

雌马酚对 DN 的保护作用及潜在靶点

杜学识,倪向敏,梁馨予,白倩,朱文艺,王建

(陆军军医大学第二附属医院营养科,重庆 400037)

摘要:目的 通过网络药理学方法探讨雌马酚(equol, Eq)对糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的潜在作用靶点,对相关保护作用靶点进行实验验证。方法 利用有机小分子生物活性数据库(PubChem)、小分子药物靶点预测在线平台(SwissTargetPrediction)和药效预测靶点数据库(PharmMapper)筛选出Eq的潜在靶点,随后与DisGeNET基因疾病关联数据库、人类基因组数据库(GeneCards)和在线人类孟德尔遗传病数据库(OMIM)共同选取的糖尿病肾病靶点取交集,然后通过STRING平台进行蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)研究,通过对关键靶点进行基因本体(Gene Ontology, GO)分析,以及与京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集研究,利用Cytoscape3.8.0软件,构建出“药物-靶点-疾病”网络图,并通过分子对接方法,验证了潜在的保护作用靶点。在体外培养MPC5细胞并分别用不同浓度的Eq处理48 h。通过CCK-8检测各组细胞存活率,以确定雌马酚干预的最佳浓度梯度,最终实验分组设置为:对照(Control)组、模型(Model)组(30 mmol/L高糖培养基)、低剂量Eq组(模型+ 1×10^{-8} mol/L Eq)、中剂量Eq组(模型+ 1×10^{-7} mol/L Eq)、高剂量Eq组(模型+ 1×10^{-6} mol/L Eq);通过流式细胞仪来分析各组的凋亡状况;Western blotting检测各组细胞中EGFR、P-EGFR、Bcl-2、Bax和Cleaved Caspase-3蛋白表达水平。结果 通过对Eq与DN的交集靶点进行分析,共发现128个目标,其中核心靶点包括PIK3CB、PIK3CA、AKT2、MAPK1、HRAS、RAF1、MAP2K1和EGFR等。流式实验结果表明,Eq干预后细胞存活率相较于模型组明显提高,凋亡率明显下降($P < 0.05$),Western blotting实验显示,雌马酚干预后抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平较模型组显著升高($P < 0.05$),而P-EGFR/EGFR、Bax和Cleaved Caspase-3蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。结论 Eq对DN发生发展保护作用具有多个靶点和通路调控途径,特别是Eq干预可以缓解肾脏足细胞凋亡现象,其机制可能与EGFR通路有关。

关键词:雌马酚;糖尿病肾病;网络药理学;分子对接;凋亡

中图分类号:R459.3

文献标志码:A

The protect effect of equol and its potential targets in the context of diabetic nephropathy

DU Xueshi, NI Xiangmin, LIANG Xinyu, BAI Qian, ZHU Wenyi, WANG Jian

(Department of Nutrition, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the potential role of equol in (diabetic nephropathy, DN) through network pharmacology methods, and validate the target for the protective effect of equol on DN. **Methods** The potential targets of Eq were identified through screening in databases such as PubChem, SwissTargetPrediction, and PharmMapper, intersecting with DN targets identified in DisGeNET, GeneCards, and OMIM. Subsequently, protein-protein interaction (PPI) analysis was conducted using the STRING platform. Enrichment analyses of Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways were performed for key targets, and the “component target disease” network diagram was constructed by Cytoscape 3.8.0 software. Molecular docking was used to validate possible targets. Cultivate MPC5 cells in vitro and treat them with varying concentrations of Eq for 48 hours. The cell viability of each group was measured using the CCK-8 assay to determine the optimal concentration gradient for equol intervention. The final experimental group settings were as follows: Control group (GLU, 5.5 mmol/L), Model group (GLU, 30 mmol/L), LEq

group(model+ 1×10^{-8} mol/L Eq), MEq group (model+ 1×10^{-7} mol/L Eq), and HEq group (model+ 1×10^{-6} mol/L Eq). Apoptosis in each group was analyzed using flow cytometry. Western blotting was used to detect the protein expression levels of EGFR, P-EGFR, Bcl-2, Bax and Cleaved Caspase-3 in each group. **Results** A total of 128 intersection targets of Eq and DN were obtained. The core targets were PIK3CB, PIK3CA, AKT2, MAPK1, HRAS, RAF1, MAP2K1 and EGFR. The findings from the flow cytometry experiments indicated that, in comparison to the model group, the cell survival rate and apoptosis rate were notably elevated following Eq intervention. Western blotting experiment indicated that the expression level of anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly higher than that of the model group after equol intervention ($P<0.05$). The protein expression levels of P-EGFR/EGFR, Bax and Cleaved Caspase-3 were significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** Equol exhibits multi-target and pathway regulatory effects against DN. Intervention with equol can alleviate the phenomenon of apoptosis in renal podocytes, and its mechanism may be related to the EGFR signaling pathway.

Key words: Equol; Diabetic nephropathy; Network pharmacology; Molecular docking; Apoptosis

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)作为一种普遍存在的糖尿病微血管并发症,成为当前终末期肾病发病的首要原因^[1]。临床上主要表现为蛋白尿、肾小球滤过率下降、肾功能进行性衰退,最终演变为肾衰竭^[2]。研究成果揭示,在DN的进展过程中,肾小球足细胞受损发挥着关键作用^[3]。细胞凋亡是足细胞在代偿性肥大到细胞脱离过程中受损的一种机制^[4],抑制足细胞凋亡是减轻足细胞损伤和蛋白尿症状的关键环节。

雌马酚作为一种与雌激素具有相似功能的代谢产物,主要由大豆苷元(一种特定的大豆异黄酮)在肠道细菌的影响下产生。雌马酚的主要作用是雌激素样作用^[5],抗雄激素作用^[6]和抗氧化作用^[7-8]。流行病学研究发现,相较于不产生雌马酚的人群,雌马酚产生人群对绝经后症状及其他疾病(例如骨质疏松症、血脂异常、血管内皮功能、乳腺癌、前列腺肥大和前列腺癌)表现出良好的作用效果^[9]。另外,动物实验中雌马酚的应用能够有效缓解胰岛素抵抗以及调节脂质代谢^[10]。因此,雌马酚被认为在某些内分泌相关疾病(如乳腺癌、前列腺癌、心血管疾病以及更年期症状)中具有保护作用^[11]。

