

沙棘提取物治疗肾缺血-再灌注损伤的作用机制： 基于网络药理学预测与实验验证

赵昱棋 焦雪菲 胡清林 高波
(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘要 **目的** 综合运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)技术、网络药理学和动物实验探讨沙棘在治疗肾缺血-再灌注损伤(renal ischemia-reperfusion injury, RIRI)的潜在作用机制。**方法** 运用 UPLC-Q-TOF-MS 技术,系统性地解析并鉴定沙棘的化学组分。应用网络药理学方法,基于筛选出的交集靶点,构建蛋白-蛋白相互作用网络图(protein-protein interaction networks, PPI)及“活性成分-靶点-通路”网络,并进行基因本体(gene ontology, GO)功能与京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,旨在发掘沙棘治疗 RIRI 的关键靶点。选取 18 只 Sprague-Dawley 雄性大鼠,随机均分为假手术组(Sham 组)、模型组(Model 组)与沙棘提取物组(H 组),每组 6 只,构建 RIRI 大鼠模型,测定血浆中肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)水平,应用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肾脏组织病理学改变,免疫荧光染色检测肾脏肿瘤蛋白 p53 表达。**结果** 鉴定出沙棘中 74 种有效化学成分。基于 TCMSP 等数据库共筛选获得的 429 个沙棘潜在作用靶点,通过获取 RIRI 疾病相关靶点并取交集,共得肿瘤蛋白 p53、白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等 226 个交集靶点,GO 功能与 KEGG 通路富集分析,结果显示其显著富集于缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)等信号通路中。动物实验结果显示,Model 组与 Sham 组相比,大鼠血清中 Cr、BUN 和 MDA 水平明显升高,GSH 水平明显下降(均 $P < 0.05$);与 Model 组相比,H 组处理的大鼠血清中,Cr、BUN、MDA 浓度明显降低,GSH 浓度明显升高,肾小管细胞内 p53 蛋白表达下降(均 $P < 0.05$)。Model 组大鼠肾小球皱缩,可见炎性细胞浸润,H 组有少量炎性细胞聚集,肾小球形状较贴合。**结论** 沙棘可能通过抑制 p53 蛋白表达,上调 HIF-1 α 信号通路从而减轻体内氧化应激状态,并降低大鼠 RIRI 中 Cr 和 BUN 浓度,改善损伤肾小管的形态和功能,治疗 RIRI。

关键词 沙棘;肾缺血-再灌注损伤;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法;网络药理学;p53;HIF-1 信号通路

中图分类号:R284;R966;R692 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2025)12-522-08

Effect and mechanism of *Hippophae rhamnoides* L. on the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: network pharmacology prediction and experimental validation

ZHAO Yuqi, JIAO Xuefei, HU Qinglin, GAO Bo
(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective Employing advanced ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) technology, in conjunction with comprehensive network pharmacology analysis and rigorous animal experimentation, we conducted an in-depth exploration and validation of the chemical constituents and pharmacological mechanisms underlying the therapeutic efficacy of *Hippophae rhamnoides* L. in reducing the adverse effects associated with renal ischemia-reperfusion injury. **Method** UPLC-Q-TOF-MS technology was utilized to analyze

the chemical components of *Hippophae rhamnoides* L. Using network pharmacology methods, based on the screened intersection targets, a protein-protein interaction network (PPI) and an "active component-target-pathway" network were constructed, and Gene Ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were conducted to identify the key targets of seabuckthorn in the treatment of renal ischemia-reperfusion injury. Eighteen male Sprague-Dawley rats were selected and randomly divided equally into the sham operation group (Sham group), the model group (Model group), and the seabuckthorn extract group (Group H), with 6 rats in each group. A rat model of renal ischemia-reperfusion injury (RIRI) was established. The levels of creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) in plasma were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of renal tissue, and the expression of tumor protein p53 in the kidney was detected by immunofluorescence staining. **Result** 74 chemical components were identified in sea buckthorn. Network pharmacology screening based on the TC MSP database yielded 429 potential targets. Intersection with RIRI-related targets identified 226 common targets, including tumor protein p53, IL-6, and TNF. GO function and KEGG pathway enrichment analysis showed that these targets were significantly enriched in signaling pathways such as hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). In animal experiments, compared with the Sham group, the Model group showed that the levels of Cr, BUN and MDA were significantly increased, while the level of GSH was significantly decreased ($P < 0.05$). In comparison to the model group, the concentrations of Cr, BUN and MDA were significantly decreased, while the level of GSH was significantly increased in the H group. The expression of p53 protein in renal tubular cells decreased ($P < 0.05$). The glomerular of the model group rats were shrunken, with visible infiltration of inflammatory cells. In the H group, there was a small amount of inflammatory cell aggregation, and the shape of the glomeruli was relatively intact. **Conclusion** *Hippophae rhamnoides* L. may alleviate the oxidative stress state in the body by inhibiting the expression of p53 protein and up-regulating the HIF-1 α signaling pathway, reduce the concentrations of Cr and BUN in rats with RIRI, improve the morphology and function of injured renal tubules, and thus treat RIRI.

