

基于药桑叶抗急性肾损伤潜在活性成分及作用机制的 UPLC-Q-TOF/MS 和网络药理学分析及其实实验验证

梁怀敏¹, 全家成¹, 陈文华¹, 李俞瑶¹, 王航宇¹, 张 珂¹, 王金辉^{1,2}

(1. 石河子大学药学院药理学系 新疆植物药资源与利用教育部重点实验室 红花产业研究院, 新疆 石河子 832003; 2. 哈尔滨医科大学药学院药物化学系, 黑龙江 哈尔滨 150081)

[摘 要] **目的:** 通过超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 联用技术和网络药理学及动物实验验证, 探讨新疆特色植物药桑叶抗急性肾损伤 (AKI) 的活性成分并阐明作用机制。**方法:** 采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对药桑叶 70% 乙醇渗漉提取物及灌胃给药后 0 和 60 min 大鼠血清进行化学成分分析; 将药桑叶入血活性成分经 PubMed 平台查得 SMILES 号后, 于 SIB 数据库获取其靶点基因, 同时以 “acute kidney injury” 为关键词在人类基因数据库 (GeneCards)、疾病基因网络数据库 (DisGENET) 和在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM) 等数据库检索 AKI 相关靶点, 对比二者并取交集, 从而发现药桑叶治疗 AKI 的基因靶点。将 70 只 SD 大鼠随机分为空白组 (10 只) 和造模组 (60 只), 造模组大鼠腹腔注射庆大霉素造模 7 d, 空白组大鼠腹腔注射等量生理盐水, 造模结束后测量大鼠血清肌酐 (CRE) 和尿素氮 (BUN) 指标, 判断模型是否制备成功。将造模成功的 60 只大鼠随机分为模型组、低剂量药桑叶组 (120 mg·kg⁻¹ 药桑叶)、中剂量药桑叶组 (300 mg·kg⁻¹ 药桑叶)、高剂量药桑叶组 (750 mg·kg⁻¹ 药桑叶)、药桑叶富集物组 (750 mg·kg⁻¹ 药桑叶) 和阳性药物组 (15 mg·kg⁻¹ 维拉帕米), 每组 10 只, 给药治疗 14 d, 收集各组大鼠 24 h 尿液, 收集大鼠血液以及肾组织用于后期检测。采用苏木精-伊红 (HE) 染色检测各组大鼠肾组织病理形态表现, 比色法检测各组大鼠尿液中尿蛋白 (UP)、尿酸 (UA)、 β 2-微球蛋白 (β 2-MG)、白蛋白 (ALB)、10 kDa 干扰素 γ 诱导蛋白 (IP-10)、肾损伤因子 1 (KIM-1) 和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 的水平, 微板法检测各组大鼠血清中肌酐 (CRE) 水平, 脲酶法检测各组大鼠血清中尿素氮 (BUN) 水平, ELISA 法检测各组大鼠血清中白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的水平以及肾组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、一氧化氮合成酶 (NOS)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性及丙二醛 (MDA) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 水平; Western blotting 法检测各组大鼠肾组织中细胞凋亡和磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (AKT) 信号通路相关蛋白表达水平。**结果:** 采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术共鉴定出 159 种化学成分, 入血成分分析筛选出 27 种, 其中 8 种原型成分和 19 种代谢成分, 主要为黄酮类、苯并呋喃类和有机酸类。网络药理学结果显示, AKT、B 细胞淋巴瘤 2 (*Bcl-2*) 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 3 (*Caspase-3*) 等为药桑叶治疗 AKI 关键作用靶点, 其作用机制主要涉及 PI3K/AKT 信号通路等多通路联动整合调控。与模型组比较, 低、中和高剂量药桑叶组大鼠尿液中 UP 和 NGAL 水平明显降低 ($P < 0.01$), 中和高剂量药桑叶组大鼠尿液中 KIM-1 和 IP-10 水平明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 低、中和高剂量药桑叶组大鼠血清中 BUN 和 TNF- α 水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 中和高剂量药桑叶组大鼠肾组织中 GSH 水平和 GSH-Px 活性

[收稿日期] 2025-03-03 [录用日期] 2025-04-06

[基金项目] 科技部国家重大专项新药创制项目 (2018ZX09735-005)

[作者简介] 梁怀敏 (1999—), 男, 新疆维吾尔自治区克拉玛依市人, 在读硕士研究生, 主要从事天然产物提取分离与活性方面的研究。

[通信作者] 张 珂, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: tcm_zk@163.com)

© 《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

明显升高 ($P < 0.01$), 中和高剂量药桑叶组大鼠肾组织中MDA水平和NOS活性明显降低 ($P < 0.01$)。Western blotting法, 与模型组比较, 高剂量药桑叶组大鼠肾组织中p-PI3K/PI3K比值明显降低 ($P < 0.01$), 低、中和高剂量药桑叶组大鼠肾组织中p-AKT/AKT比值降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 高剂量药桑叶组大鼠肾脏组织中Bcl-2蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), Caspase-3和Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 药桑叶共鉴定出159种化学成分, 其中包括27种入血成分, 主要为黄酮等; 药桑叶对庆大霉素诱导大鼠AKI具有改善作用, 其机制可能与药桑叶抑制PI3K/AKT和细胞凋亡信号通路有关。

[关键词] 药桑叶; 急性肾损伤; 化学成分; 抗炎; 细胞凋亡; 网络药理学

[中图分类号] R692.5 [文献标志码] A

UPLC-Q-TOF/MS and network pharmacology analysis and experimental verification based on potential active ingredients and mechanisms of medicinal Mulberry Leaves in anti-acute kidney injury

LIANG Huaimin¹, JIN Jiacheng¹, CHEN Wenhua¹, LI Yuyao¹, WANG Hangyu¹, ZHANG Ke¹,
WANG Jinhui^{1,2}

(1. Xinjiang Key Laboratory of Plant Medicine Resources and Utilization, Ministry of Education, Safflower Industry Research Institute, Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the active components of Xinjiang characteristic plant Medicinal Mulberry Leaves against acute kidney injury (AKI) and to clarify the mechanism through ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) technology, network pharmacology, and animal experimental verification. **Methods:** UPLC-Q-TOF/MS technology was used to analyze the chemical components in 70% ethanol percolation extract of Medicinal Mulberry Leaves and in serum of the rats at 0 and 60 min after intragastric administration; the SMILES numbers of the blood-entering active components of Medicinal Mulberry Leaves were obtained from PubMed, and then their target genes were obtained from the SIB database; meanwhile, using “acute kidney injury” as the keyword, the AKI-related targets were retrieved from databases such as the Human Gene database (GeneCards), the Disease Gene Network database (DisGENET), and the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) disease database; the two were compared and intersected to discover the gene targets of Medicinal Mulberry Leaves for treating AKI. A total of 70 SD rats were randomly divided into blank group (10 rats) and model establishment group (60 rats); the rats in model establishment group were intraperitoneally injected with gentamicin to establish the model for 7 d, the rats in blank group were injected with same amount of normal saline; after modeling, the serum creatinine (CRE) and urea nitrogen (BUN) levels of the rats were measured to determine whether the model was successfully prepared. A total of 60 successfully modeled rats were randomly divided into model group, low dose of Medicinal Mulberry Leaves group (120 mg·kg⁻¹ Medicinal Mulberry Leaves), medium dose of Medicinal Mulberry Leaves group (300 mg·kg⁻¹ Medicinal Mulberry Leaves), high dose of Medicinal Mulberry Leaves group (750 mg·kg⁻¹ Medicinal Mulberry Leaves), Medicinal Mulberry Leaves enrichment substance group (750 mg·kg⁻¹ Medicinal Mulberry Leaves), and positive drug group (15 mg·kg⁻¹ verapamil); after treated for 14 d, the 24 h urine