在前期研究中,我们发现雌马酚对糖尿病大鼠模型的肾脏功能具有一定的改善效果^[12],推测Eq可能具有抵抗糖尿病肾病的潜在活性,但其具体作用靶点及其信号通路尚不清楚。因此,我们借助网络药理学和分子对接来分析可能的作用靶点及其机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

胎牛血清(武汉普赛诺生命科技有限公司); RPMI-1640培养基、青链霉素双抗、Bax一抗和Annexin V-FITC/PI染色试剂盒(均购自武汉赛维

尔生物科技有限公司); IFN γ 生长因子和特超敏ECL化学发光试剂盒(上海生工生物工程有限公司); CCK-8细胞活力检测试剂盒、RIPA裂解液和p-EGFR一抗(上海碧云天生物技术有限公司); 雌马酚(上海大赛璐塑料工业有限公司); EGFR一抗(上海艾比玛特公司), GADPH一抗和二抗(武汉三鹰生物技术有限公司); Bcl-2一抗(CST公司,美国); 磷酸酶和蛋白酶抑制剂混合物(MCE公司,美国)。

1.2 基于网络药理学和分子对接筛选雌马酚干预通路的潜在靶点

1.2.1 雌马酚潜在靶点的筛选

通过Pubchem数据库获取Eq的三维结构,并将其导入PharmMapper数据库,选择物种为人类,以便预测Eq的靶点。将Eq的Canonical Smile号输入Swisstargetprediction,在筛选条件prob>0的基础上,对靶蛋白进行UniProt校正。汇总上述数据库的靶点,随后将不规范的和重复的靶点删除。

1.2.2 糖尿病肾病相关基因收集

采用“Diabetic nephropathy”作为关键词,在DisGeNET(score gda ≥ 0.1)和Genecards(relevance score ≥ 1)数据库中进行相关基因靶点的检索。合并预测出的靶点基因,同时删除重复数据,剩余靶点作为疾病相关基因数据。

1.2.3 构建PPI网络

使用Venny2.1软件,对Eq与DN共同靶点进行筛选,并绘制韦恩图。将共同靶点数据集引入STRING数据库(物种选择Homo Sapiens),设定最低相互作用阈值为0.4,进而生成蛋白质相互作用网络图。

1.2.4 “成分-靶点-通路-疾病”的网络构建

使用Cytoscape 3.8.0软件,对网络进行可视化处理,并采用Betweenness(BC)、Closeness(CC)、Degree(DC)三个关键度量指标,对共同靶点进行深入分析,选取参数大于等于三个指标的靶点作为核心靶点。

1.2.5 富集分析

通过应用 DAVID 数据库对关键靶点进行 GO 和 KEGG 分析,物种设定为人类进行后续筛选,并将 KEGG 通路中的前 20 和生物过程、细胞成分、分子功能的排名前 10 部分展示为柱状图。

1.2.6 分子对接

分子对接验证:利用 PDB 数据库下载(<http://www.rcsb.org/>)核心蛋白结构,用于 PPI 网络构建,并使用 PyMOL 软件去除配体和水分子。分子结构的数据通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行下载。AutoDock 1.5.6 软件用于添加原子电荷和分配原子类型。所有的柔性键都配置为可旋转的 Running AutoDock,以便进行分子对接。

通过计算机蛋白-配体对接软件(Autodock1.5.6)^[13],完成雌马酚与各关键靶点之间的结合能计算和相互作用评估。分子结构的数据从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取^[14]。首先处理蛋白和配体文件,将所有蛋白质和分子文件都转化为 PDBQT 格式,对极性氢原子和水分子进行删补。随后将网格框居于中间,以适应分子运动并将每个蛋白质的结构域覆盖。设置一个 $30\text{\AA} \times 30\text{\AA} \times 30\text{\AA}$ 的正方形对接口袋,其格点间距定为 0.05 nm 。分子对接是通过 Autodock 1.5.6 软件构建模型完成可视化呈现的。

1.2.7 方法

所有实验共重复 3 次。

1.2.7.1 细胞培养

在 RPMI 1640 培养基中培养条件永生化的小鼠足细胞(陆军军医大学第二附属医院肾内科馈赠)。细胞在 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 5% CO_2 湿润环境和添加有 100 U/mL $\text{IFN}\gamma$ 和 10% 胎牛血清(FBS)的培养基中生长。然后将足细胞放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 而不含 $\text{IFN}\gamma$ 的培养基 10 d 以诱导分化^[15],在此期间,定期观察并更换培养液,以便维持好细胞状态。在试验前,将分化的足细胞放置于无血清 RPMI 1640 培养基中生长 24 h,然后将细胞分为对照(Control)组、模型(Model)组(GLU, 30 mmol/L)^[16]、A 组(模型+ $1 \times 10^{-9}\text{ mol/L}$ Eq)、B 组(模型+ $1 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$ Eq)、C 组(模型+ $1 \times 10^{-7}\text{ mol/L}$ Eq)、D 组(模型+ $1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ Eq)、E 组(模型+ $1 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ Eq)、F 组(模型+ $1 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$ Eq)、G 组(模型+ $1 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ Eq)和 H 组(模型+ $1 \times 10^{-2}\text{ mol/L}$ Eq),干预 24 h 后进行相关检测。

1.2.7.2 测定不同浓度 Eq 干预后的细胞活力

选取第 3 至第 5 代 MPC5 细胞,在 96 孔板中使用完全培养基,以每毫升 4×10^4 个细胞的密度培养,每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 培养基。在 96 孔板生长 24 h 后,使用 RPMI-1640 培养基和 5% 胎牛血清培养,随后加入 Eq 或 GLU 再生长 24 h。每次实验设 6 个复孔。在干预结束后,加入 CCK-8 试剂,随后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵箱中进行 1 h 孵育。接着,通过多功能酶标仪在 450 nm 处检测吸光度,并据此计算细胞相对活力值。

1.2.7.3 细胞分组及干预

根据 1.2.7.2 步骤确定的 Eq 适宜浓度,将细胞分为对照(Control)组、模型(Model)组(GLU, 30 mmol/L)、LEq 组(模型+ $1 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$ Eq)、MEq 组(模型+ $1 \times 10^{-7}\text{ mol/L}$ Eq)、HEq 组(模型+ $1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ Eq),干预 24 h 后进行相关检测。

1.2.7.4 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡率

接种第 3 至第 5 代细胞到培养瓶培养,生长 24 h 后,使用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,并离心收获,随后用 PBS 重悬再离心转管,洗涤 2 次后弃上清,再加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的 Binding Buffer 重悬,并使用细胞滤网过滤,最后加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 的 Annexin V-FITC 和 PI 染色液。在室温条件下,将样品轻轻混匀并在黑暗中反应 10 min 后,向其中加入 Binding Buffer 至样本液体总量为 $500\text{ }\mu\text{L}$,随后使用流式细胞仪进行细胞凋亡率的测定。

