

# 基于网络药理学和体外细胞实验验证探讨 乳香治疗急性肾损伤的作用机制

白娟,张琰,洪术霞,史金平,徐丽婷,王芳\*

西安国际医学中心医院药学部,西安 710100

**摘要:**基于网络药理学研究乳香对急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)疾病的作用机制,并根据结果建立人肾小管上皮细胞(HK-2)体外模型进行验证。通过TCMSP数据库和Swiss Target Prediction数据库筛选出223个药物靶点;应用OMIM、DisGeNet、DrugBank及GeneCards数据库收集到1245个疾病靶点,通过韦恩图工具获取药物-疾病靶点72个。通过String数据库构建蛋白互作PPI网络;利用DAVID数据库进行GO分析和KEGG通路分析;通过Cytoscape 3.7.2软件构建网络关系图;通过Autodock进行分子对接。涉及Toll样受体、TNF、NF- $\kappa$ B等相关信号通路。基于此,通过细胞活性检测(CCK-8)法检测HK-2的增殖情况并以此确定分组,Hoechst33258荧光染色法检测细胞凋亡率,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的表达情况,聚合酶链式反应(Q-PCR)法检测MAPK3、PPARG mRNA相对表达。实验结果表明,在CCK-8实验与模型组相比,低、中、高剂量组的细胞活力逐渐增加( $P < 0.05$ );Hoechst33258、ELISA以及Q-PCR实验中,与模型组相比,低、中、高剂量组的细胞凋亡率、细胞炎症因子的产生能力和JAK2、STAT3蛋白分子量与mRNA相对表达均显著降低( $P < 0.05$ )。综上,乳香抗急性肾损伤具有多靶点、多途径的特点,为后续该药的临床应用提供了研究基础。

**关键词:**乳香;急性肾损伤;网络药理学;TLR4;NF- $\kappa$ B

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)9-1613-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.9.015

## Mechanism of olibanum in the treatment of acute kidney injury based on network pharmacology and *in vitro* cell experiment verification

BAI Juan, ZHANG Yan, HONG Shu-xia, SHI Jin-ping, XU Li-ting, WANG Fang\*

Department of Pharmacy, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710100, China

**Abstract:** To study the mechanism of olibanum on acute kidney injury (AKI) based on network pharmacology, and establish an *in vitro* model of human renal tubular epithelial cells (HK-2) according to the results. To search 223 drug targets through the TCMSP database and the Swiss Target Prediction database, then using the OMIM, DisGeNet, DrugBank and GeneCards database to collect 1245 disease targets, 72 drug-disease targets were obtained through the Venn diagram tool. Protein interaction PPI network was constructed by String database; GO analysis and KEGG pathway analysis were performed using DAVID database; Cytoscape 3.7.2 software was used to construct the network diagram; Molecular docking was performed by Autodock. Involving Toll-like receptor, TNF, NF- $\kappa$ B and other signaling pathways. Based on this, the proliferation of HK-2 was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method, and the grouping was determined. The rate of cell apoptosis was detected by Hoechst33258 fluorescent staining, and the quantitative real time polymerase chain reaction (Q-PCR) was used to detect the relative expression of MAPK3 and PPARG mRNA. The experimental results showed that in CCK-8 experiment, compared with the model group, the cell viability in low, medium and high dose groups decreased gradually ( $P < 0.05$ ); Hoechst33258 experiment, ELISA experiment and Q-PCR experiment, compared with the model group, the cell apoptosis rate, the capacity of cellular inflammatory factors and the molecular weight and mRNA expression of MAPK3 and PPARG protein de-

收稿日期:2023-02-14

接受日期:2023-05-30

基金项目:西安国际医学中心医院青年基金(2021QN006)

\*通信作者 E-mail:20205077@nwu.edu.cn

creased significantly ( $P < 0.05$ ). In conclusion, olibanum has the characteristics of multi-target and multi-pathway, which provides a basis for the clinical application of this drug.

**Key words:** olibanum; acute kidney injury; network pharmacology; TLR4; NF- $\kappa$ B

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是指多种病因和发病机制引起的突发和持续性肾功能下降,是临床上常见的危重症之一,具有较高的发病率、复发率和死亡率。据统计,全球每年约有1 300万例患者发病,由于治疗药物及策略的缺乏,致使每年约有170万例患者死亡,并且85%患者在发展中国家<sup>[1]</sup>。AKI的预防和治疗过程中,稳定血压和提高有效循环血容量非常重要<sup>[2]</sup>,因此,寻找预防和治疗AKI的药物,对挽救该疾病患者生命具有非常重要的意义。中药具有多成分、多靶点的特点,在防治AKI方面取得了较大的进展<sup>[3]</sup>。

乳香(olibanum)来源于橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw. 及同属植物 *B. bhaw-dajiana* Birdw. 树皮渗出的树脂。性温,味辛、苦,具有“活血定痛,消肿生肌”的功效,乳香活血止痛功效的主要成分为乳香酸化合物<sup>[4]</sup>。现代研究表明,乳香具有抗菌、抗癌、抗炎、抗氧化等活性<sup>[5]</sup>,基于其作用特点,进一步研究乳香对AKI的作用机制。

本研究通过网络药理学对乳香的活性成分进行筛选,构建药物-活性成分-疾病-靶点网络,在此基础上运用体外细胞实验进行验证,并阐明乳香防治AKI的作用机制,为其开发为抗急性肾损伤药物提供可靠的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 乳香相关成分及靶点预测