of the rats in various groups was collected, and the blood and kidney tissue of the rats in various groups were collected for later detection. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathomorphology of kidney tissue of the rats in various groups; colorimetric method was used to detect the levels of urine protein (UP), uric acid (UA), β 2-microglobulin (β 2-MG), albumin (ALB), 10 kDa interferon γ -induced protein (IP-10), kidney injury molecule-1 (KIM-1), and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in urine of the rats in various groups; microplate method was used to detect the serum creatinine (CRE) level of the rats in various groups; urease method was used to detect the serum urea nitrogen (BUN) level of the rats in various groups; ELISA method was used to detect the serum levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) of the rats in various groups and the activities of superoxide dismutase (SOD) and nitric oxide synthase (NOS) and the levels of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in kidney tissue of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of apoptosis and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway-related proteins in kidney tissue of the rats in various groups. **Results:** The UPLC-Q-TOF/MS results showed that a total of 159 chemical components were identified, and 27 blood-entering components were screened out, including 8 prototype products and 19 metabolites, mainly flavonoids, benzofurans, and organic acids. The network pharmacology results showed that AKT, B-cell lymphoma-2 (*Bcl-2*), and cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (*Caspase-3*) were the key targets of Medicinal Mulberry Leaves for treating AKI, and the mechanism mainly involved multi-pathway linkage and integrated regulation including the PI3K/AKT signaling pathway. Compared with model group, the levels of UP and NGAL in urine of the rats in low, medium, and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with model group, the levels of KIM-1 and IP-10 in urine of the rats in medium and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the levels of BUN and TNF- α in blood of the rats in low, medium, and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with model group, the levels of GSH and GSH-Px in kidney tissue of the rats in medium and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups were significantly increased ($P < 0.01$); compared with model group, the level of MDA and the activity of NOS in kidney tissue of the rats in medium and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups were significantly decreased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with model group, the expression level of PI3K protein in kidney tissue of the rats in high dose of Medicinal Mulberry Leaves group was significantly decreased ($P < 0.01$); compared with model group, the expression levels of AKT protein in kidney tissue of the rats in low, medium, and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with model group, the level of Bcl-2 in kidney tissue of the rats in high dose of Medicinal Mulberry Leaves group was significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of Caspase-3 and Bcl-2-associated X protein (Bax) were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Medicinal Mulberry Leaves are identified to contain a total of 159 chemical components, including 27 blood-entering components, mainly flavonoids; Medicinal Mulberry Leaves have an ameliorative effect on gentamicin-induced AKI in rats, and the mechanism may be related to the inhibition of PI3K/AKT and apoptosis signaling pathways by Medicinal Mulberry Leaves.

KEYWORDS Medicinal Mulberry Leaves; Acute kidney injury; Chemical components; Anti-inflammatory; Apoptosis; Network pharmacology

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 作为临床常见的危重症候群, 主要由缺血再灌注损伤、肾毒性物质暴露或药物不良反应引发^[1], 其高发病率

和进展为慢性肾病的高风险性使其成为全球公共卫生的重要挑战。庆大霉素作为氨基糖苷类抗生素, 虽广泛应用于革兰阴性菌感染的治疗, 但其所引起

的肾毒性使AKI成为其主要并发症^[2]。尽管血液净化等支持性治疗手段不断发展, AKI的病理机制复杂性和治疗靶点局限性导致其临床预后改善有限, 因此探索AKI新型治疗策略具有重要意义。传统中药凭借多组分协同、多靶点调控的系统性治疗优势, 在肾脏保护领域展现出独特潜力^[3]。新疆特色植物黑桑又名药桑, 属于桑科桑属植物, 其特有的22倍体花性染色体特征使其成为稀有的自然多倍体优质资源, 也是我国唯一的黑桑种^[4]。药桑作为新疆地区十分珍贵的药物资源, 其桑叶、桑枝和桑葚易于采摘, 因此已成为重要的保健水果和民间药材。现有研究^[5-6]多集中于该药材的降糖调脂作用, 而其干预AKI的分子机制研究尚未完全阐明。药桑叶中富含黄酮类、苯并呋喃类及多糖等活性组分, 现有研究^[7-8]已证实其具有抗氧化应激、抗炎和抗肾纤维化的特性, 提示其在AKI修复中的潜在价值。本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight/mass spectrometry, UPLC-Q-TOF/MS)、网络药理学及动物实验验证, 探讨新疆药桑叶抗AKI的药效物质基础及其分子机制, 为天然产物多靶点药物开发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

乙醇 (分析纯, 津市鑫铂特化工有限公司), 乙腈 (质谱级, 美国J. T. Baker公司), 甲酸 (色谱级, 天津市富宇精细化工有限公司), 纯净水 (陕西娃哈哈乳品有限公司), 硫酸庆大霉素注射液 (宜昌人福药业), 尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酐 (creatinine, CRE)、尿蛋白 (urinary protein, UP)、尿酸 (uric acid, UA)、蛋白定量 (total protein, TP)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH)、一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 β 2微球蛋白 (β 2-microglobulin, β 2-MG)、白蛋白 (albumin, ALB)、10 kDa 干扰素 γ 诱导蛋白 (10 kDa

interferon- γ -inducible protein, IP-10)、肾损伤因子1 (kidney injury molecule-1, KIM-1) 和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K)、蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) 和磷酸化AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 抗体均购自江苏亲科生物研究中心有限公司, B细胞淋巴瘤2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 相关X蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、Bcl-2蛋白和含半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3 (cysteinyI aspartate-specific proteinase-3, Caspase-3) 抗体均购自博士德生物工程有限公司, β -肌动蛋白 (β -actin) 和山羊抗兔IgG/辣根酶标记抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。超高效液相串联飞行时间质谱联用仪 (型号: I-CLASS/UPCC/XEVOG2-XS, 美国Waters公司), 离心机 (型号: TGL-16B, 上海安亭科学仪器厂), 电泳仪 (型号: DYCZ-24DN, 北京六一生物科技有限公司), 球磨机 (型号: GT200, 上海净信实业发展有限公司), 正置高分辨荧光显微镜 (型号: AXiOImaGer. m2, 北京博瑞斯科技有限公司), 化学发光检测成像系统 (型号: UVP EC3510, 美国UVP公司), 石蜡包埋机 (型号: DB-09, 湖北德力森科技有限公司)。

1.2 药物制备

药桑叶浸膏制备: 取新疆特色药桑叶2.0 kg, 粉碎后以10倍量的70%乙醇渗漉提取, 减压回收溶剂, 得流浸膏。浸膏收率为32%。药桑叶富集物制备: 取药桑叶浸膏用水分散, 而后经石油醚和乙酸乙酯萃取后, 取水层过大孔树脂用70%乙醇洗脱, 得到浸膏。浸膏收率为2%。

1.3 入血成分分析

1.3.1 药桑叶提取物处理及血浆的采集和处理

取药桑叶70%乙醇浸膏适量, 以水为溶剂, 制成浓度为2 250 g·L⁻¹ (浸膏浓度) 的药液。取浸膏用色谱甲醇溶解, 过0.22 μ m滤膜, 进行UPLC-Q-TOF/MS分析。给药前12 h大鼠禁食, 口服给予药桑叶70%乙醇浸膏。在给药后0和60 min分别眼眶取血, 3 500 r·min⁻¹、4 $^{\circ}$ C离心10 min, 取上

清,得血浆。血浆用甲醇沉淀蛋白后取上清,过96孔板式亲水亲油平衡值(hydrophilic-lipophilic balance, HLB)柱,收集流出液进行UPLC-Q-TOF/MS分析。

1.3.2 色谱-质谱(mass spectrometry, MS)条件
色谱柱型号:ACQUITY UPLC BEH C18(粒径:1.7 μm ,内径 \times 长度:2.1 mm \times 100 mm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水(B);流速:0.4 mL \cdot min⁻¹;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;样品池温度:4 $^{\circ}\text{C}$;进样量:2 μL ;梯度洗脱程序:0~3 min 5%A \rightarrow 40%A,3~10 min 40%A \rightarrow 95%A,10~12 min 95%A。质谱条件:采用电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI),正、负离子2种采集模式,正、负离子电压分别为3.0和2.5 kV,离子源温度110 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气体为氮气,流速为650 L \cdot h⁻¹,温度450 $^{\circ}\text{C}$ 。锥孔电压50 V,相对分子质量扫描范围50~1 500。