Keywords: *Hippophae rhamnoides* L.; Renal ischemia-reperfusion injury; UPLC-Q-TOF-MS/MS; Network pharmacology; p53; HIF-1 signaling pathway

肾缺血-再灌注损伤 (renal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是指肾脏血液供应功能急性受损, 后经组织血流恢复与再氧合的过程中引发的病理性反应, 属于肾内性急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 的一种^[1], 重度 RIRI 可导致以急性肾小管坏死为主要病理表现的移植物功能延迟 (delayed graft function, DGF)^[2], 严重影响患者预后与移植肾存活率。目前, 改善全球肾病预后组织 (kidney disease: improving global outcomes, KDIGO) 尚未推荐针对 AKI 预防与治疗相关的任何药物^[3]。因此, 开发新型、安全有效的治疗药物十分迫切。

沙棘为胡颓子科植物沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 经干燥处理后的成熟果实, 其主要活性成分为黄酮类化合物, 特别是异鼠李素、槲皮素、山奈酚占主导地位^[4]。异鼠李素经由对核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路的负向调控机制, 显著抑制该通路下游炎症介质的转录表达及其介导的炎症反应级联, 进而发挥肾脏保护效应^[5]。另一方面, 槲皮素展现出包括抑制肿瘤增殖、缓解炎症反应、抵抗氧化应激损伤、抗血小板聚

集和高效清除自由基等多重生物活性。沙棘作为传统的药食同源植物, 尽管其活性成分在单独研究时显现出药理潜力, 但将沙棘作为整体复方系统阐述其治疗 RIRI 的具体物质基础、多靶点作用机制以及整体药效的研究尚属空白。

本研究运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 技术对沙棘的化学成分进行系统的分析鉴定, 并借助网络药理学探讨沙棘治疗 RIRI 的作用机制, 并通过动物实验进行初步验证, 旨在揭示沙棘治疗 RIRI 的关键活性成分及其潜在靶点, 从而为沙棘在功能性食品和药品领域的广泛应用奠定了理论基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 18 只, 体重 (200 \pm 30) g, 购自青岛大任富城畜牧有限公司, 许可证号: SCXK (鲁) 2019000。动物饲养环境: 相对温度 (23 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (60 \pm 10) %。本项研究所涉及的动物实验严格遵循济宁医学院动物伦理委

员会的伦理审查流程,并已获得其正式授权(2019-YX-011)。

1.2 药品与试剂

新鲜沙棘果产自山西省吕梁市文水县凤城镇,由济宁医学院中药教研室王建安教授鉴定,鉴定为胡颓子科植物沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)。肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:C011-2-1、C013-2-1、A003-1-2、A006-2-1);p53 Rabbit Monoclonal Antibody、Cy3 标记山羊抗兔 IgG (H+L)(碧云天生物技术研究所,产品编号:AF1162、A0516)。

1.3 主要仪器与设备

Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司);Synergy H1 多功能微孔板检测仪(美国 Bio Tek 仪器有限公司);MIX-1500 微孔板震荡仪(杭州米欧仪器有限公司);生物显微镜 B204LED(重庆奥特光学仪器有限公司);激光共聚焦显微镜(徕卡显微系统有限公司)。

2 方法

2.1 沙棘提取物的制备

称取适量新鲜沙棘果,依次经碾碎、石油醚脱脂、干燥。所获取的沙棘果渣样本经 80% (V/V) 乙醇溶液于 80℃ 条件下加热回流提取 3 次,每次持续 1 h。合并 3 次提取液,采用减压蒸馏法回收溶剂,最终产物储存于 -20℃ 冰箱以备后续使用。

2.2 供试品溶液的制备

取 0.2 g 样品置于三角烧瓶中,加入甲醇溶剂 20 mL,以获得浓度为 1% 的试液。称重后采用超声波萃取技术处理 40 min,经补重滤过,制得供试品溶液。

2.3 色谱条件

采用 UPLCBEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);选用 0.1% 甲酸作为流动相组分 A, 甲醇则为流动相组分 B, 设定如下洗脱梯度:0~2 min, A 相 95%~70%, B 相 5%~30%;2~7 min, A 相 70%~66%, B 相 30%~34%;7~15 min, A 相 66%~20%, B 相 34%~80%。以 0.3 mL/min 的流速进行,设定检测波长 258 nm,柱温维持 30℃,每次进样量 1 μL。