1.2.7.5 Western blotting 检测

按照 1.2.7.3 分组制取细胞,测定各组蛋白上清浓度后,按照电泳、转膜、封闭、孵一抗、洗膜、孵二抗的顺序,完成后使用 ECL 显影,以 GADPH 为内参,Image J 软件计算各组蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 18.0 软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析和分子对接

2.1.1 Eq 抗 DN 作用靶点的获得

经过筛选,我们获得了 230 个 Eq 靶点和 4 298 个 DN 靶点。经过 Venn 图取交集,我们获得 128 个共同靶点,这些靶点即是 Eq 抗 DN 的作用潜在靶

点,如图 1 所示。

2.1.2 构建 PPI 网络和“成分-靶点-通路-疾病”网络

在 1.2.3 部分,在 STRING 数据库输入共同靶点,以此构建蛋白相互作用网络,具体展示于图 2。

PPI 网络交集靶点包含 114 个节点,489 条边,其中图形越大,颜色越深的,在蛋白质相互作用中产生的交集越多,越可能是参与反应的关键靶点。借助 Cytoscape3.8.0 软件,我们绘制了 Eq 抗 DN 蛋白靶点-通路相互作用图,如图 3 所示。

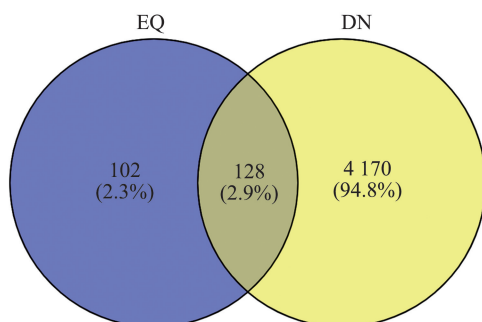


图 1 Eq 抗 DN 作用靶点
Figure 1 Equol acts on the target of diabetic nephropathy

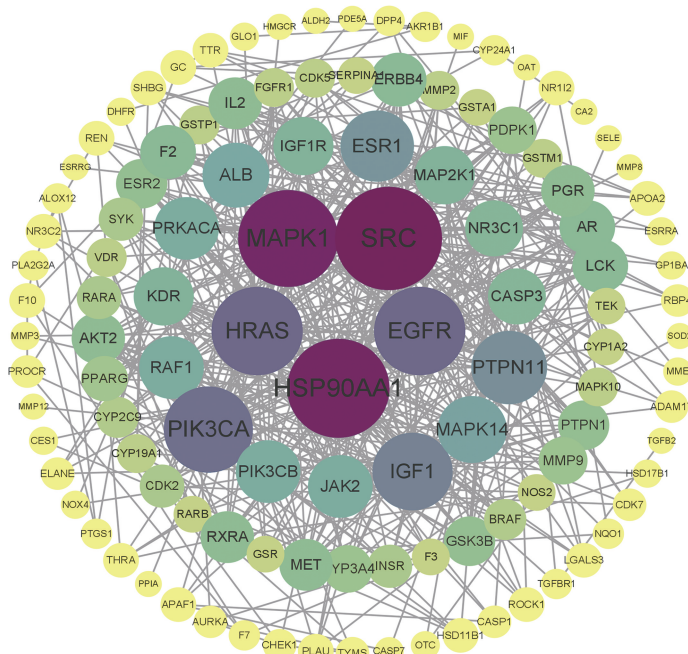


图 2 蛋白相互作用网络
Figure 2 Protein interaction networks

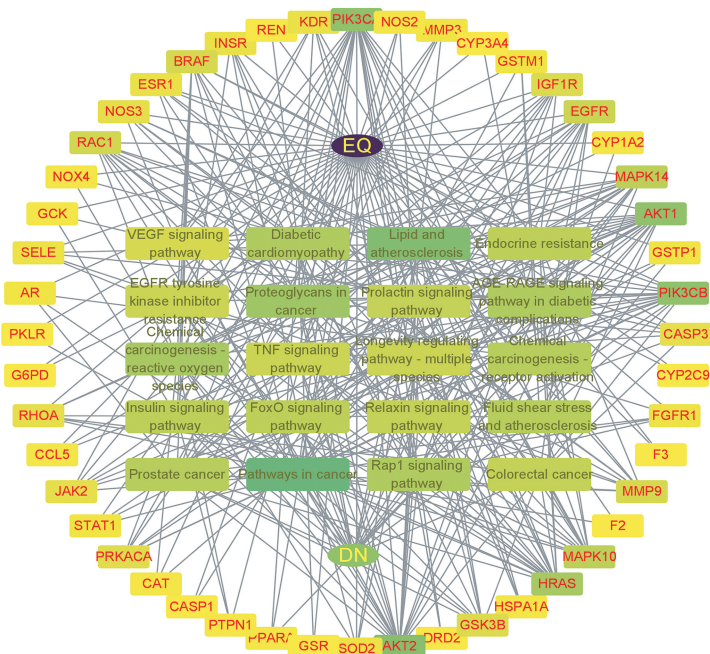


图 3 Eq 抗 DN 的蛋白靶点-通路相互作用
Figure 3 Protein target-pathway interaction of equol intervention in diabetic nephropathy

依据 Cytoscape3.8.0 软件中计算得出的 Betweenness (BC)、Closeness (CC)、Degree (DC) 数值,我们选取参数大于等于上述三个数值的靶点为核心靶点,得到 Eq 抗 DN 的核心靶点包括 PIK3CB、PIK3CA、AKT2、MAPK1、HRAS、RAF1、MAP2K1、EGFR 等。

2.1.3 GO、KEGG 通路富集分析

在 GO 富集分析中,我们得到了 614 条富集过程的结果,其中生物过程 (BP) 425 条目,细胞组成 (CC) 有 57 条目,分子功能 (MF) 有 132 条目,柱状图颜色代表显著性,颜色越偏向红色,显著性越强;

横坐标柱状图长短代表参与该功能的靶点数目,数目越大,参与该功能靶点越多。如图 4 所示。

KEGG 富集分析结果表明,富集的通路共有 150 条。依据 $P < 0.05$,选取前 10 个条目构建 GO 富集柱状图以及前 20 个条目作为 KEGG 柱状图,如图 5 所示。BP 富集结果为:蛋白激酶 B 信号转导的正调节、凋亡负反馈、信号转导、mapk 级联的正调节、蛋白质磷酸化、蛋白质自身磷酸化、细胞迁移的正调控、正向调节磷脂酰肌醇 3-激酶信号、蛋白质水解、胰岛素样生长因子受体信号通路等。