1.3.3 数据处理 采用MassLynxV4.1软件对MS数据进行采集,将所采集的数据导入至UNIFI软件中,以进行峰识别(观察指标)和峰指认(观察指标)。

1.4 网络药理学

1.4.1 药桑叶及疾病相关靶点获取 将上述所得的入血成分认定为活性成分,于PubMed(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)平台查询出对应化合物的SMILES号,再在SIB数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>)中输入上述活性成分的SMILES号,从而获取该化合物相应的靶点基因;同时,以“acute kidney injury”作为关键词,在人类基因数据库(GeneCards)(<https://www.genecards.org/>)、疾病基因网络数据库(DisGENET)(<https://www.disgenet.org/>)和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)(<https://www.omim.org/>)等疾病数据库中检索并获取与AKI相关的靶点信息;最后,将上述得到的药桑叶活性成分的基因靶点与疾病基因靶点进行比对,取二者交集,进而确定药桑叶治疗AKI的基因靶点。

1.4.2 治疗AKI的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建及富集分析 在获取了相关的交集靶点后,将其导入至STRING数据库,以此构建PPI网络图。随后,借助Cytoscape 3.9.1软件对所构建的PPI网络图进行呈现和分析,并依据度值,进一步筛选出在药桑叶

治疗AKI过程中发挥关键作用的靶点。采用DAVID数据平台,针对药桑叶在防治AKI方面的相关靶点,开展基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集分析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。在分析过程中,严格筛选出 $P<0.05$ 的生物过程及通路。利用微生信在线平台,绘制GO和KEGG富集分析气泡图。

1.5 实验验证

1.5.1 实验药材和实验动物 药桑叶采摘自新疆维吾尔自治区喀什地区,经石河子大学药学院朱芸教授鉴定为新疆特色植物药桑。76只SPF级雄性SD大鼠,体质量(200 \pm 20)g,动物生产许可证号:SCXK(豫)2019-0002,购于郑州市惠济区华兴实验动物养殖场。大鼠饲养于石河子大学药学院实验动物中心,室温(22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 \pm 5)%,自由饮水摄食。本动物实验在石河子大学伦理委员会的全程监督下开展,严格遵循了实验室动物管理的相关原则和规范。本研究已获得石河子大学生物伦理委员会的正式批准,伦理批准编号:A2025-051。

1.5.2 实验动物分组和模型建立 将70只大鼠随机分为空白组($n=10$)和庆大霉素造模组($n=60$)。造模组大鼠连续7d腹腔注射庆大霉素(100 mg \cdot kg⁻¹),空白组大鼠腹腔注射等量生理盐水。2组大鼠眼眶取血,检测大鼠血清CRE和BUN水平,组内检验将CRE和BUN水平与空白组进行统计学比较。有明显统计学差异($P<0.05$)的大鼠则纳入模型组,排除无统计学差异($P>0.05$)的大鼠。将造模成功的60只大鼠随机分为模型组、低剂量药桑叶组(120 mg \cdot kg⁻¹药桑叶)、中剂量药桑叶组(300 mg \cdot kg⁻¹药桑叶)、高剂量药桑叶组(750 mg \cdot kg⁻¹药桑叶)、药桑叶富集物组(750 mg \cdot kg⁻¹药桑叶)和阳性药物组(15 mg \cdot kg⁻¹维拉帕米),每组10只。空白组和模型组大鼠给予空白溶剂双蒸水,各给药组大鼠给予相应剂量的药物,每只大鼠以每毫升100 g的灌胃体积进行灌胃给药,持续给药14 d。给药结束后,在代谢笼中禁食不禁水,收集大鼠24 h的尿液;收集尿液结束后,采用腹主动脉的方法收集大鼠血清,将收集到大鼠尿液和血清于-80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。同时快速取下大鼠左右两侧肾脏组织,生理盐水漂洗,滤纸擦干,称质量并拍照;右肾纵切后固定于10%中性甲醛溶液中;左肾于-80 $^{\circ}\text{C}$ 条

件下保存。

1.5.3 各组大鼠肾脏相关基础指标检测 将解剖后的大鼠两侧肾脏拍照,精密称重以计算肾脏系数[肾脏系数=肾脏湿重(mg)/大鼠体质量(g)×100%];对固定于10%中性甲醛溶液的肾组织进行脱水、浸蜡、包埋和切片(4 μm薄片)及苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,观察各组大鼠肾脏病理学形态表现。

1.5.4 微板法和比色法检测各组大鼠肾功能及相关标志物 按试剂盒说明书检测各组大鼠血清和尿液中的CRE、BUN、UA和UP水平;按说明书检测各组大鼠尿液中NGAL、β2-MG、ALB、IP-10和KIM-1等生物标志物。

1.5.5 ELISA法检测各组大鼠肾组织中炎症和氧化应激因子水平 将部分左侧肾组织制备成10%肾组织匀浆,按说明书检测各组大鼠肾脏组织中TNF-α和IL-6水平;按说明书检测各组大鼠10%左肾组织匀浆中TP、GSH和MDA水平以及SOD、NOS和GSH-Px活性。

1.5.6 Western blotting法检测各组大鼠肾组织中PI3K、AKT、Caspase-3、Bcl-2和Bax蛋白表达水平

采用蛋白裂解缓冲液提取大鼠肾组织,通过凝胶电泳分离蛋白,再将其转移至聚氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,放入5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)中室温封闭2 h。将膜与对应抗体p-PI3K(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-AKT(1:1 000)、AKT(1:1 000)、Caspase-3(1:800)、Bcl-2(1:800)、Bax(1:800)和β-actin(1:3 000)溶液4℃孵育过夜。用1×含吐温20的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(Tris-buffered saline with Tween-20, TBST)洗涤膜4次,每次10 min,再与相应二抗室温孵育1.5 h,然后用1×TBST洗涤4次,每次5 min。采用增强化学发光检测试剂,以凝胶成像系统检测,采用Image J软件分析蛋白质条带灰度值,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.5.7 统计学分析 采用OriginLab Origin 10.1软件进行数据分析,GraphPad Prism 8.2软件进行可视化处理。各组大鼠尿液中UP、UA、β2-MG、ALB、IP-10、KIM-1和NGAL水平,血液中BUN、CRE、IL-6和TNF-α水平,肾组织中MDA和GSH水平以及SOD、NOS和GSH-Px活性,大鼠肾组

织中PI3K、AKT、Caspase-3、Bcl-2和Bax蛋白表达水平,均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间样本均数比较采用两独立样本*t*检验,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SNK-*q*检验。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入血成分分析

2.1.1 药桑叶化学成分分析 在UPLC-Q-TOF/MS联合技术分析中,新疆药桑叶70%乙醇渗漉提取物呈现出丰富的化学成分。于正离子模式下检测到45种化合物,负离子模式下检测到126种化合物。去除重复成分后,共确定159种化学成分。其中黄酮类93种、苯并呋喃类23种、有机酸类12种、生物碱1种、苯丙素类8种和其他类22种。

