

基于网络药理学和实验验证探讨二氢杨梅素改善 db/db 小鼠肾纤维化的作用机制

刘醒然^{1,3}, 牛梦竹¹, 高原¹, 寇现娟^{1,2*}

¹武汉体育学院运动医学院; ²武汉体育学院运动训练监控湖北省重点实验室, 武汉 430079;

³广西医科大学体育与健康学院, 南宁 530021

摘要:本研究利用网络药理学、分子对接技术以及动物实验研究探讨二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)改善2型糖尿病 db/db 小鼠肾纤维化的作用机制。首先观察10周的DHM干预对db/db小鼠肾纤维化的改善作用。进一步通过TCMSP、PharmMapper获取DHM化学结构以及靶点,通过DisGeNET数据库检索疾病靶点;将DHM靶点与疾病靶点进行Venn分析,获得交集靶点后上传至String数据库构建PPI网络,采用Cytoscape软件构建“药物-靶点-疾病”网络;David数据库对交集靶点基因进行GO富集分析和KEGG富集分析。同时取PPI网络排名前10的交集靶点进行可视化处理,采用PDB数据库、Pymol软件以及AutoDock Tools软件将排名前5的交集靶点分别与DHM进行分子对接;对排名第一的核心靶点AKT及相关通路进行Western blot验证。动物实验观察可见DHM干预可以降低db/db小鼠体重,改善db/db小鼠血糖、肌酐、尿素氮、尿蛋白水平,HE、Masson和PAS染色结果显示db/db小鼠肾脏纤维化得到缓解。此外,网络药理学筛选共获得药物与疾病靶点交集37个,富集分析得到300个GO相关条目,108条相关通路;分子对接结果表明DHM与关键靶点均能自发结合。Western blot结果显示DHM干预可以降低db/db小鼠肾脏中的Notch1、NICD、Hes1、Hey1的蛋白表达,上调PTEN蛋白表达,抑制AKT的磷酸化,进而改善db/db小鼠肾纤维化。因此,DHM可能通过调控Notch/PTEN/AKT通路改善db/db小鼠肾纤维化。

关键词:糖尿病肾病;肾纤维化;二氢杨梅素;网络药理学;分子对接

中图分类号:R96

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)11-1964-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.11.015

Mechanism of dihydromyricetin in improving renal fibrosis in db/db mice based on network pharmacology and experimental validation

LIU Xing-ran^{1,3}, NIU Meng-zhu¹, GAO Yuan¹, KOU Xian-juan^{1,2*}

¹School of Sports Medicine, Wuhan Sports University;

²Hubei Exercise Training and Monitoring Key Laboratory, Wuhan Sports University, Wuhan 430079, China;

³School of Physical Education and Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: Network pharmacology, molecular docking and animal experimental studies were used to investigate the mechanism of dihydromyricetin (DHM) in improving renal fibrosis in type 2 diabetic db/db mice. Initially, a 10-week DHM intervention was observed to ameliorate renal fibrosis in db/db mice. The chemical structure and targets of DHM were further obtained by TCMSP and PharmMapper, and the disease targets were retrieved by DisGeNET database. Venn analysis was performed on DHM targets and disease targets, and the intersection targets were uploaded to the String database to construct the PPI network. The 'drug-target-disease' network was constructed by Cytoscape software. The GO enrichment analysis and KEGG enrichment analysis of the intersection target genes were performed by the David database. At the same time, the top 10 intersection targets of PPI network were visualized, and the top 5 intersection targets were subjected to molecular docking with DHM using PDB database, Pymol software and AutoDock Tools software. The first core target AKT and related signaling pathways

收稿日期:2023-06-19 接受日期:2023-09-01

基金项目:国家自然科学基金(81601228);教育部人文社会科学基金(21YJA890014)

* 通信作者 Tel:86-013627292193; E-mail:kouxianjuan@126.com

were verified by Western blot. Animal experiments showed that DHM intervention could reduce the body weight of db/db mice and improve the levels of blood glucose, creatinine, urea nitrogen and urine protein in db/db mice. HE, Masson and PAS staining showed that renal fibrosis of db/db mice was alleviated. In addition, a total of 37 intersections of drugs and disease targets were obtained by network pharmacology, 300 GO-related items and 108 related pathways were obtained by enrichment analysis. Molecular docking results showed that DHM could spontaneously bind to key targets. Western blot analysis results showed that DHM intervention could reduce the protein expression of Notch1, NICD, Hes1 and Hey1 in the kidney of db/db mice, up-regulate the level of PTEN protein, inhibit the phosphorylation of AKT, thus improve renal fibrosis. Taken together, DHM may alleviate renal fibrosis in db/db mice by regulating Notch/PTEN/AKT pathway.

Key words: diabetic kidney disease, DKD; renal fibrosis; dihydromyricetin; network pharmacology; molecular docking

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是2型糖尿病(diabetes mellitus type 2, T2DM)主要的血管并发症之一,也是终末期肾病的主要病因。其主要特征是肾小球基底膜的增厚、系膜和肾小管间质的基质扩张以及足细胞丢失,导致微量白蛋白尿的发展和肾功能下降^[1]。随着DKD的持续发展,肾脏组织的显微结构出现持续炎症及损伤,导致弥漫性间质纤维化破坏正常肾脏显微结构,最终发展成肾纤维化(renal fibrosis, RF)。而目前缓解DKD发展成RF的手段多集中于通过改善DKD来实现。但对于包括DKD在内的多数糖尿病并发症的发生机制仍未阐明,以至于DKD演变为RF过程中的复杂机制也未清晰,导致DKD及RF的治疗效果不尽人意^[2]。因此探明DKD的发病机制以及发现新的治疗靶点来抑制DKD的发展迫在眉睫。

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)是一种天然黄酮类化合物,具有多种药理作用,包括抗炎、抗氧化、清除自由基、改善线粒体功能障碍、调节自噬等^[3,4]。目前多项研究表明DHM在治疗代谢性疾病方面具有巨大潜力,其不仅可以通过诱导自噬、改善氧化应激、抑制炎症、提高线粒体活性等途径改善胰岛素抵抗,降低血糖水平^[5];同时对多种糖尿病并发症具有良好的改善作用,如:糖尿病脑病^[6]、糖尿病心肌病^[7]等。但DHM改善糖尿病并发症相关研究并不充分,相关药理机制仍需进一步探究。此外,DHM是否能够进一步改善DKD所导致的RF研究较少,治疗作用尚不明确。

网络药理学可以在庞大的生物发生过程网络背景下,基于中药成分的结构,结合其生物效应,联合疾病相关靶点进而构建“药物—成分—靶点—疾病”互作网络,是探索中药有效成分、分子机制以及潜在靶点的有效手段。分子对接可以模拟分子和蛋白质之间的相互作用,预测配体和受体的构象,对亲和力和结合模式进行计算和预测以验证药物成分对