通过 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) 数据库,以口服利用度(oral bio-availability, OB)  $\geq 30\%$  且类药性(drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$  的属性值筛选出活性成分。结合相关文献研究<sup>[6-8]</sup>,将与研究主题相关的化合物,仍纳入活性成分中。将活性成分输入 Pubchem 数据库,找到 Canonical SMILES,再利用 SwissTargetPrediction 进行靶点预测,输入成分的 Canonical SMILES 形式,物种选择为 *Homo sapiens*,将其中 probability  $> 0.1$  的活性成分的靶基因进行筛选收集。

### 1.2 急性肾损伤疾病靶点筛选

以“acute kidney injury”“AKI”为关键词,分别通过 OMIM 数据库 (<http://www.omim.org>)、DisGeNet 数据库 (<http://www.disgenet.org/home/>)、

DRUGBANK 数据库 (<https://www.DrugBank.ca/>) 及 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>) 筛选出疾病相关靶点。

### 1.3 共有靶点筛选

将筛选后的乳香活性成分靶点和急性肾损伤疾病靶点,统一利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 进行统一规范。通过 VENNY 2.1 网站 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 绘制韦恩图,取得化合物-疾病交集,映射筛选出共同靶点。

### 1.4 乳香与急性肾损伤共有靶点 PPI 网络构建

利用 String 数据库 (<https://string-db.org>),将共有靶点导入,选择总得分  $> 0.4$  和“*Homo sapiens*”,去除无交互作用的单一蛋白,其余均为默认设置,利用 Cytoscape 3.7.2 软件将共有靶点 PPI 网络可视化,分析筛选出核心靶点。

### 1.5 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析

使用 DAVID 数据库 (<http://www.david.niaid.nih.gov>) 将筛选出的乳香与急性肾损伤共有靶点录入,设置  $P < 0.05$ ,分析其主要的生物学过程与代谢通路并进行富集分析,结果以条形图或气泡图形式呈现,根据核心通路富集程度探究乳香治疗 AKI 的可能作用机制。

### 1.6 分子对接验证

将乳香的主要活性成分和靶点进行分子对接验证。活性成分和靶点使用 Pymol 和 AutoDockTools 进行修饰。结合能可用于评价化合物与目标物的结合程度。结合能小于  $-5$  kJ/mol,表明目标物与组分结合效果较好<sup>[9]</sup>。

### 1.7 体外细胞实验方法

#### 1.7.1 实验材料

$\alpha$ -乳香酸(货号:20130517,纯度 $\geq 95\%$ ,宝鸡辰光生物科技有限公司);DMEM 培养液、胰蛋白酶、胎牛血清、青霉素/链霉素溶液(货号分别为:SH30021、J200033、SH30396、SV30010, Hyclone); CCK-8、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(货号分别为:C0037、PI328、PT516,碧云天生物技术有限公司);Hoechst33258(货号:H1398, Thermo);人肾小管上皮细胞(HK-2),为本实验室传代培养获得;细胞使用 DMEM 培养液培养。

### 1.7.2 体外 I/R 模型制备

取复苏后第 3~4 代人近曲肾小管上皮细胞(HK-2),调整细胞终浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,种入 6 孔培养板,在  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$  环境中培养 24 h,当 HK-2 细胞达到 80% 汇合时,用 Hank's 平衡盐溶液(含有  $1.3\text{ mmol/L}$  Ca 和  $0.8\text{ mmol/L}$  Mg)代替培养基。在初步实验中,我们消耗 ATP 和葡萄糖,分别用  $400\text{ }\mu\text{mol/L}$  抗霉素 A(复合物 III 线粒体电子传递抑制剂)和  $10\text{ mmol/L}$  2-脱氧葡萄糖(L-葡萄糖的非代谢异构体)培养 4 h,模拟 HK-2 细胞体外缺血,然后在完全生长培养基中恢复到正常条件(5%  $\text{CO}_2$  和 95%  $\text{O}_2$ )24 h 以用于复氧和再灌注<sup>[10-12]</sup>。

### 1.7.3 实验分组与细胞增殖实验

实验分为对照组(Con)、模型组(Mod)、 $\alpha$ -BA 低剂量组( $\alpha$ -BA-L,  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ )、 $\alpha$ -BA 中剂量组( $\alpha$ -BA-M,  $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ )、 $\alpha$ -BA 高剂量组( $\alpha$ -BA-H,  $40\text{ }\mu\text{mol/L}$ )。待 HK-2 细胞进入指数生长期,DMEM 培养液悬浮并调整浓度为  $5 \times 10^3$  个细胞/孔接种到 96 孔板中。缺血再灌注组用上述方法处理。在模型 + 治疗药物组中, HK-2 分别用 I/R 和  $\alpha$ -BA 低、中、高剂量处理 24 h。然后加入  $10\text{ }\mu\text{L}$  CCK-8 并将细胞孵育 4 h,并使用酶标仪在  $450\text{ nm}$  下测量吸光度。

### 1.7.4 细胞凋亡检测

将细胞以密度为每孔  $5 \times 10^5$  个接种到 6 孔板中。接种 24 h 后,细胞贴壁,待细胞充满培养瓶 80% 时,加入  $\alpha$ -BA,继续培养 24 h 后,造体外缺血再灌注模型,造模完成后,吸去上清,用 PBS 冲洗 2 遍,用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 冲洗 2 遍,每孔加入  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  Hoechst 33258 染色液,染色 30 min。用 PBS 洗 2 遍,加一滴抗荧光淬灭液。置于荧光显微镜下观察,并随机拍照。

### 1.7.5 血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 表达水平

ELISA 法对 HK-2 细胞培养上清、模型组细胞、

$\alpha$ -BA 低、中、高剂量组,细胞培养上清液中的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  进行含量测定,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.7.6 实时荧光定量 PCR 法检测 MAPK3 和 PPAR $\gamma$ 的相对表达量