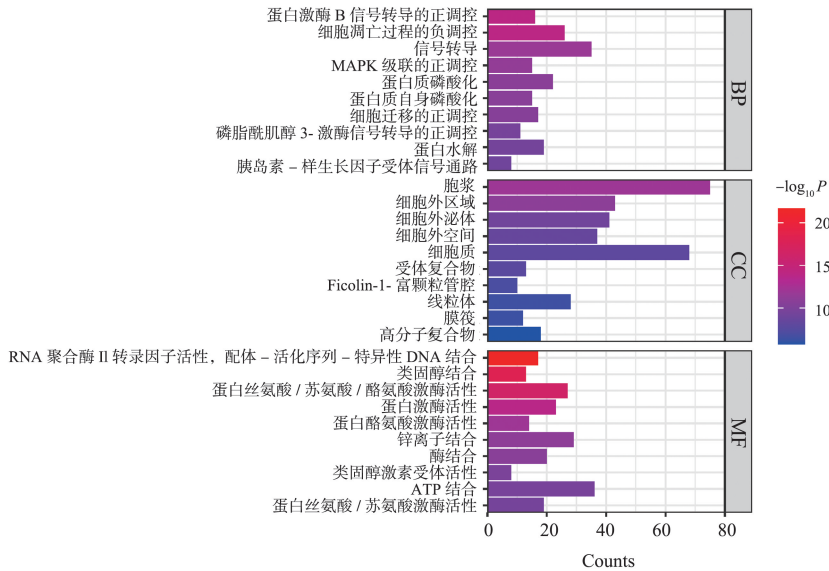


图 4 GO 富集结果

Figure 4 GO analysis results

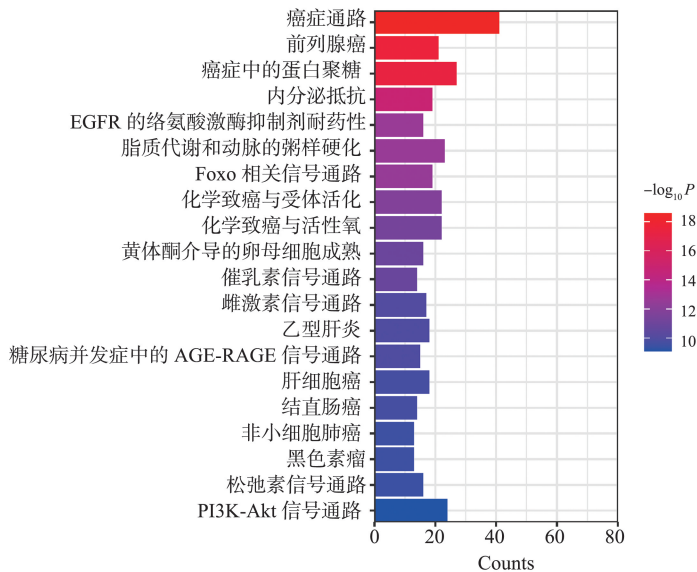


图 5 KEGG 富集结果

Figure 5 KEGG analysis results

KEGG 前 20 富集通路为:癌症中的途径、前列腺癌、癌症中的蛋白聚糖、内分泌抵抗、EGFR 的络

氨酸激酶抑制剂耐药性、脂质代谢和动脉的粥样硬化、Foxo 相关信号通路、化学致癌与受体活化、化学

致癌与活性氧、孕酮与卵母细胞成熟、催乳素信号通路、雌激素信号通路、乙型肝炎、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、肝细胞癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、松弛素信号通路、PI3K-AKT 信号通路等。

2.1.4 分子对接结果

为了评估候选药物与其靶标的亲和力,我们

进行分子对接分析。在 Eq 与靶蛋白的特异性对接模型中,靶蛋白以深蓝色的卡通形态呈现,配体则以青色的棍棒模型展示,它们之间的结合点表示为品红色棍棒结构。氢键,离子相互作用,疏水相互作用在图 6 中分别以黄色,品红色和绿色虚线表示。

