

基于筒鞘蛇菰治疗高尿酸血症的网络药理学分析及其对高尿酸细胞模型和高尿酸血症模型小鼠的治疗作用

刘 丽^{1,2}, 黄林生³, 赵永恒¹, 曹文洁^{1,2}, 钱永帅^{1,2}, 余惠凡^{1,2}, 李 飞^{1,2}

(1. 湖北医药学院药学院, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000; 3. 湖北省十堰市太和医院肝胆胰外科, 湖北 十堰 442000)

[摘要] **目的:** 基于网络药理学、分子对接和体内外高尿酸模型实验探讨筒鞘蛇菰治疗高尿酸血症(HUA)的作用, 阐明其活性成分的主要作用靶点和信号通路相关机制。**方法:** 通过台湾中医药资料库、本草组鉴数据库、化学专业数据库、TargetNet数据库、SwissTargetPrediction数据库、GeneCards数据库、药物靶点数据库(TTD)、DrugBank数据库、DisGeNET数据库、人类在线孟德尔遗传(OMIM)数据库和Venny数据库获取筒鞘蛇菰治疗HUA的潜在靶点; 利用STRING数据库和Cytoscape软件构建筒鞘蛇菰活性成分-预测靶点网络和蛋白-蛋白互作(PPI)网络, 并进行拓扑分析筛选筒鞘蛇菰主要活性成分和核心靶点, 采用R软件进行基因本体论(GO)功能和京都基因组与基因百科全书(KEGG)信号通路富集分析, 采用AutoDock Vina软件进行分子对接验证。NRK-52E细胞分为空白对照组、空白给药组、模型组和不同浓度(2.0、10.0及50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)圣草酚(EDT)组, 模型组和不同浓度EDT组细胞采用腺苷诱导制备高尿酸细胞模型, 采用高效液相色谱(HPLC)法检测各组细胞培养上清液中尿酸(UA)水平。雄性ICR小鼠随机分为空白对照组、空白给药组、模型组和EDT组, 后2组小鼠制备HUA模型, 采用试剂盒检测各组小鼠血清中UA、肌酐(Cr)和血尿素氮(BUN)水平; 取小鼠两侧肾组织, 称质量, 计算各组小鼠肾脏指数; TUNEL染色法观察各组小鼠肾组织中细胞凋亡情况; Western blotting法检测各组小鼠肾组织中蛋白激酶B(AKT)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K)、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和基质金属蛋白酶9(MMP-9)蛋白表达水平。**结果:** 筛选得到筒鞘蛇菰6种活性成分, 涉及116个交集靶点, 14个核心靶点。富集分析得到1828个GO条目和145条信号通路。分子对接结果, EDT与MMP-9具有较好的结合活性。高尿酸细胞实验, 与空白对照组比较, 模型组细胞中UA水平明显升高($P<0.01$); 与模型组比较, 2.0、10.0和50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDT组细胞中UA水平明显降低($P<0.01$)。与空白对照组比较, 模型组小鼠血清中UA、Cr和BUN水平及肾脏指数明显升高($P<0.01$); 与模型组比较, EDT组小鼠血清中UA、Cr和BUN水平及肾脏指数明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与空白对照组比较, 模型组小鼠肾组织中可见大量凋亡细胞; 与模型组比较, EDT组小鼠肾组织中凋亡细胞数明显减少。与空白对照组比较, 模型组小鼠肾组织中p-AKT/AKT及p-PI3K/PI3K比值和Bcl-2蛋白表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Bax和MMP-9蛋白表达水平明显升高($P<0.01$); 与模型组比较, EDT组小鼠肾组织中p-AKT/AKT及p-PI3K/PI3K比值和Bcl-2蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Bax和MMP-9蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。**结论:** 筒鞘蛇菰活性成分EDT具有降UA作用, 且可能通过激活PI3K/AKT信号通路抑制细胞凋亡并缓解肾损伤。

[关键词] 网络药理学; 筒鞘蛇菰; 圣草酚; 高尿酸血症; 肾损伤

[中图分类号] R285.5; R589.7 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-02-12

[基金项目] 湖北省卫健委青年人才项目(WJ2021Q010); 湖北省教育厅重点项目(D20192101)

[作者简介] 刘 丽(1997-), 女, 河南省鹿邑县人, 在读硕士研究生, 主要从事肾脏系统药理学方面的研究。

[通信作者] 李 飞, 教授, 硕士研究生导师(E-mail: piaopodexinlifei@163.com)

Network pharmacological analysis on *Balanophora involucrata Hook.f.* in treatment of hyperuricemia and its therapeutic effect on hyperuricemia cell model and hyperuricemia model mouse

LIU Li^{1,2}, HUANG Linsheng³, ZHAO Yongheng¹, CAO Wenjie^{1,2}, QIAN Yongshuai^{1,2},
YU Huifan^{1,2}, LI Fei^{1,2}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Hubei Medical College, Shiyan 442000, China; 2. Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei Medical College, Shiyan 442000, China;
3. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Taihe Hospital, Shiyan City, Hubei Province, Shiyan 442000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the efficacy of *Balanophora involucrata Hook. f.* in treatment of hyperuricemia (HUA) based on network pharmacology, molecular docking, and hyperuricemia models *in vivo* and *in vitro*, and to clarify the main targets of its active components and related signaling pathway mechanism. **Methods:** The potential targets of *Balanophora involucrata Hook. f.* in treatment of HUA were identified by Databases such as the Traditional Chinese Medicine Database in Taiwan, the Chinese Herbal Medicine Identification Database, Professional Chemical Database, TargetNet Database, SwissTargetPrediction Database, GeneCards, Therapeutic Target Database (TTD), DrugBank Database, DisGeNET Database, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) Database, and Venny Database. STRING Database and Cytoscape software were used to construct the active component-predictive target network and protein-protein interaction (PPI) network for *Balanophora involucrata Hook. f.*; topological analysis was used to select the main active components and core targets; Gene Ontology (GO) functional and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were performed by R software; AutoDock Vina software was used for molecular docking validation. The NRK-52E cells were divided into blank control group, blank administration group, model group, and different concentrations (2.0, 10.0, and 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of erythrodiol (EDT) groups. High-performance liquid chromatography culture (HPLC) was used to detect the uric acid (UA) levels in the cell culture supernatants in various groups. The male ICR mice were divided into blank control group, blank administration group, model group, and EDT group; the mice in the last two groups were used to prepare the HUA models; kits were used to detect the levels of UA, creatinine (Cr), and blood urea nitrogen (BUN) in serum of the mice in various groups; the bilateral kidney tissue of the mice was harvested and weighed; the kidney indexes of the mice in various groups were calculated; TUNEL staining was used to observe the apoptosis in kidney tissue of the mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of protein kinase B (AKT), phosphorylated AKT (p-AKT), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) proteins in kidney tissue of the mice in various groups. **Results:** Six active components of *Balanophora involucrata Hook. f.* were identified, involving 116 intersecting targets and 14 core targets. The enrichment analysis yielded 1 828 GO terms and 145 signaling pathways. The molecular docking results showed that EDT had good binding activity with MMP-9. The high uric acid cell experiment results showed that compared with blank control group, the UA level in the cells in model group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with model group, the UA levels in the cells in 2.0, 10.0, and 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDT groups were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with blank control group, the levels of UA, Cr, and BUN in serum of