主要靶点的具体作用方式。因此,本研究采用网络药理学方式,筛选并预测DHM作用于DKD以及RF的潜在靶点,构建“成分—靶点—疾病”互作网络,结合分子对接以及体内实验对预测的主要靶点进行验证,探讨二氢杨梅素改善db/db小鼠肾纤维化的分子机制,为DHM的临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6周龄SPF级雄性m/m小鼠10只,体重 23 ± 2 g,6周龄db/db小鼠20只,体重 39 ± 2 g,购买自常州卡文斯实验动物有限公司,实验动物许可证号SCXK(苏)(2016-0010)。饲养于湿度40%~55%、温度22~26℃,自由饮食饮水,保持良好的通风环境。实验期间均以普通饲料喂养。普通饲料均由武汉市万千佳兴生物科技有限公司提供。本实验经武汉体育学院动物实验伦理委员会批准(伦理审查批准号:0087-202010-1301)。

1.1.2 药物与试剂

二氢杨梅素(纯度98%,批号ALB-202106,美国ALB Technology Limited公司);小鼠尿微量白蛋白ELISA试剂盒(批号2M-KMLJM219762m,南京卡米洛生物工程有限公司);血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血清肌酐(serum creatinine, Scr)试剂盒(批号分别为C013-2-1、C011-2-1,南京建成生物工程研究所);Notch1、Notch胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)抗体(批号分别为20687-1-AP、20687-1-AP,Proteintech公司);split多毛增强子1(hairy and enhancer of split1, Hes1)和发状分裂增强子1(hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1, Hey1)抗体(批号分别为ab71559、ab154077,Abcam公司);第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homo-

logue deleted on chromosome ten, PTEN)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)、*p*-AKT 抗体(批号分别为 9188T、4691T、13038T, Cell Signaling Technology)。

1.1.3 仪器

DYY-6C 型垂直电泳仪(北京市六一仪器厂); EPS-300 型转膜仪器(海天能科技有限公司); 低温高速离心机(5415R, Eppendorf); K3 型酶标仪(赛默飞); 超声波细胞粉碎机(JY99-IIDN, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 荧光及化学放光仪(ChemiScope 6300, 上海勤翔); 显微镜(IXplore SpinSR, Olympus corporation); 数显恒温水浴锅(HH-4, 金坛市友连仪器研究所)。

1.2 方法

1.2.1 网络药理学研究

1.2.1.1 DHM 作用靶点预测与疾病靶点获取

通过 TCMSP (<https://tcmssp-e.com/>) 数据库获取 DHM 化学结构的 mol 文件, 并通过 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Drugbank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库进行验证, 验证后将所获 mol 文件上传至 PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 数据库对 DHM 的作用靶点进行预测, 通过 uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库对所预测靶点名称进行规范化处理。以“diabetic nephropathy”“diabetic kidney disease”“renal fibrosis”为关键词, 采用 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库进行检索, 分别获取“DKD”“RF”的靶点。

1.2.1.2 “药物—靶点—疾病”网络的构建

将获取的 DHM、DKD 以及 RF 的靶点上传至微生信 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 在线平台进行 Venn 图绘制并获取交集基因。而后将交集基因导入 Cytoscape 3.9.1 软件构建“药物—靶点—疾病”可视化互作网络。

1.2.1.3 PPI 网络的构建

将交集基因导入 String (<https://string-db.org/>) 数据库进行蛋白质相互作用分析, 并将分析结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 采用插件 cytoHubba 对分析结果进行网络拓扑参数进行分析, 并以度值 (degree) 为参考依据选取前 10 位基因进行可视化处理, 同时作为后期实验验证的靶基因选取依据。

1.2.1.4 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

采用 David (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库

对交集基因进行基因本体论 (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, 分别筛选 KEGG 富集分析和 GO 分析中的生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞成分 (cellular component, CC) 的前 10 条结果上传至微生信平台进行可视化处理。

1.2.1.5 分子对接

选取 PPI 网络中 degree 值前 5 位的靶基因并结合我们前期研究基础选取靶基因与 DHM 进行分子对接验证。通过查阅文献报道和 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库获取靶基因蛋白结构的 pdb 文件。采用 Pymol 2.5.5 软件对 TCMSP 数据库获取的 DHM 分子结构去除水分子和小分子配体, 采用 AutoDock Tools 1.5.6 对 DHM 结构文件和靶基因蛋白结构文件进行加氢、定义受体和配体、分配扭转键等构象处理; 采用 autogrid4 设置对接盒子, AutoDock4 进行分子对接并获取最低结合能组合。最后使用 Pymol 进行结果可视化处理。

1.2.2 动物实验验证

1.2.2.1 动物分组与模型建立

实验小鼠适应性喂养 1 周后, 将 6 周龄的 m/m 小鼠和 db/db 小鼠随机分为对照组 (NC 组)、2 型糖尿病肾病组 (DKD 组)、DHM 药物干预组 (DHM 组), 每组各 10 只。NC 组正常喂养不做干预, DHM 药物干预组灌胃 DHM (基于前期研究结果选择 DHM 终剂量为 100 mg/(kg·d))^[8,9], DKD 组灌胃等体积的生理盐水, 每周干预 5 d, 连续干预 10 周。

1.2.2.2 样品制备与动物处理

10 周干预结束后, 禁食测血糖, 次日取材, 摘眼球取血, 分离血清用于生化指标检测, 摘取双侧肾脏后, 称重, 取一侧肾脏于多聚甲醛固定, 其余液氮冻存后转 -80 °C 冰箱保存。

1.2.2.3 小鼠体重、空腹血糖和肾功能指标检测

实验期间, 小鼠禁食过夜, 12 h 后每周固定时间测小鼠体重和空腹血糖。10 周干预结束后, 眼球取血, 静置 2 h 后离心取适量血清备用。按照试剂盒提供的方法测定小鼠血清中尿素氮、肌酐、尿蛋白 (urine protein, UP) 表达水平。

1.2.2.4 肾脏组织病理学观察

肾脏组织于 4% 的多聚甲醛固定后, 石蜡切片厚度约 5 μm, 按照乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋, 制备石蜡切片进行 HE、Masson 与 PAS 染色, 观察各组小

鼠肾组织病理学改变。

1.2.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)

提取小鼠肾脏组织及细胞样品的总蛋白,通过 BCA 法测定蛋白浓度后加热变性后制备蛋白样品。经制胶、上样、电泳、PVDF 转膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜后,加入对应的一抗,4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜,二抗室温孵育 1 h, ECL 发光液显影,凝胶成像分析仪摄取图像,计算目标蛋白的灰度值。

1.2.2.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,符合正态分布方差齐性,组间比较采用单因素方差分析;若不符合正态分布,则用非参数检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHM 改善 db/db 小鼠病理表现

