



在线全文

汉黄芩苷通过调控MAPK信号通路减轻高血压所致肾脏损伤的机制研究*

郭智^{1,2,3}, 谢意^{1,2,3}, 刘红纾^{1,2,3}, 肖珺丹^{1,2,3}, 陈榕基^{1,2,3}, 吴美珠^{1,2,3},
彭军^{1,2,3}, 沈阿灵^{1,2,3△}

1. 福建中医药大学中西医结合研究院(福州 350122); 2. 福建中医药大学中西医结合学院(福州 350122);
3. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室(福州 350122)

【摘要】目的 通过高通量基因表达数据库(GEO)和网络药理学方法探讨汉黄芩苷对高血压所致肾损伤的潜在治疗作用、靶点及通路,并通过体内外实验验证汉黄芩苷干预对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)肾脏组织和血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)刺激大鼠肾细胞NRK-52E凋亡的影响及对相关通路的调控作用。**方法** 通过GEO数据库、网络药理学分析汉黄芩苷治疗高血压性肾病的关键治疗靶点,STRING数据库分析治疗靶点间的互作关系,基因本体(GO)数据库分析相关生物学功能,京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库富集潜在信号通路。将SHR大鼠随机分组并分别灌胃给予低、中、高剂量(0.075、0.75和7.5 mg/kg)汉黄芩苷,干预10周后,通过HE染色检测肾脏组织形态的改变,ELISA检测血清中炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6的表达,TUNEL染色检测细胞凋亡率,Western blot检测Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、caspase-3表达及细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的磷酸化和总蛋白的表达。构建Ang Ⅱ刺激的NRK-52E细胞模型,采用不同剂量汉黄芩苷(25、50、100 μ mol/L)干预细胞24 h,通过Annexin V染色检测细胞凋亡率以及Western blot验证上述凋亡相关蛋白及通路相关蛋白的表达。**结果** 通过数据集GSE41453分析,发现与WKY组相比,SHR组肾脏组织中有11 673个基因上调和5 902个基因下调,通过多个数据库获取汉黄芩苷371个潜在作用靶点,从而获取98个交集靶点,进一步筛选得到45个核心治疗靶点,其中包括TNF、CASP3等靶点。通过GO数据库分析,凋亡过程的负向调控等过程被显著富集。通过KEGG数据库富集分析发现,凋亡通路、IL-17信号通路和MAPK信号通路等通路被显著富集。汉黄芩苷干预可有效抑制SHR大鼠肾脏组织的病理损伤及血清炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达($P<0.05$),同时减少SHR肾脏组织和Ang Ⅱ刺激后NRK-52E细胞的凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3的表达,并上调Bcl-2的表达($P<0.05$)。此外,汉黄芩苷干预可抑制SHR肾脏组织和Ang Ⅱ刺激NRK-52E细胞中ERK、p38 MAPK的磷酸化($P<0.05$)。**结论** 汉黄芩苷通过调控MAPK通路抑制炎症反应和细胞凋亡可能是其抗高血压所致肾损伤的重要机制之一。

【关键词】 高通量基因表达数据库 网络药理学 汉黄芩苷 高血压性肾病 细胞凋亡

Wogonoside Attenuates Hypertension-Induced Renal Injury Through Modulation of the MAPK Signaling Pathway: A Mechanism Study GUO Zhi^{1,2,3}, XIE Yi^{1,2,3}, LIU Hongshu^{1,2,3}, XIAO Jundan^{1,2,3}, CHEN Rongji^{1,2,3}, WU Meizhu^{1,2,3}, PENG Jun^{1,2,3}, SHEN Aling^{1,2,3△}. 1. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 3. Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, China

△ Corresponding author, E-mail: saling86@hotmail.com

【Abstract】Objective To investigate the potential therapeutic effects, targets, and pathways of wogonoside in hypertension-induced renal injury using the Gene Expression Omnibus (GEO) database and network pharmacology, and to validate the effects of wogonoside intervention on the renal tissues of spontaneously hypertensive rats (SHR), angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ)-stimulated NRK-52E cell apoptosis, and the regulation of relevant pathways through *in vivo* and *in vitro* experiments. **Methods** GEO dataset and network pharmacology analyses were performed to investigate the key therapeutic targets of wogonoside for hypertensive nephropathy. The STRING database was used to analyze protein-protein interactions. Biological functions were annotated via Gene Ontology (GO), and the potential signaling pathways were enriched using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). SHR were randomly divided into groups and given low, medium, or high doses of wogonoside (0.075, 0.75, and 7.5 mg/kg) via gastric gavage for 10 weeks.

* 国家自然科学基金(No. U22A20372, No. 82074363), 中华中医药学会2021-2023年度青年人才托举工程项目(No. 2021-QNRC2-B19), 福建中医药大学青年科研拔尖人才(No. XQB202202)和福建省卫生健康中青年领军人才研修培养项目(闽卫人函[2023]2841)资助

△ 通信作者, E-mail: saling86@hotmail.com

出版日期: 2025-01-20

Morphological changes in the kidney tissue were assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum levels of inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6, were measured using ELISA. Apoptosis rates were evaluated by TUNEL staining, and Western blot was performed to determine the expression of Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3, and caspase-3, and the expression of phosphorylated and total extracellular signal-regulated kinases (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) proteins. An *in vitro* model of Ang II-stimulated NRK-52E cells was constructed and was treated with wogonoside at different concentrations (25, 50, or 100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. The apoptosis rates were then assessed by Annexin V staining, and Western blot was performed to validate the expression of apoptosis-related and pathway-associated proteins. **Results** Analysis of dataset GSE41453 revealed 11 673 upregulated and 5 902 downregulated genes in the renal tissues of SHR compared to the Wistar Kyoto (WKY) rats, or the WKY control group. Through the analysis of multiple databases, 371 potential targets of wogonoside were identified, resulting in 98 overlapping targets. From these, 45 core therapeutic targets were identified through further analysis, including TNF, CASP3, etc. GO analysis significantly enriched processes such as the negative regulation of apoptosis. KEGG pathway enrichment analysis highlighted the apoptosis pathway, IL-17 signaling pathway, and MAPK signaling pathway as being significantly enriched. Wogonoside treatment effectively mitigated pathological damage in SHR kidney tissues and significantly inhibited the expression of inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P < 0.05$). It also decreased cell apoptosis rates in SHR kidney tissues and Ang II-stimulated NRK-52E cells, downregulated the expression of Bax and cleaved caspase-3, and upregulated Bcl-2 expression ($P < 0.05$). Furthermore, wogonoside treatment inhibited the phosphorylation of ERK and p38 MAPK in SHR kidney tissues and Ang II-stimulated NRK-52E cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Wogonoside may exert its protective effects against hypertension-induced renal injury by suppressing the inflammatory response and cell apoptosis, potentially through the regulation of the MAPK signaling pathway.