2.4 质谱条件

实验采用负离子检测模式,校准毛细管电压至

3.0 kV,提取锥孔电压 20 kV,样品锥孔电压 40 kV,离子源温度 120℃,脱溶剂温度 450℃,脱溶剂流速 600 L/h,锥孔气流速 50 L/h,扫描时间 18 min,离子检测质荷比 100~1000 Da,采用 LE 溶液进行在线质量校正。

2.5 网络药理学分析

2.5.1 沙棘活性成分作用靶点预测

借助 TCMSP 数据库平台(<https://tcmsp.91medicine.cn/#/database>)进行检索,键入检索词“沙棘”,设定筛选标准为口服生物利用度(oral bioavailability, OB) ≥ 30%,类药性(drug-like, DL) ≥ 0.18%,对化学成分进行筛选处理,其中,OB ≥ 30% 确保成分具备良好的口服吸收潜力,而 DL ≥ 0.18% 则能在保证类药性的同时,有效涵盖天然产物中结构多样的先导化合物。依照 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定结果与上述 TCMSP 数据库筛选结果比对去重后,参照 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取对应化合物的 SMILES 结构,导入 SwissTargetPrediction 数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>)预测相关靶点。整合 TCMSP 数据库与 SwissTargetPrediction 数据库所获取的靶点信息,在剔除重复项的基础上,利用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行校正。通过排除非人类基因靶点,最终确定沙棘中化学成分的潜在作用靶点。

2.5.2 RIRI 疾病靶点检索

在 OMIM(<https://www.omim.org/>)和 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)2 个数据库中,以“renal ischemia reperfusion injury”为关键词获取 RIRI 疾病基因,其中 GeneCards 数据库检索条件选择 relevance score ≥ 5 的基因。在此基础上对获取的靶点进行严格去重处理,并对合并后的信息进行整合分析。利用 Venny 2.1.0 在线分析工具(<https://bioinfo.pcnb.csic.es/tools/venny/index.html>),将筛选得到的 RIRI 的特异性靶点基因集与沙棘已知的靶点基因库进行交叉比对分析,通过取交集的方式,筛选出沙棘针对 RIRI 可能发挥治疗作用的潜在靶点。

2.5.3 蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络构建

将筛选所得的交集靶点数据导入 STRING 数据库系统中(<https://cn.string-db.org/>),选择“multiple protein”作为分析对象,物种限定为“Homo sapiens”,设置互作阈值为 0.700,在此基础上,排除所有孤立蛋白节点,导出文件,利用 Cytoscape3.9.1 进行拓扑结构分析,根据 degree 值筛选排名前 10 的核

心靶点。

2.5.4 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 从 Venny 2.1.0 获取的沙棘治疗 RIRI 的潜在靶点, 导入 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 系统性地实施了 GO 功能富集分析及 KEGG 中的代谢通路及信号传导通路解析, 随后借助微生信-在线生物信息学分析、可视化云平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 对分析结果进行富集并生成相应图表直观展示。

2.6 动物实验验证

2.6.1 动物分组、模型建立与给药方案 18 只 Sprague-Dawley 雄性大鼠依据随机化原则被均分 3 组: 假手术组 (Sham 组)、模型组 (Model 组) 和沙棘提取物组 (H 组), 每组 6 只。Model 组与 H 组大鼠通过腹腔注射 10% 异戊巴比妥 (1 mL/kg) 进行麻醉, 脱毛备皮后以先碘伏后酒精的顺序消毒, 于洁净鼠台呈俯卧位固定, 手术剪于背部距脊柱和左右两侧季肋下缘各 0.5 cm 处开口, 约 1~2 cm, 充分暴露左右肾脏, 游离左右侧肾动脉, 并使用无创动脉夹夹闭双侧肾动脉以实现完全阻断血流, 同时加盖生理盐水浸润的纱布并计时, 45 min 后, 恢复肾脏的血流灌注。Sham 组仅游离双侧肾动脉, 其余步骤均严格遵循上述两组的操作流程。术后 30 min, H 组大鼠灌胃给药 1 次 (提取物 2.5 g/kg, 按干膏量计算, 加入适量生理盐水配置为 3 mL), 而 Sham 组与 Model 组则分别接受等剂量生理盐水进行灌胃处理。术后 24 h, 通过内眦静脉采集大鼠血液样本, 在 4℃ 条件下以 4 000 r/min 的速度离心 10 min, 收集上清液并储存于 -80℃ 冰箱中以备后续分析。