2.1.1 DHM 降低 db/db 小鼠体重和空腹血糖

每周定时测定各组小鼠体重和空腹血糖,结果显示与 NC 组相比,DKD 组小鼠体重、血糖均明显升高 ($P < 0.001$ 、 $P < 0.001$)。与 DKD 组小鼠相比,DHM 组小鼠的体重和血糖值下降 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$) (见表 1、表 2)。

2.1.2 DHM 改善 db/db 小鼠的肾功能损伤

与 NC 组相比,DKD 组小鼠血清中肌酐、尿素氮

表 1 DHM 对 db/db 小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of dihydromyricetin on body weight of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	干预前 Before intervention (g)	干预后 After intervention (g)
NC	20.50 ± 0.43	23.03 ± 0.89
DKD	39.34 ± 1.22	39.05 ± 4.28 ^{###}
DHM	39.71 ± 0.77	31.39 ± 5.77 ^{**}

注:与 NC 组相比,^{###} $P < 0.001$;与 DKD 组相比,^{**} $P < 0.01$ 。
Note: Compared with NC,^{###} $P < 0.001$; Compared with DKD,^{**} $P < 0.01$.

表 2 DHM 对 db/db 小鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of dihydromyricetin on blood glucose in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	干预前 Before intervention (mmol/L)	干预后 After intervention (mmol/L)
NC	6.45 ± 1.33	9.69 ± 0.68
DKD	29.14 ± 3.62	32.81 ± 1.22 ^{###}
DHM	30.47 ± 2.90	30.06 ± 2.12 ^{**}

注:与 NC 组相比,^{###} $P < 0.001$;与 DKD 组相比,^{**} $P < 0.01$ 。
Note: Compared with NC,^{###} $P < 0.001$; Compared with DKD,^{**} $P < 0.01$.

和尿蛋白均明显升高 ($P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$)。与 DKD 组相比,DHM 组小鼠的肌酐、尿素氮和尿蛋白均有不同程度的下降 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$) (见图 1)。表明 DHM 可以稳定 db/db 小鼠肾功能状态,缓解肾功能损伤。

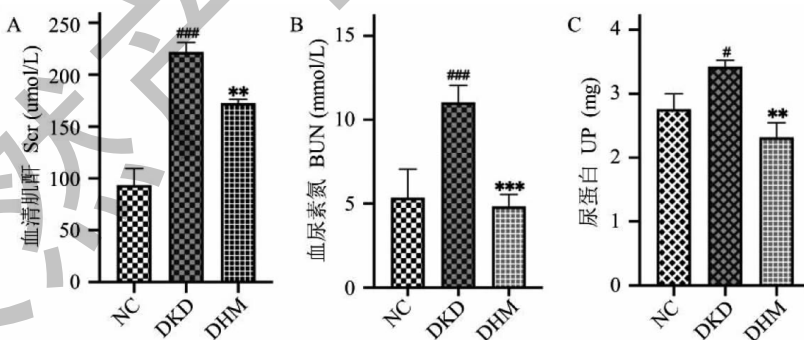


图 1 DHM 对 db/db 小鼠血清中肌酐、尿素氮和尿蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 The expression levels of Scr, BUN and UP in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$).

注:与 NC 组相比,[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.001$;与 DKD 组相比,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。Note: Compared with NC,[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.001$;
Compared with DKD,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$.

2.1.3 DHM 减轻 db/db 小鼠肾病理损伤

为了探究 DHM 干预对 db/db 小鼠肾脏病理损伤的影响,各组小鼠病理切片行 HE 染色、PAS 染色。结果如图 2 所示,NC 组小鼠肾小球结构规则,

肾小管结构清晰,肾小管上皮细胞排列整齐,且基底膜完整;DKD 组小鼠肾小球体积增大,肾小球系膜细胞增生,肾间质可见肾小管肿胀且呈空泡样变性;而 DHM 组小鼠肾小球体积减小,肾小球系膜细胞

轻度增生且基底膜增厚改善,肾间质肾小管肿胀减轻且呈空泡样变性改善,肾病理损伤程度得到改善(见图2)。

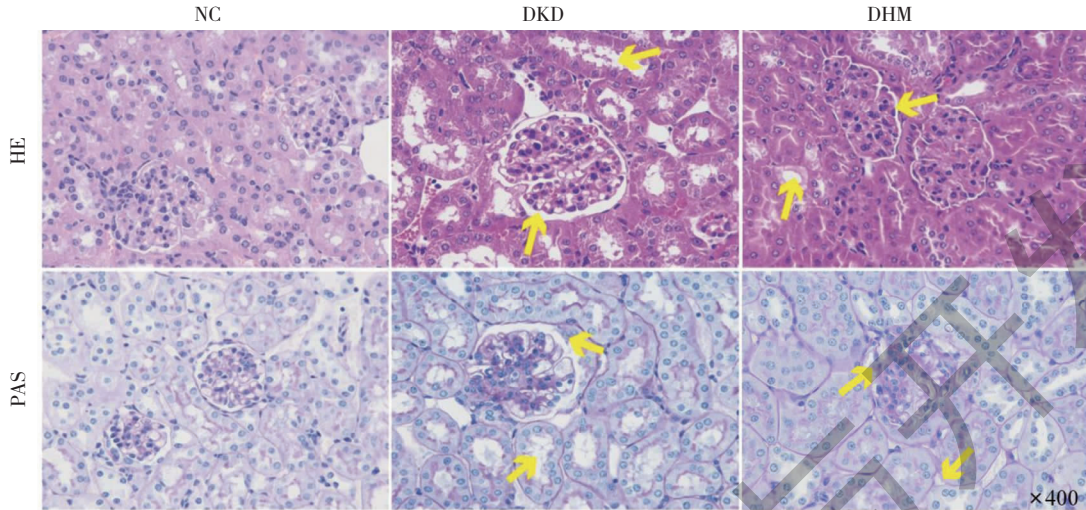


图2 DHM对db/db小鼠肾脏组织病理学的影响($\times 400$)

Fig. 2 Effects of DHM on histopathology of mouse kidney ($\times 400$)

2.1.4 DHM改善db/db小鼠肾纤维化

为了观察DHM对db/db小鼠肾纤维化的影响,我们对肾脏组织切片行Masson和免疫荧光染色,可见与NC组相比,DKD组小鼠肾脏间质细胞外基质和肾小管胶原纤维蛋白明显增多,并且小鼠肾皮质和肾髓质中 α -SMA、Fibronectin、CollagenI细胞

荧光染色阳性信号显著增强、亮度较强;与DKD组比较,DHM组小鼠肾脏胶原蛋白沉积减少,并且肾脏中 α -SMA、Fibronectin、CollagenI细胞荧光染色阳性信号减弱,提示DHM改善db/db小鼠肾纤维化(见图3)。