[Key words] Gene Expression Omnibus Network pharmacology Wogonoside Hypertensive nephropathy Apoptosis

重大慢病高血压可引发心脑肾等多种靶器官损伤,高血压肾病是临床常见的高血压并发症,对人类健康及社会经济造成了严重影响^[1-2]。长期持续的高血压可导致肾脏的组织病理学改变,引发肾脏炎症反应、氧化应激及细胞凋亡,进而损害肾脏功能,导致肾损伤^[3-4]。因此,抑制肾脏炎症和细胞凋亡对于治疗高血压引发的肾损伤具有重要意义。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的激活介导了高血压引发的肾损伤过程,在肾损伤和肾纤维化中起关键作用^[5-6]。MAPK家族包含多个成员,其中研究最为深入且广泛的同工酶包括细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、c-Jun N末端激酶(JNK)以及p38激酶(p38 MAPK)^[5,7]。这些同工酶通过调控不同的下游靶点,参与细胞增殖、凋亡、炎症反应及纤维化等多种生物学过程。因此,抑制该信号通路被认为是减轻肾脏损伤的重要策略之一。

尽管目前临床常用的降压药物能够有效降低血压,但它们在阻止肾损伤进展方面仍显不足^[8-9]。中药因其多靶点、多成分的特点,在防治靶器官损害方面具有独特优势,尤其在高血压肾损伤的治疗中备受关注。如黄芩具有清热燥湿、泻火解毒的功效,常用于治疗热病、目赤肿

痛等症,并主要用于治疗肝阳上亢型高血压,通过其抗氧化作用改善高血压所致肾损害^[10]。汉黄芩苷(Wogonoside)是一种类黄酮单体,是黄芩的主要活性成分之一^[11],具有抗炎^[12]、抗肿瘤^[13]、抗氧化^[14]等药理作用。既往研究报道,汉黄芩苷可减轻糖尿病肾病上皮间质转化损伤^[15],并通过调控转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)/p38 MAPK信号通路发挥抗糖尿病大鼠肾损伤及纤维化的保护作用^[16]。然而,其对高血压所致肾损伤的作用及其潜在的活性靶点和药理机制尚不明确。为此,本研究借助高通量基因表达数据库(GEO)和网络药理学分析,系统筛选汉黄芩苷治疗高血压相关肾损伤的核心靶点及潜在信号通路,并进一步通过构建动物模型和细胞模型对预测结果进行实验验证,旨在深入揭示汉黄芩苷对高血压性肾损伤的保护机制,为其在临床上的新应用提供科学依据和理论参考。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

1.1.1 疾病靶点及成分-疾病交集靶点的获取

通过GEO数据库,以“Hypertensive renal injury”为关键词,限定物种为小鼠,进行数据检索,获取相关基因表达矩阵。设定筛选标准为 P 值 < 0.05 且 $\log_2[\text{fold change}]>$

1, 从中筛选出差表达基因。这些基因被认为是与高血压引起的肾脏损伤密切相关的疾病基因, 并基于此数据集通过微生信数据库(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制聚类分析图和火山图以展示差异基因的表达模式^[17]。

通过PharmMapper和SwissTargetPrediction两个数据库预测汉黄芩苷的潜在作用靶点。将从GEO数据库获得的差异基因与汉黄芩苷的潜在作用靶点进行交集分析, 最终确定的交集靶点即为汉黄芩苷对高血压所致肾脏损伤的潜在治疗靶点。

1.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建及关键靶点分析

将交集靶点分别导入GeneMANIA和STRING数据库, 构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络图, 计算PPI网络的拓扑属性, 并将结果输出为TSV格式文件。将TSV文件导入Cytoscape软件, 进行进一步的网络拓扑分析, 获取各靶点在PPI网络中的以下关键拓扑参数: degree(度中心性)、closeness centrality(紧密中心性)、betweenness centrality(介数中心性)和topological coefficient(拓扑系数)。这些参数用于评估各靶点在PPI网络中的重要性和生物学功能关联。

为了识别网络中的核心作用靶点, 本研究设定以下筛选条件: degree> 中位数、closeness centrality> 中位数、betweenness centrality> 中位数和topological coefficient> 中位数。满足这些条件的靶点被定义为核心作用靶点, 代表其在PPI网络中具有较高的连接度和功能重要性。

1.1.3 基因本体富集分析和京都基因与基因组百科全书富集分析

利用DAVID平台(<https://david.ncifcrf.gov>)对交集靶点进行基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。设定显著性水平为 $P < 0.05$ 。根据 P 值大小, 选取前10条显著富集的通路, 通过微生信数据库以气泡图形式进行结果展示。

1.2 实验试剂

DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液以及BCA蛋白检测试剂盒(Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司。血管紧张素 II (Ang II) 购自美国MedChemExpress公司。缬沙坦(Valsartan)购自北京诺华制药有限公司。TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(C1098)购自中国碧云天生物技术有限公司。Annexin V-AbFluor™ 647 细胞凋亡检测试剂盒(2116)购自中国武汉亚科因生物技术有限公司。大鼠ELISA试剂盒(1113, 14368, 3917)购自中国江苏

酶免实业有限公司。实验中所用的一抗及二抗详细信息, 包括抗体货号及稀释浓度, 参见网络资源附件附表1。

1.3 实验药物及配制

汉黄芩苷(货号: B20488-20 mg)购自上海源叶生物科技有限公司。细胞实验: 实验前, 称取汉黄芩苷粉末置于无菌离心管中, 以二甲基亚砜(DMSO)溶解, 配制浓度为100 mmol/L的储备液; 储备液分装后储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用; 动物实验: 称取汉黄芩苷粉末于无菌离心管内, 加入无菌双蒸水充分溶解, 配制成分数分别为0.075、0.75和7.5 mg/kg的溶液; 各质量分数溶液分别用于不同实验组大鼠的灌胃处理, 每只大鼠灌胃体积为1 mL。

1.4 实验动物造模与分组

4周龄雄性WKY大鼠6只和SHR大鼠30只按随机数字法分成WKY、SHR、SHR+Wogonoside(低剂量L)、SHR+Wogonoside(中剂量M)、SHR+Wogonoside(高剂量H)和SHR+Valsartan(缬沙坦)6组, 每组6只。低、中、高剂量组分别按0.075、0.75、7.5 mg/(kg·d)给予汉黄芩苷灌胃; SHR+Valsartan组按7.5 mg/(kg·d)给予缬沙坦灌胃, 其剂量参考相关文献中常用剂量^[18], 并结合缬沙坦的临床常用剂量80~160 mg/(70 kg·d), 采用体表面积等效剂量换算公式, 得出缬沙坦的灌胃剂量。WKY组和SHR组大鼠作为对照组和模型组, 均给予等体积的双蒸水灌胃, 实验持续10周。所有实验动物均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 并于福建中医药大学实验动物中心进行饲养。饲养环境保持恒温($22\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$)、恒湿($40\%\sim 70\%$), 并采用12 h昼夜交替照明模式。所有动物均可自由获取食物和水。实验过程中所有操作均遵循福建中医药大学实验动物中心的伦理规范和实验动物伦理要求(伦理批号: 2022175)。

1.5 样本采集

实验结束后, 大鼠通过持续吸入异氟烷进行麻醉, 确保处于深度麻醉状态后, 将大鼠腹腔铺开, 暴露腹主动脉血管, 使用注射器进行血液采集, 血样置于抗凝管中, 进行血清分离并分装储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中, 用于后续实验。血液采集后, 使用大剂量异氟烷进行安乐死, 确保无痛处死。