the mice in model group were increased ($P < 0.01$), and the kidney indexes were significantly increased ($P < 0.01$); compared with model group, the levels of UA, Cr, and BUN in serum of the mice in EDT group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the kidney index was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with blank control group, the number of apoptotic cells in kidney tissue of the mice in model group was increased; compared with model group, the number of the apoptotic cells in kidney tissue of the mice in EDT group was significantly decreased. Compared with blank control group, the ratios of p-AKT/AKT and p-PI3K/PI3K and expression level of Bcl-2 protein in kidney tissue of the mice in model group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expression levels of Bax and MMP-9 proteins were significantly increased ($P < 0.01$); compared with model group, the ratios of p-AKT/AKT and p-PI3K/PI3K and expression level of Bcl-2 protein in kidney tissue of the mice in EDT group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression levels of Bax and MMP-9 proteins were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The active component of *Balanophora involucrata Hook. f.*, EDT, has a UA-decreasing effect and may inhibit the apoptosis and alleviate the kidney injury by activating the PI3K/AKT signaling pathway.

KEYWORDS Network pharmacology; *Balanophora involucrata Hook.f.*; Eriodictyol; Hyperuricemia; Kidney injury

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是由嘌呤代谢紊乱或尿酸 (uric acid, UA) 排泄减少所引起的代谢性疾病^[1]。HUA 是痛风的基础, 其 UA 病理阈值为 $405 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 当血清 UA 水平高于正常阈值时, 尿酸钠晶体沉积于关节, 引起关节损伤和炎症反应, 从而引发痛风^[2-3]。防治痛风和 HUA 的主要措施是降低血 UA 水平。但目前临床一线降 UA 药物不良反应较多, 如采用非布司他和别嘌醇治疗的患者急性肾功能衰竭发生率较高^[4-5], 别嘌醇和苯溴马隆可引起不同程度的急性肝损伤^[6-7]。因此, 发现不良反应少且具有肝肾保护作用的降 UA 药物至关重要。筒鞘蛇菰为蛇菰科蛇菰属草本植物, 分布于湖北、江西、湖南、四川、广西和云南等地, 可全株入药, 具有凉血止血、清热解毒、润肺止咳和益肾养阴的功效^[8-9]。研究^[9-17]显示: 筒鞘蛇菰具有镇痛抗炎、抑菌、醒酒保肝、止血散瘀、抗氧化和抗衰老等作用。此外, 疏花蛇菰乙酸乙酯部位提取物具有较强的黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 抑制活性, 同时可降低氧嗪酸钾诱导的 HUA 小鼠 UA 水平^[18]。目前筒鞘蛇菰降 UA 的机制尚不清楚, 其有效成分的分子机制如特定靶点和通路等还有待进一步研究。本文作者采用网络药理学方法联合体内外实验验证的方法分析筒鞘蛇菰作用于 HUA 的活性成分和潜在作用靶点, 探讨其可能的作用机制, 为深入研究筒鞘蛇菰治疗 HUA 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 筒鞘蛇菰活性成分和靶点筛选 以“筒鞘蛇菰”和“*Balanophora involucrata Hook. f.*”为关键词, 检索台湾中医药数据库 (<http://tcm.cmu.edu.tw/review.php>)、本草组鉴数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 和化学专业数据库 (<http://www.organchem.csdb.cn/scdb/default.asp>), 同时在中国知网、万方数据库、维普数据库和 PubMed 等数据库进行文献检索, 获取筒鞘蛇菰化学成分。利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取筒鞘蛇菰化学成分 2D 分子结构的 sdf 格式, 将其导入 Swiss ADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>), 根据药代动力学参数以肠胃吸收为“High”作为条件, 筛选口服生物利用度较好的活性成分; 同时, 以 Lipinski、Ghose、Veber、Egan 和 Muegge 5 种规则进行类药性预测分析, 选择预测结果中有 2 个及 2 个以上为“Yes”的化合物作为活性化合物。此外, 将不符合筛选条件但结合文献报道显示具有药理活性的成分予以纳入。将活性成分的 sdf 文件导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 设定“Homo sapiens”, 根据结合概率值排序, 选取前 15 个预测靶点。通过 TargetNet 数据库 (<http://targetnet.scbdd.com/>), 以受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 下面积 (area under curve, AUC) ≥ 0.7 和可能性 > 0.9 为遴选

条件进行潜在靶点预测, 利用 Uniprot (<http://www.uniprot.org>) 数据库剔除非人源的潜在靶点。

1.2 HUA 疾病靶点和交集靶点获取 以“hyperuricemia”和“gout”为关键词, 通过 DisGeNET 数据库、药物靶点数据库 (Therapeutic Target Database, TTD)、GeneCards 数据库、DrugBank 数据库和人类在线孟德尔遗传 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 数据库进行检索、汇总和去重后得到与 HUA 相关的靶点。分别将筒鞘蛇菰活性成分靶点及 HUA 疾病靶点输入 Venny 2.1.0 数据库 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>), 得到交集靶点。

1.3 活性成分-预测靶点网络和蛋白-蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建筒鞘蛇菰活性成分-预测靶点网络。将交集靶点输入到 STRING 11.5 数据库中, 限定“Organism”为“Homo sapiens”, 其余参数选择默认值, 获得 PPI 网络, 采用 Cytoscape 3.7.2 软件使结果可视化。

1.4 分子对接 从 PubChem 数据库下载筒鞘蛇菰活性成分的 3D 结构, 从国际蛋白质结构数据库中 (<http://www.rcsb.org/>) 下载核心靶点的 3D 结构, 采用 AutoDock TOOLS 进行去水和加氢并分别将其选为配体和受体, 利用 AutoDock Vina 软件进行对接, 采用 PyMOL 软件进行可视化。

1.5 基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能富集和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析 采用 R 软件对筒鞘蛇菰治疗 HUA 的靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析, 分析筒鞘蛇菰治疗 HUA 交集靶点参与的生物学过程和涉及的信号通路。

1.6 细胞、动物、主要试剂和仪器 大鼠肾小管上皮 NRK-52E 细胞购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。ICR 雄性小鼠 32 只, 体质量 18~22 g, 购自湖北医药学院实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK (鄂) 2019-0008, 经湖北医药学院动物实验伦理审查委员会批准 (2022-实 043), 小鼠自由饮水进食, 分笼饲养, 室温 23 °C~25 °C, 相对湿度 50%~70%, 12 h 明暗交替, 适应性喂养 3 d。DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司, CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所, XO 购自美国

Solarbio 公司, UA、氧嗪酸钾和次黄嘌呤均购自美国 Sigma 公司, UA、肌酐 (creatinine, Cr) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 圣草酚 (eriodictyol, EDT) (含量 $\geq 98\%$) 购自陕西省宝鸡市辰光生物科技有限公司, TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)、磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, p-AKT)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K) 和 B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体购自美国 CST 公司, Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 抗体购自美国 Abcam 公司。高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪购自美国 Thermo 公司, 全波长酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司。