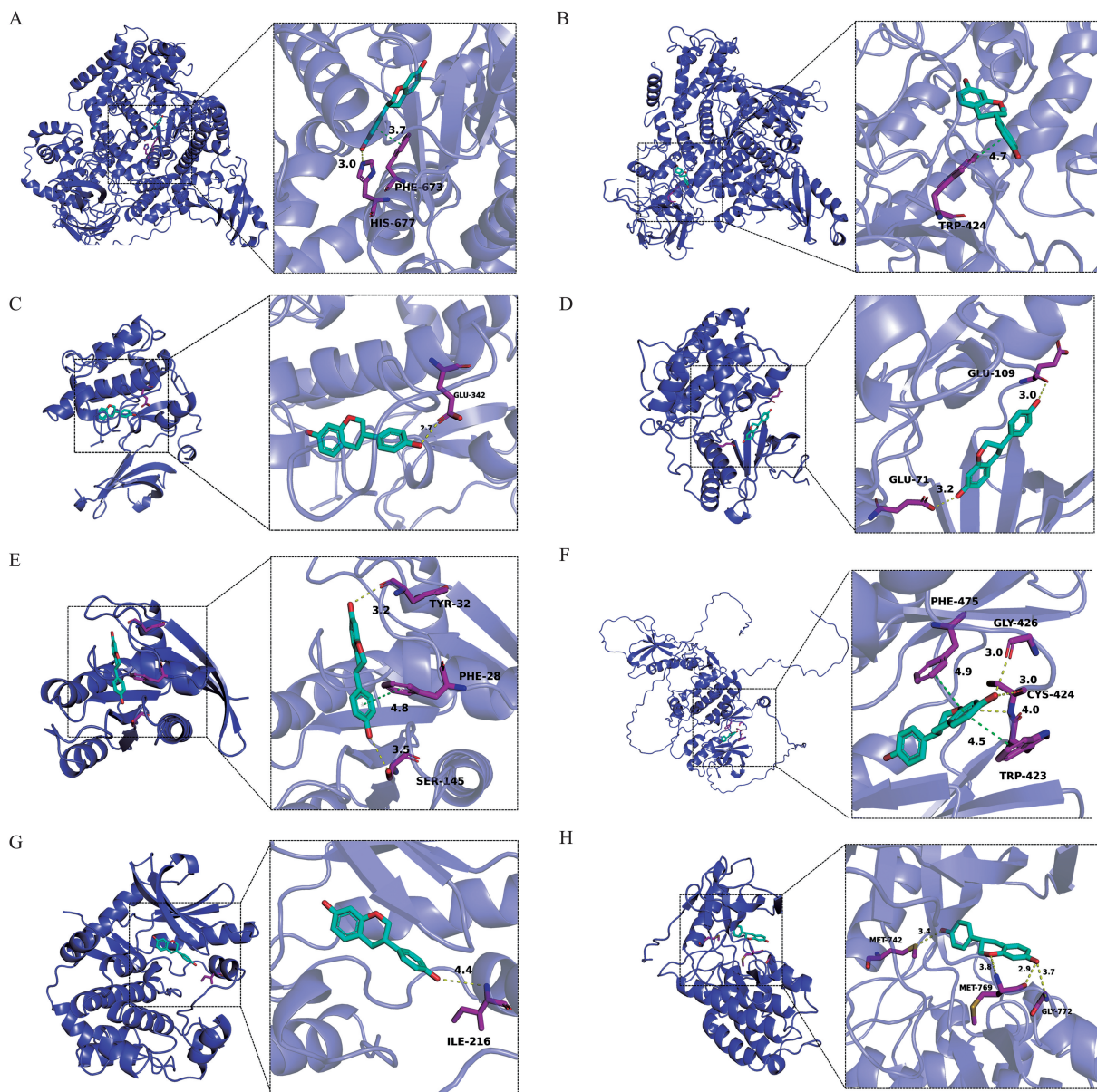


图 6 雌马酚与靶蛋白分子对接图

A:雌马酚与 PIK3CB 结合图;B:雌马酚与 PIK3CA 结合图;C:雌马酚与 AKT2 结合图;D:雌马酚与 MAPK1 结合图;E:雌马酚与 HRAS 结合图;F:雌马酚与 RAF1 结合图;G:雌马酚与 MAP2K1 结合图;H:雌马酚与 EGFR 结合图。

Figure 6 Docking diagram of equol with target protein molecules

A:Binding diagram of equol and PIK3CB; B:Binding diagram of equol and PIK3CA; C:Binding diagram of equol and AKT2; D:Binding diagram of equol and MAPK1; E:Binding diagram of equol and HRAS; F:Binding diagram of equol and RAF1; G:Binding diagram of equol and MAP2K1; H:Binding diagram of equol and EGFR.

我们将发现的相互作用力进行分析,并计算结合时产生的结合能。受体蛋白与小分子之间形成了多组相互作用力,这些相互作用力共同影响了蛋白质-

小分子复合物的结合能。结合能数值表示药物与靶蛋白结合需要的能量,能量越小结合体越稳定;一般情况下,结合能小于 -5 kcal/mol 可认为两者有良好

的结合能力^[17],见表 1,这表明雌马酚与上述靶点蛋白接触时能够自发且稳定地与上述各个靶点结合。

表 1 雌马酚与靶蛋白分子复合物的结合能对接结果

药物	靶点	Uniprot 数据库识别码	结合能 (kcal/mol)
Equol	PIK3CB	P42338	-7.6
Equol	PIK3CA	P42336	-8.1
Equol	AKT2	P31751	-8.9
Equol	MAPK1	P28482	-7.5
Equol	HRAS	P01112	-8.2
Equol	RAF1	P04049	-7.6
Equol	MAP2K1	Q02750	-8.2
Equol	EGFR	P00533	-7.2

2.2 细胞实验

2.2.1 测定不同浓度 Eq 干预后的细胞活力

在 CCK-8 测定中,与对照组相比,细胞活力显著降低($P<0.05$)时雌马酚干预浓度为 1×10^{-4} mol/L,如图 7 所示。基于此,本研究选取每组分别添加 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-6} mol/L 三个不同浓

度的 Eq 进行细胞凋亡实验。

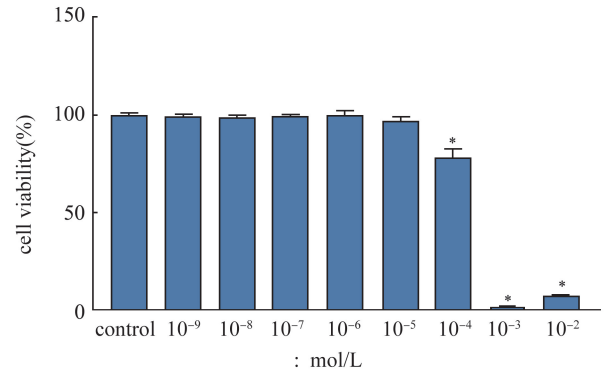


图 7 不同浓度 Eq 干预下对细胞活力 (* $P<0.05$ vs 对照组)
Figure.7 Effect of different concentrations of Eq on cell viability(* $P<0.05$ vs the control group)

2.2.2 Eq 干预对各组细胞凋亡率的影响

与对照组 (3.42 ± 1.10)% 相比,模型组凋亡率 (13.42 ± 2.36)% 显著提高($P<0.05$);经过 Eq 干预,LEq、MEq、HEq 的凋亡率分别为 (12.00 ± 2.01)%、(7.11 ± 1.56)%、(5.20 ± 1.19)%,三组的凋亡率均较模型组显著下降($P<0.05$),如图 8 所示。