肾脏取材: 左侧肾脏组织被完整取出, 剥离其周围多余结缔组织。用预冷生理盐水漂洗以去除表面残留血液。沿肾脏纵向切开, 将样本置于体积分数为4%多聚甲醛中固定48 h, 用于后续实验。

1.6 HE染色检测汉黄芩苷干预对SHR大鼠肾脏病理的影响

肾脏组织固定48 h后, 经过梯度乙醇脱水、浸蜡和

包埋处理。切片厚度设定为4 μm 。切片依次经二甲苯和梯度乙醇脱蜡至水。随后,进行苏木素染色50 s以标记细胞核,伊红染色2 s以标记细胞质。使用中性树胶封片,在光学显微镜下进行组织学结构的观察和图像采集。损伤面积的半定量评分标准如下:0分,无损伤;0.5分,损伤面积<10%;1分,10% $\leq$ 损伤面积<25%;2分,25% $\leq$ 损伤面积<50%;3分,50% $\leq$ 损伤面积<70%;4分,损伤面积 $\geq$ 70%。

1.7 ELISA检测汉黄芩苷干预对SHR大鼠血清中炎症因子表达的影响

操作方法参照酶免ELISA试剂盒说明书,具体步骤如下:将标准品梯度稀释以绘制标准曲线。将酶标板分别加入标准品、样本和空白对照液,并用封板膜覆盖。将酶标板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育2 h。孵育结束后,弃去孔内液体,使用洗板液清洗酶标板3~5次,每次拍干残留液体。加入酶标试剂并再次封膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60 min加入TMB显色液,置于室温避光孵育15 min。最后,加入终止液,使用酶标仪在450 nm波长读取各孔的吸光度值,并根据标准曲线计算样本的浓度。

1.8 TUNEL染色检测汉黄芩苷干预对SHR大鼠肾脏凋亡的影响

肾脏组织经切片复水后,滴加3% H_2O_2 ,室温处理10 min。滴加0.01 mol/L Proteinase K在37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化10 min。滴加标记缓冲液(含TdT和DIG-d-UTP)37 $^{\circ}\text{C}$ 标记2 h。滴加封闭液室温封闭30 min。将稀释后的生物素化抗地高辛抗体在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min。使用稀释后的SABC在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min。DAB显色液显色30 s,水洗。显色后用苏木素轻度复染,脱水封片,并置于镜下观察、拍照。

1.9 细胞培养和分组

大鼠肾小管上皮细胞系NRK-52E(CL-0174)购自中国武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞培养于含10%FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM高糖培养基中,培养环境为37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 恒温培养箱。细胞生长至80%~90%汇合度时进行传代或用于实验。

实验分为5组:①Control组;②血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)组;③Ang II+汉黄芩苷(25 $\mu\text{mol/L}$)组;④Ang II+汉黄芩苷(50 $\mu\text{mol/L}$)组;⑤Ang II+汉黄芩苷(100 $\mu\text{mol/L}$)组。Control组细胞培养于含10%FBS的常规DMEM培养基中。其余各组细胞在实验开始时给予Ang II(1 $\mu\text{mol/L}$)刺激,并分别给予DMSO作为溶剂对照)或含有25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 汉黄芩苷的培养基进行联合干预处理24 h。

1.10 流式细胞仪检测汉黄芩苷干预对Ang II刺激后细胞凋亡的影响

将细胞以 $1\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于6孔板中,每孔加入2 mL含相应实验处理的培养基。药物干预持续24 h后,使用不含EDTA的胰蛋白酶消化细胞,并通过轻柔吹打确保细胞单分散性后收集于流式管中。细胞经过1 000 r/min离心5 min后,弃去上清,细胞沉淀用100 μL Annexin V Binding Buffer重悬。加入5 μL Annexin V-AbflourTM 647荧光标记的Annexin V溶液和2 μL Propidium Iodide(PI)溶液,轻轻混匀,在室温避光条件下孵育30 min。随后,加入100 μL Annexin V Binding Buffer稀释细胞悬液。BD FACSCantoTM II流式细胞仪(美国BD Biosciences公司)通过647 nm通道检测Annexin V-AbflourTM 647荧光信号,并通过530 nm通道检测PI荧光信号。数据采集后,采用BD FACSDivaTM软件(版本8.0)进行分析。

1.11 Western blot检测汉黄芩苷干预对细胞凋亡、潜在富集通路等相关蛋白表达的影响

肾脏组织样本:大鼠肾脏组织样本在冰上加入Western & IP细胞裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂),并使用组织研磨仪将组织充分研磨裂解。细胞样本:将NRK-52E细胞以 $1\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于6孔板中,待药物干预结束后,吸去培养基,使用Western & IP细胞裂解缓冲液裂解细胞。裂解后,细胞与肾脏组织样本在4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 条件下离心20 min,取上清并进行蛋白定量。取等量蛋白样品(每组50 μg),10%SDS-PAGE凝胶进行电泳分离,通过湿转法将蛋白转移至PVDF膜上(电压100 V, 90 min)。使用5%脱脂奶粉在室温下封闭膜2 h。封闭结束后, PVDF膜在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育相应稀释的一抗过夜。使用TBST缓冲液洗膜3次,每次5 min,膜在室温下与稀释比例为1:5 000的HRP标记的二抗孵育1 h。采用增强型化学发光(ECL)试剂盒检测目标蛋白的表达水平。使用化学发光成像仪(Bio-Rad)对膜进行曝光,并使用ImageJ软件对条带灰度值进行半定量分析。目标蛋白的相对表达量通过与内参蛋白 β -actin的灰度值比值进行标准化处理。

1.12 统计学方法

数据统计分析采用SPSS 26.0软件(SPSS/PC+)。采用Shapiro-Wilk检验对数据进行正态性检验。若数据符合正态分布,则以 $\bar{x}\pm s$ 表示。当数据符合正态分布且方差齐时,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),并使用LSD法进行事后检验以比较各组间的差异;当数据符合正态分布但方差不齐时,采用Games-Howell法进行事后检验。若数据不符合正态分布,则采用Kruskal-Wallis H检验进行多组间比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

所有实验均独立重复至少3次。

2 结果

2.1 高血压所致肾脏损伤疾病靶点及汉黄芩苷潜在作用靶点的获取

本研究选取GEO数据库中的GSE41453数据集作为核心数据来源。WKY组和SHR组内样本在基因表达水平上均表现出良好的均一性,其中红色代表高表达基因,蓝色代表低表达基因(附图1A)。与WKY组相比,SHR组中共有17 575个基因呈现差异表达,包括11 673个上调基因(红色)和5 902个下调基因(蓝色)(附图1B)。如附图1C所示,汉黄芩苷(CAS: 51059-44-0)的分子式为 $C_{22}H_{20}O_{11}$ 。通过PharmMapper和SwissTargetPrediction数据库经过去重处理后,共获得371个汉黄芩苷的作用靶点(附图1D)。所有附图见网络资源附件。