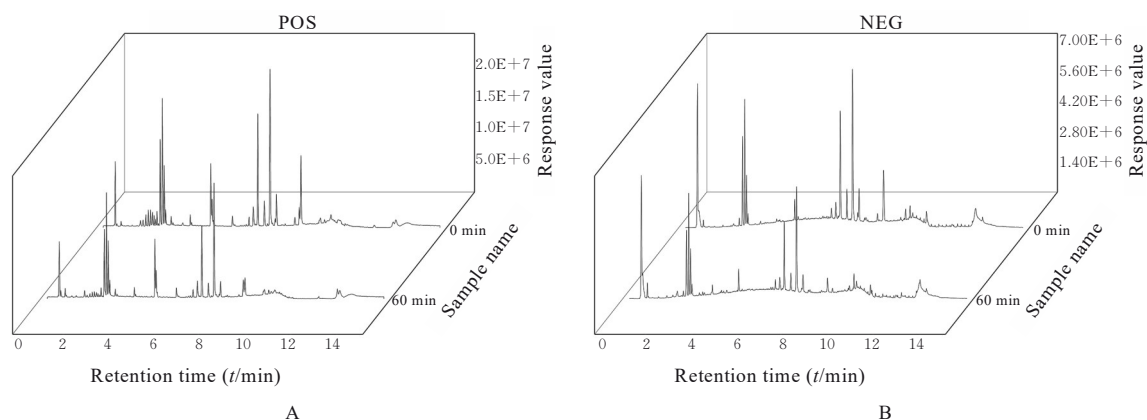
2.1.2 药桑叶入血成分分析 运用UPLC-Q-TOF/MS联合技术对口服新疆药桑叶70%乙醇渗漉浸膏后的大鼠血浆成分进行分析,结果显示:在正离子模式下,从自建数据库成功匹配到8种化合物;负离子模式下检索出19种化合物。经过去重处理,最终确定共有27种化合物,其中包含8种原型成分和19种代谢成分。进一步分析发现上述化合物分属于不同类别,其中黄酮类化合物有12种、苯并呋喃类4种、生物碱类3种、有机酸类3种和其他类别化合物5种。见图1和表1及2。

2.2 网络药理学预测

2.2.1 新疆药桑叶活性成分靶点及AKI靶点筛选 以UPLC-Q-TOF/MS联用技术测得药桑叶入血成分27种化合物。作为潜在活性成分,从数据库中共筛选出药桑叶活性成分相对应的靶点基因365个。通过GeneCards、DisGENET和OMIM数据库以“acute kidney injury”为关键词,合并3个数据库得到的靶点基因,去除重复的,共得到1 154个AKI靶点基因,取交集后共得到150个药桑叶治疗AKI形成的共同靶点基因。见图2。

2.2.2 PPI网络 将药桑叶治疗AKI形成相关靶点基因导入STRING数据库进行PPI分析得到PPI网络关系图,将PPI数据导入Cytoscape 3.9.1软件中,利用软件筛选出关键靶点基因,预测关键靶点可能为AKT、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、Bcl-2和Caspase-3等。见图3。

2.2.3 GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析 通过David数据库对药桑叶治疗AKI形成的



A: Plasma component analysis diagram in positive ion mode; B: Plasma component analysis diagram in negative ion mode.

图1 药桑叶入血成分TIC图

Fig. 1 TIC current chromatogram of blood-entering components of Medicinal Mulberry Leaves

表1 药桑叶血浆原型成分

Tab. 1 Prototypic components in Medicinal Mulberry Leaves plasma

Number	Retention time (t/min)	Compound name	Molecular formula	Mass-to-charge ratio(m/z)	Error (ppm)
1	0.56	Kuwanol D	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	453.192 5	1.43
2	9.04	Wittifuran U	C ₂₄ H ₂₆ O ₆	455.172 1	2.15
3	0.58	Melezitose	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	527.159 9	3.16
4	7.23	Kaempferol-3-O-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.167 7	3.23
5	4.29	Aurantiamide	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	425.182 7	-2.09
6	3.18	Bakuchalcone	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	363.120 6	0.84
7	3.36	Wittifuran B	C ₂₄ H ₂₄ O ₅	415.152 8	2.96
8	2.62	Mulberroside F	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	567.171 1	0.40

靶点基因进行GO功能富集分析,GO功能富集分析结果显示:主要生物过程(biological process, BP)集中于外源物质的刺激反应、蛋白质磷酸化和细胞增殖的正调节等;细胞成分(cellular component, CC)主要涉及细胞质膜、细胞表面和细胞线粒体等;分子功能(molecular function, MF)主要与酶结合、蛋白结合和相同蛋白结合等。对靶点基因进行KEGG信号通路富集分析,共得到174条富集信号通路,主要包括癌症的途径、前列腺癌和PI3K/AKT等信号通路,表明药桑叶对AKI的治疗可能是通过多通路、多途径共同发挥作用。见图4和5。

2.3 实验验证

2.3.1 AKI模型的建立 连续注射庆大霉素7 d后,检测2组大鼠血清中CRE和BUN水平,结果显示:造模组大鼠血清中CRE和BUN水平明显高于空白组($P<0.01$),提示大鼠肾功能受损,表明成功建立了AKI模型。见表3。

2.3.2 各组大鼠肾外观和肾脏系数 空白组大鼠肾脏体积相对较小,颜色为深红色,色泽饱满,而模型组大鼠肾组织明显肿大且泛白,低和中剂量药桑叶组大鼠肾脏肿大缓解,但仍呈泛白状态;高剂量药桑叶组、药桑叶富集物组和阳性药物组大鼠肾脏肿大明显减轻,色泽更红润。肾脏系数检测结果显示:与空白组(0.5737 ± 0.0455)比较,模型组大鼠肾脏系数(0.9710 ± 0.0728)明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,富集物药桑叶组(0.7508 ± 0.0346)和阳性药物组(0.7908 ± 0.0953)大鼠肾脏系数明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),低、中和高剂量药桑叶组(0.8954 ± 0.1302 , 0.8085 ± 0.0648 , 0.8048 ± 0.1163)肾脏系数差异无统计学意义($P>0.05$),表明药桑叶给药14 d能改善AKI所致的大鼠肾肿胀。见图6。

2.3.3 各组大鼠肾脏组织病理形态表现 HE染色结果显示:空白组大鼠肾组织细胞排列紧密,肾小球和肾小管结构均无明显异常。模型组大鼠肾组织

表2 药桑叶血浆代谢成分
Tab.2 Metabolic components in Medicinal Mulberry Leaves plasma

Number	Retention time (t/min)	Compound name	Molecular formula	Mass-to-charge ratio(m/z)	Error (ppm)
1	0.56	Mulberrofuran Y	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	453.1910	-1.91
2	3.17	Albanin F	C ₄₀ H ₃₆ O ₁₁	737.2242	0.39
3	10.47	Eicosenoic acid	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	309.2787	-3.94
4	3.73	Kynurenine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	253.0832	0.90
5	3.73	Morrole G	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₄	281.0788	3.26
6	3.14	Kuwanon W	C ₄₅ H ₄₂ O ₁₁	757.2656	0.16
7	0.56	2',4'-dihydroxy-7'-methoxy-8-prenylflavan	C ₂₁ H ₂₄ O ₄	363.1574	2.04
8	2.75	2-O- α -D-galactopyranosyl-1-deoxynojirimycin	C ₁₂ H ₂₃ NO ₉	326.1432	-4.26
9	8.73	Behenic acid	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	341.3417	0.76
10	7.50	Kuwanol C	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	445.1623	0.39
11	7.72	Sanggenol N.	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	445.1618	-0.82
12	0.58	D-pantothenic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	220.1184	2.17
13	5.29	Isobaisseoside.	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₃	509.1277	2.33
14	4.77	Kuwanol B	C ₃₄ H ₂₆ O ₈	563.1676	-4.28
15	0.59	N-(3-Amino-3-oxopropyl 3,4-DHP	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₄	205.1173	-4.98
16	6.80	Palmitoleic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	277.2128	-3.68
17	2.81	Euchrenone a7	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	363.1198	-1.40
18	9.02	Sanggenon G	C ₄₀ H ₃₈ O ₁₁	695.2457	-4.31
19	7.80	Sanggenon N	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	445.1635	2.94

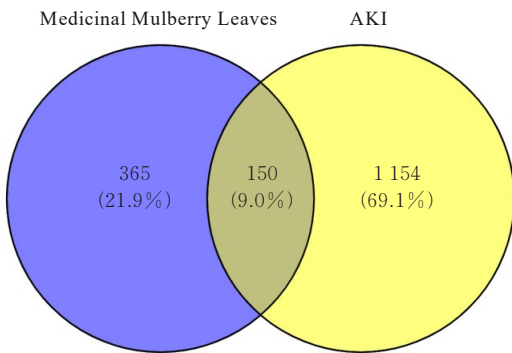


图2 药桑叶与AKI共同靶点基因的韦恩图
Fig.2 Venn diagram of common target genes of Medicinal Mulberry Leaves and AKI

