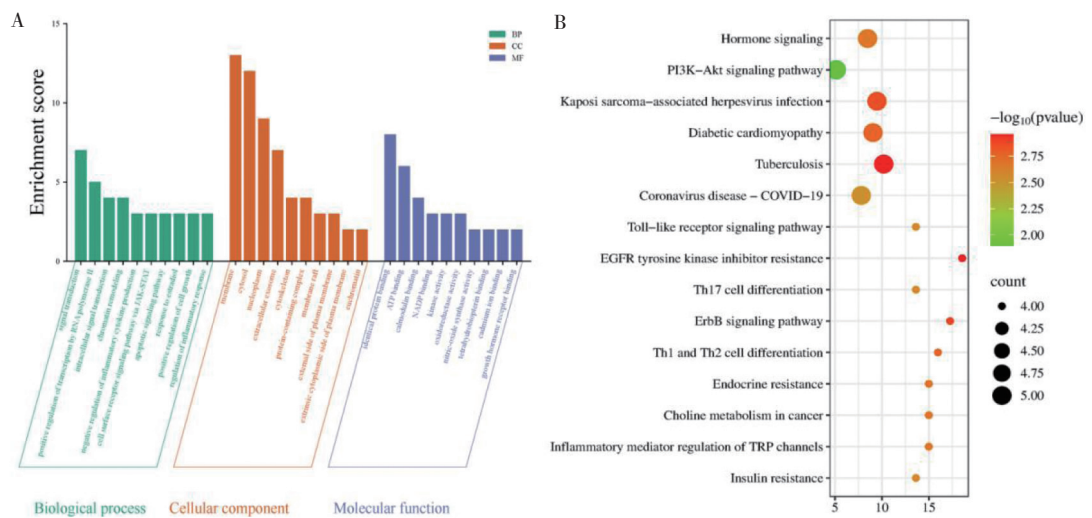


图9 GO(A)及KEGG(B)富集分析

Fig. 9 GO (A) and KEGG (B) enrichment analyses

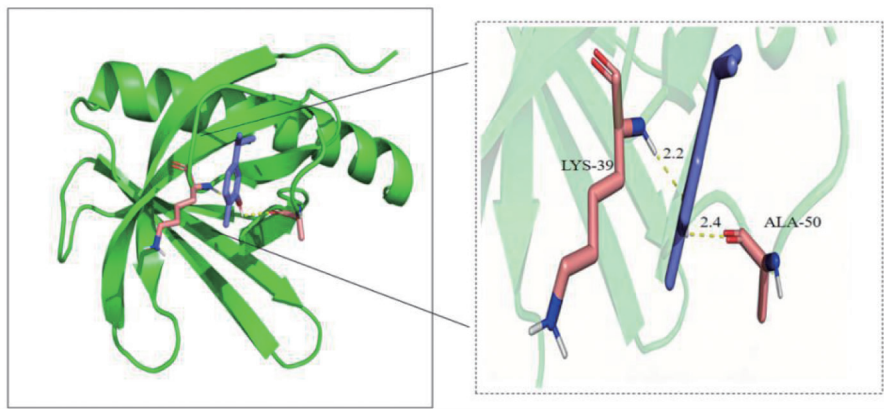


图10 香芹酚-AKT1 的分子对接可视化

Fig. 10 Molecular docking visualization of carvacrol-AKT1

2.4 香芹酚对关键作用靶点的考察结果

2.4.1 DARTS-Western blot 验证香芹酚对 AKT1 蛋白酶解稳定性的影响

结果见图 11。不同浓度的香芹酚与 AKT1 结合后,均能不同程度地提高 AKT1 的稳定性,降低了链霉蛋白酶对 AKT1 的消化作用,提高其酶解稳定性。AKT1 可能是香芹酚的作用靶点。

2.4.2 香芹酚对 PI3K-AKT 通路蛋白及凋亡相关蛋白表达水平的影响

Western blot 检测结果见图 12。香芹酚能抑制 AKT 磷酸化,下调线粒体介导的内源性细胞凋亡关键启动因子 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 及促凋亡蛋白 BAX 的表达水平,上调抗凋亡蛋白 BCL-2 的表达。与 Con 组比,Mod 组 BCL-2 的蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$); p-PI3K/PI3K、p-AKT/