2.2 汉黄芩苷治疗高血压所致肾脏损伤疾病靶点分析及PPI网络构建

如附图2A所示,将汉黄芩苷的371个潜在作用靶点与GSE41453数据集中鉴定的4055个差异表达基因进行了交集分析,共获得98个共同靶点,为汉黄芩苷对高血压所致肾脏损伤疾病的潜在关键治疗靶点。将交集靶点导入STRING数据库,以构建PPI网络。如附图2B所示,该PPI网络包含87个节点和558条边。通过设定的筛选条件进一步筛选出45个核心治疗靶点。其中,度值排名前三的靶点分别为TNF、CASP3和MMP9(附图2C)。附图2D展示了核心治疗靶点的PPI网络关系图,该网络包含45个节点和398条边。

2.3 GO富集分析与KEGG富集分析

将交集靶点导入David数据库中,进行潜在的生物信息学分析。GO分析结果显示,共获得84项生物过程。其中,主要涉及的生物过程包括:正向调控神经元凋亡过程(positive regulation of neuron apoptotic process)、蛋白水解(proteolysis)和凋亡过程的负向调控(negative regulation of apoptotic process)等(附图3A);在细胞成分方面,共获得23项相关条目,主要包括:细胞外间隙(extracellular space)、细胞外区域(extracellular region)和胞质(cytosol)等(附图3B);分子功能分析共获得25项相关条目,主要包括:内肽酶活性(endopeptidase activity)、肽酶活性(peptidase activity)和凋亡执行阶段(execution phase of apoptosis)等(附图3C)。

KEGG通路富集分析(附图3D)显示,排名前三的通路分别为凋亡通路(apoptosis)、白细胞介素(interleukin, IL)-17信号通路(IL-17 signaling pathway)和代谢通路

(metabolic pathways)。此外,富集分析结果前十的通路中,凋亡通路、IL-17信号通路、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路(MAPK signaling pathway)及多物种凋亡通路(apoptosis-multiple species)均与细胞凋亡及炎症反应密切相关。提示汉黄芩苷可能通过调控这些通路,发挥其抗高血压所致肾损伤的作用。

2.4 汉黄芩苷干预减轻SHR肾脏的组织形态损伤和炎症反应

与WKY组相比,SHR组大鼠肾脏组织表现出肾小球囊间隙扩大、肾小球萎缩以及肾小球毛细血管袢纤维素样坏死,且肾脏损伤评分升高($P < 0.05$)。不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后,上述病理改变均得到显著抑制,肾脏损伤评分较SHR组降低($P < 0.05$);其中,中、高剂量汉黄芩苷的改善效果优于低剂量组($P < 0.05$)(图1A、1B)。如图1C~1E所示,与WKY组相比,SHR组大鼠血清中TNF- α 、IL-6及IL-1 β 的水平升高($P < 0.05$),不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均较SHR组降低($P < 0.05$),提示汉黄芩苷干预能够有效减轻高血压引起的肾脏组织形态损伤及炎症反应。

2.5 汉黄芩苷干预抑制SHR大鼠肾脏组织中的细胞凋亡

与WKY组相比,SHR组大鼠肾脏组织中的细胞凋亡水平升高($P < 0.05$)。经不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后,肾脏组织中的细胞凋亡较SHR组减少($P < 0.05$)(图2A、2B)。如图2C~2H所示,与WKY组相比,SHR组大鼠肾脏组织中促凋亡蛋白Bax和cleaved caspase-3的表达水平上调($P < 0.05$),而抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平下调($P < 0.05$)。经不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后,Bax和cleaved caspase-3的表达水平较SHR组下调($P < 0.05$),而Bcl-2的表达水平较SHR组上调($P < 0.05$)。其中,汉黄芩苷高剂量组对cleaved caspase-3表达的抑制作用优于汉黄芩苷低剂量组($P < 0.05$)。

2.6 汉黄芩苷抑制SHR大鼠肾脏组织中MAPK通路的异常活化

如图3A~3C,与WKY组相比,SHR组肾脏组织中p-ERK蛋白水平上调,ERK蛋白水平下调($P < 0.05$),不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后,逆转上述蛋白水平的改变($P < 0.05$)。如图3D~3F,与WKY组相比,SHR组肾脏组织中p-p38 MAPK蛋白水平上调($P < 0.05$),不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后,下调p-p38 MAPK蛋白水平($P < 0.05$)。其中,汉黄芩苷中剂量组对p-p38 MAPK表达的抑制作用优于汉黄芩苷低剂量组($P < 0.05$)。

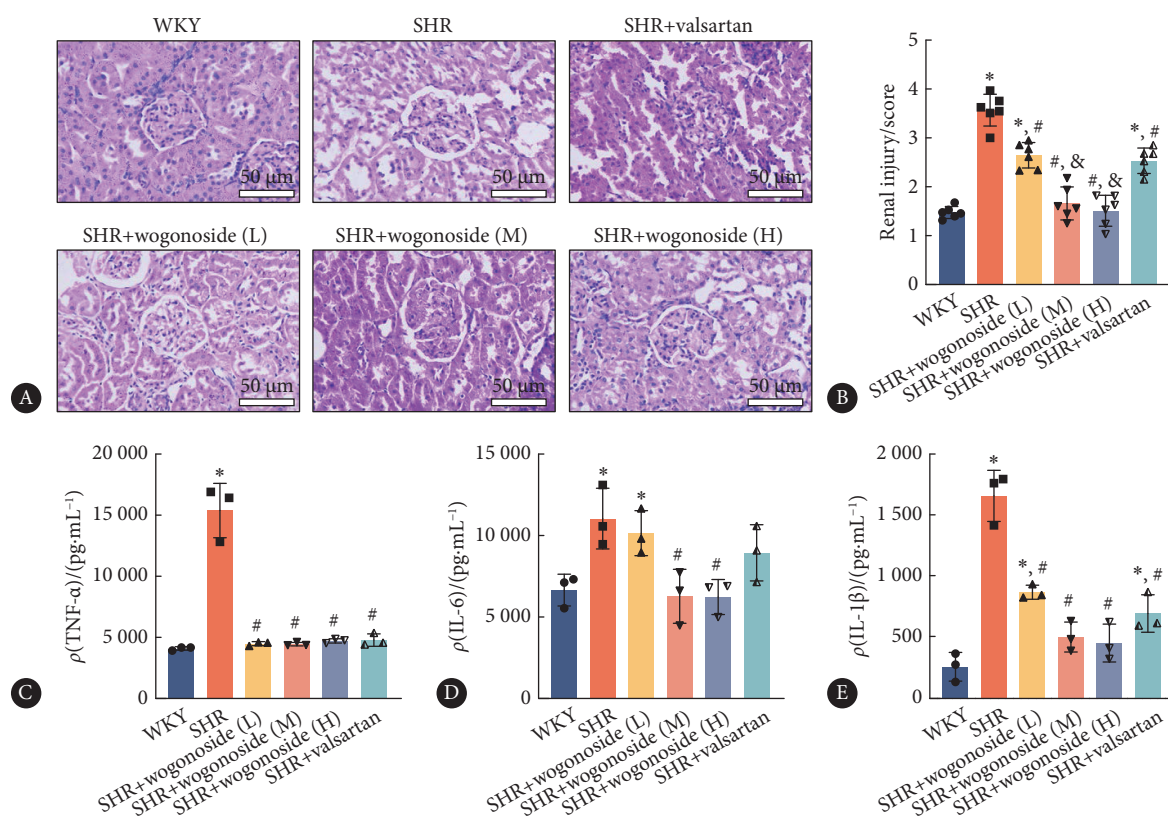


图1 汉黄芩苷干预对大鼠肾脏组织形态及炎症反应的影响

Fig 1 Effects of wogonoside intervention on renal tissue morphology and inflammatory response in rats

TNF-α: tumor necrosis factor-α; IL: interleukin. A, HE staining; B, quantitative analysis of renal tissue injury area ($n=6$); C-E, ELISA ($n=3$). * $P<0.05$, vs. WKY group; # $P<0.05$, vs. SHR group; & $P<0.05$, vs. SHR + wogonoside (L) group.