1.7 CCK-8 法检测各组细胞增殖活性 采用含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 NRK-52E 细胞。取对数生长期 NRK-52E 细胞调整密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板, 待细胞生长融合至 80%, 血清饥饿 12 h, 弃去培养液, 给药组每孔加入含 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDT 的培养液, 同时设置空白对照组和溶剂对照组, 每组 6 个复孔。培养 24 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 的完全培养液, 检测各组细胞于波长 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 并计算各组细胞增殖活性。细胞增殖活性 = (实验组 A 值 - 空白对照组 A 值) / (溶剂对照组 A 值 - 空白对照组 A 值)。

1.8 建立腺苷诱导的高尿酸细胞模型 取对数生长期 NRK-52E 细胞接种于 24 孔细胞培养板中培养 24 h, 设置空白对照组、空白给药组、模型组和不同浓度 (2、10 及 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) EDT 组, 血清饥饿 24 h, 同时预给药。空白对照组和模型组细胞更换含 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 腺苷的无血清培养液, 空白给药组和不同浓度 EDT 组细胞更换含 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 腺苷和不同浓度 EDT 的无血清培养液, 24 h 后, 除

空白对照组和空白给药组外,其余各组细胞每孔加 $5\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ XO $1\ \mu\text{L}$, 6 h后收集各组细胞上清液进行检测。

1.9 HPLC法检测各组细胞中UA水平 色谱柱为Agilent-ZORBAX SB-C18柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\ \mu\text{m}$),流动相为95%缓冲盐水溶液($0.52\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-戊烷磺酸钠和 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸一钾, pH 4.0)-5%乙腈,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长254 nm,柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $1\ \mu\text{L}$ 。精密称取对照品UA 1.00 mg,加 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶解并定容至1 mL,制成 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ UA对照品溶液,混匀, $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过。用超纯水稀释至100.000 0、50.000 0、25.000 0、12.500 0、6.250 0、3.125 0和 $1.5625\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 共7个浓度,HPLC法检测,以UA浓度为横坐标,出峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归。收集各组细胞培养上清液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ g}$ 离心15 min后取上清待测。

1.10 制备HUA小鼠模型和药物干预 SPF级ICR雄性小鼠随机分为空白对照组、空白给药组、模型组和EDT($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组8只。模型组和EDT组小鼠采用次黄嘌呤($300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)联合氧嗪酸钾($300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)连续腹腔注射7 d制备HUA小鼠模型^[19]。空白对照组小鼠灌胃给予生理盐水,空白给药组和EDT组小鼠灌胃给予 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ EDT,连续14 d,包括7 d预给药。末次灌胃给药2 h后,摘各组小鼠眼球取血。上述各组小鼠灌胃和腹腔注射给药剂量均为 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.11 试剂盒法检测各组小鼠血清中UA、Cr和BUN水平及计算肾脏指数 取各组小鼠血清,按照试剂盒说明书中的方法检测血清中UA、Cr和BUN水平。取小鼠两侧肾组织,称质量,计算各组小鼠肾脏指数:肾脏指数=小鼠肾脏质量(g)/小鼠体质量(g) $\times 100\%$ 。

1.12 TUNEL法观察小鼠肾组织中细胞凋亡情况 将4%多聚甲醛固定的小鼠肾组织进行脱水、浸蜡和包埋,切片(厚度 $5\ \mu\text{m}$),参照凋亡试剂盒说明书进行TUNEL染色处理,观察各组小鼠肾组织中细胞凋亡情况。

1.13 Western blotting法检测各组小鼠肾组织中AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K、Bcl-2、Bax和MMP-9蛋白表达水平 各组小鼠肾组织匀浆后取上清,采用BCA法测定总蛋白浓度。取 $20\sim 30\ \mu\text{g}$ 组织蛋白样本经凝胶、电泳、转膜和封闭,加一抗AKT

(1:500)、p-AKT(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:500)、Bcl-2(1:2 000)、Bax(1:1 000)和MMP-9(1:1 000),洗膜,加二抗,均以1:5 000稀释,洗膜,ECL显色。GAPDH一抗以1:8 000稀释,二抗以1:10 000稀释。采用ImageQuant LAS 4000凝胶成像仪分析蛋白条带灰度值,计算目的蛋白表达水平和p-AKT/AKT及p-PI3K/PI3K比值。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值,p-AKT/AKT比值=p-AKT蛋白表达水平/AKT蛋白表达水平,p-PI3K/PI3K比值=p-PI3K蛋白表达水平/PI3K蛋白表达水平。

1.14 统计学分析 采用SPSS 23.0统计软件进行统计学分析。各组细胞增殖活性,各组细胞中UA水平,各组小鼠血清中UA、Cr和BUN水平及肾脏指数,各组小鼠肾组织中AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K、Bcl-2、Bax和MMP-9蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筒鞘蛇菰活性成分和靶点筛选 通过数据库和文献数据检索,得到筒鞘蛇菰相关成分85个,利用SwissADME数据库筛选,得到26个活性成分,其中calycosin-7-O- β -D-glucoside、 β -sitosterol、(E)-1-Caffeoyl- β -D-glucopyranoside和(E)-1-O-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside不符合筛选标准,但文献数据结果显示其具有较好的生物活性,因此将其纳入分析,最终获得30个筒鞘蛇菰活性成分。见表1。通过SwissTargetPrediction和TargetNet数据库对活性成分靶点进行检索筛选,利用Uniprot数据库对靶点名称进行规范并剔除非人源的潜在靶点,删除重复靶点后,共得到323个靶点。

2.2 HUA疾病靶点和交集靶点获取 以“hyperuricemia”和“gout”为关键词,采用DisGeNET、TTD、GeneCards、Drugbank和OMIM数据库进行检索,将收集的靶点输入Uniprot数据库进行靶点名称规范,删除重复值,整理得到疾病靶点2 247个,与323个活性成分靶点取交集后,共获得116个交集靶点,即为筒鞘蛇菰治疗HUA的潜在作用靶点。见图1。

表 1 筒鞘蛇菰治疗 HUA 的活性成分

Tab. 1 Active components of *Balanophora involucreta* Hook. f in treatment of hyperuricemia

No.	Component	PubChem CID
SG1	Coniferin	5319518
SG2	Methylconiferin	5319561
SG3	Eriodictyol	440735
SG4	Methyl brevifolincarboxylate	5319518
SG5	Ethyl brevifolincarboxylate	5487248
SG6	Gallic acid	348787247
SG7	Scaphopetalone	637239
SG8	(+)-pinoselinol	73399
SG9	(+)-Isolariciresinol	160521
SG10	Burselignan	11631864
SG11	(-)-Secoisolariciresinol	6336781
SG12	Dihydrocubebin	193042
SG13	2,3-Dihydroflavone	10251
SG14	3-(3-Methoxy-4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenyl)acrylaldehyde	-
SG15	Naringenin	932
SG16	Homoeriodictyol	73635
SG17	Hesperetin	72281
SG18	Sakuranetin	73571
SG19	Penicillic acid	1268111
SG20	Dihydroartemisininic acid	11020893
SG21	2-Methylfuran-3-ylmethanol	2777165
SG22	5-Hydroxymaltol	70627
SG23	5,7-Dihydroxychromone	5281343
SG24	5,7,3',5'-Tetrahydroxydihydroflavonoid	-
SG25	(+)-9-Acetoxyisolariciresinol	-
SG26	Yunnanensin A	-
SG27	Calycosin-7-O-β-D-glucoside	5318267
SG28	β-sitosterol	222284
SG29	(E)-1-Caffeoyl-β-D-glucopyranoside	-
SG30	(E)-1-O-p-coumaroyl-β-D-glucopyranoside	-

“-”:No data.