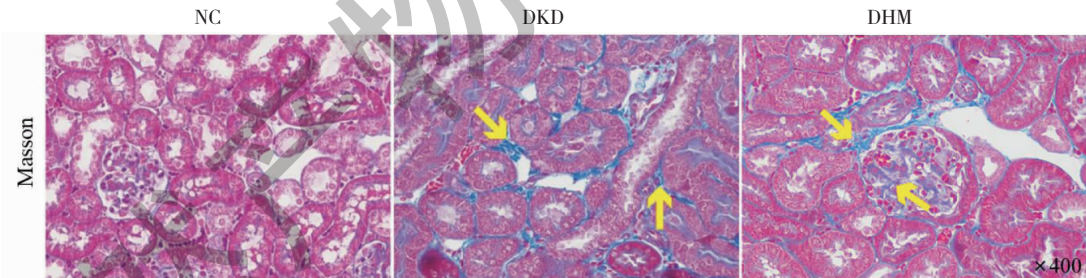


图3 DHM对db/db小鼠肾脏组织病理学的影响($\times 400$)

Fig. 3 Effects of DHM on renal pathology in db/db mice ($\times 400$)

2.2 DHM改善db/db小鼠肾纤维化的网络药理学研究

2.2.1 DHM、DKD与RF的靶点获取与“药物—靶点—疾病”网络的构建

通过PharmMapper数据库共获取DHM相关靶点379个,分别从DisGeNET数据库获取DKD、RF相关靶点1189、570个。将DHM、DKD和RF靶点取交集后得到37个交集靶点(见图4),并进一步导入Cytoscape软件构建“药物—靶点—疾病”网络图(见图5)。

2.2.2 DHM、DKD与RF交集靶点相互作用的蛋白-蛋白互作PPI网络构建

将37个交集基因导入String数据库构建PPI互作网络。结果显示该网络共包含37个节点数,边数为241,平均节点度为13,聚类系数为0.768(见图6)。在Cytoscape软件中使用cytoHubba插件分析并根据度值(degree)获取前10的靶点,分别为蛋白激酶B1(protein kinase B1, AKT1)、血清中白蛋白(albumin, ALB)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteine-aspartate protease-3, CASP3)、表皮生长因子受体

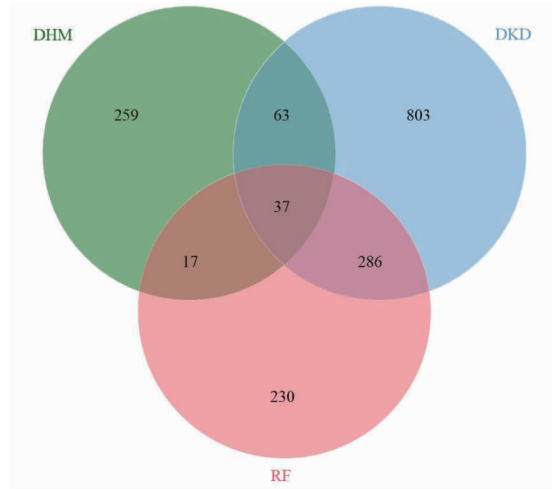


图 4 DHM、DKD 与 RF 靶点 Venn 图

Fig. 4 Venn diagram of intersection targets of DHM,DKD and RF

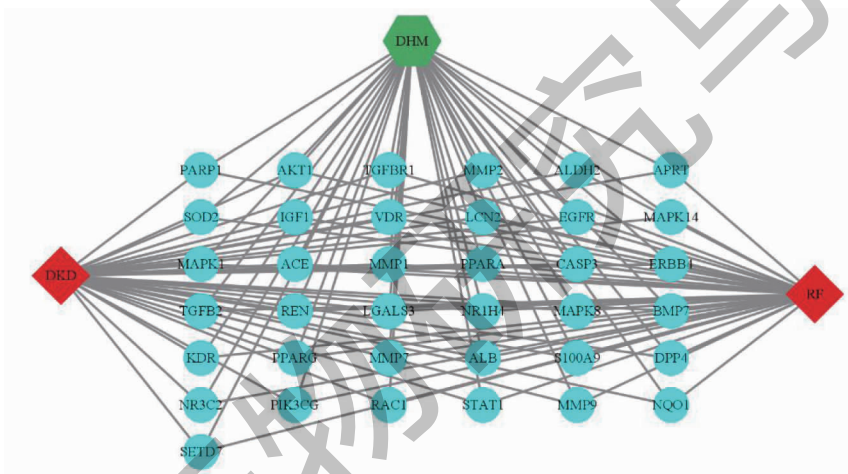


图 5 药物—靶点—疾病网络

Fig. 5 Drug-target-disease network

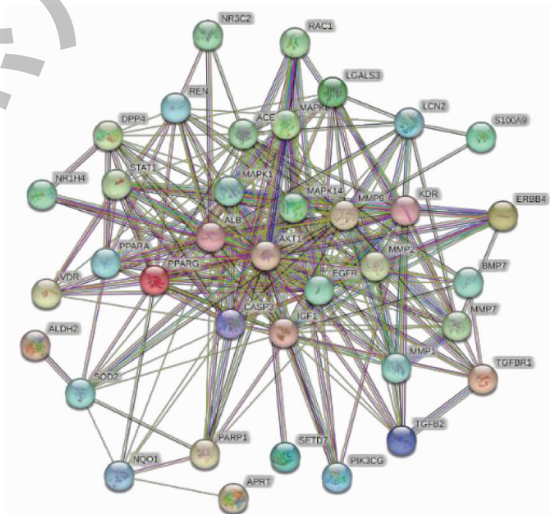


图 6 DHM、DKD 与 RF 靶点 PPI 网络图

Fig. 6 PPI network diagram of targets of DHM,DKD, and RF

(epidermal growth factor receptor, EGFR)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP9)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-

activated receptor gamma, PPARG)、激酶插入区受体(kinase insert domain receptor, KDR)、MMP2、血管紧张素转化酶(angiotensin I-converting enzyme, ACE)。随后将前 10 位基因进一步可视化(见图 7)。

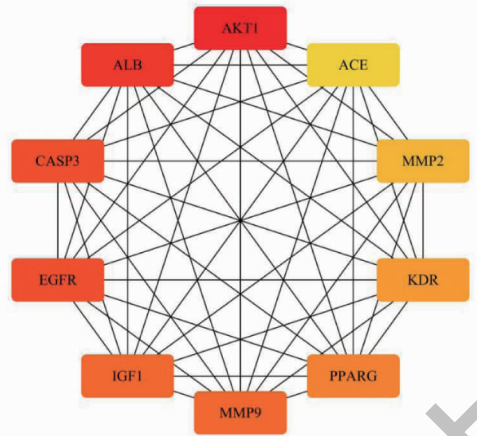


图 7 核心靶点 PPI 网络图

Fig. 7 PPI network diagram of core target protein

2.2.3 DHM、DKD 与 RF 交集靶点的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

将 37 个交集基因上传至 David 数据库进行 GO 功能分析和 KEGG 富集分析,结果显示 DHM 与 DKD、RF 的联系涉及 GO 功能分析中 BP 223 项、CC 25 项以及 MF 52 项。BP 主要涉及凋亡的负调控与正调控、细胞对活性氧的反应以及对缺氧反应等过程(见图 8);CC 主要涉及胞外区、受体复合物以及细胞外空间等细胞成分(见图 9);MF 则主要集中在锌离子结合、酶结合和 RNA 聚合酶 II 的调节等功能(见图 10)。KEGG 通路富集结果显示 DHM 对