2.7 汉黄芩苷干预抑制Ang II诱导的NRK-52E细胞的凋亡

与Control组相比, Ang II刺激提高了NRK-52E细胞的凋亡水平($P<0.05$)。经不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后, NRK-52E细胞的凋亡率较Ang II组降低($P<0.05$) (图4A)。如图4B~4G所示, 与Control组相比, Ang II刺激后NRK-52E细胞中促凋亡蛋白Bax和cleaved caspase-3的表达水平上调($P<0.05$), 而抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平较Ang II组下调($P<0.05$)。不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后, Bax和cleaved caspase-3的表达水平下调($P<0.05$), 同时Bcl-2的表达水平上调($P<0.05$)。

2.8 汉黄芩苷干预抑制Ang II诱导的NRK-52E细胞中MAPK通路的异常活化

如图5A~5C, 与Control组相比, Ang II刺激后NRK-52E细胞中p-ERK蛋白水平上调($P<0.05$), 经不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后, p-ERK蛋白水平较Ang II组下调($P<0.05$)。此外, 如图5D~5F所示, Ang II刺激导致NRK-52E细胞中p-p38 MAPK蛋白水平上调($P<0.05$); 而经不同剂量汉黄芩苷及缬沙坦干预后, p-p38 MAPK蛋白水平较Ang II组下调($P<0.05$)。

3 讨论

高血压是心脑血管疾病发病与死亡的主要危险因素。肾脏不仅是高血压发生的重要器官, 也是高血压损害的主要靶器官。高血压肾病由原发性高血压引起, 起病隐匿且病程较长^[19]。若不及时治疗, 随着病情进展可发展为终末期肾病, 并引发多种心血管并发症, 严重威胁患者生命健康^[20]。中医药在抗高血压及其靶器官损害方面具有独特的优势。现有研究表明, 黄芩中的主要活性成分为黄酮类^[21]。因此, 本研究聚焦于黄芩中的黄酮单体——汉黄芩苷, 探讨其抗高血压所致肾脏损伤的作用机制。本研究利用GEO数据库及网络药理学方法, 筛选汉黄芩苷对高血压所致肾损伤的潜在作用靶点, 预测靶点间的相互作用及相关信号通路, 并通过SHR模型及Ang II刺激的细胞模型, 验证汉黄芩苷的药效作用及其潜在调控机制。

本研究通过GEO数据库筛选, 发现WKY与SHR大鼠肾脏中有4005个差异基因, 汉黄芩苷的371个潜在作用靶点中有98个与这些差异基因重叠, 进一步筛选得到45个核心治疗靶点, 其中TNF、CASP3、MAPK8和MMP9等靶

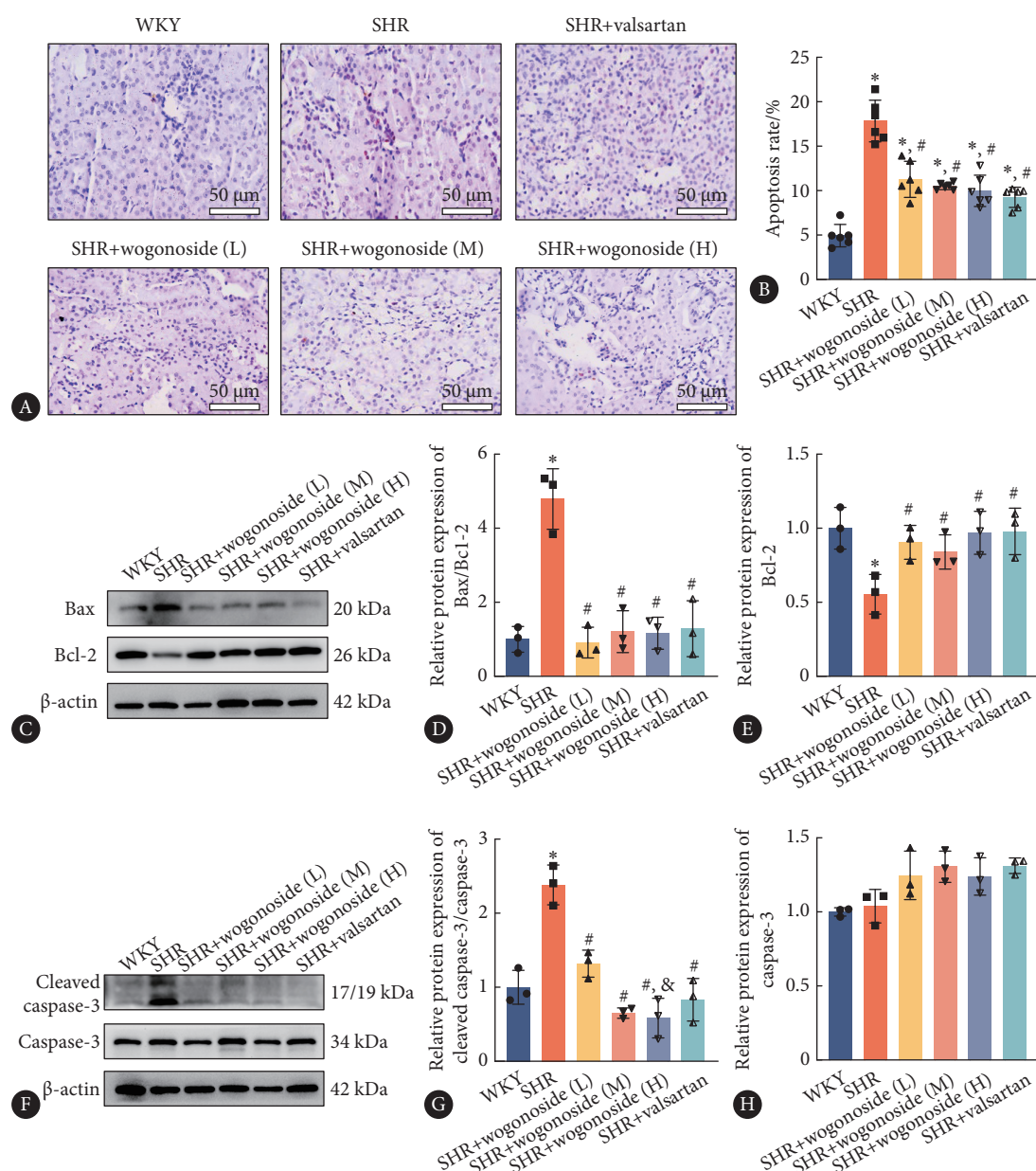


图2 汉黄芩苷干预对大鼠肾脏组织细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of wogonoside intervention on the apoptosis of renal tissue cells in rats

A, Apoptosis in rat tissues was assessed by TUNEL; B, statistical analysis of apoptosis in rat renal tissue ($n = 6$); C and F, Western blot; D, E, G, and H, statistical analysis ($n = 3$).