取对数生长期的细胞按上述分组进行处理 6 h,收集细胞,按照试剂盒说明分别提取各组细胞总 RNA。根据逆转录试剂盒说明书对提取的 mRNA 进行逆转录。其中 MAPK3 上游引物序列:5'-CTA-CACGCAGTTGCAGTACAT-3',下游引物序列:5'-CAGCAGGATCTGGATCTCCC-3'; PPAR $\gamma$  上游引物序列:5'-GGGATCAGCTCCGTGGATCT-3',下游引物序列:5'-TGCACCTTTGGTACTCTTGAAGTT-3'。PCR 反应条件:95  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min,95  $^\circ\text{C}$  变性 30 s,60  $^\circ\text{C}$  退火 30 s,72  $^\circ\text{C}$  延伸 30 s,共 45 个循环。每组设 3 个复孔,重复 3 次,以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算各目的基因的相对表达量。

### 1.7.7 统计学处理

采用 SPSS 25 软件进行统计分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。各组间比较采用单因素方差分析,两组均数比较采用成组  $t$  检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学结果

#### 2.1.1 乳香主要活性成分及靶点预测结果

通过 TCMSP 数据库初步获得乳香的活性成分共 127 个,经过 OB 值和 DL 值筛选及文献补充后,最终获得主要活性成分共 10 个(见表 1)。活性成分导入 SwissTargetPrediction 数据库中进行靶点预测,去除重复值后共得到化学成分相应靶点 223 个。在 Cytoscape 中建立了一个具有 79 个节点和 210 个边缘的可视化网络图,如图 1 所示。

表 1 乳香活性成分

Table 1 The active ingredient of Boswellic

Mol ID	化合物名称 Molecule name	OB(%)	DL
MOL001215	甘遂醇 Tirucallol	42.12	0.75
MOL001241	3-O-乙酰基- $\alpha$ -乳香酸 3-O-Acetyl- $\alpha$ -boswellic acid	42.73	0.7
MOL001243	$\alpha$ -乳香酸 $\alpha$ -Boswellic acid	39.32	0.75
MOL001255	乳香酸 Boswellic acid	39.55	0.75

续表 1 (Continued Tab. 1)

Mol ID	化合物名称 Molecule name	OB(%)	DL
MOL001263	3-氧代-铁铝酸 3-Oxo-tirucallic acid	42.86	0.81
MOL001265	乙酰- $\alpha$ -乳香酸 Acetyl- $\alpha$ -boswellic acid	42.73	0.7
MOL001272	燃烧物 Incensole	45.59	0.22
MOL001295	扁枝杉烯 Phyllocladene	33.4	0.27
MOL001268	$\beta$ -乳香酸 $\beta$ -Boswellic acid	17.63	0.75
MOL001264	3-乙酰基-11-酮- $\beta$ -乳香酸 3-Acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid	17.79	0.67

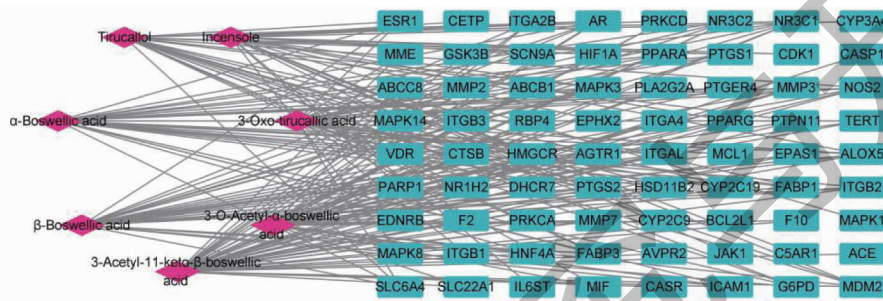


图 1 乳香“化合物-靶点”的可视化网络图

Fig. 1 Visualization network diagram of “compound-target” for olibanum

注:浅蓝色为乳香;桃粉色为基因靶点。Note: Light blue is olibanum; Peach pink is the gene target.

### 2.1.2 急性肾损伤相关靶点的获取

检索 OMIM、Disgenet、DrugBank、GeneCards 数据库,获得急性肾损伤疾病靶点,筛选并去除重复值后得到疾病相应靶点 1 245 个。

### 2.1.3 交集靶点韦恩图绘制

将乳香活性成分靶点与 AKI 疾病相关靶点取交集得到共有靶点 72 个,绘制交集靶点基因的韦恩图(见图 2)。

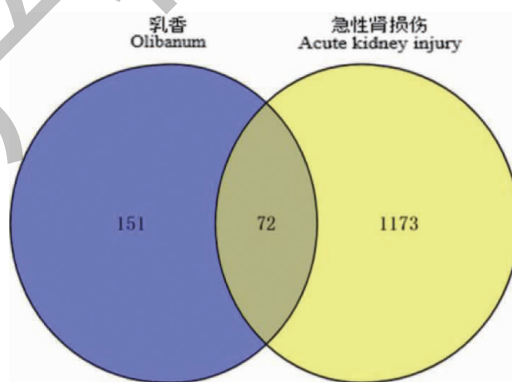


图 2 乳香-急性肾损伤交集靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram for the intersection targets of olibanum-AKI

### 2.1.4 PPI 蛋白互作网络分析

将交集靶点导入 String 数据库,获得 PPI 蛋白互作网络信息,利用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制靶蛋白 PPI 网络(见图 3)。图中共有 71 个节点,479 条

边缘。根据度值和紧密度进行排序,前 5 位分别为 MAPK3、PPARG、PTGS2、HIF1 $\alpha$  和 ESR1(见表 2),其中 degree 值越大,图形越大,颜色越深(红);combine scores 越大,颜色越浅(蓝),线条越粗。