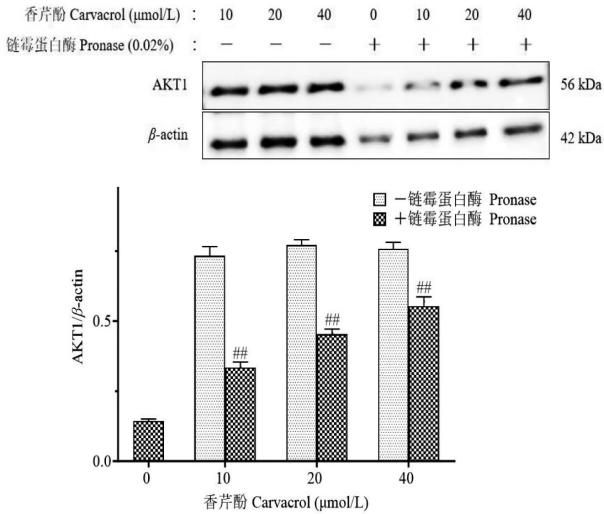


图11 香芹酚对 AKT1 蛋白酶解稳定性的影响

Fig. 11 Effect of carvacrol on the stability of AKT1 proteolysis

AKT、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 及 BAX 的蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与 Mod 组比, 香芹酚给药组 BCL-2 的蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$); p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 及 BAX 的蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

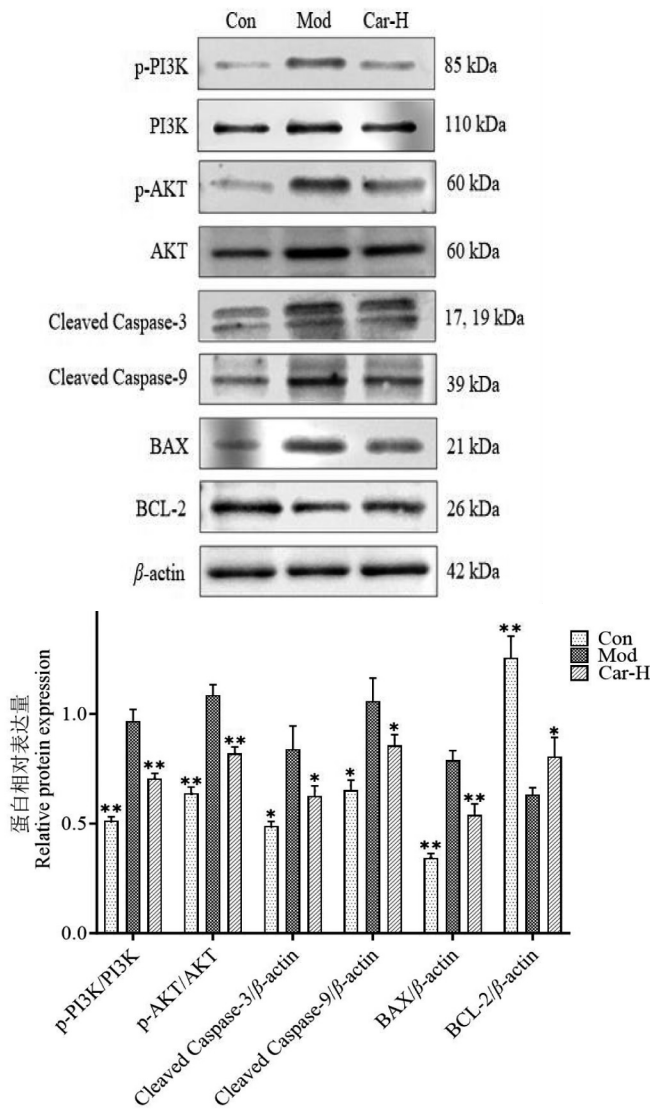


图 12 香芹酚对 DN 小鼠肾组织中 PI3K/AKT 信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effects of carvacrol on the expression of proteins related to the PI3K/AKT signaling pathway and apoptosis in renal tissues of DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

本研究通过 db/db DN 小鼠模型及高糖诱导的 HK-2 细胞模型,评价了香芹酚的防治作用。动物实验结果显示,香芹酚能显著降低 DN 小鼠 FBG、BUN、SCr 及 24 h-U-Alb 水平 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 并减轻肾组织纤维化与结构损伤。细胞实验证实,香芹酚可提高高糖环境下 HK-2 细胞活力并抑制其凋亡。

为阐明其机制,本研究采用网络药理学方法进

行探索。通过 SwissTargetPrediction 数据库预测香芹酚潜在靶点,与 DisGeNET、GeneCards 及 OMIM 数据库中的 DN 疾病靶点进行交集分析,获得交集靶点。利用 STRING 平台及 Cytoscape 3.6.0 软件进行分析,根据 degree 值筛选出 AKT1 可能是香芹酚发挥作用的关键靶点。分子对接与 DARTS-WB 实验显示,香芹酚与 AKT1 结合性好并能提高其酶解稳定性。KEGG 富集分析提示,香芹酚的作用与 PI3K-AKT 信号通路密切相关。Western blot 实验显示,香