* $P < 0.05$, vs. WKY group; # $P < 0.05$, vs. SHR group; & $P < 0.05$, vs. SHR + wogonoside (L) group.

点与汉黄芩苷的作用密切相关。进一步通过GO和KEGG数据库分析发现, apoptosis、MAPK、IL-17、TNF等与凋亡、炎症相关的通路被显著富集。这些结果表明, 汉黄芩苷调控高血压所致肾损伤可能与细胞凋亡、炎症反应等过程相关。然而, 汉黄芩苷与TNF、CASP3、MAPK8等关键靶点的分子对接能力尚需进一步研究。

SHR是目前研究原发性高血压应用最广泛的动物模型。在本研究中, 与WKY组相比, SHR组肾脏可见肾小球囊间隙扩大、肾小球萎缩以及肾小球毛细血管样坏死, 给予汉黄芩苷干预后显著改善了SHR大鼠肾脏

形态损伤。炎症反应是SHR大鼠肾脏损伤发展的重要因素, 进一步检测血清中炎症因子表达水平发现, 汉黄芩苷干预能够抑制SHR大鼠血清中炎症因子TNF- α 、IL-6及IL-1 β 的表达。

高血压进程中的肾脏损伤与肾小管上皮细胞凋亡、氧化应激和能量代谢密切相关^[22]。结合前期生物信息学分析, 减少上皮细胞凋亡可能是汉黄芩苷治疗高血压肾损伤的重要途径。本研究TUNEL染色实验证实, 汉黄芩苷干预能够改善SHR大鼠肾组织中的细胞凋亡, 并抑制凋亡相关蛋白Bax/Bcl-2比值和caspase-3的表达。既往研

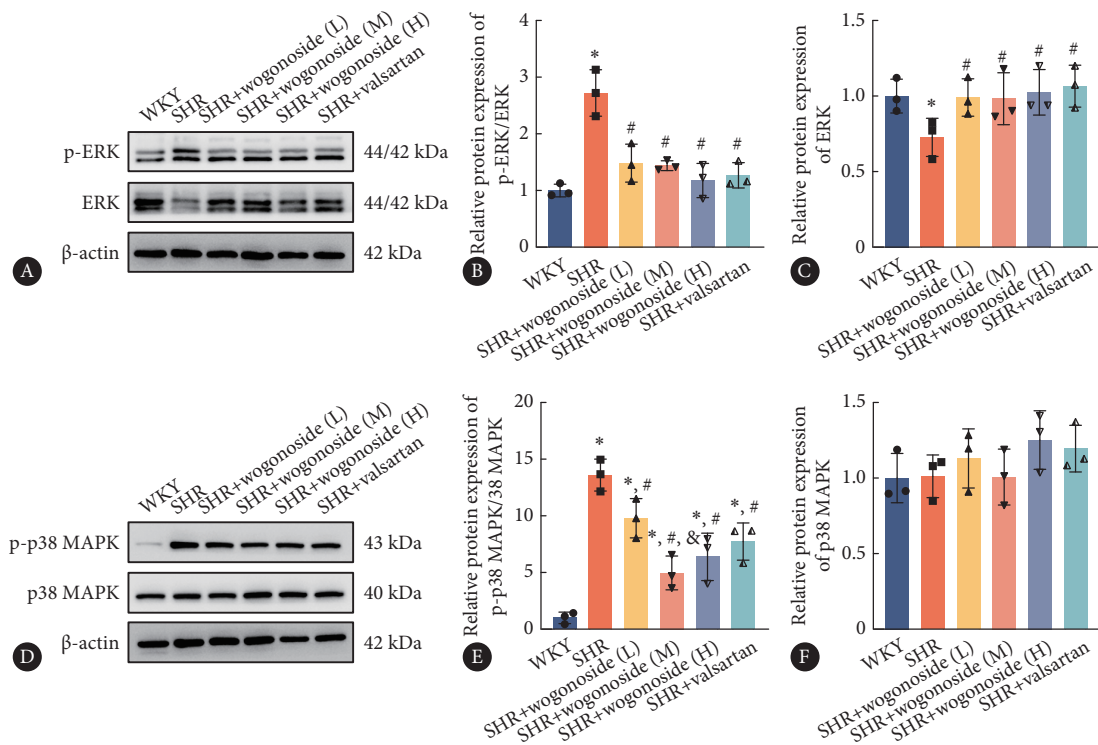


图 3 汉黄芩苷干预对大鼠肾脏组织中MAPK通路活化的影响

Fig 3 Effect of wogonoside intervention on MAPK pathway activation in rat renal tissue

A and D, Western blot (ERK: extracellular regulated protein kinases; MAPK: mitogen-activated protein kinase); B, C, E, and F, statistical analysis ($n = 3$). * $P < 0.05$, vs. WKY group; # $P < 0.05$, vs. SHR group; & $P < 0.05$, vs. SHR + wogonoside (L) group.