2.6.2 肾脏组织病理学分析 24 h 取血后脱颈处死大鼠, 摘取其左右两侧肾脏, 去除肾脏被膜, 冠状切开, 置于中性福尔马林溶液中固定 24 h, 经梯度乙醇脱水处理、二甲苯透明化、浸蜡处理及石蜡包埋等步骤, 制成厚度为 5 μm 的切片, HE 染色, 中性树脂封片, 用光学显微镜在 400 倍放大成像后, 随机选择 10 个视野对肾小管损伤进行评分, 评估主要指标包括肾小管上皮细胞空泡变性、刷状缘脱落、肾小管扩张和上皮细胞脱落, 损伤程度按以下标准评分: 正常肾小管计 0 分, 肾小管损伤 <25% 计 1 分, 肾小管 25%~50% 受损计 2 分, 肾小管 50%~75% 损伤计 3 分, 肾小管损伤 >75% 计 4 分。

2.6.3 免疫荧光染色 按照 2.6.2 步骤所制备的

5 μm 石蜡切片, 需经历一系列处理流程: 首先通过二甲苯进行脱蜡处理, 并采用梯度酒精实现水化; 随后, 经抗原修复, 血清封闭处理, 一抗以 1:100 比例稀释后滴加, 4℃ 条件湿盒孵育过夜, 经 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入以 1:200 稀释后的二抗, 室温孵育 50 min, DAPI 复染细胞核, 并滴加自发荧光淬灭剂以消除背景荧光, 以抗荧光淬灭封片剂进行封片, 采用激光共聚焦显微镜下观察。使用 Image J 软件测定平均荧光强度分析并进行定量分析, 所有数据经归一化处理后, 采用单因素方差进行组间比较。

2.6.4 血清生化指标检测 参照试剂盒说明书进行操作, 测定血浆中 Cr、BUN、MDA 和 GSH 含量。

2.7 统计学方法

运用 SPSS 29.0 统计软件分析, 符合正态分布的计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 若差异具有统计学意义, 进一步采用 Tukey 法进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 沙棘化学成分 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定结果

最终鉴别出 74 种化学成分, 其中萜类成分 23 个, 黄酮类成分 21 个, 脂肪酸类成分 7 个, 香豆素类成分 4 个, 酚酸类成分 4 个, 酚苷类成分 3 个, 甾体化合物类成分 2 个, 苯丙素类成分 2 个, 醌类成分 2 个, 有机酸类成分 2 个, 多酚类成分 1 个, 苯丙素类成分 1 个, 生物碱类成分 1 个, 聚炔类成分 1 个。见图 1。

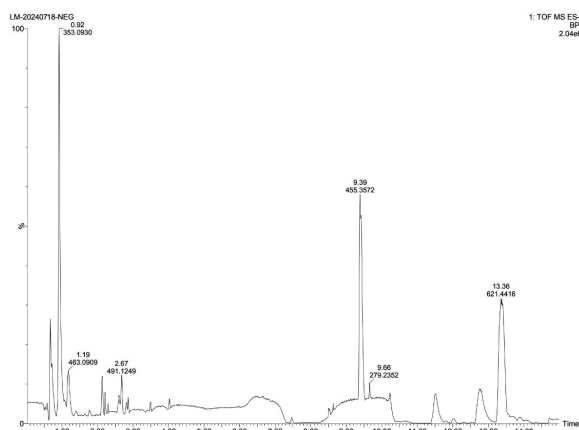


图 1 沙棘的 UPLC-MS/MS 基峰离子流图

3.2 网络药理学分析结果

3.2.1 沙棘与 RIRI 的共同作用靶点 共筛选出沙棘化学成分潜在作用靶点 429 个, 确定 RIRI 相关靶点共 2 159 个。沙棘与 RIRI 的交集靶点共 226 个, 其中 203 个靶点为沙棘所特有, 而 1933 个靶点仅与 RIRI 相关。见图 2。

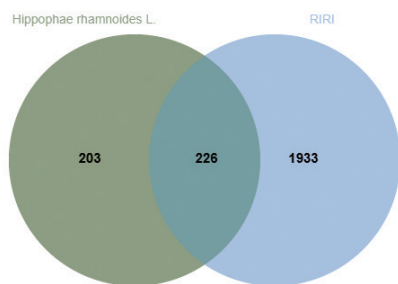


图 2 沙棘有效成分与肾缺血-再灌注损伤靶点维恩图

3.2.2 关键靶点 PPI 网络分析 沙棘治疗 RIRI 的靶点蛋白 PPI 如图 3 所示, 其中节点 221 个, 边 1 597 条, 以节点度值为评价标准, 数值越高, 则颜色越深, 直径越大, 其治疗作用越关键, 依据 degree 值排名, 前 10 的核心靶点共包括: p53 肿瘤蛋白编码基因(p53)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT1 (AKT1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、表皮生长因子受体编码基因(EGFR)、连环蛋白 β -1 编码基因(CTNN β -1)、B 淋巴瘤细胞瘤-2 编码基因(BCL-2)、酪氨酸蛋白激酶(SRC)、胱天蛋白酶 3(CASP3)。