DKD、RF 的作用通路可能涉及糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)及其糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)信号通路、糖尿病心病以及叉头转录因子 O 亚族(forkhead transcription factor of the O class, FoxO)信号通路等(见图 11)。

2.2.4 DHM 与靶基因蛋白分子对接结果

将 DHM 与 PPI 网络中 degree 值前 5 位的核心靶点 (AKT1、ALB、CASP3、EGFR、MMP9) 以及结合我们前期研究基础所选 AKT1 上游靶点 Notch1 和

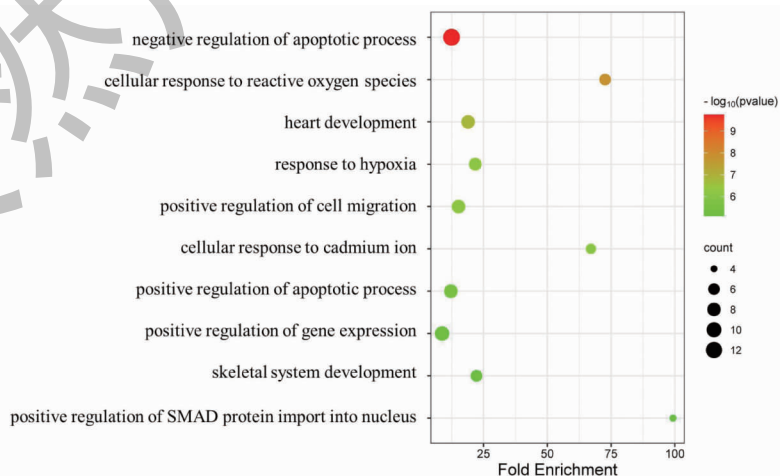


图 8 交集靶点 GO 功能分析 (BP)

Fig. 8 Intersection target GO function analysis (BP)

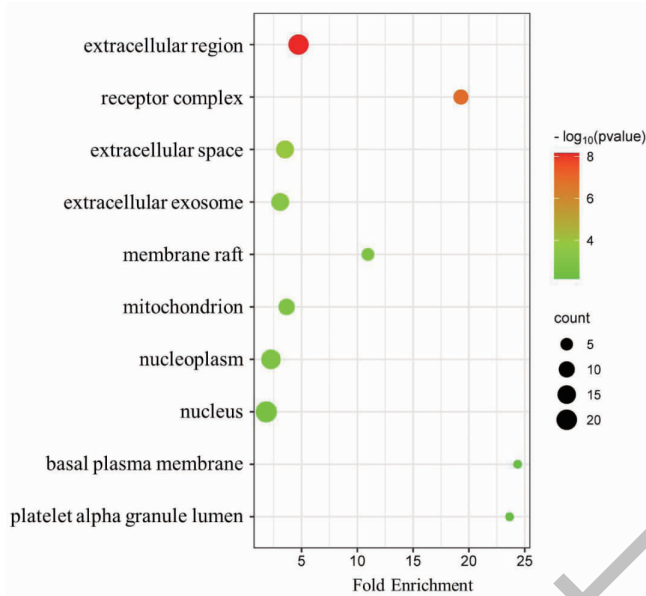


图9 交集靶点 GO 功能分析(CC)

Fig. 9 Intersection target GO function analysis (CC)

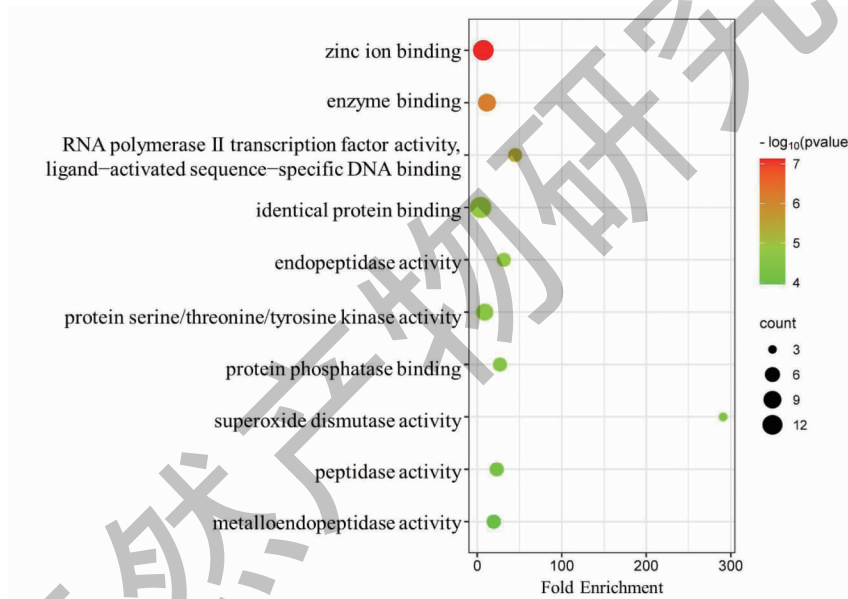


图10 交集靶点 GO 功能分析(MF)

Fig. 10 Intersection target GO function analysis (MF)

PTEN 进行分子对接(见图 12)。结果显示 DHM 与各靶点蛋白的结合能均小于 0 kcal/mol(表 3),表示 DHM 与所选取靶点蛋白均能良好结合,意味着 DHM 可以通过所对接靶点蛋白进行调控进而改善 db/db 小鼠 DKD。

2.3 DHM 改善 db/db 小鼠肾纤维化分子机制的实验验证

为进一步探讨 DHM 改善 db/db 小鼠肾纤维化

的分子机制,基于网络药理学和分子对接结果,结合前期研究基础,我们对 DHM 干预的 db/db 小鼠肾脏中 Notch/PTEN/AKT 通路相关蛋白的变化进行研究。Western Blot 结果显示,与 NC 组相比,DKD 组小鼠肾组织中的 Notch 通路出现过度激活,表现为 Notch1、NICD、Hes1、Hey1 蛋白明显上调($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$)并抑制 PTEN 的表达($P < 0.01$),同时促进 AKT 的磷酸化,即 p-AKT 上