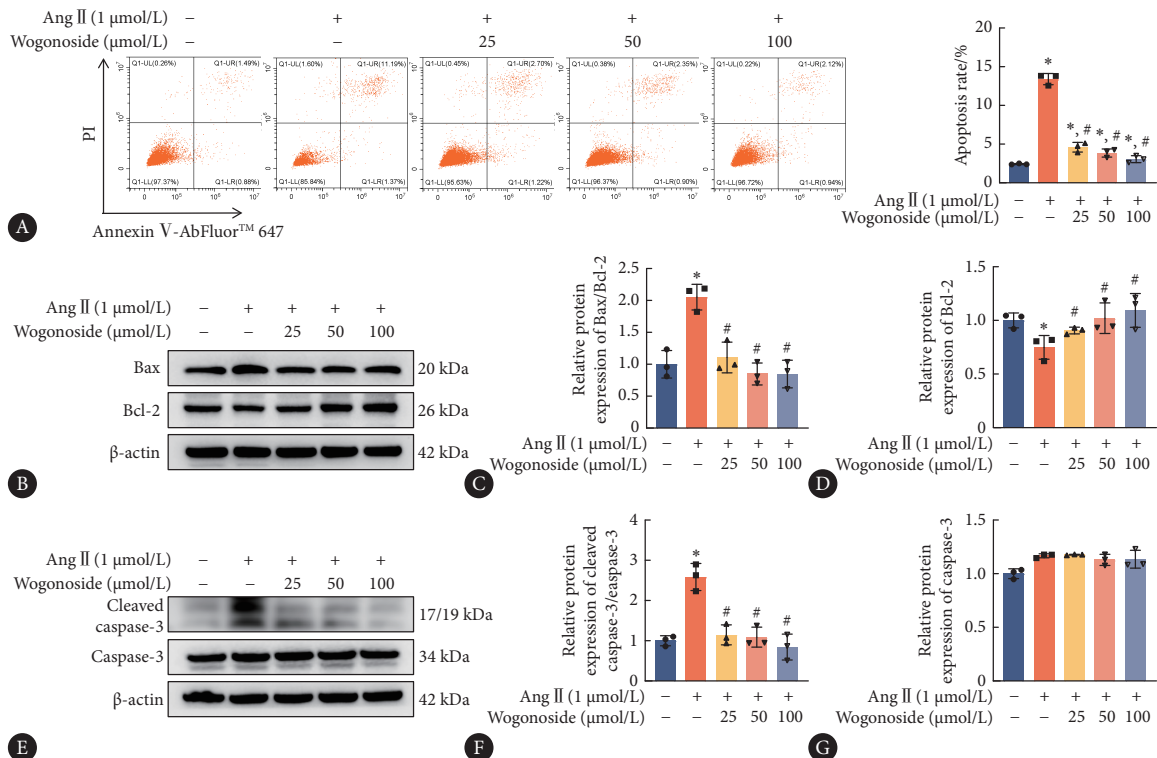


图 4 汉黄芩苷干预对Ang II诱导的NRK-52E细胞凋亡的影响

Fig 4 Effect of wogonoside intervention on angiotensin II (Ang II)-induced apoptosis of NRK-52E cells

A, The apoptosis of NRK-52E cells was assessed by Annexin V ($n = 3$); B and E, Western blot; C, D, F, and G, statistical analysis ($n = 3$). * $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. Ang II group.

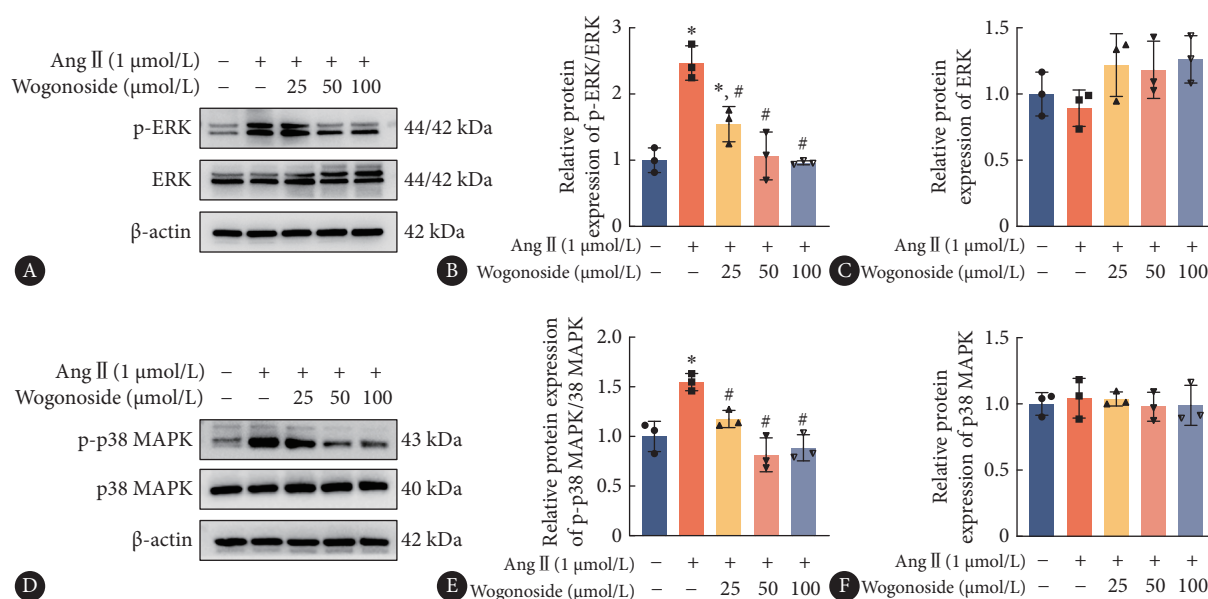


图5 汉黄芩苷干预对Ang II诱导的NRK-52E细胞中MAPK通路活化的影响

Fig 5 Effect of wogonoside intervention on angiotensin II (Ang II)-induced activation of MAPK pathway in NRK-52E cells

ERK: extracellular regulated protein kinases; MAPK: mitogen-activated protein kinase. A and D, Western blot; B, C, E, and F, statistical analysis ($n = 3$). * $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. Ang II group.

研究表明,肾素-血管紧张素系统的激活与高血压及高血压所致肾损伤密切相关,而Ang II是肾素-血管紧张素系统中的关键活性物质^[22-23],可促进NRK-52E细胞的凋亡。因此,本研究进一步通过Ang II刺激NRK-52E细胞,发现汉黄芩苷干预能够抑制Ang II诱导的NRK-52E细胞凋亡及凋亡相关蛋白Bax/Bcl-2比值和cleaved caspase-3的表达。

结合生物信息学分析结果,汉黄芩苷的干预作用可能与MAPK信号通路密切相关。既往研究已证实,MAPK通路的异常活化会促进细胞凋亡,并诱导肾损伤和肾纤维化^[7, 24]。为此,本研究通过体内外实验进一步证实,汉黄芩苷能够抑制MAPK通路的异常活化。提示调控MAPK通路的活化可能是汉黄芩苷发挥抗高血压所致肾损伤作用的关键机制之一。然而,本研究尚存在一定的局限性。尽管通过多种实验手段验证了汉黄芩苷的药效作用及其潜在机制,但尚未使用通路抑制剂对汉黄芩苷调控MAPK通路的机制进行直接验证。因此,未来的研究应进一步探索MAPK通路在汉黄芩苷抗高血压肾损伤中的具体作用,并通过使用特异性抑制剂或基因敲除技术,验证该通路在其中的关键作用。

综上所述,本研究采用GEO芯片数据挖掘和网络药理学方法,对汉黄芩苷进行了潜在靶点预测和信号通路分析,探讨了其抗高血压肾损伤的潜在作用机制。通过体内、体外实验进一步验证,汉黄芩苷通过抑制MAPK通路的异常活化,减轻了高血压所致的肾脏炎症反应和细胞凋亡。本研究为汉黄芩苷在抗高血压肾损伤中的应用

提供了科学依据,并为其在临床高血压肾病治疗中的潜在价值奠定了基础。

作者贡献声明 郭智负责论文构思、数据审编、正式分析、调查研究、研究方法、验证、可视化和初稿写作,谢意和刘红纾负责数据审编、正式分析、调查研究和验证,肖珺丹、陈榕基和吴美珠负责正式分析、调查研究和验证,彭军和沈阿灵负责经费获取、研究项目管理、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表