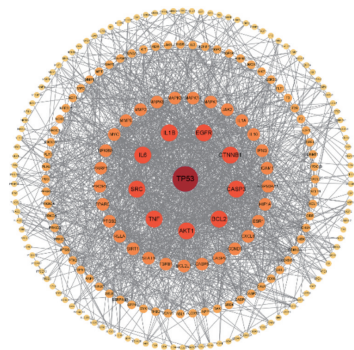


图 3 沙棘有效成分与 RIRI 靶点蛋白相互作用(PPI)网络图(节点 221 个, 边 1597 条)

3.2.3 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 利用 DAVID 数据库执行 GO 分析, 设置 PValue<0.05 为

筛选阈值, 共筛选出 959 个 GO 条目, 其中 BP、CC、MF 各选前 10 项进行可视化分析, 如图 4, 结果表明, 沙棘治疗 RIRI 的潜在作用靶点所涵盖的 BP 包括对脂多糖的反应、对外源性刺激的反应和缺氧反应等。CC 提示靶点主要定位在膜小凹、质膜微域和细胞表层等信号转导的关键区域; MF 囊括核受体活性、转录共激活因子结合和内肽酶催化活性等生物特性, 提示沙棘可能通过直接调节基因转录发挥治疗作用。KEGG 分析经筛选后共有 185 条细胞信号通道, 选取前 20 条进行可视化分析, 如图 5, IL-17 和 HIF-1 等信号通路富集显著性较高。HIF-1 α 是一种对低氧环境敏感的转录激活因子, 能够响应缺氧状态。HIF-1 α 参与缺氧时 p53 的激活^[6], 因此 p53 通过调节 HIF-1 信号通路所诱导的氧化应激可能在 RIRI 中起到关键作用。

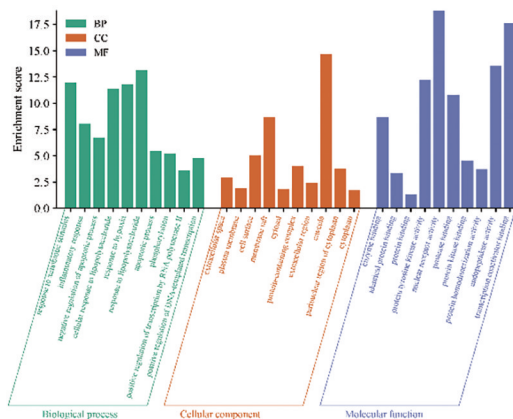


图 4 核心靶点的 GO 分析

3.2.4 “活性成分-靶点-通路”网络构建 利用 Cytoscape3.9.1 软件平台, 筛选 KEGG 富集分析排名前 20 条与 RIRI 相关通路, 导入沙棘活性成分及相关靶点基因, 剔除无关信息后, 构建“活性成分-靶点-通路”交互网络图, 如图 6。以边数排名为依据, 获得排名前 10 的化学成分, 分别是: 槲皮素、山奈酚、异鼠李素、天竺葵素、曼迪诺尔、(+)-儿茶素、 β -谷固醇、肖坦醇、大黄酸与谷固醇, 提示沙棘可能主要通过上述化学成分发挥治疗 RIRI 疾病的作用。

3.3 动物实验验证结果

3.3.1 沙棘提取物改善 RIRI 引起的肾组织病理损伤 Sham 组肾组织细胞呈现出正常形态, 结构保持完整, 肾小球及其周边血管区域未见炎性细胞的浸润与聚集现象; 相比之下, Model 组则展现出

肾小球皱缩的病理特征,伴有炎性细胞的明显浸润,且细胞界限模糊;H 组肾小管损伤程度有所减轻,仅有少量炎性细胞浸润,肾小球整体形态相对保持完整,仅有个别肾小管细胞质出现皱缩现象。使用 Jablonski 评分对肾损伤程度进行评估,Model 组损伤明显高于假手术组 ($P < 0.001$),H 组损伤明显小于 Model 组 ($P < 0.01$)。见图 7。