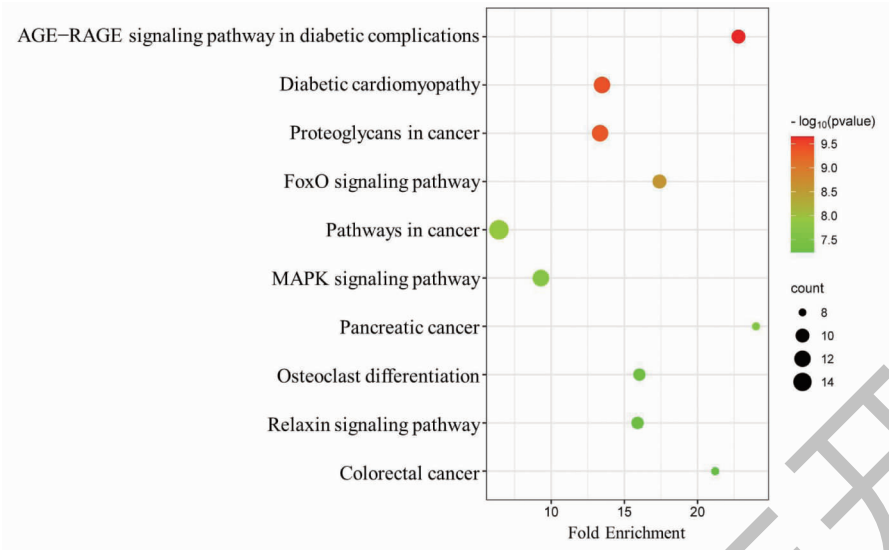


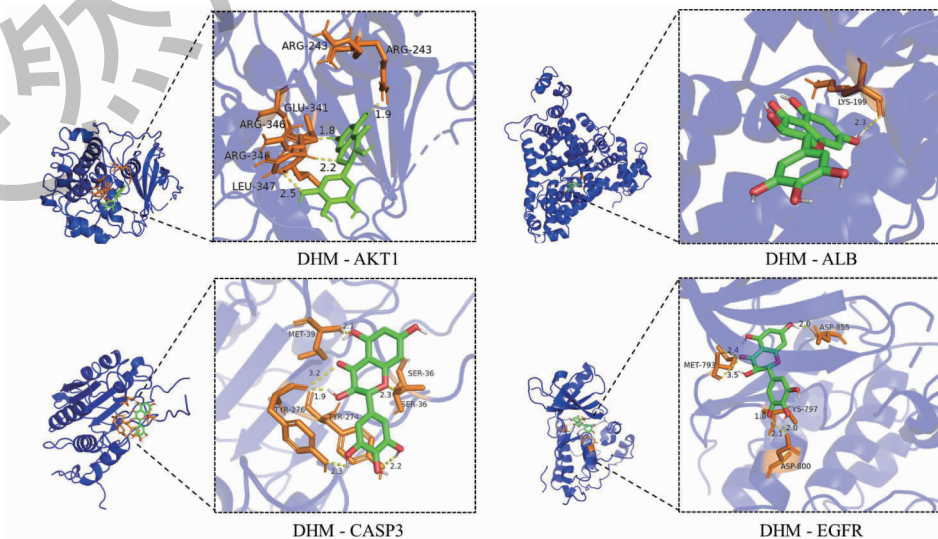
图 11 KEGG 通路富集分析

Fig. 11 Intersection target KEGG pathway enrichment analysis

表 3 DHM 与核心靶点蛋白分子对接结果

Table 3 Molecular docking results of DHM and core target protein

药物 Drug	靶点 Target	PDB ID	结合能 Binding energy (kcal/mol)
DHM	AKT1	4GV1	-4.44
DHM	ALB	6YG9	-5.01
DHM	CASP3	5IBP	-3.97
DHM	EGFR	8A2D	-5.06
DHM	MMP	6ESM	-8.41
DHM	Notch1	5L0R	-5.7
DHM	PTEN	4O1V	-4.2



续图 12(Continued Fig.12)

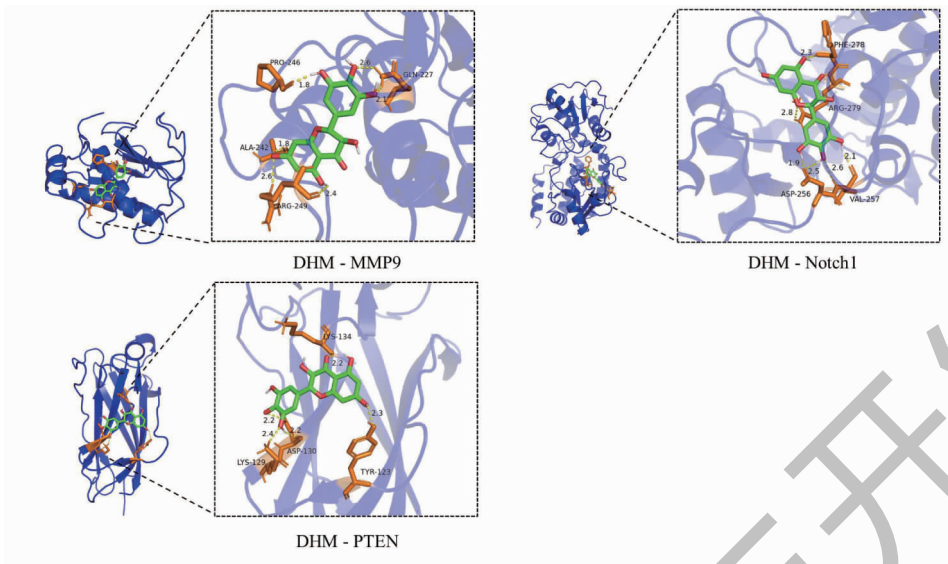


图 12 DHM 与核心靶点蛋白分子对接结果模式图

Fig. 12 Molecular docking result pattern of DHM and core target protein

调($P < 0.01$)。而 DHM 干预则可逆转上述变化, DHM 组 Notch 通路受到抑制,相关蛋白 NICD、Hes1、Hey1 以及 p-AKT 的表达均出现下降($P < 0.05$ 、 $P <$

0.01 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),而 PTEN 的表达上调($P < 0.001$)(见图 13)。提示 DHM 可能通过调控 Notch/PTEN/AKT 通路改善 db/db 小鼠肾纤维化。