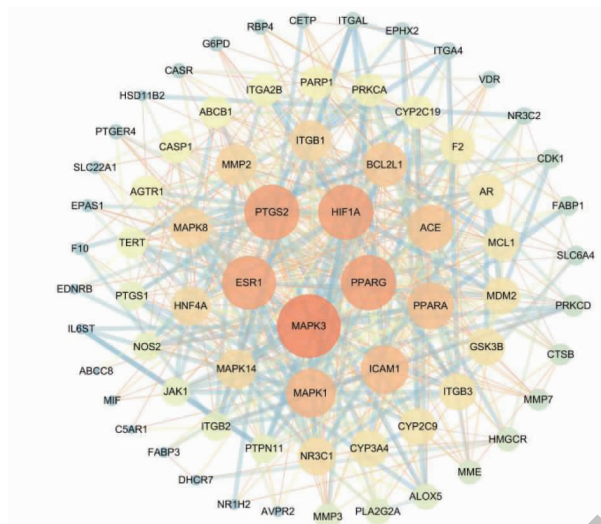


图 3 乳香对急性肾损伤作用靶点的 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram of the targets of the action of olibanum on AKI

表 2 乳香-急性肾损伤匹配基因注释及其度值和紧密度

Table 2 Olibanum-AKI matching gene annotation and its degree and closeness centrality

基因名称 Gene name	注释 Annotate	度值 Degree	紧密度 Closeness centrality
MAPK3	丝裂原活化蛋白激酶 3 Mitogen-activated protein kinase 3	40	0.70
PPARG	过氧化酶体增殖物激活受体 $\gamma$ Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	33	0.65
PTGS2	环氧酶 2 Prostaglandin G/H synthase 2	33	0.65
HIF1 $\alpha$	低氧诱导因子-1 $\alpha$ Hypoxia-inducible factor 1-alpha	33	0.64
ESR1	雌激素受体 1 Estrogen receptor	32	0.63

### 2.1.5 GO 功能富集分析

对乳香治疗急性肾损伤进行 GO 功能分析,发现其可能的作用机制。GO 富集分析分为 3 类:分别是生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。GO 功能分析得到 101 个 BP,主要有基因表达的正向调控、对缺氧的反应、凋亡过程、血管收缩的正向调节、炎症反应等;34 个 CC,主要有整合素复合物、细胞表面、质膜、细胞质、线粒体等;72 个 MF,主要有酶结合、转录共激活因子结合、细胞黏附分子结合、内肽酶活性及 MAP 激酶活性等。对排名前 10 的 GO 功能分析进行展示(见图 4)。

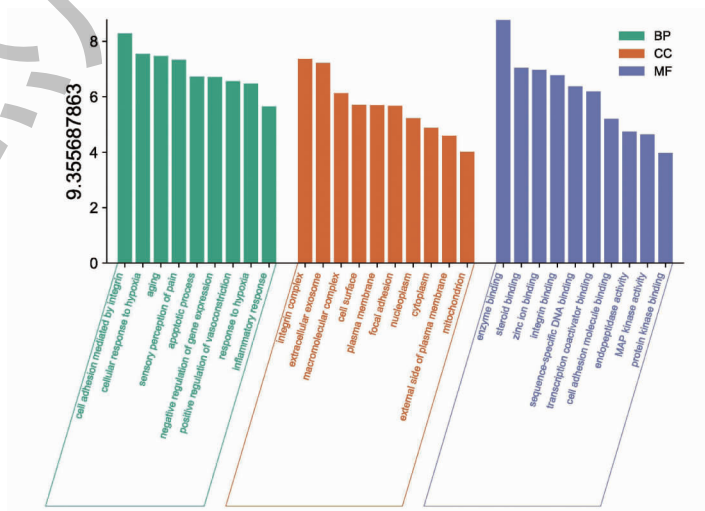


图 4 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis

### 2.1.6 KEGG 通路富集分析

通过 KEGG 通路富集分析,共得到 117 个结果,主要涵盖包括 Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路