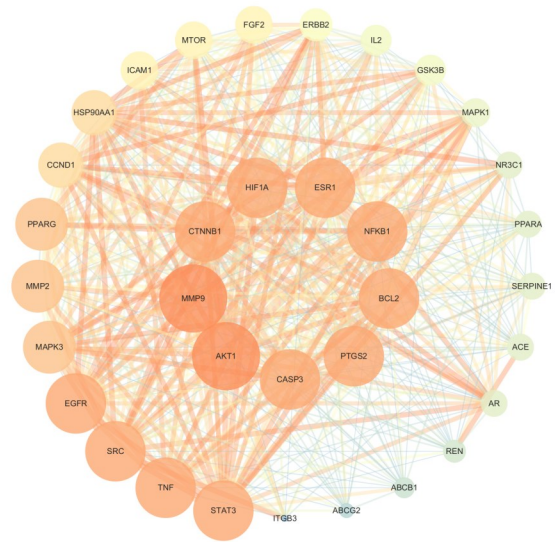


图3 药桑叶治疗AKI关键靶点的网络图
Fig.3 Network diagram of key targets of Medicinal Mulberry Leaves leaves in treating AKI

肾小管上皮细胞高度肿胀，空泡化现象显著，肾间质可见大量炎性细胞浸润。低剂量药桑叶组大鼠肾组织肾小管上皮细胞坏死、空泡化程度及炎性细胞浸润数量均有所减轻。中剂量药桑叶组和高剂量药桑叶组大鼠肾组织仅表现为轻度肾小管变性，未观察到明显炎性浸润。富集药桑叶组和阳性药物组大鼠肾实质结构清晰，肾小管上皮细胞出现轻度变性，细胞形态基本正常。见图7。

2.3.4 各组大鼠血清中BUN、CRE和UA水平及尿液中UP水平 与空白组比较，模型组大鼠血清中CRE、BUN和UA水平及尿液中UP水平明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，药桑叶富集组

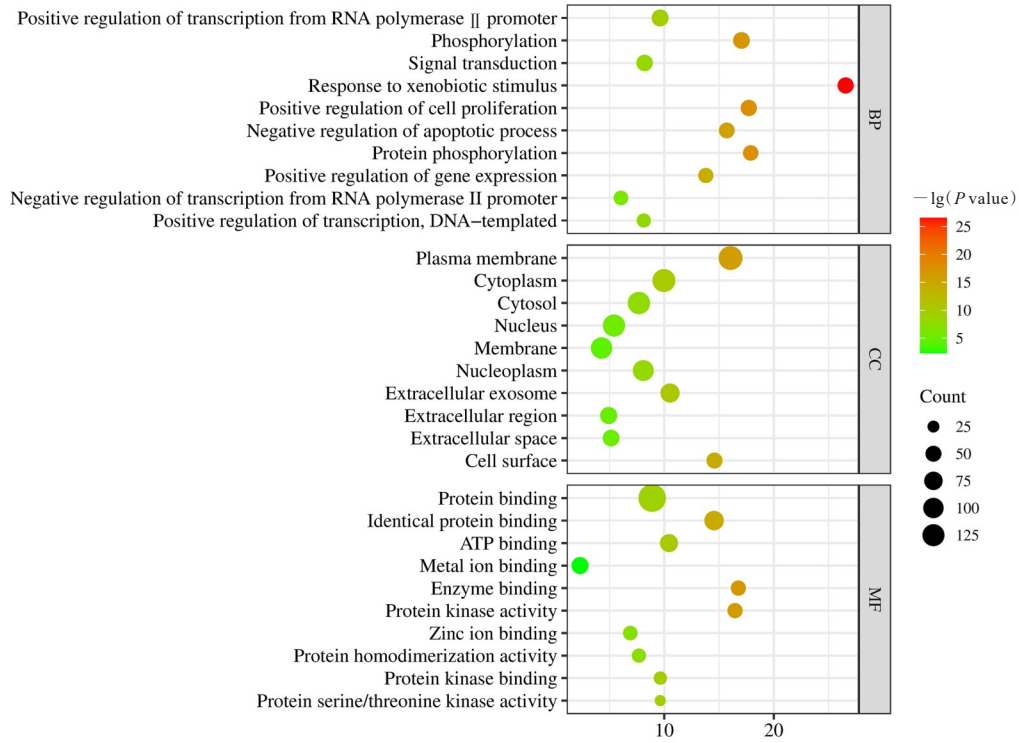


图4 药桑叶治疗AKI关键靶点的GO功能富集分析气泡图

Fig. 4 GO functional enrichment analysis bubble plot of key targets of Medicinal Mulberry Leaves in treating AKI

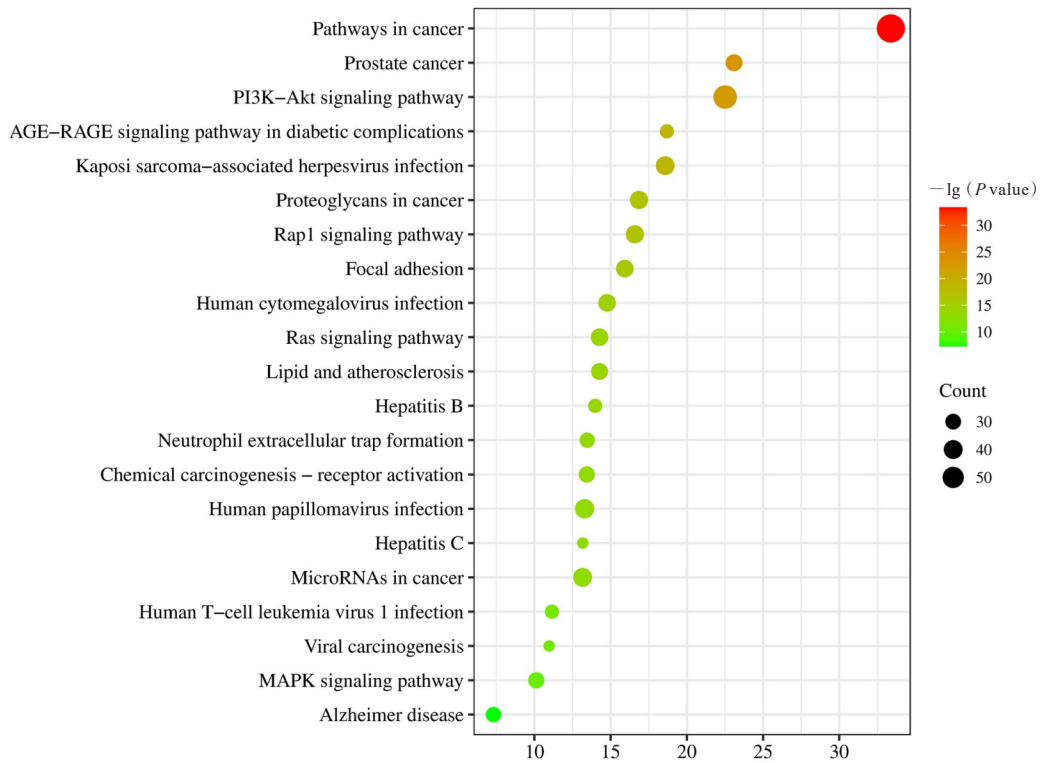


图5 药桑叶治疗AKI关键靶点的KEGG信号通路富集分析气泡图

Fig. 5 KEGG signaling pathway enrichment analysis bubble plot of key targets of Medicinal Mulberry Leaves in treating AKI