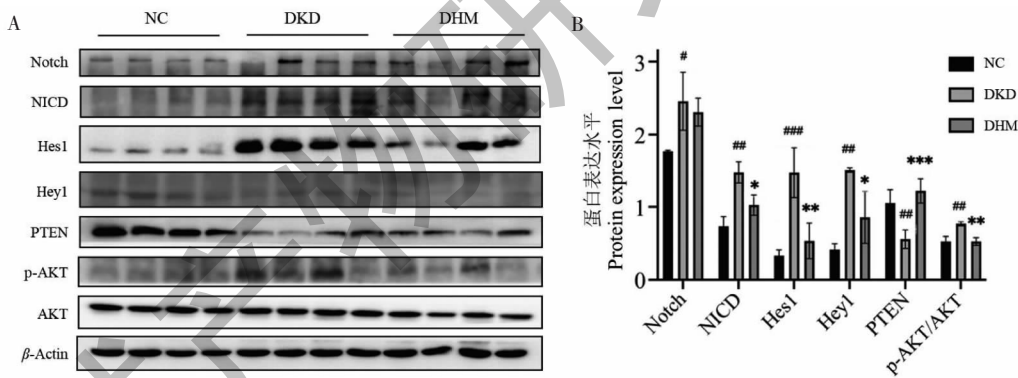


图 13 DHM 对 db/db 小鼠肾脏 Notch/PTEN/AKT 通路的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 13 Effect of DHM on the Notch/PTEN/AKT pathway in the kidneys of db/db mice($\bar{x} \pm s, n = 4$)

注:与 NC 组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$;与 DKD 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with NC, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with DKD, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论与结论

目前糖尿病普遍的治疗手段主要依靠血糖的控制,而作为糖尿病最严重并发症之一的 DKD 并无有效治疗策略^[10,11]。因此深入了解 DKD 的发病机制以及寻找有效治疗策略来抑制 DKD 向肾纤维化发展的趋势非常重要。天然药物已被证实具有较少的副作用以及多靶点疗效的独特优势,是近年来研发慢性疾病新型药物的重要来源。对 DHM 进一步研究发现, DHM 在改善代谢性疾病方面显示出巨大的

治疗潜力。因此,本研究在 DHM 改善 db/db 小鼠的肾纤维化的基础上,结合网络药理学以及分子对接技术深入探讨 DHM 改善 db/db 小鼠肾纤维化的潜在治疗靶点以及分子机制,并通过动物实验验证。

首先我们观察发现 10 周的 DHM 干预可以使 db/db 小鼠血糖、体重、肌酐、尿素氮、尿蛋白及肾脏的病理表现出现有效缓解,意味着 DHM 可减轻 db/db 小鼠肾功能损伤,减缓 DKD 的发展。在对 DHM、DKD 以及 RF 的 37 个交集靶点分析筛选发现

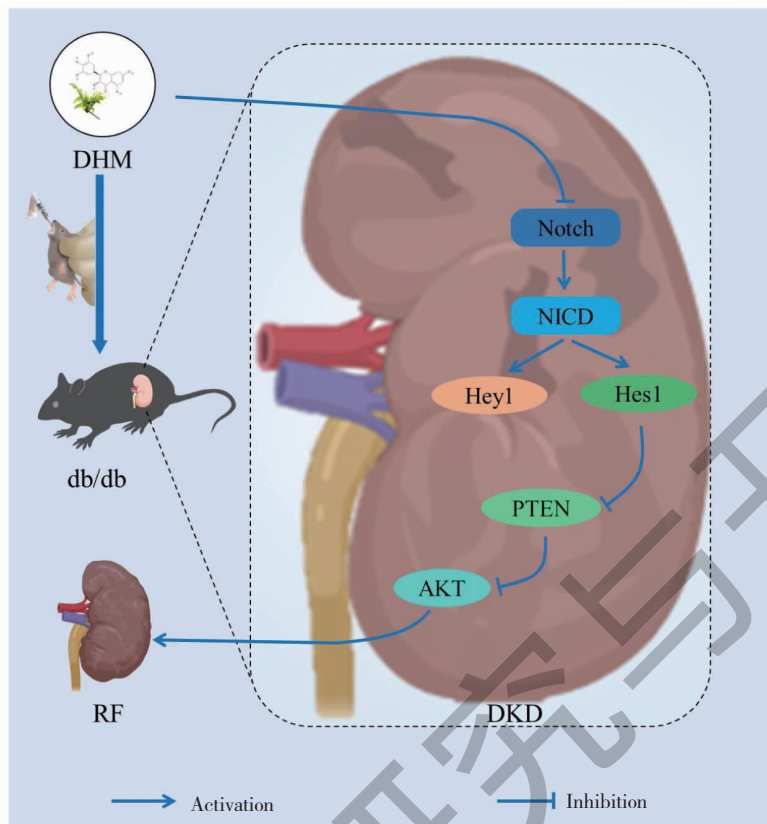


图 14 DHM 通过调控 Notch/PTEN/AKT 通路改善 db/db 小鼠肾纤维化

Fig. 14 DHM improves renal fibrosis in db/db mice by regulating Notch/PTEN/AKT signaling pathway

AKT1、ALB、CASP3、EGFR、MMP9、IGF1、PPARG、KDR、MMP2、ACE 等 10 个靶点可能是 DHM 改善 DKD 的关键靶点。其中 AKT1、CASP3、EGFR、MMP9、IGF1、MMP2、ACE 已被证实在糖尿病环境中被激活,而通过特异性抑制后可改善 DKD 的受损状态,减缓纤维化发展的趋势^[12-16]。PPARG、KDR 则在糖尿病生理环境下受到抑制,激活后则起到肾脏保护作用^[17]。ALB 是观察 DKD 是糖尿病发展过程中重要的观察肾脏损伤程度的生化指标,通常表现为随着 DKD 的发生而升高,DKD 改善后出现下降^[18]。意味着我们所筛选出 10 个关键基因不仅可以作为 DKD 潜在的生物标志物,也可能是进一步探讨 DKD 发病机制以及治疗手段的关键靶点。

KEGG 通路富集分析结果显示 DHM 对 DKD 的改善作用可能涉及 AGE-RAGE 信号通路、糖尿病心肌病以及 FoxO 信号通路。其中 AGE-RAGE 信号通路与 FoxO 信号通路在 DKD 发展过程中具有关键的调控作用。研究发现 AGEs 在 DKD 患者的内皮细胞、肾小管和系膜细胞以及足细胞等细胞出现特异性激活,并与 RAGE 相互作用增强,进一步加剧肾

脏中的氧化应激和炎症,导致 DKD 的恶化^[19]。另外,活化的 FoxO3a 则可以抑制糖尿病大鼠肾脏中的氧化应激水平,改善炎症,进而抑制 DKD 的发生^[20]。表明特异性调控 AGE-RAGE 信号通路或 FoxO 信号通路可能对防治 DKD 具有重要意义。

分子对接结果显示 DHM 与所选排名前 5 的靶点均能表现出良好的结合性,意味着 DHM 治疗 DKD 的有效性在分子层面得到验证。此外我们注意到所筛选排名第一的关键靶基因 AKT1 与 KEGG 通路富集分析得到 AGE-RAGE 信号通路和 FoxO 信号通路在 DKD 发展中密切相关。其中 AGE-RAGE 信号通路可协同 PI3K/Akt 信号通路诱发肾脏内的氧化应激和慢性炎症,进而导致肾脏疾病^[21]。而 PI3K/Akt/FoxO3a 通路的激活则可以改善糖尿病环境下肾脏的生理功能^[22]。因此,我们进一步尝试探究 AKT1 上游的 Notch 通路与 DHM 的相互作用并进行分子对接验证。分子对接结果显示 DHM 与 Notch1、PTEN 均表现出了良好的结合性。