和 NF- $\kappa$ B 信号通路等,对排名前 20 的 KEGG 通路富集分析进行展示(见图 5)。

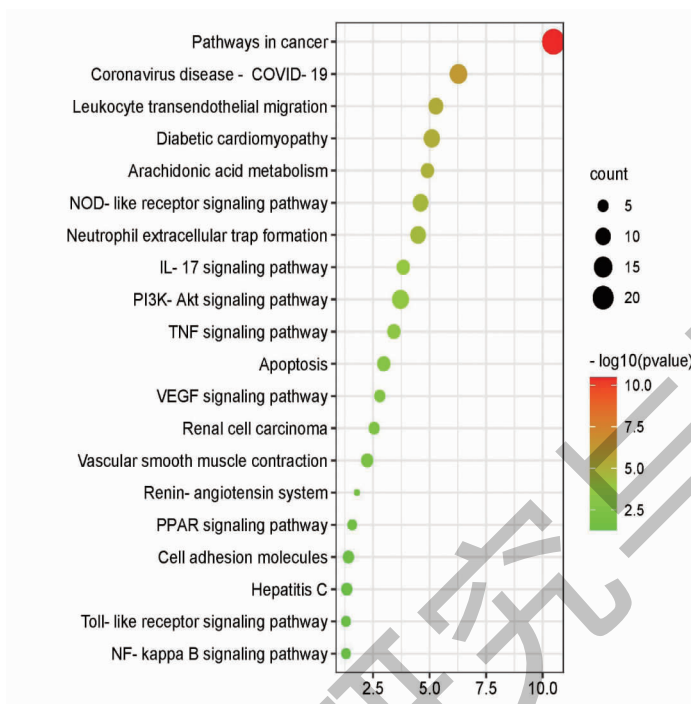


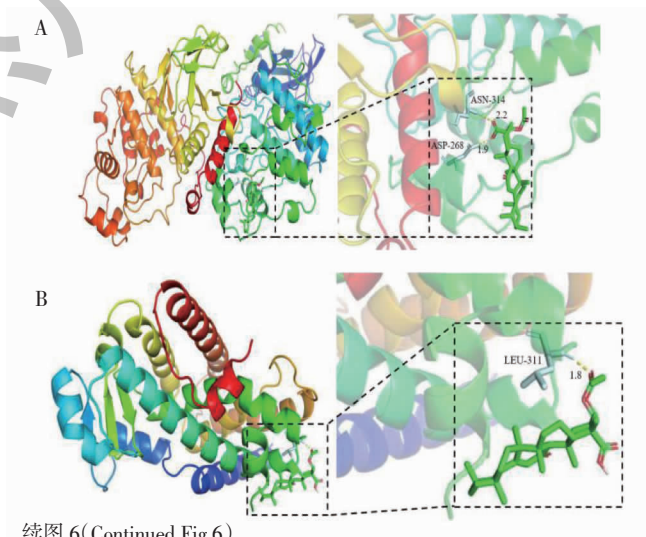
图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

### 2.1.7 分子对接验证

通过模拟有效成分 3-乙酰基-11-酮- $\beta$ -乳香酸 (AKBA) 和  $\alpha$ -乳香酸 ( $\alpha$ -BA) 分别与 AKI 潜在药物核心靶点 MAPK3 和 PPARG 对接。AKBA 对 MAPK3 (结合能为-7.79 kJ/mol) 和 PPARG (结合能

为-9.71 kJ/mol) 具有较强的结合能力;  $\alpha$ -BA 对 MAPK3 (结合能为-8.4 kJ/mol) 和 PPARG (结合能为-8.23 kJ/mol) 的对接能力均较好。分子对接验证可为进一步研究药物靶点提供重要的参考依据,对接结果如图 6 所示。



续图 6(Continued Fig.6)



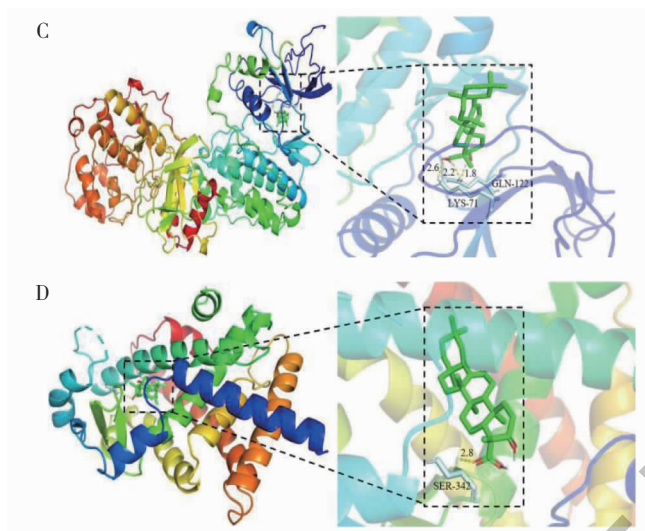


图6 分子对接模式图

Fig. 6 Molecular docking diagram

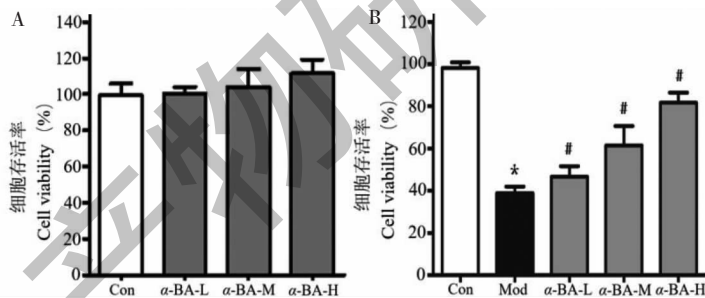
注:A. AKBA 与 MAPK3;B. AKBA 与 PPARG;C.  $\alpha$ -BA 与 MAPK3;D.  $\alpha$ -BA 与 PPARG。Note:A. AKBA and MAPK3;B. AKBA and PPARG; C.  $\alpha$ -BA and MAPK3;D.  $\alpha$ -BA and PPARG.

## 2.2 体外细胞实验结果

### 2.2.1 细胞活性检测结果

检测结果表明,当使用  $\alpha$ -BA 低、中、高浓度时,

HK-2 细胞活力与对照组差异无统计学意义(见图 7A);但模型组可显著抑制 HK-2 细胞的增殖, $\alpha$ -BA 以浓度依赖性方式显著增强其活力(见图 7B)。

图7  $\alpha$ -BA 对 HK-2 细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Fig. 7 Effect of  $\alpha$ -BA on proliferation of HK-2 cell ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

注:与对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.01$ ,下同。Note:Compared with control group,\* $P < 0.01$ ;Compared with Model group,# $P < 0.01$ ,the same below.