的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。
Author Contribution GUO Zhi is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, validation, visualization, and writing--original draft. XIE Yi and LIU Hongshu are responsible for data curation, formal analysis, investigation, and validation. XIAO Jundan, CHEN Rongji, and WU Meizhu sre responsible for formal analysis, investigation, and validation. PENG Jun and SHEN Ailing are responsible for funding acquisition, project administration, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] BASULI D, PAREKH R U, WHITE A, *et al*. Kinin B1 receptor mediates renal injury and remodeling in hypertension. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 780834. doi: 10.3389/fmed.2021.780834.
- [2] STOMPÓR T, PERKOWSKA-PTASIŃSKA A. Hypertensive kidney disease: a true epidemic or rare disease? *Pol Arch Intern Med*, 2020,

- 130(2): 130-139. doi: 10.20452/pamw.15150.
- [3] LI X T, SONG J W, ZHANG Z Z, *et al.* Sirtuin 7 mitigates renal ferroptosis, fibrosis and injury in hypertensive mice by facilitating the KLF15/Nrf2 signaling. *Free Radic Biol Med*, 2022, 193(Pt 1): 459-473. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.10.320.
- [4] ZHANG Y, ZHANG N, ZOU Y, *et al.* Deacetylation of septin4 by SIRT2 (silent mating type information regulation 2 homolog-2) mitigates damaging of hypertensive nephropathy. *Circ Res*, 2023, 132(5): 601-624. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.321591.
- [5] GENG X Q, MA A, HE J Z, *et al.* Ganoderic acid hinders renal fibrosis via suppressing the TGF- β /Smad and MAPK signaling pathways. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(5): 670-677. doi: 10.1038/s41401-019-0324-7.
- [6] YUE J, LOPEZ J M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2346. doi: 10.3390/ijms21072346.
- [7] LIVINGSTON M J, ZHANG M, KWON S H, *et al.* Autophagy activates EGR1 via MAPK/ERK to induce FGF2 in renal tubular cells for fibroblast activation and fibrosis during maladaptive kidney repair. *Autophagy*, 2024, 20(5): 1032-1053. doi: 10.1080/15548627.2023.2281156.
- [8] HALL J E, MOUTON A J, Da SILVA A A, *et al.* Obesity, kidney dysfunction, and inflammation: interactions in hypertension. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(8): 1859-1876. doi: 10.1093/cvr/cvaa336.
- [9] ZHOU Y, LIU L, FAN F, *et al.* Relation between elevated first SBP from baseline (delta SBP) and postoperative outcome. *J Hypertens*, 2021, 39(10): 1982-1990. doi: 10.1097/HJH.0000000000002872.
- [10] GUAN Y, CHEN K, QUAN D, *et al.* The combination of *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Sophora japonica* L. ameliorate renal function by regulating gut microbiota in spontaneously hypertensive rats. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 575294. doi: 10.3389/fphar.2020.575294.
- [11] TAN Y Q, LIN F, DING Y K, *et al.* Pharmacological properties of total flavonoids in *Scutellaria baicalensis* for the treatment of cardiovascular diseases. *Phytomedicine*, 2022, 107: 154458. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154458.
- [12] LIU J, LIU S, PAN W, *et al.* Wogonoside attenuates the articular cartilage injury and the infiltration of Th1/Th2-type cytokines in papain-induced osteoarthritis in rat model via inhibiting the NF- κ B and ERK1/2 activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43(3): 343-352. doi: 10.1080/08923973.2021.1913503.
- [13] BANIK K, KHATOON E, HARSHA C, *et al.* Wogonin and its analogs for the prevention and treatment of cancer: a systematic review. *Phytother Res*, 2022, 36(5): 1854-1883. doi: 10.1002/ptr.7386.
- [14] YU X, CAI B, YU L, *et al.* Wogonoside ameliorates airway inflammation and mucus hypersecretion via NF- κ B/STAT6 signaling in ovalbumin-induced murine acute asthma. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(13): 7033-7042. doi: 10.1021/acs.jafc.3c04082.
- [15] XIE J, LIN H, JIN F, *et al.* Jia Wei Qingxin Lotus Seed Drink ameliorates epithelial mesenchymal transition injury in diabetic kidney disease via inhibition of JMJD1C/SP1/ZEB1 signaling pathway. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156142. doi: 10.1016/j.phymed.2024.156142.
- [16] 柯亚琼, 郝建波, 芦玲, 等. 汉黄芩苷抗糖尿病大鼠肾损伤及纤维化的机制研究. *广州中医药大学学报*, 2022, 39(9): 2109-2115. doi: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2022.09.024.
- KE Y Q, HAO J B, LU L, *et al.* Study on the mechanism of wogonoside protecting against renal injury and fibrosis in diabetic rats. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2022, 39(9): 2109-2115. doi: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2022.09.024.
- [17] WU Y Z, ZHANG Q, WEI X H, *et al.* Multiple anti-inflammatory mechanisms of Zedoary Turmeric Oil Injection against lipopolysaccharides-induced acute lung injury in rats elucidated by network pharmacology combined with transcriptomics. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154418. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154418.
- [18] WU M, ZHANG S, ZHANG W, *et al.* Qingda granule ameliorates vascular remodeling and phenotypic transformation of adventitial fibroblasts via suppressing the TGF- β 1/Smad2/3 pathway. *J Ethnopharmacol*, 2023, 313: 116535. doi: 10.1016/j.jep.2023.116535.
- [19] YANG C, WANG H, ZHAO X, *et al.* CKD in China: evolving spectrum and public health implications. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76(2): 258-264. doi: 10.1053/j.ajkd.2019.05.032.
- [20] BURNIER M, DAMIANAKI A. Hypertension as cardiovascular risk factor in chronic kidney disease. *Circ Res*, 2023, 132(8): 1050-1063. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.321762.
- [21] WANG J, CHEN S, ZHANG J, *et al.* *Scutellaria baicalensis* georgi is a promising candidate for the treatment of autoimmune diseases. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 946030. doi: 10.3389/fphar.2022.946030.
- [22] ZHANG X L, LI J P, WU M Z, *et al.* Quercetin protects against hypertensive renal injury by attenuating apoptosis: an integrated approach using network pharmacology and RNA sequencing. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2024, 84(3): 370-382. doi: 10.1097/FJC.0000000000001598.
- [23] 杨芮, 刘凯, 陈晓平. 圣地红景天对自发性高血压大鼠左室重构的影响及其机制探讨. *四川大学学报(医学版)*, 2013, 44(2): 201-204. doi: 10.13464/j.scuxbyxb.2013.02.004.
- YANG R, LIU K, CHEN X P. Effect of *Rhodiola sacra* on left ventricular remodeling and its mechanism in spontaneously hypertensive rats. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2013, 44(2): 201-204. doi: 10.13464/j.scuxbyxb.2013.02.004.
- [24] TAO Y, TANG C, WEI J, *et al.* Nr4a1 promotes renal interstitial fibrosis by regulating the p38 MAPK phosphorylation. *Mol Med*, 2023, 29(1): 63. doi: 10.1186/s10020-023-00657-y.

(2024-11-30收稿, 2025-01-08修回)

编辑 余琳



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用 4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*