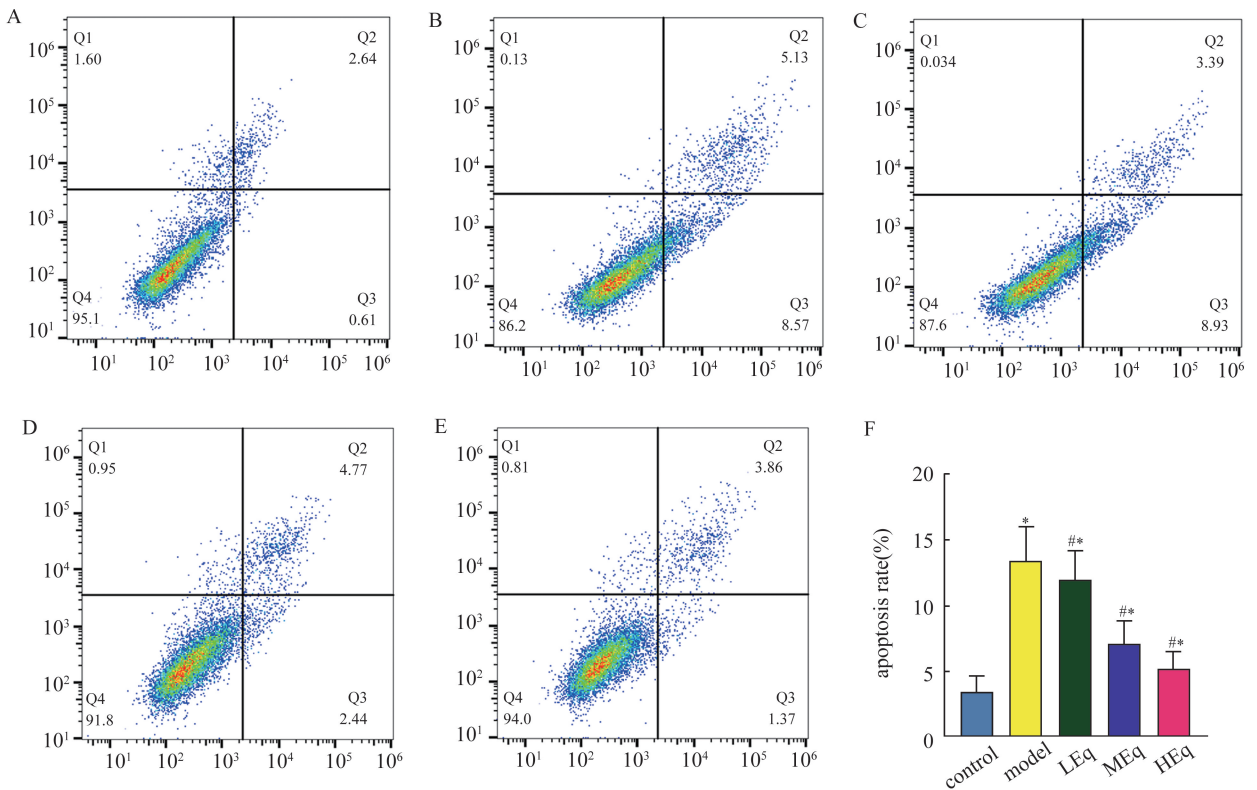


图 8 Eq 干预对各组细胞凋亡率的影响 (* $P<0.05$ vs 对照组;# $P<0.05$ vs 模型组)

A: 对照组;B: 模型组;C: LEq 组;D: MEq 组;E: HEq 组;F: 各组凋亡率。

Figure 8 Effect of Eq intervention on apoptosis rate in each group(* $P<0.05$ vs the control group; # $P<0.05$ vs the model group)

A: Control group; B: Model group; C: LEq group; D: MEq group; E: HEq group; F: Apoptosis rate in each group.

2.2.3 Eq 干预抑制 MPC5 细胞 EGFR 相关通路

WB 检测结果表明,与对照组比较,模型组细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著降低($P<0.05$),而 P-EGFR/EGFR、Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达

水平显著升高($P<0.05$),EGFR 蛋白表达水平与对照组相比差异无统计学意义;与模型组比较,各干预组细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著升高($P<0.05$),而 P-EGFR/EGFR、Bax 和 Cleaved Caspase-3

蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), EGFR 蛋白表达水平差异无统计学意义, 见图 9。

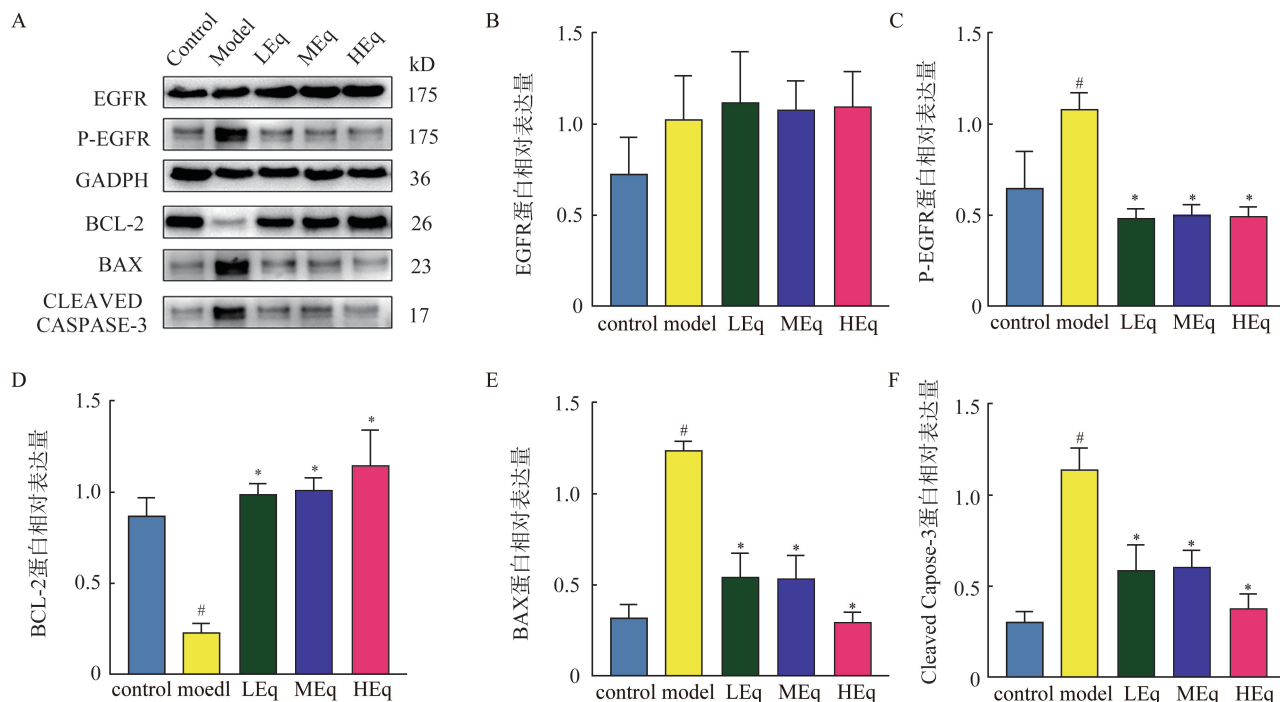


图 9 Eqs 干预对各组细胞蛋白含量的表达 (* $P < 0.05$ vs 对照组; # $P < 0.05$ vs 模型组)

A: Western blotting 检测结果; B: EGFR 蛋白相对表达量; C: P-EGFR 蛋白相对表达量; D: Bcl-2 蛋白相对表达量; E: Bax 蛋白相对表达量; F: Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量。

Figure 9 Effect of Eqs intervention on the expression of cell protein content in each group (* $P < 0.05$ vs the control group; # $P < 0.05$ vs the model group)

A: Western blotting test results; B: Relative expression of EGFR protein; C: Relative expression of P-EGFR protein; D: Relative expression of bcl-2 protein; E: Relative expression of BAX protein; F: Relative expression of Cleaved Caspase-3 protein.