### 2.2.2 $\alpha$ -BA 对肾缺血再灌注细胞凋亡的影响

利用 Hoechst 33258 染色结果显示模型组显著上调凋亡细胞的比例,而  $\alpha$ -BA 显著降低其凋亡细胞并呈浓度依赖性(见图 8)。结果表明, $\alpha$ -BA 有效抑制 I/R 诱导的肾近端肾小管细胞凋亡。

### 2.2.3 $\alpha$ -BA 对 HK-2 细胞中细胞因子 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 水平的影响

与对照组比较,模型组细胞中的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平显著性升高;与模型组比较, $\alpha$ -BA 给药组中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平降低,且其变化呈现出剂量依

赖性关系(见图 9)。

### 2.2.4 HK-2 细胞中关键靶点基因 RT-qPCR 检测结果

本研究选取 AKI 相关的主要靶点 MAPK3 和 PPARG 基因进行验证。与对照组比较,I/R 模型组 MAPK3 和 PPARG 基因 mRNA 明显上调,与模型组比较, $\alpha$ -BA 低、中、高剂量组 MAPK3 和 PPARG 基因 mRNA 表达均明显下调,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(见图 10)。

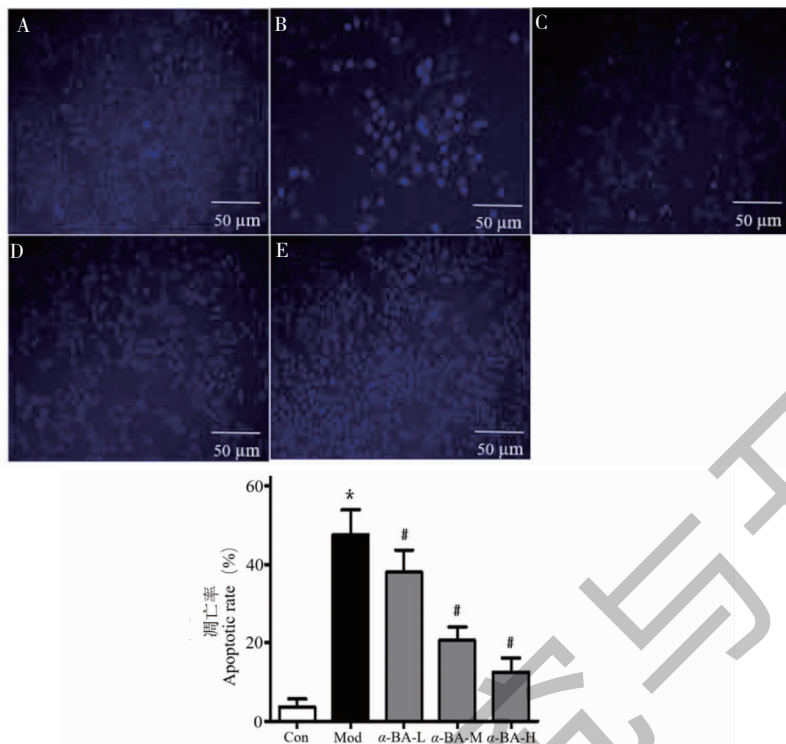


图8  $\alpha$ -BA 对 I/R 诱导 HK-2 凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Effect of  $\alpha$ -BA on HK-2 apoptosis induced by Mod ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

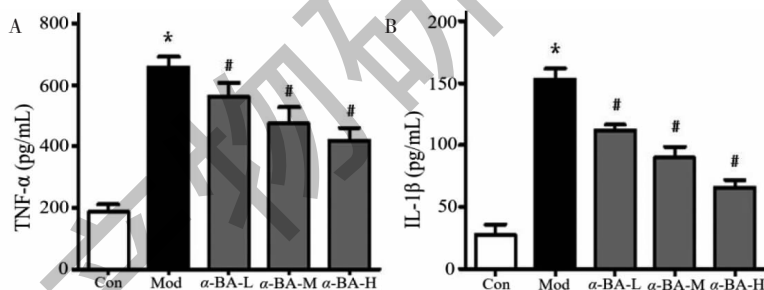


图9 HK-2 细胞中 TNF- $\alpha$  (A) 和 IL-1 $\beta$  (B) 水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 9 Levels of TNF- $\alpha$  (A) and IL-1 $\beta$  (B) in HK-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

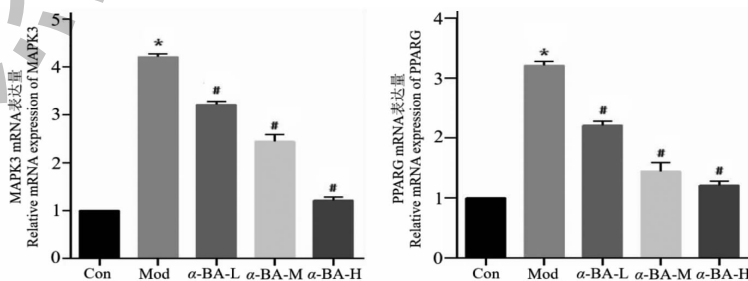


图10  $\alpha$ -BA 对关键靶点基因 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effect of  $\alpha$ -BA on the mRNA of the key target genes ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3 讨论与结论

西医认为 AKI 的发生与肾脏缺血、缺氧有较大

关系,目前为止临床仍缺乏有效的治疗方法和干预措施,主要通过对症治疗来改善患者疾病状态<sup>[13]</sup>。



中医将 AKI 的临床特点归于“癃闭”“关格”“水肿”“溺毒”等范畴<sup>[14]</sup>,故以清热解毒、活血化瘀、泻热逐水、通腑泻浊为治疗基本法则<sup>[15]</sup>。乳香具有生肌止血、活血祛瘀,消肿止痛功效,临床多用于治疗血瘀证或痹证等<sup>[16]</sup>。因此,在急性肾损伤的早、中期加入活血化瘀药,对患者肾功能的改善、减轻血尿等临床表现,以及减慢疾病的进展速度等方面有着重要的防治作用<sup>[17]</sup>。