芹酚能下调线粒体介导的内源性细胞凋亡关键启动因子 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 及促凋亡蛋白 BAX 的表达水平,上调抗凋亡蛋白 BCL-2 的表达。说明香芹酚在一定程度上能够通过抑制 BAX 激活,促进 BCL-2 表达,抑制 Caspase 级联反应,介导内源性细胞凋亡,进而干预 DN 的发展进程。

综上,本研究采用 DN 小鼠及肾小管上皮细胞 (HK-2) 模型考察香芹酚抗 DN 的药效作用,再运用网络药理学对香芹酚抗 DN 的分子作用机制进行了探索,并采用 DN 小鼠模型对相关信号通路及途径进行了初步验证。结果提示,香芹酚发挥抗 DN 的分子机制可能与靶向 AKT1、调控 PI3K-AKT 通路及抑制 Caspase 级联反应,抑制内源性细胞凋亡途径有关。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00057>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Wang Y, Jin MY, Cheng CK, et al. Tubular injury in diabetic kidney disease: molecular mechanisms and potential therapeutic perspectives [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1238927.
- 2 Chen SN, Li B, Chen L, et al. Uncovering the mechanism of resveratrol in the treatment of diabetic kidney disease based on network pharmacology, molecular docking, and experimental validation[J]. *J Transl Med*, 2023, 21: 380.
- 3 Petrazzuolo A, Sabiu G, Assi E, et al. Broadening horizons in mechanisms, management, and treatment of diabetic kidney disease[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 190: 106710.
- 4 Jaikumkao K, Thongnak L, Htun KT, et al. Dapagliflozin and metformin in combination ameliorates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis and activating autophagy in diabetic rats[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870: 166912.
- 5 Liu YH, Wang ST, Jin G, et al. Network pharmacology-based study on the mechanism of ShenKang injection in diabetic kidney disease through Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 118: 154915.
- 6 Michos ED, Bakris GL, Rodbard HW, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in diabetic kidney disease: a review of their kidney and heart protection[J]. *Am J Prev Cardiol*, 2023, 14: 100502.
- 7 Hu HT, Li WW, Hao YQ, et al. Baicalin ameliorates renal fibrosis by upregulating CPT1 α -mediated fatty acid oxidation

- in diabetic kidney disease [J]. *Phytomedicine*, 2024, 122: 155162.
- 8 Liu X, Wang X, Liu X, et al. Carvacrol alleviates oxidative stress damage in rats with diabetic nephropathy via the SIRT1/FOXO1 pathway[J]. *Chongqing Med J (重庆医科大学学报)*, 2023, 48: 771-776.
- 9 Qing J, Zhou H, Chen L, et al. Effect and mechanism of carvacrol on liver injury in type 2 diabetes mellitus [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2024, 42: 131-135.
- 10 Khalaf MM, Hassan SM, Sayed AM, et al. Carvacrol mitigates vancomycin-induced nephrotoxicity via regulation of IkB α /p38MAPK and Keap1/Nrf2 signaling pathways: an experimental study with in silico evidence[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26: 8738-8755.
- 11 Ram C, Gairola S, Syed AM, et al. Carvacrol preserves antioxidant status and attenuates kidney fibrosis via modulation of TGF- β 1/Smad signaling and inflammation[J]. *Food Funct*, 2022, 13: 10587-10600.
- 12 Jamshidi HR, Zeinabady Z, Zamani E, et al. Attenuation of diabetic nephropathy by carvacrol through anti-oxidative effects in alloxan-induced diabetic rats [J]. *Res J Pharmacogn*, 2018, 5: 57-64.
- 13 Canbaz HT, Sozen ME, Cinar Ayan I, et al. Effects of carvacrol on oxidative stress and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic nephropathy: histological, gene expression, and biochemical insights[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 27: 291.
- 14 Wang KJ, Yin J, Chen JY, et al. Inhibition of inflammation by berberine: Molecular mechanism and network pharmacology analysis[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155258.
- 15 Shang LR, Wang YC, Li JX, et al. Mechanism of Sijunzi Decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302: 115876.
- 16 Shi XY, Zhang WW, Bao X, et al. Eugenol modulates the NOD1-NF- κ B signaling pathway via targeting NF- κ B protein in triple-negative breast cancer cells [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1136067.
- 17 Tan XP, He Y, Yang J, et al. Blockade of NMT1 enzymatic activity inhibits N-myristoylation of VILIP3 protein and suppresses liver cancer progression[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 14.
- 18 Xue LW, Jin XS, Ji TT, et al. Luteolin ameliorates DSS-induced colitis in mice via suppressing macrophage activation and chemotaxis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124: 110996.