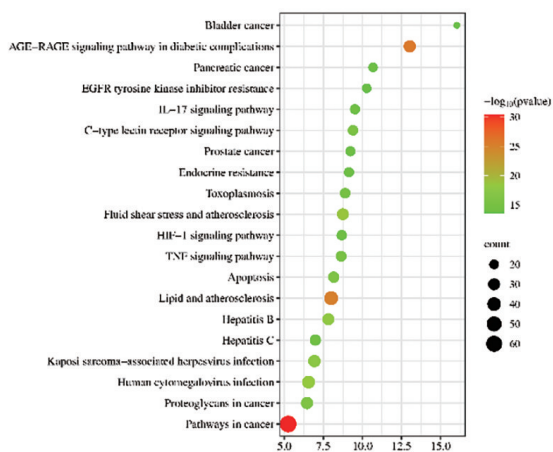


图 5 核心靶点的 KEGG 富集分析

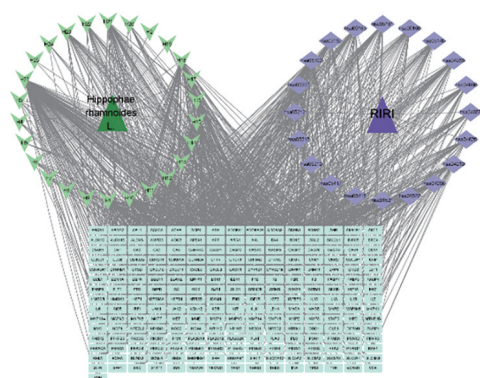


图 6 “活性成分-靶点-通路”网络图

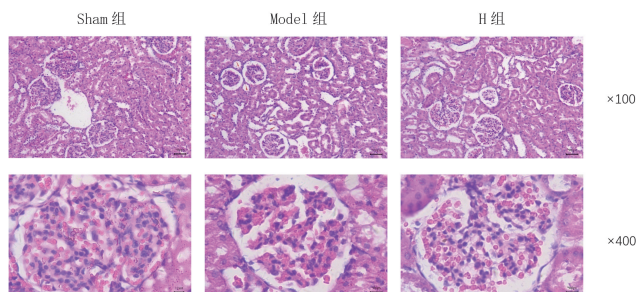
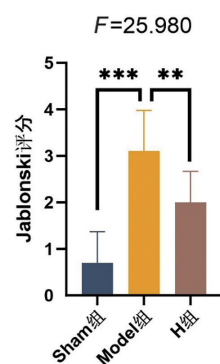


图 7-1 沙棘对 RIR1 大鼠肾脏组织病理形态的影响



注:与 Sham 组相比,*** $P < 0.001$;与 Model 组相比,** $P < 0.01$ 。

图 7-2 大鼠肾组织 HE 染色 Jablonski 评分

3.3.2 沙棘提取物降低肾组织 p53 蛋白表达 与 Sham 组相比,Model 组大鼠肾脏 p53 蛋白质表达水平显著升高 ($P < 0.001$),并且在肾小管上皮细胞中累积。相较于 Model 组,H 组大鼠肾脏 p53 蛋白含量显著下降 ($P < 0.001$)。

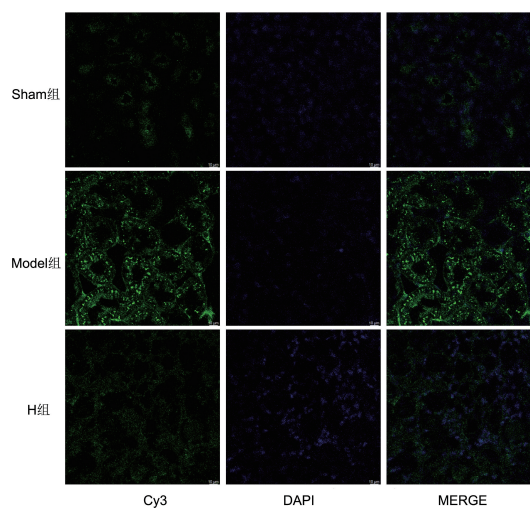
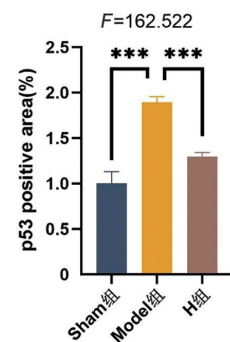


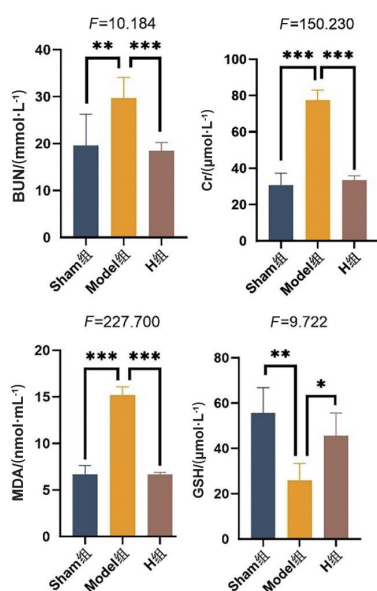
图 8-1 大鼠肾脏 p53 免疫荧光染色图



注:与 Sham 组相比,*** $P < 0.001$;与 Model 组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 8-2 大鼠肾脏 p53 免疫荧光统计图