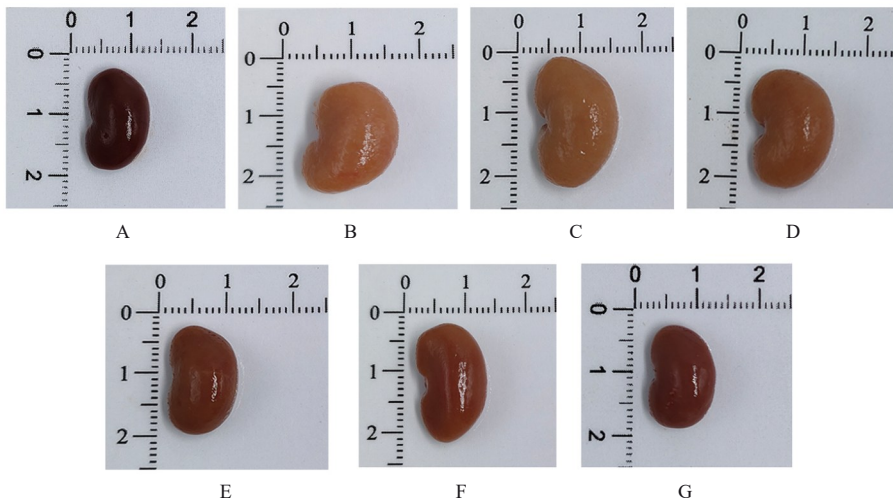
表3 2组大鼠血清中CRE和BUN水平
Tab.3 Levels of serum CRE and BUN ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CRE [$c_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$]	BUN [$c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$]
Blank	10	65.76 \pm 5.50	3.78 \pm 1.08
Modeling	60	211.27 \pm 42.71*	14.56 \pm 4.02*

* $P < 0.01$ compared with blank group.

大鼠血清中CRE、BUN和UA水平明显降低 ($P < 0.01$), 低、中和高剂量药桑叶组及阳性药物组大鼠血清中BUN水平和尿液中UP水平均明显降低 ($P < 0.01$)。见表4。

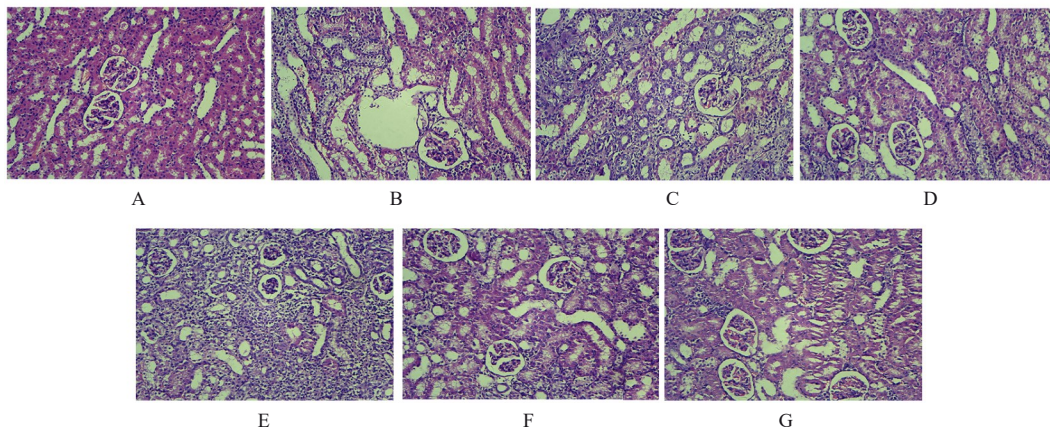
2.3.5 各组大鼠尿液中 $\beta 2$ -MG、ALB、IP-10、KIM-1和NGAL水平 与空白组比较, 模型组大鼠尿液中 $\beta 2$ -MG、ALB、IP-10、KIM-1和NGAL水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 低剂量药桑叶组大鼠尿液中NGAL水平明显降低 ($P < 0.01$), 中和高剂量药桑叶组大鼠尿液中IP-10、KIM-1和NGAL水平明显降低 ($P < 0.01$), 药桑叶富集物组大鼠尿液中IP-10、KIM-1和NGAL水平均明显降低 ($P < 0.01$), 阳性药物组大鼠尿液中IP-10和NGAL水平均明显降低 ($P < 0.01$)。见表5。



A: Blank group; B: Model group; C—E: Low, medium, and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups; F: Medicinal Mulberry Leaves enriched substance group; G: Positive drug group.

图6 各组大鼠肾脏外观

Fig. 6 Renal appearance of rats in various groups



A: Blank group; B: Model group; C—E: Low, medium, and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups; F: Medicinal Mulberry Leaves enriched substance group; G: Positive drug group.

图7 各组大鼠肾组织病理形态表现(HE, $\times 200$)

Fig. 7 Pathomorphology of kidney tissue of rats in various groups (HE, $\times 200$)

表4 各组大鼠血清中CRE、BUN和UA以及尿液中UP水平

Tab. 4 Levels of CRE, BUN, and UA in serum and levels of UP in urine of rats in various groups ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	CRE [$c_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$]	BUN [$c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$]	UA [$c_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$]	UP [$\rho_B/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]
Blank	53.76±6.08	4.57±0.88	35.40±15.32	370.75±103.10
Model	68.43±6.54*	10.32±0.88*	88.33±23.56*	626.00±149.44*
Medicinal Mulberry Leaves				
Low dose	67.28±5.57	4.81±0.37 [△]	93.18±15.09	396.60±122.26 [△]
Medium dose	64.76±8.09	3.65±0.46 [△]	78.07±15.48	384.80±68.93 [△]
High dose	59.21±6.94	3.29±0.94 [△]	65.31±8.38	390.48±92.64 [△]
Medicinal Mulberry Leaves enrichment substance	52.20±2.45 [△]	5.44±0.57 [△]	47.84±7.57 [△]	545.77±52.62
Positive drug	63.36±5.02	3.72±0.67 [△]	66.75±14.50	379.37±54.87 [△]

* $P < 0.01$ compared with blank group; [△] $P < 0.01$ compared with model group.表5 各组大鼠尿液中 β 2-MG、ALB、IP-10、KIM-1和NGAL水平Tab. 5 Levels of β 2-MG, ALB, IP-10, KIM-1 and NGAL in urine of rats in various groups ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	β 2-MG [$\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]	ALB [$\rho_B/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$]	IP-10 [$\rho_B/(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1})$]	KIM-1 [$\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]	NGAL [$\rho_B/(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1})$]
Blank	0.85±0.04	36.84±10.93	93.90±19.66	0.77±0.11	395.78±81.77
Model	1.12±0.11*	52.43±9.95*	414.18±128.44**	6.07±0.88**	1 815.37±123.92**
Medicinal Mulberry Leaves					
Low dose	1.04±0.06	50.35±1.67	300.64±107.85	5.25±1.00	691.43±48.83 [△]
Medium dose	1.06±0.17	47.74±6.61	191.90±43.80 [△]	3.06±0.62 [△]	408.77±48.67 [△]
High dose	0.98±0.23	42.96±5.90	99.06±29.89 [△]	1.31±0.45 [△]	173.26±60.34 [△]
Medicinal Mulberry Leaves enrichment substance	1.08±0.16	42.73±5.33	214.07±62.52 [△]	1.68±0.53 [△]	390.15±93.91 [△]
Positive drug	0.91±0.08	46.33±5.84	100.55±28.92 [△]	5.13±1.42	470.71±118.28 [△]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with blank group; [△] $P < 0.01$ compared with model group.