本研究利用网络药理学的方法,系统地分析了乳香“多成分-多靶点-多途径”治疗 AKI 的物质基础和作用机制。大量实验证明乳香酸被认为是乳香中最具生物活性的成分。最显著的是抗炎和抗肿瘤特性,以及许多其他药理活性,如抗溃疡、免疫调节、降血脂、肾保护、抗菌作用等<sup>[18]</sup>。研究结果表明,AKBA、 $\alpha$ -BA 等是治疗 AKI 的主要活性成分。有文献报道, $\alpha$ -BA 可以抑制 U937 巨噬细胞中 LPS 刺激的促炎细胞因子(TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ )的产生,证实了其在体外的抗炎特性<sup>[19]</sup>。乳香的生物活性成分五环三萜,通过 5-脂氧合酶阻断白三烯的生物合成并发挥其抗炎作用<sup>[20]</sup>。有研究表明,乳香酸通过抗氧化和抗炎作用对环磷酰胺诱导的膀胱炎大鼠发挥尿路保护作用<sup>[21]</sup>。

由 PPI 网络可知 MAPK3、PPARG、PTGS2、HIF1 $\alpha$  和 ESR1 是乳香治疗急性肾损伤的核心靶点。MAPK3 属于丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 家族成员。MAPK 级联激活是多种信号通路的中心,参与细胞生长、分化、凋亡等生理过程<sup>[22]</sup>。PPARG 属于核转录因子超家族,实验证明 PPARG 缺失小鼠出现糖尿病和白蛋白尿增加,随着年龄的增长,小鼠出现肾功能不全、2 型糖尿病进一步加重<sup>[23]</sup>。据报道,PPARG 激动剂通过抑制 I/R 损伤诱导的弥漫性肾小管坏死和急性炎症,并降低一氧化氮血浆水平、ED-1<sup>+</sup> 细胞浸润,从而保护肾脏免受 I/R 损伤,PPAR 激动剂在治疗 AKI 方面显示出相当大的前景<sup>[24]</sup>。PTGS2 是花生四烯酸转化为炎症介质前列腺素的关键酶,主要分布在核膜,受炎症因子、肿瘤生长因子等刺激后诱导其表达。研究表明,金骨莲提取物剂量依赖性下调 PTGS2/COX-2 mRNA 表达,从而发挥抗炎作用<sup>[25]</sup>。HIF1 $\alpha$  是对缺氧的适应性反应的主要调节因子,在肾缺血-再灌注诱导的 AKI 模型中,HIF1 $\alpha$  在肾小管上表达明显增多<sup>[26]</sup>。

在 GO 富集分析的过程中,主要涉及对缺氧的反应、凋亡过程、炎症反应等生物过程、线粒体等分

子功能以及内肽酶活性等细胞组分,提示乳香治疗 AKI 的生物学途径丰富且复杂。由 KEGG 通路富集分析可知,乳香治疗 AKI 的信号通路与 Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路相关。其中,Toll 样受体(Toll-like receptor,TLR)是一种膜蛋白受体,TLR4 是引起 AKI 炎症反应的重要分子,可转录及释放多种细胞因子和炎症介质,引发免疫炎症反应<sup>[27]</sup>。有研究表明,急性肾损伤严重程度与血清 TLR4、NF- $\kappa$ B 水平密切相关,通过抑制 TLR4-NF- $\kappa$ B 信号通路可减轻急性肾损伤严重程度<sup>[28]</sup>。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor TNF)是一种具有广泛生物学效应的细胞因子,一般 TNF 是指巨噬细胞产生的,即 TNF- $\alpha$ 。被激活后主要发挥促进细胞生长、分化、凋亡及诱发炎症等重要作用<sup>[29]</sup>。AKI 激活 TLR4-NF- $\kappa$ B 信号通路后,诱导促炎因子 TNF- $\alpha$  释放。故加强对 TLR4、NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$  水平的控制,以减轻急性肾损伤,促进患者预后改善。

采用分子对接法对乳香中主要有效成分作用于 MAPK3 和 PPARG 的结合能进行了测定,结果显示 AKBA 和  $\alpha$ -BA 对 MAPK3 和 PPARG 都有良好的结合能力。

最后,本研究通过细胞培养模拟肾脏 I/R 损伤研究  $\alpha$ -BA 的作用机制。研究结果表明  $\alpha$ -BA 对 HK-2 细胞无毒性作用,且呈剂量依赖性提高 I/R 损伤模型的细胞活力,提示具有肾脏保护作用。Hoechst 33258 染色显示 I/R 处理显著上调凋亡细胞的比例,而  $\alpha$ -BA 显著降低其凋亡细胞并呈浓度依赖性。 $\alpha$ -BA 可显著抑制由 I/R 诱导的 HK-2 细胞产生的炎症因子。同时,实时荧光定量 RT-PCR 检测表明, $\alpha$ -BA 能够下调 AKI 进程中的关键靶点 MAPK3 和 PPARG 基因表达,这与网络药理学预测的结果相一致。

本研究运用中药网络药理学的方法,检索出乳香的活性成分及潜在靶点,以及 AKI 的相关靶点,得到活性成分与疾病靶点交集为 72 个,再对这些靶点进行 GO 及 KEGG 信号通路富集分析,预测出主要的活性成分 AKBA、 $\alpha$ -BA 等,主要通过调节 MAPK3、PPARG、PTGS2 等靶点,调控 Toll 样受体、TNF 和 NF- $\kappa$ B 等信号通路来减轻缺血、缺氧损伤、调控细胞凋亡,从而达到治疗 AKI 的目的。同时,体外细胞实验初步证实了预测的准确性和可靠性,为后续中医药研究及临床推广提供了参考依据。但其仍具有一定的局限性,有待动物实验进一步验证。