3.3.3 沙棘提取物对血清肾功能及氧化应激指标的影响 相较于 Sham 组, Model 组大鼠的血清 Cr 和 BUN 呈现明显上升趋势 ($P < 0.001$, $P < 0.01$)。而当与 Model 组进行比较时, H 组大鼠的血清 Cr 和 BUN 水平均有所下降, 且统计学具有显著差异 (均 $P < 0.001$)。另一方面, 与 Sham 组相比, Model 组大鼠的血清 MDA 浓度显著增高 ($P < 0.001$), 而 GSH 含量则显著降低 ($P < 0.01$)。相较于 Model 组, H 组大鼠的血清 MDA 含量表现出明显下降趋势 ($P < 0.001$), 其 GSH 含量有所上升 ($P < 0.05$)。具体见图 9。



注:与 Sham 组相比, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$;与 Model 组相比, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ 。

图 9 各组大鼠 Cr、BUN、GSH 和 MDA 的水平

4 讨论

RIRI 是急性肾损伤的主要病因之一,其复杂的病理机制如氧化应激、凋亡与炎症级联反应,给治疗带来了巨大挑战^[7]。尽管一些药物在研究中展现出潜力,但其安全性与有效性仍存争议^[8-9]。本研究首次整合 UPLC-Q-TOF-MS 化学成分分析、网络药理学系统预测与体内实验验证,揭示了沙棘提取物通过调控 p53/HIF-1 信号轴减轻 RIRI 的潜在机制。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术,从沙棘中共鉴定出 74 种化学成分,并对沙棘进行网络药理学研究,共获得潜在的化学成分作用靶点 429 个,

RIRI 相关靶点 2 159 个,化学成分与 RIRI 交集获得交集靶点共 226 个。利用 STRING 数据库对上述 226 个交集靶点进行 PPI 分析,进一步揭示沙棘可能通过作用于 p53、IL-6、TNF 等关键靶点发挥改善 RIRI 的作用。其中, CASP3 是细胞凋亡的关键调节因子,可以通过 p53 依赖性信号通路激活^[10]。p53 亦参与 AKI 修复不良阶段,驱动肾纤维化与慢性炎症进展^[11]。为深入阐明其潜在作用机理,借助 DAVID 6.8 数据库平台,针对所筛选的潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析,结果显示靶点主要富集于 TNF、HIF-1 和 IL-17 等多条核心信号转导通路之中。HIF-1 信号通路在调节氧化应激中发挥核心作用,其功能失调不仅减少 HIF-2 对抗氧化相关基因的转录活性,还通过 HIF-1 依赖的方式激活促氧化酶基因,增加 ROS 的产生^[12]。研究揭示 p53 能够通过靶向 HIF-1 α , 促进其经由 Mdm2 介导的泛素化,进而抑制 HIF-1 的活性^[6]。此外,“活性成分-靶点-通路”网络图表明沙棘的疗效源于槲皮素、山奈酚等多种活性成分对 p53 等核心靶点的作用,而槲皮素不仅可以激活核因子- κ B 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 通路抑制 p53, 还可抑制脂多糖刺激下 TNF 的生成^[13], 通过多靶点调节同时影响氧化应激、细胞凋亡等多个生物学过程。

实验研究显示,沙棘提取物对大鼠 RIRI 呈现出明显的改善作用。在临床诊断 AKI 的过程中,血清 Cr 和 BUN 水平是两项关键的检测参数。相较于模型组,接受沙棘提取物处理的大鼠,其血清中 Cr 和 BUN 明显下降,表明沙棘有效改善 RIRI 所致的 AKI。与模型组相比,沙棘提取物组大鼠血清 MDA 明显降低, GSH 明显升高,结果显示沙棘大幅度改善体内氧化应激水平。免疫荧光染色分析进一步显示,沙棘提取物组大鼠肾小管中 p53 蛋白的表达量较模型组显著减少。上述实验结果均提示,沙棘提取物可有效减轻大鼠 AKI 程度,其机制可能与其下调 p53 蛋白表达,进而激活 HIF-1 信号有关,网络药理学预测结果得到初步证实。根据已有文献报道,沙棘总黄酮其主要黄酮成分槲皮素、异鼠李素和山奈酚的曲线下面积 (AUC) 和 Cmax 值与给药剂量成正比^[14]。本实验所采取沙棘提取物剂量 (2.5 g/kg) 与文献中报告能产生类似药效的剂量范围相符^[15]。而在大鼠肾脏病理组织中所呈现的改善趋势、肾小管细胞中 p53 蛋白的