2.3 活性成分-预测靶点网络构建 构建筒鞘蛇菰活性成分-预测靶点网络 (图 2), 其中黄色 V 形代表筒鞘蛇菰, 红色菱形代表筒鞘蛇菰活性成分, 浅绿色圆形代表筒鞘蛇菰治疗 HUA 靶点。采用 Cytoscape 3.7.2 软件中 Network Analyzer 工具进行网络拓扑分析, 度值排名前 6 位的化合物分别为没食子酸、5-羟麦芽酚、(+)-松脂素、5,7-二羟基色原酮、青霉素和 EDT, 推测该 6 种活性成分可能

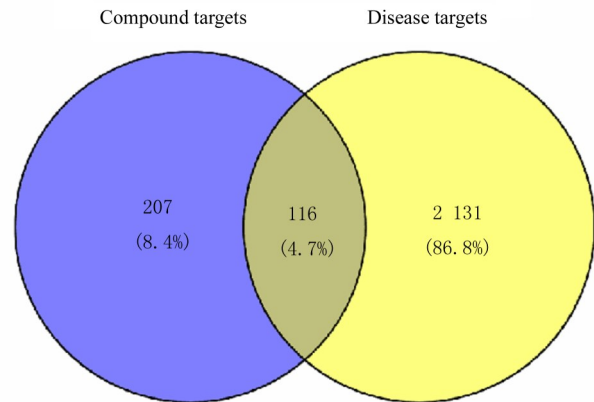


图 1 疾病靶点与活性成分靶点交集的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of intersection of disease targets and active ingredient targets

是筒鞘蛇菰治疗 HUA 的主要活性成分。

2.4 PPI 网络构建 将 116 个交集靶点导入 STRING 11.5 数据库并利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络图, 共有 107 个靶蛋白节点, 434 条边。见图 3。经拓扑分析, 大于平均连接度值 2 倍的靶点有 14 个, 丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1)、磷酸肌醇 3-激酶调节亚基 1 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1)、SRC 原癌基因、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、雄激素受体 (androgen receptor, AR)、GAPDH、转录因子 p65 (transcription factor p65, RELA)、MMP-9、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin kinase, mTOR) 和白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2), 表明上述靶点可能是筒鞘蛇菰治疗 HUA 的核心靶点。

2.5 分子对接结果 将筒鞘蛇菰中 6 种主要活性成分与 14 个核心靶点进行分子对接, 结合能绝对值越大表示活性成分与靶点活性中心的结合活性越强。在对接结果中, 大多数络合物具有较高的结合能 (表 2), 表明筒鞘蛇菰主要活性成分与核心靶点之间的结合活性较强, 网络药理学方法预测结果较为准确。EDT 与 MMP-9 结合能为 $-10.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,