## 参考文献

- 1 Mehta RL, Cerda J, Burdman EA, et al. International Society of Nephrology's Oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology[J]. *Lancet*, 2015, 385:2616-2643.
- 2 Yan WJ, Zhang J. Research progress in acute kidney injury[J]. *J Int Pathol Clin Med (临床与病理杂志)*, 2019, 39: 1571-1575.
- 3 Zhang YF, Chen GY. Curative effect of combination therapy of activating blood circulation and removing blood stasis on chronic renal failure and its effects on the patients' renal function and electrolyte[J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志)*, 2018, 27:3790-3793.
- 4 Cai HD, Su SL, Zhou W. Research progress in boswellic acids from medicinal plants in *Boswellia* Roxb. ex Colebr. and their pharmacological action as well as mechanisms[J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2016, 47:2175-2181.
- 5 Yang L, Lin LF, Liu YL, et al. Research progress of mastiche and olibanum[J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2021, 52:1193-1205.
- 6 Sami MM, Ali EAI, Galhom RA, et al. Boswellic acids ameliorate doxorubicin-induced nephrotoxicity in mice; a focus on antioxidant and antiapoptotic effects[J]. *Egyptian J Basic Appl Sci*, 2019, 6:10-24.
- 7 Liu M, Liu T, Shang P, et al. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid ameliorates renal interstitial fibrosis via Klotho/TGF-beta/Smad signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 4997-5007.
- 8 Liu MN, Lliu TL, Liu LM, et al. Preventive and therapeutic effects of  $\alpha$ -boswellic acid on renal interstitial fibrosis in mice[J]. *Shandong Med J (山东医药)*, 2018, 58:18-22.
- 9 Li B, Rui J, Ding X, et al. Exploring the multicomponent synergy mechanism of Banxia Xiexin Decoction on irritable bowel syndrome by a systems pharmacology strategy[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 233: 158-168.
- 10 Wang LT, Chen BL, Wu CT, et al. Protective role of AMP-activated protein kinase-evoked autophagy on an in vitro model of ischemia/reperfusion-induced renal tubular cell injury[J]. *PLoS One*, 2013, 8:e79814.
- 11 Xie J, Guo Q. Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17:3336-3346.
- 12 Lee HT, Emala CW. Preconditioning and adenosine protect human proximal tubule cells in an in vitro model of ischemic injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13:2753-2761.
- 13 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 Stan Manag (中国卫生标准管理)*, 2021, 12:125-127.
- 14 Li YX, Zhu XL, Yin LP. An analysis of Professor WANG Canhui's academic thought on the treatment of acute kidney injury[J]. *Clin Res in Chin Med (中医临床研究)*, 2022, 14:76-79.
- 15 Zhang J, Xie H, Ma J. Effect of Jiefenxiao decoction combined with basic treatment on the short-term and long-term renal function of acute kidney injury[J]. *Tradit Chin Med Res (中医研究)*, 2019, 32:14-17.
- 16 Ha RW, Zhou HY, Zhan ZL, et al. review of chemical components and pharmacological actions of Ruxiang (olibanum) and predictive analysis of its quality markers[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2021, 39:94-107.
- 17 Guo Y, Zhang CF. Research progress in the treatment of kidney diseases by activating blood circulation and removing stasis[J]. *Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药)*, 2017, 13: 61-63.
- 18 Xiong L, Liu Y, Zhu F, et al. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid attenuates titanium particle-induced osteogenic inhibition via activation of the GSK-3 $\beta$ /beta-catenin signaling pathway[J]. *Theranostics*, 2019, 9:7140-7155.
- 19 Zhang J, Zhao J, Sun Y, et al. GR-mediated anti-inflammation of alpha-boswellic acid: Insights from *in vitro* and *in silico* studies[J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 155:112379.
- 20 Siemoneit U, Pergola C, Jazsar B, et al. On the interference of boswellic acids with 5-lipoxygenase: mechanistic studies in vitro and pharmacological relevance[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 606:246-254.
- 21 Fatima M, Anjum I, Abdullah A, et al. Boswellic acids, pentacyclic triterpenes, attenuate oxidative stress, and bladder tissue damage in cyclophosphamide-induced cystitis[J]. *ACS Omega*, 2022, 7:13697-13703.
- 22 Jo S, Won EJ, Kim MJ, et al. STAT3 phosphorylation inhibition for treating inflammation and new bone formation in ankylosing spondylitis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, 60: 3923-3935.
- 23 Toffoli B, Gilardi F, Winkler C, et al. Nephropathy in Pparg-null mice highlights PPAR $\gamma$  systemic activities in metabolism and in the immune system[J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0171474.
- 24 Gao J, Gu Z. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in kidney diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 832732.

- 25 Li SH, Lian DY, Zhang GP, et al. Inhibitory effect and mechanism of Jingulian extract on LPS-induced RAW264. 7 cell inflammatory response based on PI3K/Akt signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27:29-35.
- 26 Zhang RB, Shen KW, Yuan Q, et al. Research progress of NF- $\kappa$ B signaling pathway in kidney ischemia-reperfusion injury[J]. Organ Transplant(器官移植), 2022, 13:349-355.
- 27 Li WH. Changes and clinical significance of serum TLR4 and NF- $\kappa$ B levels in patients with severe pneumonia complicated with acute kidney injury[J]. J Qiqihar Univ Med(齐齐哈尔医学院学报), 2021, 42:1297-1300.
- 28 Fan H, Zhao Y, Zhu J H. S-nitrosoglutathione protects lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting toll-like receptor 4-nuclear factor-kappaB signal pathway [J]. J Pharm Pharmacol, 2019, 71:1255-1261.
- 29 Niu YL, Cao JM, Wang Z, et al. The mechanism of curcumin improve renal extracellular matrix deposition byregulating Nrf2 signaling pathway in exercise-induced renal injury of rats[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:2123-2130.

## 《天然产物研究与开发》青年编委会

### 青年编委 (以姓氏笔划为序)

#### Members

王 扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		