表达与具有高度统计学意义的生化指标结果完全一致。因此,本研究的结果可间接支持网络药理学的预测,为沙棘提取物的治疗 RIRI 提供了初步的体内实验证据。

本研究存在一定局限性。例如,动物样本量相对较小,且未能直接测定动物血清中关键黄酮成分的药代动力学参数,无法完全实现网络预测浓度与体内实际暴露浓度的精准对接。此外,我们虽证实了沙棘对 p53 的抑制作用,并对 p53-HIF-1 轴的调控关系进行了合理推论,但该机制仍需通过基因敲除、特异性抑制剂或激动剂干预等实验在未来予以最终证实。

综上所述,本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术系统鉴定了沙棘的化学成分,结合网络药理学初步阐明了沙棘在改善 RIRI 中的潜在作用机制,并通过动物实验初步证实 p53 可能是 HIF-1 信号通路介导氧化应激过程中的关键靶点。这不仅为沙棘的临床应用提供了科学依据,也为深入开发其作为 RIRI 防治药物或功能性食品指明了方向。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Peng P, Zou J, Zhong B, et al. Protective effects and mechanisms of flavonoids in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Pharmacology*, 2023, 108(1): 27-36.
- [2] Yang W, Li X, He L, et al. Empagliflozin improves renal ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation and enhancing mitochondrial fusion through AMPK-OPA1 pathway promotion[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 42. DOI: 10.1186/s11658-023-00457-6.
- [3] Ostermann M, Bellomo R, Burdmann EA, et al. Controversies in acute kidney injury: conclusions from a kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) conference[J]. *Kidney Int*, 2020, 98(2): 294-309. DOI: 10.1016/j.kint. 2020. 04. 020.
- [4] Liu S, Xiao P, Kuang Y, et al. Flavonoids from sea buckthorn: a review on phytochemistry, pharmacokinetics and role in metabolic diseases[J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(5): e13724. DOI: 10.1111/jfbc. 13724.
- [5] Gong G, Guan YY, Zhang ZL, et al. Isorhamnetin: a review of pharmacological effects[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110301. DOI: 10.1016/j.biopha. 2020. 110301.
- [6] Wang P, Guan D, Zhang XP, et al. Modeling the regulation of p53 activation by HIF-1 upon hypoxia[J]. *FEBS Lett*, 2019, 593(18): 2596-2611. DOI: 10.1002/1873-3468. 13525.
- [7] 杨欢. p53-CypD 在缺血再灌注介导的急性肾损伤中的机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [8] Erpicum P, Rowart P, Defraigne JO, et al. What we need to know about lipid-associated injury in case of renal ischemia-reperfusion[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(6): F1714-F1719. DOI: 10.1152/ajprenal. 00322. 2018.
- [9] Shin JA, Hwang Y, Park H, et al. Renoprotective effects of MIT-001 in ischemia-reperfusion injury: modulation of ferroptosis, ROS and fibrotic markers[J]. *J Cell Mol Med*, 2025, 29(20): e70914. DOI: 10.1111/jcmm. 70914.
- [10] Lu H, Xie D, Qu B, et al. Emodin prevents renal ischemia-reperfusion injury via suppression of p53-mediated cell apoptosis based on network pharmacology[J]. *Heliyon*, 2023, 9(5): e15682. DOI: 10.1016/j.heliyon. 2023. e15682.
- [11] Zhang C, Zheng Z, Xu K, et al. Proximal tubular lats2 ablation exacerbates ischemia/reperfusion injury (IRI)-Induced renal maladaptive repair through the upregulation of p53[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15258. DOI: 10.3390/ijms242015258.
- [12] 温奎申. 沙棘提取物的产品研究与开发及质量评价[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2020.
- [13] 任梦瑶. 槲皮素通过 Nrf2/P53 通路对邻苯二甲酸二(2-乙基)酯诱导肉鸡脾脏炎症的保护作用[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2025.
- [14] Lu Q, Yang H, Feng S, et al. Establishment of a UPLC-MS method for quantitative analysis of tryptophan-kynurenine metabolism in IBS-D model rats[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 251: 116426. DOI: 10.1016/j.jpba. 2024. 116426.
- [15] 雷涛, 许迪, 雷颖, 等. 沙棘总黄酮对早期糖尿病肾病大鼠的治疗与作用机制研究[J]. *中医药信息*, 2025, 42(7): 36-41. DOI: 10.19656/j.cnki. 1002-2406. 20250706.

(收稿日期 2025-06-20)

(本文编辑:石俊强)