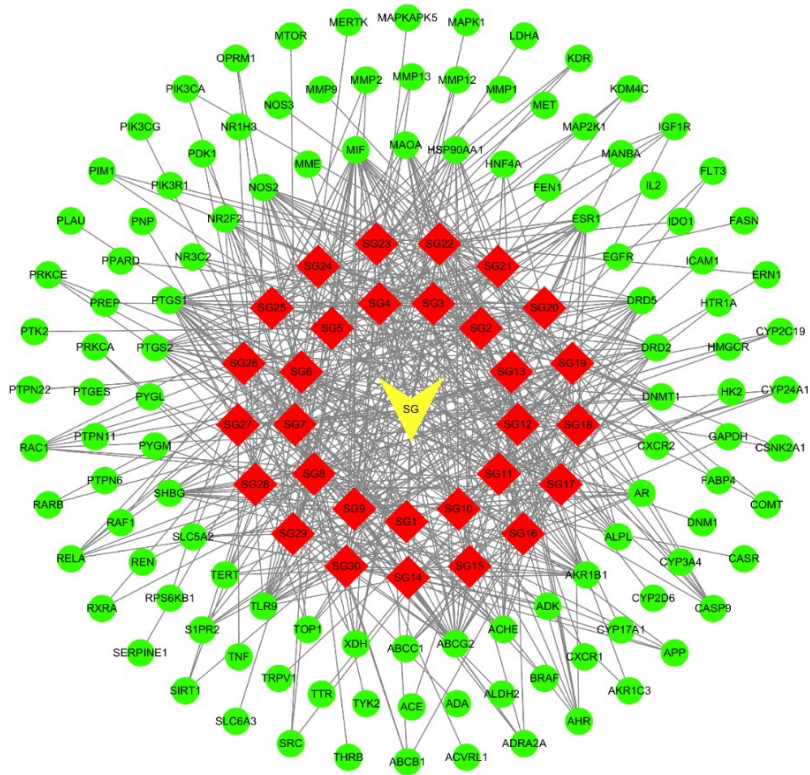


图2 活性成分-预测靶点网络图

Fig. 2 Network diagram of active components-predictive targets

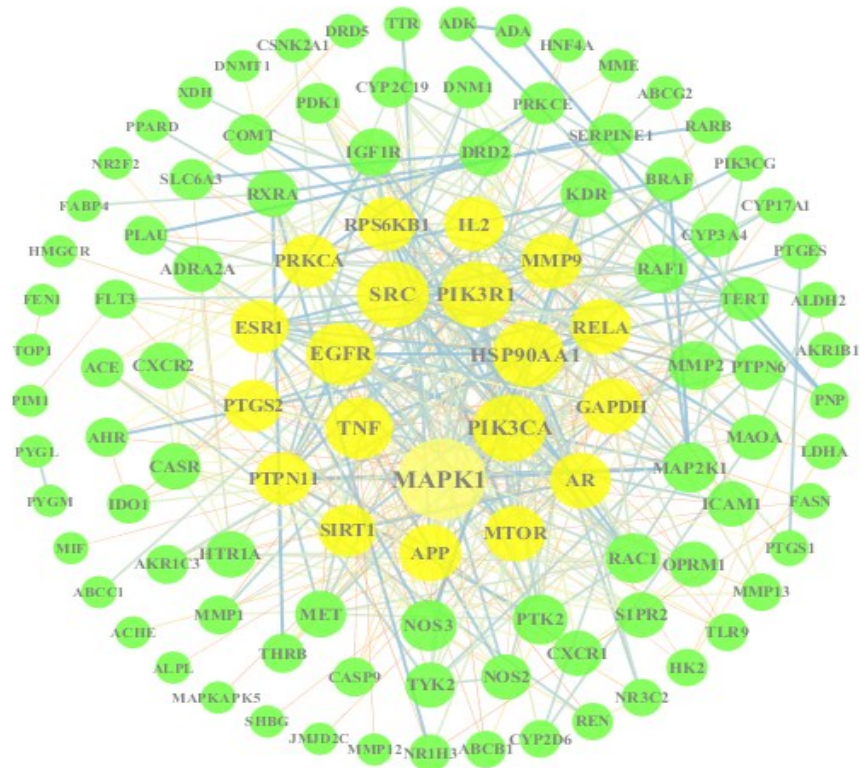


图3 潜在作用靶点的PPI网络图

Fig. 3 PPI network diagram of potential action targets

表2 分子对接结果
Tab. 2 Molecular docking results

Target	PDB ID	Affinity(kcal·mol ⁻¹)					
		Gallic acid	5-hydroxy maltol	(+)-pinoresinol	5,7-dihydroxy chromone	Penicillic acid	Eriodictyol
MAPK1	6SLG	-5.8	-4.9	-7.3	-5.9	-5.2	-7.3
PIK3CA	5DXT	-6.2	-5.8	-8.3	-6.5	-5.2	-9.2
HSP90AA1	4BQG	-5.9	-5.1	-8.1	-7.0	-5.5	-9.8
PIK3R1	5GJI	-6.7	-6.3	-7.3	-7.0	-6.1	-7.9
SRC	2BDF	-6.1	-5.3	-8.0	-6.6	-5.1	-8.5
EGFR	3W2S	-6.2	-5.4	-8.3	-6.4	-5.0	-9.1
TNF	2ZA5	-6.6	-6.2	-6.9	-6.5	-4.3	-7.0
APP	3KTM	-6.1	-5.3	-7.4	-6.5	-5.0	-8.4
AR	1E3G	-6.4	-5.8	-8.4	-7.7	-5.5	-9.2
GAPDH	1U8F	-6.7	-5.8	-8.9	-6.7	-5.2	-9.4
RELA	1NFI	-5.7	-5.5	-7.6	-6.1	-4.8	-8.8
MMP-9	6ESM	-7.1	-6.3	-8.2	-7.8	-5.8	-10.8
MTOR	5WBH	-5.6	-5.3	-7.2	-6.4	-5.1	-8.4
IL-2	1M48	-5.4	-5.1	-8.2	-6.3	-5.0	-7.4

与GLN-227、ALA-189和MET-247残基的结合活性最强(图4),因此选择EDT进行下一步实验验证。

2.6 GO功能和KEGG信号通路富集分析 利用R Studio软件进行GO功能富集分析,选择排名前15位的通路进行可视化(图5)。其中,生物过程(biological process, BP)共富集到1 677条,主要涉及细菌起源分子反应和AKT信号传导等;分子功能(molecular function, MF)共富集到119条,主要涉及核受体活性和配体激活的转录因子活性等;细胞组分(cellular component, CC)共富集到32条,主要涉及膜筏和膜微区等。KEGG信号通路富集分析共得到145条信号通路,其中排名前30位的信号通路涉及缺氧诱导因子1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和PI3K/AKT等多个通路。见图6。

2.7 各组细胞增殖活性 NRK-52E细胞经不同浓度EDT处理后,与空白对照组比较,0.1~50.0 μmol·L⁻¹ EDT组细胞增殖活性差异无统计学意义($P>0.05$),100.0 μmol·L⁻¹ EDT组细胞增殖活性明显降低($P<0.01$),因此设置2.0、10.0和50.0 μmol L⁻¹ 3个EDT浓度进行后续实验。见表3。

2.8 各组细胞中UA水平 UA标准曲线回归方程

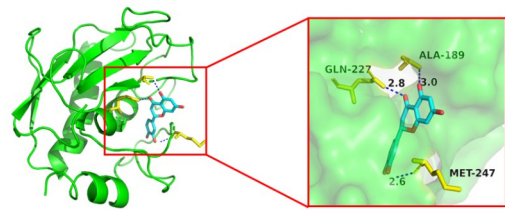


图4 EDT与MMP-9对接模式图

Fig. 4 Docking pattern diagram of EDT and MMP-9

为 $y=30.520 0x+0.000 1$ ($R^2=0.999 2$),表明UA在0.001 562 5~0.100 000 0 g·L⁻¹范围内线性关系良好。与空白对照组比较,模型组细胞中UA水平明显升高($P<0.01$);与模型组比较,2.0、10.0和50.00 μmol·L⁻¹ EDT组细胞中UA水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表4。

2.9 各组小鼠血清中UA、Cr和BUN水平及肾脏指数 与空白对照组比较,模型组小鼠血清中UA、Cr和BUN水平及肾脏指数明显升高($P<0.01$);与模型组比较,EDT组小鼠血清中UA、Cr和BUN水平及肾脏指数明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表5。