既往研究表明,在 DKD 发展过程中 Notch 通路出现过度激活,表现为 Notch1、NICD、Hes1 和 Hey1

的表达上升^[23]。Notch1 的抑制剂则可以通过降低 Hes1 的活化来激活 PTEN,进而改善自噬障碍,减缓 RF 的发生^[24]。此外,另有研究发现 PTEN 的激活也可以通过抑制 PI3K/AKT 通路来缓解 DKD 的进展^[25,26]。基于以上结果,我们推测 DHM 可以通过调控 Notch/PTEN/AKT 通路改善 DKD。Western blot 结果显示 db/db 小鼠肾脏中 Notch 通路活化程度异常升高,PTEN 表达降低以及 AKT 的磷酸化增加。而 DHM 摄入可以抑制 Notch 通路的活化,激活 PTEN 并抑制 AKT 的磷酸化。尽管 Notch/PTEN/AKT 信号轴作为整体路径在糖尿病环境下的肾脏保护作用研究较少,但我们的研究一定程度上完善了相关研究,并丰富了 DHM 通过多靶点发挥其生物学保护作用的分子机制。

综上所述,本研究以观察 DHM 改善 DKD 病理表现的结果为基础,结合网络药理学及分子对接技术初步论证了 DHM 改善 DKD 进展的作用可能通过 AKT1、ALB、CASP3、EGFR、MMP9、IGF1、PPARG、KDR、MMP2、ACE 等关键靶点来实现,并对相关通路进行了分析。最后结合动物实验对 DHM 潜在的 AKT 靶点进行了初步验证及分析,发现 DHM 可能通过调控 Notch/PTEN/AKT 通路起到防治 DKD 的作用(见图 14)。但目前关于 DHM 对 T2DM 的并发症研究相对较少,其治疗潜力仍待进一步研究。

参考文献

- Xu BH, Sheng J, You YK, et al. Deletion of Smad3 prevents renal fibrosis and inflammation in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Metabolism*, 2020, 103:154013.
- Djudjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65:16-36.
- Sun Y, Liu S, Yang S, et al. Mechanism of dihydromyricetin on inflammatory diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:794563.
- Zhang M, Peng M, Yang Q, et al. Antioxidant properties and correlation with major chemical components in *Ampelopsis grossedentata* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:387-394.
- Tong H, Zhang X, Tan L, et al. Multitarget and promising role of dihydromyricetin in the treatment of metabolic diseases [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 870:172888.
- Jiang B, Le L, Pan H, et al. Dihydromyricetin ameliorates the oxidative stress response induced by methylglyoxal via the AMPK/GLUT4 signaling pathway in PC12 cells [J]. *Brain Res Bull*, 2014, 109:117-126.
- Chen Y, Zheng Y, Chen R, et al. Dihydromyricetin attenuates diabetic cardiomyopathy by inhibiting oxidative stress, inflammation and necroptosis via sirtuin 3 activation [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12:200.
- Kou X, Li J, Liu X, et al. Ampelopsin attenuates the atrophy of skeletal muscle from d-gal-induced aging rats through activating AMPK/SIRT1/PGC-1alpha signaling cascade [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90:311-320.
- Kou X, Liu X, Chen X, et al. Ampelopsin attenuates brain aging of D-gal-induced rats through miR-34a-mediated SIRT1/mTOR signal pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7:74484-74495.
- Xiang E, Han B, Zhang Q, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells prevent the progression of early diabetic nephropathy through inhibiting inflammation and fibrosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11:336.
- Xie F, Ran M, Feng J, et al. Naringin ameliorates fibrosis via down-regulating RhoA/ROCK signaling pathway in diabetic nephropathy mice [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32:1637-1643.
- Wang X, Jiang L, Liu XQ, et al. Paeoniflorin binds to VEGFR2 to restore autophagy and inhibit apoptosis for podocyte protection in diabetic kidney disease through PI3K-AKT signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106:154400.
- Li Y, Pan Y, Cao S, et al. Podocyte EGFR inhibits autophagy through upregulation of rubicon in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2021, 70:562-576.
- Wang M, Liu X, Wang Z, et al. The extract of *Polygala fallax Hemsl.* slows the progression of diabetic nephropathy by targeting TLR4 anti-inflammation and MMP-2/9-mediated anti-fibrosis in vitro [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104:154251.
- Li J, Dong R, Yu J, et al. Inhibitor of IGF1 receptor alleviates the inflammation process in the diabetic kidney mouse model without activating SOCS2 [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12:2887-2896.
- Zheng C, Huang L, Luo W, et al. Inhibition of STAT3 in tubular epithelial cells prevents kidney fibrosis and nephropathy in STZ-induced diabetic mice [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10:848.
- Xing L, Fang J, Zhu B, et al. Astragaloside IV protects against podocyte apoptosis by inhibiting oxidative stress via activating PPARgamma-Klotho-FoxO1 axis in diabetic nephropathy [J]. *Life Sci*, 2021, 269:119068.
- Han W, Ma Q, Liu Y, et al. Huangkui capsule alleviates renal tubular epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and TLR4/NF-kappaB signaling [J]. *Phytomedicine*, 2019, 57:

- 203-214.
- 19 Wu XQ, Zhang DD, Wang YN, et al. AGE/RAGE in diabetic kidney disease and ageing kidney[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 171:260-271.
- 20 Jz AL, Alfaris NA, Al-Farga AM, et al. Curcumin reverses diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetes in rats by inhibition of PKC β /p(66)Shc axis and activation of FOXO-3a[J]. *J Nutr Biochem*, 2021, 87:108515.
- 21 Sanajou D, Ghorbani Haghjo A, Argani H, et al. AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: current status and future directions[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833:158-164.
- 22 Wang Z, Li Y, Wang Y, et al. Pyrroloquinoline quinine protects HK-2 cells against high glucose-induced oxidative stress and apoptosis through Sirt3 and PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508:398-404.
- 23 Wang YD, Zhou R, Dong KX, et al. Traditional Chinese medicine in prevention and treatment of renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting notch signaling pathway: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2023, 29:221-227.
- 24 Liu X, Zhang Y, Shi M, et al. Notch1 regulates PTEN expression to exacerbate renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy by inhibiting autophagy via interactions with Hes1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497:1110-1116.
- 25 Lyu J, Zhang Y, Bai J, et al. Protective effect and mechanism of icariin combined with dexamethasone on doxorubicin-induced podocyte injury based on PTEN/PI3K/Akt/mTOR [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理)*, 2023, 34:739-746.
- 26 Song Y, Liu W, Tang K, et al. Mangiferin alleviates renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice through regulating the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020:9481720.