2.3.6 各组大鼠血清中TNF- α 和IL-6水平 与空白组比较,模型组大鼠血清中TNF- α 和IL-6水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,低剂量药桑叶组大鼠血清中TNF- α 水平降低($P < 0.05$),中和高剂量药桑叶组及药桑叶富集组大鼠血清中TNF- α 水平明显降低($P < 0.01$),阳性药物组大鼠血清中TNF- α 和IL-6水平明显降低($P < 0.01$)。见表6。

2.3.7 各组大鼠肾组织中GSH和MDA水平及GSH-Px、SOD和NOS活性 与空白组比较,模型组大鼠肾组织中GSH水平及GSH-Px和NOS活性均降低($P < 0.01$),MDA水平和NOS活性升高($P < 0.01$)。与模型组比较,低、中和高剂量药桑叶组大鼠肾组织中NOS活性明显降低($P < 0.01$),GSH-Px活性明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,中和高剂量药桑叶组大鼠肾组织中GSH和MDA水平明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,高剂量药桑叶组大鼠肾组织中SOD活性明显降低($P < 0.01$),药桑叶富集组和阳性药物组大鼠肾组

表6 各组大鼠血清中TNF- α 和IL-6水平Tab. 6 Levels of TNF- α and IL-6 in serum of rats in various groups [$n=6, \bar{x} \pm s, \rho_B/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]

Group	TNF- α	IL-6
Blank	13.03±5.62	33.66±22.85
Model	58.72±13.11*	94.98±30.90*
Medicinal Mulberry Leaves		
Low dose	40.68±13.66 [△]	73.49±8.36
Medium dose	14.75±5.64 ^{△△}	70.17±11.44
High dose	16.56±6.89 ^{△△}	68.87±17.72
Medicinal Mulberry Leaves enrichment substance	22.42±7.42 ^{△△}	75.31±13.11
Positive drug	29.67±10.78 ^{△△}	55.73±8.45 ^{△△}

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

织中GSH水平和GSH-Px及SOD活性均明显升高($P < 0.01$),MDA水平和NOS活性均明显降低($P < 0.01$)。见表7。

表7 各组大鼠GSH和MDA水平及GSH-Px、SOD和NOS活性

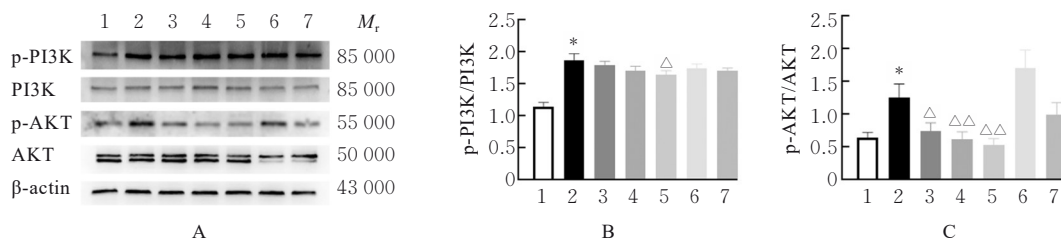
Tab.7 Levels of GSH, MDA and activities of GSH-Px, SOD and NOS of rats in various groups (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Group	GSH	MDA	GSH-Px	SOD	NOS
	[$m_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$]	[$m_B/(\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1})$]	[$\lambda_B/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$]	[$\lambda_B/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$]	[$\lambda_B/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$]
Blank	0.31±0.02	2.32±0.17	757.43±38.93	211.17±30.56	0.17±0.03
Model	0.16±0.01*	5.17±0.22*	434.49±54.53*	97.43±8.73*	0.87±0.04*
Medicinal Mulberry Leaves					
Low dose	0.19±0.01	4.76±0.09	562.66±47.25 Δ	130.27±6.93	0.76±0.03 Δ
Medium dose	0.20±0.01 Δ	4.19±0.37 Δ	598.96±49.79 Δ	129.07±12.68	0.68±0.04 Δ
High dose	0.28±0.01 Δ	3.77±0.24 Δ	726.85±36.76 Δ	147.10±20.53 Δ	0.65±0.03 Δ
Medicinal Mulberry Leaves enriched substance	0.21±0.02 Δ	4.13±0.10 Δ	637.29±27.84 Δ	161.12±13.17 Δ	0.60±0.04 Δ
Positive drug group	0.23±0.02 Δ	3.27±0.27 Δ	656.88±41.47 Δ	178.57±29.65 Δ	0.37±0.04 Δ

* $P<0.01$ compared with blank group; $\Delta P<0.01$ compared with model group.

2.3.8 各组大鼠肾组织中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值 与空白组比较, 模型组大鼠肾组织中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 高剂量药桑叶组大鼠肾组织中p-PI3K/PI3K比值明显升高 ($P<0.05$); 与模

型组比较, 低剂量药桑叶组大鼠肾组织中p-AKT/AKT比值降低 ($P<0.05$); 中和高剂量药桑叶组大鼠肾组织中p-AKT/AKT比值明显降低 ($P<0.01$)。见图8。



Lane 1: Blank group; Lane 2: Model group; Lane 3-5: Low, medium, and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups; Lane 6: Medicinal Mulberry Leaves enriched substance group; Lane 7: Positive drug group. 1: Blank group; 2: Model group; 3-5: Low, medium, and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups; 6: Medicinal Mulberry Leaves enriched substance group; 7: Positive drug group. * $P<0.01$ compared with blank group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ compared with model group.

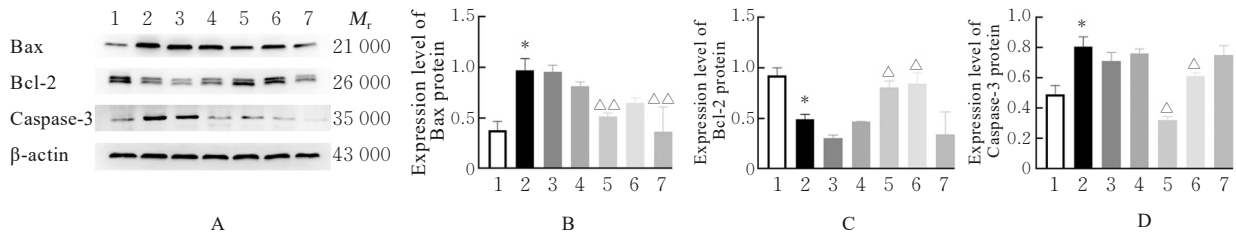
图8 各组大鼠肾组织中PI3K和AKT蛋白表达电泳图(A)及直条图(B,C)

Fig.8 Electrophoregram (A) and histograms (B,C) of expressions of PI3K and AKT in kidney tissue of rats in various groups

2.3.9 各组大鼠肾组织中Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达水平 与空白组比较, 模型组大鼠肾组织中Bcl-2蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), Bax和Caspase-3蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 高剂量药桑叶组和药桑叶富集组大鼠肾组织中Bcl-2蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), Caspase-3蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 高剂量药桑叶组和阳性药物组大鼠肾组织中Bax蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。见图9。

3 讨论

研究^[9-12]显示: 药桑叶中的黄酮类、多酚类和多糖类化合物在疾病的治疗中具有显著的生物活性, 对糖尿病肾病、AKI和肾纤维化等多种肾脏疾病表现出了明显的药效。本实验通过UPLC-Q-TOF/MS联合技术对药桑叶的化学成分进行了深入分析, 共鉴定出159种化学成分, 主要包括黄酮类、苯并呋喃类和有机酸类等。结合血浆分析, 结果显示27种化学成分进入血液循环, 其中包括8种原型成分和17种代谢产物。



Lane 1: Blank group; Lane 2: Model group; Lane 3–5: Low, medium, and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups; Lane 6: Medicinal Mulberry Leaves enriched substance group; Lane 7: Positive drug group. 1: Blank group; 2: Model group; 3–5: Low, medium, and high doses of Medicinal Mulberry Leaves groups; 6: Medicinal Mulberry Leaves enriched substance group; 7: Positive drug group. * $P < 0.01$ compared with blank group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ compared with model group.