3 讨论

糖尿病肾病的发病率不断攀升,已成为全球性的公共卫生问题^[18]。DN 的发展过程涉及多种因素,主要包括高血糖引起的代谢失调、炎症反应、微血管损伤以及肾间质纤维化等^[19]。目前临床实践中,对糖尿病肾病治疗手段有限,患者预后较差,亟待开发新的治疗方法和药物。

近年来,多酚类化合物,尤其是大豆异黄酮及其代谢产物雌马酚,因具有雌激素活性和抗氧化特性,显示出改善多种健康问题的潜力^[20-21]。众多研究发现雌马酚具有降低心血管疾病风险,预防骨质疏松,以及降低肿瘤发生风险等多种健康保护功能^[22-26]。我国成年人群中的前瞻性队列研究显示,尿液中雌马酚含量与体质量指数、体脂率之间存在显著的独立负相关性^[27]。此外,在本实验室前期研究中,通过高脂饮食结合去卵巢操作诱导的大鼠肥胖模型,发现 40 mg/kg Eqs 灌胃干预 12 周后,显著减轻了大鼠体质量^[28]。这些研究为雌马酚在糖尿

病肾病治疗中的应用提供了初步证据。

网络药理学和分子对接技术作为新兴的生物信息学工具,在早期药物有效性研究中展现出了较高的可信度与可行性^[29-31]。本研究利用这些方法揭示了雌马酚可能作用于糖尿病肾病治疗的多个靶点,其中包括 PIK3CB、PIK3CA、AKT2、MAPK1、HRAS、RAF1、MAP2K1、EGFR 等关键靶点,这些靶点主要在细胞增殖、分化以及凋亡等方面起作用。EGFR 作为细胞膜蛋白,在已知信号通路中占据上游位置,且可被雌激素相关通路激活^[32-34],而雌马酚又具有类雌激素效应^[35],故我们重点关注雌马酚对 EGFR 相关通路的效应。

我们的研究表明,在模型组中 EGFR 磷酸化水平显著增加,这一发现与先前他人在动物模型研究中的结论相一致^[36]。此外,在小鼠模型中,足细胞 EGFR 基因敲除减轻了糖尿病肾病的进展^[37]。这些结果在临床研究中也得到了验证,与健康对照组相比,各慢性肾脏病阶段的糖尿病肾病患者血清中表皮生长因子水平普遍升高^[38]。

本研究进一步探讨了雌马酚对 EGFR 信号通路

的调节作用及其对足细胞凋亡的影响。我们发现,雌马酚通过调节 EGFR 信号,能够改善抗凋亡蛋白的表达,进而对促凋亡蛋白 Bax 以及裂解的胱天蛋白酶-3 产生影响,而减少促凋亡相关蛋白胱天蛋白酶-3 和胱天蛋白酶-8 的表达,可以降低蛋白尿,改善肾功能^[39]。在本研究中,高糖环境下足细胞的凋亡率显著增加,而雌马酚的干预显著改善了这一现象。类似的研究也表明雌马酚能够改善成骨细胞的凋亡^[40],这些研究进一步证实了其在抗细胞凋亡方面的广泛潜力,为糖尿病肾病的治疗提供了新的视角。

综上,本研究验证了雌马酚对足细胞的抗凋亡作用,并通过网络药理学和分子对接技术探讨了其对肾脏足细胞保护作用的潜在靶点。此外,雌马酚在糖尿病肾病预防和辅助治疗中具有一定的应用价值,其机制可能与 EGFR 通路相关。但本实验仅涉及细胞层面的现象,实验证据有所欠缺,我们将进一步完成动物实验,后续更要基于临床样本和人群研究,来进一步验证雌马酚对 DN 患者的健康效应。

参考文献:

- [1] Jitraknatee J, Ruengorn C, Nochaiwong S. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease among type 2 diabetes patients: a cross-sectional study in primary care practice[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6205. doi:10.1038/s41598-020-63443-4.
- [2] Podgórski P, Konieczny A, LIS Ł, et al. Glomerular podocytes in diabetic renal disease[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2019, 28(12): 1711-1715.
- [3] Li XL, Zhu QQ, Zheng R, et al. Puerarin attenuates diabetic nephropathy by promoting autophagy in podocytes[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 73. doi:10.3389/fphys.2020.00073.
- [4] Conti S, Remuzzi G, Benigni A, et al. Imaging the kidney with an unconventional scanning electron microscopy technique: analysis of the subpodocyte space in diabetic mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1699. doi:10.3390/ijms23031699.
- [5] Pool KR, Kent TC, Blache D. Oestrogenic metabolite equol negatively impacts the functionality of ram spermatozoa in vitro[J]. *Theriogenology*, 2021, 172: 216-222. doi:10.1016/j.theriogenology.2021.07.005.
- [6] Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, et al. Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback[J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(4): 1188-1195.
- [7] Choi EJ, Kim GH. The antioxidant activity of daidzein metabolites, O-desmethylangolensin and equol, in HepG2 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(1): 328-332. doi:10.3892/mmr.2013.1752.
- [8] Wei XJ, Wu J, Ni YD, et al. Antioxidant effect of a phytoestrogen equol on cultured muscle cells of embryonic broilers[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011, 47(10): 735-741.
- [9] Gong YN, Lv JP, Pang XY, et al. Advances in the metabolic mechanism and functional characteristics of equol[J]. *Foods*, 2023, 12(12): 2334. doi:10.3390/foods12122334.
- [10] Mayo B, Vázquez L, Flórez AB. Equol: a bacterial metabolite from the daidzein isoflavone and its presumed beneficial health effects[J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 2231. doi:10.3390/nu11092231.
- [11] Sekikawa A, Wharton W, Butts B, et al. Potential protective mechanisms of S-equol, a metabolite of soy isoflavone by the gut microbiome, on cognitive decline and dementia[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11921. doi:10.3390/ijms231911921.
- [12] 李硕, 倪向敏, 徐喆, 等. 雌马酚对 2 型糖尿病大鼠的肾脏保护作用[J]. *陆军军医大学学报*, 2022, 44(10): 1009-1017.
LI Shuo, NI Xiangmin, XU Zhe, et al. Renal protective effect of equol on type 2 diabetic rats[J]. *Journal of Army Medical University*, 2022, 44(10): 1009-1017.
- [13] Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, et al. AutoDock vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings[J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(8): 3891-3898.
- [14] Wang YL, Bryant SH, Cheng TJ, et al. PubChem BioAssay: 2017 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(1): 955-963.
- [15] Yu CP, Zhang H, Liu SX, et al. Flot2 acts as a novel mediator of podocyte injury in proteinuric kidney disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(2): 502-520.
- [16] Hsu MF, Ito Y, Afkarian M, et al. Deficiency of the Src homology phosphatase 2 in podocytes is associated with renoprotective effects in mice under hyperglycemia[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(10): 516. doi:10.1007/s00018-022-04517-6.
- [17] 范晓艳, 王元耕, 陈泽涛. 黄芪桂枝五物汤治疗心衰的网络药理学机制[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2022, 60(11): 70-81.
FAN Xiaoyan, WANG Yuangeng, CHEN Zetao. Network pharmacologic mechanism of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction in treating heart failure[J]. *Journal of Shandong University(Health Sciences)*, 2022, 60(11): 70-81.
- [18] Wu Y, Chen Y. Research progress on ferroptosis in diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 945976. doi:10.3389/fendo.2022.945976.