2.10 各组小鼠肾组织中细胞凋亡情况 与空白对照组比较,模型组小鼠肾组织中可见大量凋亡细胞;与模型组比较,EDT组小鼠肾组织中凋亡细胞数明显减少。见图7。

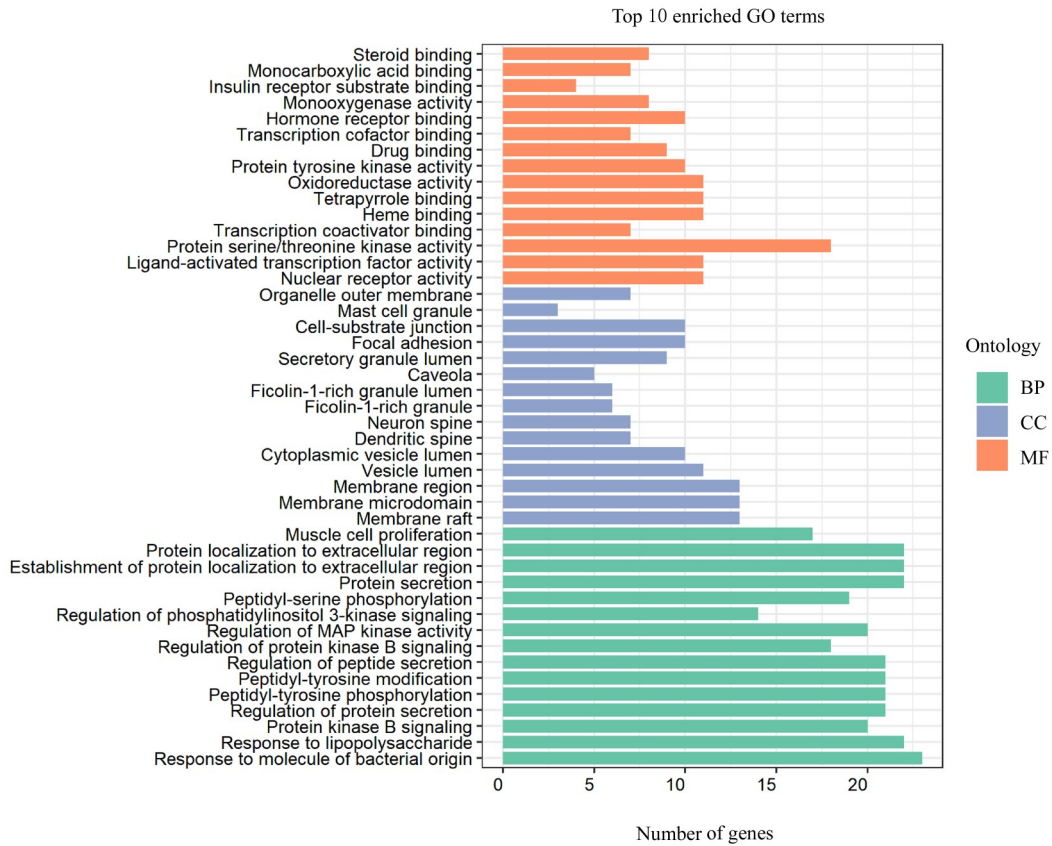


图5 潜在作用靶点GO功能富集分析

Fig. 5 GO functional enrichment analysis on potential action targets

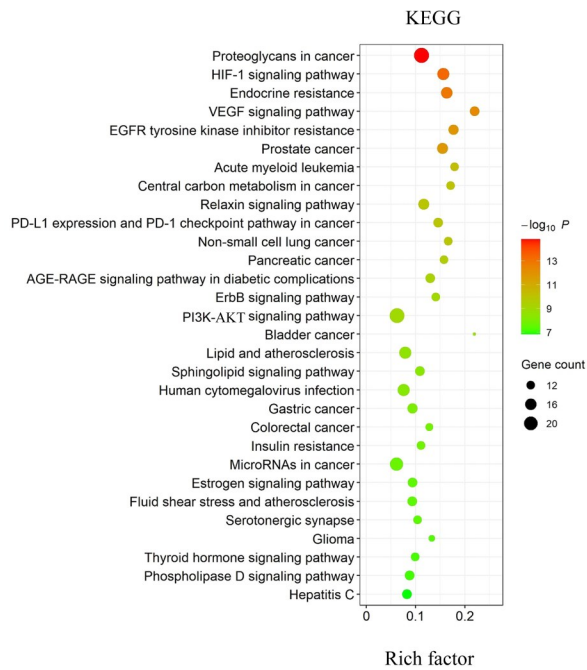


图6 潜在作用靶点KEGG信号通路富集分析

Fig. 6 KEGG signaling pathway enrichment analysis on potential action targets

表3 各组细胞增殖活性

Tab. 3 Proliferation activities of cells in various groups

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Proliferation activity of cells
Blank control	1.000 ± 0.041
EDT ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
0.1	1.194 ± 0.021
0.5	1.175 ± 0.028
1.0	1.157 ± 0.028
2.0	1.141 ± 0.037
5.0	1.130 ± 0.035
10.0	1.070 ± 0.023
20.0	1.018 ± 0.030
50.0	0.898 ± 0.020
100.0	0.776 ± 0.024*

* $P < 0.01$ vs blank control group.

2.11 各组小鼠肾组织中 p-AKT/AKT 及 p-PI3K/PI3K 比值和 Bcl-2、Bax 及 MMP-9 蛋白表达水平与空白对照组比较, 模型组小鼠肾组织中 p-AKT/AKT 及 p-PI3K/PI3K 比值和 Bcl-2 蛋白表达水平明

表4 各组细胞中UA水平

Tab. 4 Levels of UA in cells in various groups
[$n=6, \bar{x} \pm s, \rho_B / (g \cdot L^{-1})$]

Group	UA
Blank control	0.000±0.000
Blank administration	0.000±0.000
Model	0.033±0.001*
EDT ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
2.0	0.024±0.001 [△]
10.0	0.011±0.001 ^{△△}
50.0	0.005±0.000 ^{△△}

* $P < 0.01$ vs blank control group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs model group.

显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bax 和 MMP-9 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, EDT 组小鼠肾组织中 p-AKT/AKT 及 p-PI3K/PI3K 比值和 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bax 和 MMP-9 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$). 见图8。

3 讨论

目前HUA是一个全球性的公共卫生问题,是痛风、高血压、慢性肾病和肥胖等多种疾病的独立危险因素,已成为继高血压、高血糖和高血脂之后的“第四高”^[20]。2021年数据^[21]显示:我国HUA患病率为16.4%,并且呈现年轻化趋势。降低血清UA是防治HUA的首要策略。研究^[18]显示:蛇菰可降低HUA患者的UA水平。但由于蛇菰成分较多,其降UA的活性物质及作用机制尚不明确。

本研究利用网络药理学方法,通过构建活性成分-预测靶点网络和PPI网络,多方面和多层次深入研究简鞘蛇菰治疗HUA的主要活性成分和潜在靶点及其作用机制,进一步通过分子对接、高尿酸细胞模型和HUA小鼠模型实验进行验证,通过构