图9 各组大鼠肾组织中Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

Fig. 9 Electrophoregram (A) and histograms (B–D) of expressions of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 proteins in kidney tissue of rats in various groups

本研究将上述27种化学成分作为药桑叶中活性物质,通过网络药理学分析结合GeneCards、DisGENET和OMIM数据库共得到150个药桑叶治疗AKI形成的共同靶点基因。PPI网络分析结果显示:AKT、MMP-9、Bcl-2和Caspase-3等关键蛋白与AKI疾病具有相关性。GO和KEGG分析发现药桑叶的活性成分通过调控PI3K/AKT信号通路和抗细胞凋亡等多个通路共同发挥作用。

PI3K/AKT信号通路是细胞生存、增殖、代谢和应激反应中的一个关键通路,广泛参与许多生理和病理过程^[13]。该通路由PI3K及其下游效应分子AKT组成,通常通过细胞表面受体的激活,触发一系列的级联反应,最终导致AKT的磷酸化与激活^[14]。过度激活的PI3K/AKT信号通路会诱导炎症和氧化因子的过度表达,加剧肾脏的炎症反应。研究^[15]表明:AKT的过度激活会通过上调核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等炎症通路以及生成过量的自由基和活性氧以加剧细胞损伤,促进炎症因子的产生,进而诱导肾脏细胞损伤。因此,本研究探讨了药桑叶提取物对PI3K/AKT信号通路的影响。结果显示:药桑叶提取物可降低TNF- α 、IL-6和MDA水平,抑制NOS活性,增加SOD和GSH-Px等抗氧化酶的活性以及抑制PI3K/AKT信号通路的过度激活,从而有效缓解AKI中的炎症和氧化应激反应。

细胞凋亡与AKI密切相关。大量细胞凋亡会破坏肾脏结构功能,导致肾小管重吸收等功能受损、管腔堵塞^[16]。同时肾脏细胞凋亡异常,未及时清除凋亡细胞,会加剧炎症,加重肾损伤^[17]。

Bcl-2家族蛋白是调控细胞凋亡的关键因子,Bcl-2和Bax蛋白是最具代表性的成员^[18]。Bcl-2是一种抗凋亡蛋白,其通过与Bax等促凋亡蛋白相互作用,抑制细胞内促凋亡信号的传递,从而防止Caspase家族的激活,抑制细胞的程序性死亡。在正常情况下,Bcl-2通过维持线粒体膜的稳定性,阻止细胞色素C的释放,进而避免了Caspase-3的激活^[19]。然而,在AKI中,细胞损伤打破了Bcl-2与Bax之间的平衡,导致Bax上调、Bcl-2下调,从而触发Caspase级联反应,最终导致细胞凋亡。Caspase家族蛋白,尤其是Caspase-3,作为凋亡的执行蛋白,Caspase-3的激活是细胞凋亡的关键步骤^[20]。在AKI中,Caspase-3的过度激活会导致肾脏细胞膜结构破坏、细胞内容物泄漏以及肾脏功能衰竭^[21]。因此,本实验探讨药桑叶提取物对Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白的影响。结果显示:药桑叶提取物可显著上调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平,抑制促凋亡蛋白Bax的过度激活,进而减少凋亡执行酶Caspase-3的激活,有效阻断细胞过度凋亡的进程。

综上所述,本研究对药桑叶的化学成分进行分析,共发现159种化学成分,其中27种化学成分进入血液,以27种化学成分与AKI进行网络药理学分析,结果显示其主要与PI3K/AKT信号通路和细胞凋亡信号通路相关,最后动物实验验证药桑叶提取物对庆大霉素诱导的AKI具有治疗作用,其机制可能与药桑叶抑制PI3K/AKT信号通路和细胞凋亡信号通路有关。

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:

梁怀敏参与研究设计和论文撰写, 金家成参与实验数据的获取, 陈文华参与数据整理和论文撰写, 李俞瑶参与实验数据的分析, 王航宇提供实验药材并指导实验操作, 张珂参与论文修改, 王金辉参与论文审阅。

[参考文献]

- [1] WILSON F P, YAMAMOTO Y, MARTIN M, et al. A randomized clinical trial assessing the effect of automated medication-targeted alerts on acute kidney injury outcomes[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2826.
- [2] STARKEL S, GOODBERLET M, SCHULER B, et al. Evaluating the incidence of acute kidney injury and gentamicin synergy dosing for endocarditis[J]. *JAC- Antimicrob Resist*, 2024, 6(1): dlad144-dlad144.
- [3] ZHU J, YUAN A N, LE Y F, et al. Yi-Qi-Jian-Pi-Xiao-Yu formula inhibits cisplatin-induced acute kidney injury through suppressing ferroptosis via STING-NCOA4-mediated ferritinophagy [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156189-156189.
- [4] 贺水花, 杨玲. 新疆特色植物药桑多酚的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(20): 167-172.
- [5] LI R L, WANG J, LIU J Y, et al. Mulberry leaf and its effects against obesity: A systematic review of phytochemistry, molecular mechanisms and applications[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155528.
- [6] PAN Y, SONG Y S, ZHAO M J, et al. Mulberry leaf extract ameliorates high-fat diet-induced obesity in mice by regulating the gut microbiota and metabolites [J]. *Food Biosci*, 2024, 62: 105359.
- [7] HU Y X, ZHANG Y, CUI X A, et al. Structure-function relationship and biological activity of polysaccharides from mulberry leaves: a review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 268(P1): 131701.
- [8] YAO Q F, ZHANG X Y, WANG L F, et al. Therapeutic potential of p-coumaric acid in alleviating renal fibrosis through inhibition of M2 macrophage infiltration and cellular communication [J]. *Phytomedicine*, 2025, 139:156507.
- [9] 李炳钦. 新疆药桑叶化学成分和生物活性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2019.
- [10] 马志, 孟庆海, 蒯美玉, 等. 桑酮碱对2型糖尿病肾病大鼠的保护作用及机制[J]. *中成药*, 2016, 38(6): 1215-1220.
- [11] 寇婕, 石梦茜, 吕晨慧, 等. 茶多酚通过抑制线粒体凋亡改善糖尿病肾病大鼠肾功能的研究[J]. *营养学报*, 2023, 45(1): 70-75.
- [12] CHEN Y L, HUANG J Y, WANG H X, et al. Polysaccharides from Sacha Inchi shell reduces renal fibrosis in mice by modulating the TGF- β 1/Smad pathway and intestinal microbiota [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 280: 136039.
- [13] WALKOWSKI B, KLEIBERT M, MAJKA M, et al. Insight into the role of the PI3K/Akt pathway in ischemic injury and post-infarct left ventricular remodeling in normal and diabetic heart [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1553.
- [14] 黄丹, 周斌, 彭盛亮, 等. PI3K-Akt信号通路在大鼠肾缺血再灌注损伤的作用及白黎芦醇的干预研究[J]. *吉林医学*, 2024, 45(12): 2897-2900.
- [15] 万金艳, 龙宇, 张羽璐, 等. PI3K/Akt信号通路在糖尿病肾病中的作用及中药干预的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(12): 3705-3716.
- [16] 郭晨雪, 刘笑芬, 曲星伊, 等. 细胞凋亡在药物诱导的急性肾小管坏死中的作用[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2023, 23(2): 254-260.
- [17] 雷鸣琤. 电针通过抑制肾脏细胞凋亡和炎症反应减轻急性肾损伤的作用机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2024.
- [18] 陈雪, 王莺, 康晶, 等. 毛蕊花糖苷对热损伤睾丸间质细胞凋亡的保护作用[J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57(6): 70-75.
- [19] QI H, YIN Y S, YIN Z Y, et al. Mitochondrial outer membrane permeabilization and inner membrane permeabilization in regulating apoptosis and inflammation[J]. *J Theor Biol*, 2023, 571: 111558.
- [20] 李瑞杰, 项瑞君, 郑树眺, 等. 基于NF- κ B/NLRP3/Caspase-1信号通路探究大黄素对草酸钙肾结石模型大鼠的影响[J]. *解放军医学院学报*, 2024, 45(11): 1159-1166.
- [21] 芮翊馨, 谢红潇, 李丹, 等. 中乌宁通过BAX/BCL-2/Caspase3信号通路抑制细胞凋亡改善慢性肾衰竭大鼠肾纤维化[J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(5): 42-48.