- [19] Srivastava SP, Kanasaki K, Goodwin JE. Editorial: combating diabetes and diabetic kidney disease[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 716029. doi:10.3389/fphar.2021.716029.
- [20] Osuna-Prieto FJ, Martinez-Tellez B, Segura-Carretero A, et al. Activation of brown adipose tissue and promotion of white adipose tissue browning by plant-based dietary components in rodents: a systematic review[J]. *Adv Nutr*, 2021, 12(6): 2147-2156.
- [21] Nishad R, Meshram P, Singh AK, et al. Activation of Notch1 signaling in podocytes by glucose-derived AGEs contributes to proteinuria[J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2020, 8(1): e001203. doi:10.1136/bmjdr-2020-001203.
- [22] Zhu JJ, Zhao Q, Qiu Y, et al. Soy isoflavones intake and obesity in Chinese adults: a cross-sectional study in Shanghai, China[J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2715. doi:10.3390/nu13082715.
- [23] Nakai S, Fujita M, Kamei Y. Health promotion effects of soy isoflavones[J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2020, 66(6): 502-507.
- [24] Mayo B, Vázquez L, Flórez AB. Equol: a bacterial metabolite from the daidzein isoflavone and its presumed beneficial health effects[J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 2231. doi:10.3390/nu11092231.
- [25] Takahashi A, Anzai Y, Tanji N, et al. Association of equol with obesity in postmenopausal women[J]. *Menopause*, 2021, 28(7): 807-810.
- [26] Takahashi A, Kokubun M, Anzai Y, et al. Association between equol production and metabolic syndrome in Japanese women in their 50s-60s[J]. *Menopause*, 2022, 29(10): 1196-1199.
- [27] Wu YY, Gou WL, Yan Y, et al. Gut microbiota and acylcarnitine metabolites connect the beneficial association between equol and adiposity in adults: a prospective cohort study[J]. *Am J Clin Nutr*, 2022, 116(6): 1831-1841.
- [28] 张贵明, 倪向敏, 崔涵强, 等. 雌马酚对肥胖模型大鼠脂代谢的影响[J]. *营养学报*, 2023, 45(3): 287-293. ZHANG Guiming, NI Xiangmin, CUI Hanqiang, et al. Effect of equol on lipid metabolism in obese rats[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2023, 45(3): 287-293.
- [29] Boezio B, Audouze K, Ducrot P, et al. Network-based approaches in pharmacology[J]. *Mol Inform*, 2017, 36(10): 10. doi:10.1002/minf.201700048.
- [30] Guo MF, Dai YJ, Gao JR, et al. Uncovering the mechanism of Astragalus membranaceus in the treatment of diabetic nephropathy based on network pharmacology[J]. *J Diabetes Res*, 2020: 5947304. doi: 10.1155/2020/5947304.
- [31] Agu PC, Afiukwa CA, Orji OU, et al. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 13398. doi:10.1038/s41598-023-40160-2.
- [32] Ge LC, Chen ZJ, Liu HY, et al. Involvement of activating ERK1/2 through G protein coupled receptor 30 and estrogen receptor α/β in low doses of bisphenol A promoting growth of Sertoli TM4 cells [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 226(1): 81-89.
- [33] Zhao Y, Liu HK, Fan MZ, et al. G protein-coupled receptor 30 mediates cell proliferation of goat mammary epithelial cells via MEK/ERK&PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(19): 2027-2037.
- [34] Lei BL, Xu LB, Zhang XL, et al. The proliferation effects of fluoxetine and amitriptyline on human breast cancer cells and the underlying molecular mechanisms [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2021, 83: 103586. doi:10.1016/j.etap.2021.103586.
- [35] Ariyani W, Miyazaki W, Koibuchi N. A novel mechanism of S-equol action in neurons and astrocytes: the possible involvement of GPR30/GPER1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5178. doi:10.3390/ijms20205178.
- [36] Perlman AS, Chevalier JM, Wilkinson P, et al. Serum inflammatory and immune mediators are elevated in early stage diabetic nephropathy[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2015, 45(3): 256-263.
- [37] Chen JC, Chen JK, Harris RC. EGF receptor deletion in podocytes attenuates diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(5): 1115-1125.
- [38] Harskamp LR, Gansevoort RT, van Goor H, et al. The epidermal growth factor receptor pathway in chronic kidney diseases[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(8): 496-506.
- [39] 杨元凤, 熊高才, 黎豫川, 等. 鹿苓安肾颗粒对慢性肾功能衰竭大鼠炎症反应及细胞凋亡的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2023, 61(10): 9-16. YANG Yuanfeng, XIONG Gaocai, LI Yuchuan, et al. Effects of Luling Anshen Granule on the inflammatory response and cell apoptosis in rats with chronic renal failure [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2023, 61(10): 9-16.
- [40] Ni XM, Wu B, Li S, et al. Equol exerts a protective effect on postmenopausal osteoporosis by upregulating OPG/RANKL pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154509. doi:10.1016/j.phymed.2022.154509.