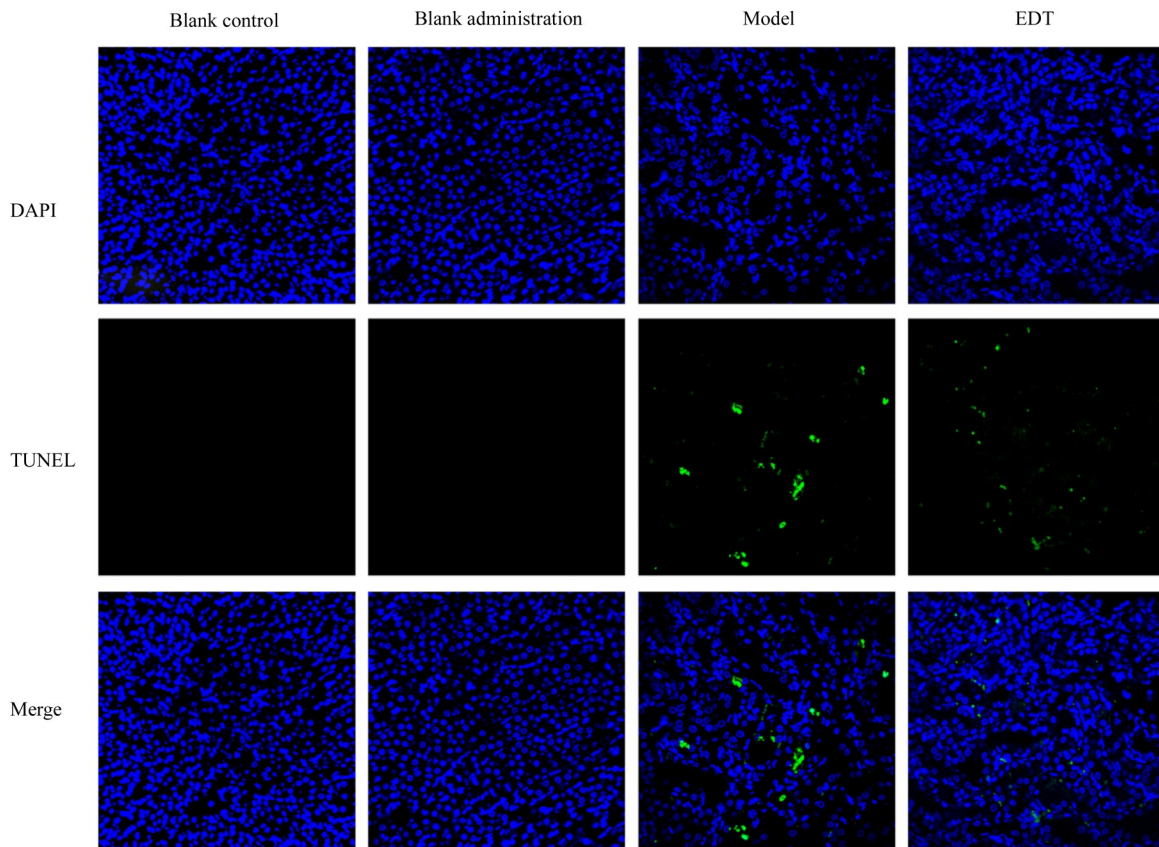
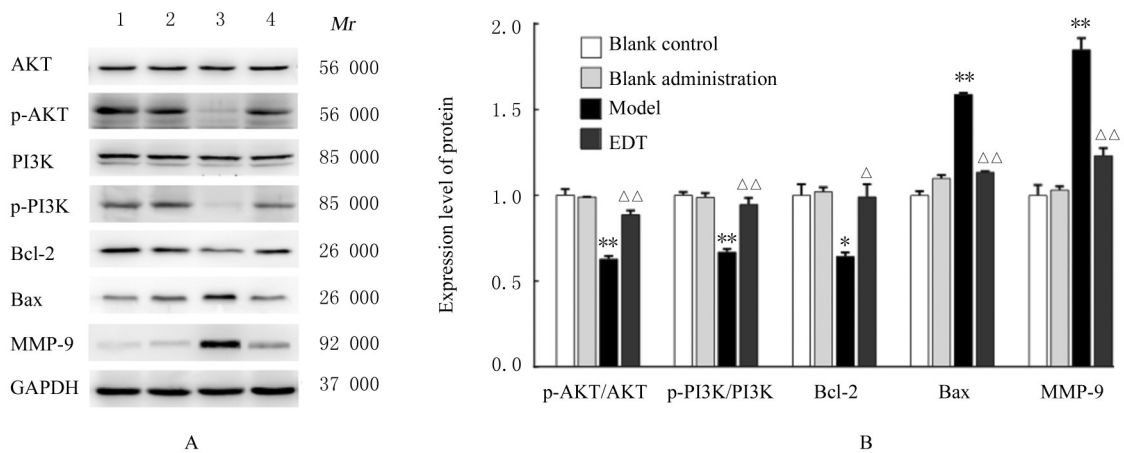
建活性成分-预测靶点网络筛选出没食子酸、5-羟麦芽酚、(+)-松脂素、5,7-二羟基色原酮、青霉酸和EDT等6种活性成分,可能是简鞘蛇菰治疗HUA的主要活性成分;通过PPI网络获取核心靶点14个,分别为MAPK1、PIK3CA、HSP90AA1、PIK3R1、SRC、EGFR、TNF、APP、AR、GAPDH、RELA、MMP-9、MTOR和IL-2;分子对接结果显示:主要活性成分与关键靶点具有较好的结合作用,其中主要活性成分EDT与MMP-9的对接结果最优。本研究结果提示:EDT可能为简鞘蛇菰的主要活性成分。基于以上原因,本研究选择分子对接中与靶点结合活性最强的EDT用于后续的体内外实验验证,并对其作用机制进行研究。UA是嘌呤代谢的终产物,腺苷被腺苷脱氨酶转化为肌苷,肌苷经嘌呤核苷酸磷酸化酶转化成次黄嘌呤,次黄嘌呤被XO转化为黄嘌呤,进一步被XO转化为UA^[22-23]。本研究首先通过腺苷诱导NRK-52E细胞建立高尿酸细胞模型,采用HPLC法检测细胞培养上清液中UA水平,结果显示:EDT可明显降低细胞中UA水平;同时,采用氧嗪酸钾联合次黄嘌呤建立HUA小鼠模型,通过抑制小鼠体内尿酸酶来减少UA分解,补充外源性UA前体物质,从而增加其UA生成,模拟HUA的效果^[19, 24]。本研究结果显示:模型组小鼠血清中UA水平明显升高,表明HUA小鼠造模成功;EDT组小鼠血清中UA水平明显降低,表明EDT有降UA的作用。血清Cr和BUN水平是评价肾功能的重要指标。本研究结果显示:EDT可降低HUA小鼠血清中Cr和BUN水平及肾脏指数,提示EDT可改善小鼠肾损伤。为阐明简鞘蛇菰如何通过核心靶点产生作用,本研究进一步进行了靶点功能富集分析,KEGG信号通路富集分析结果显示:简鞘蛇菰的作用可能与HIF-1、VEGF、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药、急性髓系白血病、

表5 各组小鼠血清中UA、Cr和BUN水平及肾脏指数

Tab. 5 Levels of serum UA, Cr, BUN and kidney indexes of mice in various groups ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	UA	Cr	BUN	Kidney index
	[$c_B / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$]	[$c_B / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$]	[$c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$]	
Blank control	37.32±1.71	34.38±1.06	7.46±0.67	1.58±0.05
Blank administration	39.75±1.01	32.05±1.33	8.37±0.43	1.60±0.04
Model	831.57±20.82*	110.14±0.64*	27.99±0.93*	2.70±0.04*
EDT	384.31±22.93 ^{△△}	64.99±4.74 ^{△△}	23.32±0.56 ^{△△}	2.42±0.08 [△]

* $P < 0.01$ vs blank control group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs model group.

图7 各组小鼠肾组织 TUNEL 免疫荧光染色结果($\times 400$)Fig. 7 TUNEL immunofluorescence staining results of kidney tissue of mice in various groups ($\times 400$)

Lane 1: Blank control group; Lane 2: Blank administration group; Lane 3: Model group; Lane 4: EDT group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group.

图8 各组小鼠肾组织中 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K、Bcl-2、Bax 和 MMP-9 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 8 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of AKT, p-AKT, PI3K, p-PI3K, Bcl-2, Bax, and MMP-9 proteins in kidney tissue of mice in various groups

松弛素和糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物 (advanced glycosylation end product, AGE) -AGE 受体 (receptor of AGE, RAGE) 及 PI3K/AKT 等

信号通路有关。PI3K/AKT 信号通路是保护肾脏细胞和抑制细胞凋亡的重要信号通路^[24-25], 富集靶点较多, 提示其可能是筒鞘蛇菰治疗 HUA 较为主

要的通路。PI3K/AKT 信号通路参与细胞增殖、分化和凋亡等过程^[26-27], 与多种肾脏疾病的发生发展均有密切关联^[28-31]。PI3K 被激活后可促进 AKT 的活化, 活化后的 AKT 磷酸化激活或者抑制其下游靶蛋白, 可通过 PI3K/AKT 信号通路直接调节凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达进而抑制细胞凋亡^[32-34]。本研究结果表明: EDT 可抑制 HUA 小鼠肾组织中细胞凋亡, 激活 PI3K/AKT 信号通路, 提高 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平, 上调 Bcl-2 并下调 Bax 表达, 以达到对肾组织的抗凋亡保护作用, 缓解肾组织损伤。

MMP-9 是基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 家族成员之一, 可通过降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 参与尿酸性肾病肾间质纤维化和肾小管损伤的过程, 当尿酸性肾病导致的肾损害加重时, MMP-9 蛋白表达水平升高, 可促进 ECM 的降解^[35-36]。本研究结果显示: EDT 可下调 HUA 小鼠肾组织中 MMP-9 蛋白表达水平, 表明其可能通过抑制 MMP-9 的表达改善小鼠肾损伤。

综上所述, 本研究采用网络药理学方法和分子对接技术对筒鞘蛇菰治疗 HUA 的机制进行预测, 阐述多种成分、多个靶点和多种通路间复杂的相互作用关系, 通过分子对接技术初步验证其作用靶点, 同时通过高尿酸细胞实验和 HUA 小鼠实验验证了筒鞘蛇菰活性成分 EDT 的降 UA 活性, EDT 可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路抑制细胞凋亡, 缓解肾损伤。本研究结果为进一步研究筒鞘蛇菰的降 UA 活性成分和作用机制提供了理论依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

刘丽参与实验设计和实施、数据采集和分析、统计学分析及论文撰写, 黄林生参与实验技术操作, 赵永恒参与实验技术指导和数据分析, 曹文洁和钱永帅参与实验设计和数据分析, 余惠凡参与实验技术指导, 李飞参与实验技术指导、实验设计、数据分析和对文章的知识性内容进行审阅并提供研究经费。

[参考文献]

[1] YOKOSE C, MCCORMICK N, CHOI H K. The role of diet in hyperuricemia and gout [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2021, 33(2): 135-144.
[2] DALBETH N, MERRIMAN T R, STAMP L K.

Gout[J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2039-2052.

- [3] ROBINSON P C. Gout-An update of aetiology, genetics, co-morbidities and management[J]. *Maturitas*, 2018, 118: 67-73.
[4] REY A, BATTEUX B, LAVILLE S M, et al. Acute kidney injury associated with febuxostat and allopurinol: a post-marketing study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 229.
[5] 郭钦惠, 方 宏, 陈俊文, 等. 非布司他药物相关不良反应文献分析[J]. *中国医学创新*, 2020, 17(22): 104-107.
[6] 袁 华, 李静华, 封宇飞. 114 例别嘌醇不良反应文献分析[J]. *中国药物应用与监测*, 2016, 13(6): 359-362.
[7] 傅恒涛, 张 苗, 慈小燕, 等. 治疗痛风和高尿酸血症药物的研究进展[J]. *药物评价研究*, 2021, 44(8): 1811-1816.
[8] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志·第三十九卷[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 250-268.
[9] 阮汉利, 张勇慧, 皮慧芳, 等. 蛇菰的化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(1): 74-75.
[10] 阮汉利, 李 娟, 赵晓亚, 等. 筒鞘蛇菰镇痛有效部位的筛选[J]. *医药导报*, 2006, 25(5): 383-384.
[11] SUN X, ZHANG L, CAO Y, et al. Anti-neuraminidase activity of chemical constituents of *Balanophora involucreata* [J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(12): e4949.
[12] 周卫华, 石慧娟, 杨梅松竹, 等. 蛇菰水提物对大鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(20): 4438-4440.
[13] 汤子春, 邹 坤, 汪鋆植, 等. 开口箭与筒鞘蛇菰提取物醒酒作用机制的研究[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(12): 2958-2960.
[14] 黄徐英, 宋红萍, 柳 鑫, 等. 筒鞘蛇菰乙酸乙酯萃取物的止血作用[J]. *医药导报*, 2019, 38(9): 1160-1162.
[15] 王 慧, 张红歧, 郭昊洋, 等. 筒鞘蛇菰提取物及松柏苷的抗氧化作用研究[J]. *三峡大学学报(自然科学版)*, 2009, 31(3): 99-101.
[16] 何 玲, 高 辉, 李春艳. 筒鞘蛇菰多糖抗疲劳作用研究[J]. *怀化学院学报*, 2011, 30(S1): 43-45.
[17] 侯文彬, 周丽丽, 周卫华. 蛇菰水提物对自然衰老小鼠的抗衰老作用研究[J]. *中国民族民间医药*, 2012, 21(3): 33.
[18] HO S T, TUNG Y T, HUANG C C, et al. The hypouricemic effect of *Balanophora laxiflora* extracts and derived phytochemicals in hyperuricemic mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 910152.
[19] WANG Y M, KONG W, WANG L, et al. Multiple-purpose connectivity map analysis reveals the benefits of

- esculetin to hyperuricemia and renal fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7695.
- [20] YANAI H, ADACHI H, HAKOSHIMA M, et al. Molecular biological and clinical understanding of the pathophysiology and treatments of hyperuricemia and its association with metabolic syndrome, cardiovascular diseases and chronic kidney disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9221.
- [21] LI Y, SHEN Z Y, ZHU B W, et al. Demographic, regional and temporal trends of hyperuricemia epidemics in mainland China from 2000 to 2019: a systematic review and meta-analysis [J]. *Glob Health Action*, 2021, 14(1): 1874652.
- [22] HOU C L, LIU D, WANG M, et al. Novel xanthine oxidase-based cell model using HK-2 cell for screening antihyperuricemic functional compounds [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 136: 135-145.
- [23] 黄佳豪, 李先平, 赵军英, 等. 益生菌缓解高尿酸血症作用机制研究进展 [J/OL]. *食品科学*. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230308.1134.026.html>.
- [24] 吴 芑, 王 亮, 李海涛, 等. 高尿酸血症模型的建立及降尿酸药物的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(7): 1283-1294.
- [25] HUBER T B, HARTLEBEN B, KIM J, et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(14): 4917-4928.
- [26] CHEN K Q, LI Y Q, ZHANG X H, et al. The role of the PI3K/AKT signalling pathway in the corneal epithelium: recent updates [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 513.
- [27] CHEN H J, ZHANG Y, ZOU M M, et al. Bisphenol A aggravates renal apoptosis and necroptosis in selenium-deficient chickens via oxidative stress and PI3K/AKT pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(8): 3292-3304.
- [28] YUAN Q, TANG B, ZHANG C. Signaling pathways of chronic kidney diseases, implications for therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 182.
- [29] EL-MAADAWY W H, HASSAN M, HAFIZ E, et al. Co-treatment with Esculin and erythropoietin protects against renal ischemia-reperfusion injury via P2X7 receptor inhibition and PI3K/Akt activation [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 6239.
- [30] HU T T, CHEN F, CHEN D, et al. DNMT3a negatively regulates PTEN to activate the PI3K/AKT pathway to aggravate renal fibrosis [J]. *Cell Signal*, 2022, 96: 110352.
- [31] XIAO Q. Cinnamaldehyde attenuates kidney senescence and injury through PI3K/Akt pathway-mediated autophagy via downregulating miR-155 [J]. *Ren Fail*, 2022, 44(1): 601-614.
- [32] 宋璐霞. 温肾益髓生血方对肾性贫血大鼠肾脏的保护作用及对肾组织 PI3K/AKT 信号通路影响的实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [33] LI Y Y, TIAN Z H, SU S S, et al. Anti-apoptotic effect of HeidihuangWan in renal tubular epithelial cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302(Pt A): 115882.
- [34] 翟志恒, 田 杨, 周玉妮, 等. lncRNA NEAT1 激活 PI3K/Akt 信号通路对 A β 25-35 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响及机制 [J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(12): 1188-1195.
- [35] 陈彦名. 加味活血四妙汤干预慢性尿酸性肾病进展的临床及动物实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [36] WOZNIAK J, FLOEGE J, OSTENDORF T, et al. Key metalloproteinase-mediated pathways in the kidney [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(8): 513-527.