

# 参芪泄浊饮通过调控 Rap1/MAPK/FoxO3a 信号通路改善氧化应激及炎症反应延缓大鼠肾纤维化

卢晓宇<sup>1</sup>, 刘智慧<sup>1</sup>, 刘 焯<sup>2</sup>, 庞天霄<sup>2</sup>, 卞 蓉<sup>2</sup>, 郭 玲<sup>2</sup>, 何学红<sup>2</sup>

<sup>1</sup>辽宁中医药大学第一临床学院, 辽宁 沈阳 110847; <sup>2</sup>辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110083

**摘要:**目的 明确参芪泄浊饮(SQXZD)的化学成分,并结合网络药理学及实验阐明 SQXZD 延缓大鼠肾纤维化的作用机制。方法 通过 Q Exactive 高分辨液质联用系统(UPLC-Q Exactive/MS)鉴定 SQXZD 化学成分。基于 SQXZD 化学成分构建 SQXZD 延缓肾纤维化的成分-疾病靶点网络,并进行富集分析以筛选关键通路与作用靶标。将 49 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分成空白组,假手术组,模型组,氯沙坦组(4.6 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)及 SQXZD 低、中、高剂量组(9.7、19.4、38.8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。除空白组及假手术组,其他组大鼠均以单侧输尿管结扎法复制肾纤维化模型。造模成功并连续灌胃 14 d 后取材,HE 染色观察术侧肾组织病理变化,Masson 染色观察术侧肾组织胶原沉积面积,全自动生化分析仪检测血清 BUN、Cr 水平,ELISA 法检测血清 SOD、MDA、GSH-px、IL-6、TNF-α 水平;Western blotting 及 qRT-PCR 检测各组大鼠术侧肾组织 α-SMA、Col-I、NAKED2、Rap1、B-raf、Raf-1、MEK3/6、p38MAPK、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、FoxO3a、p-FoxO3a 及 MnSOD 表达及 mRNA 转录水平。结果 从 SQXZD 中鉴定出 263 种化学成分;网络药理学获得 SQXZD 成分和肾纤维化疾病交集靶点 170 个,分析显示 SQXZD 延缓肾纤维化可能与 MAPK、Rap1、FoxO 等通路相关。动物实验显示,与假手术组比较,模型组大鼠术侧肾组织结构异常、纤维化面积扩大;血清 BUN、Cr、MDA、IL-6、TNF-α 水平升高(P<0.01),SOD 及 GSH-px 水平下降(P<0.01);术侧肾组织 α-SMA、Col-I、NAKED2、Rap1、B-raf、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、MEK3/6、p38MAPK 表达及其 mRNA 转录水平上调(P<0.01),Raf-1、FoxO3a、p-FoxO3a 及 MnSOD 表达及其 mRNA 转录水平下调(P<0.01)。与模型组相比,各给药组大鼠术侧肾组织结构可见不同程度改善,纤维化面积可见不同程度减少;血清 BUN、Cr、MDA、IL-6、TNF-α 水平下降,SOD 及 GSH-px 水平升高,SQXZD 高剂量组及氯沙坦组差异具有统计学意义(P<0.05),SQXZD 中剂量组差异具有统计学意义(P<0.01);术侧肾组织 α-SMA、Col-I、NAKED2、Rap1、B-raf、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、MEK3/6、p38MAPK 表达及其 mRNA 转录水平下调,Raf-1、FoxO3a、p-FoxO3a 及 MnSOD 表达及其 mRNA 转录水平上调,SQXZD 低、高剂量组及氯沙坦组差异具有统计学意义(P<0.05),SQXZD 中剂量组差异具有统计学意义(P<0.01)。结论 SQXZD 可改善肾功能、延缓肾纤维化,其机制可能是调控 Rap1/MAPK/FoxO3a 信号通路以改善氧化应激及炎症状态。

**关键词:**参芪泄浊饮;肾纤维化;氧化应激;炎症因子;Rap1/MAPK/FoxO3a 信号通路

## Shenqi Xiezhuo Decoction alleviates renal fibrosis in rats by ameliorating oxidative stress and inflammation through the Rap1/MAPK/FoxO3a signaling pathway

LU Xiaoyu<sup>1</sup>, LIU Zhihui<sup>1</sup>, LIU Ye<sup>2</sup>, PANG Tianxiao<sup>2</sup>, BIAN Rong<sup>2</sup>, GUO Ling<sup>2</sup>, HE Xuehong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>First Clinical College of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; <sup>2</sup>Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110083, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of Shenqi Xiezhuo Decoction (SQXZD) for improving renal fibrosis (RF) in rats. **Methods** The chemical components of SQXZD were identified using UPLC-Q Exactive/MS, and component-disease target network and enrichment analyses were conducted to screen the key pathways and targets. In the animal experiment, 49 male SD rats were randomized equally into blank control group, sham operation group, unilateral ureteral obstruction-induced RF model group, losartan treatment (daily dose 4.6 mg/kg) group, and low-, medium-, and high-dose SQXZD (9.7, 19.4, and 38.8 g/kg, respectively) treatment groups. After 14 days' treatment, renal pathologies and collagen deposition of the rats were examined with HE and Masson staining, and serum levels of BUN, Cr, SOD, MDA, GSH-px, IL-6, and TNF-α were detected. Western blotting and qRT-PCR were used to detect renal protein and mRNA expressions of α-SMA, Col-I, NAKED2, Rap1, B-raf, Raf-1, MEK3/6, p38MAPK, MEK, ERK1/2, p-ERK1/2, FoxO3a, p-FoxO3a, and MnSOD. **Results** A total of 263 chemical components were identified in SQXZD. Network pharmacology revealed 170 intersecting targets between the components and RF enriched in the MAPK, Rap1, and FoxO pathways. The rat models of RF showed abnormal renal structural changes, increased fibrosis area, elevated serum BUN, Cr, MDA, IL-6, and TNF-α levels, reduced SOD and GSH-px levels, upregulated renal expressions of α-SMA, Col-I, NAKED2, Rap1, B-raf, MEK, ERK1/2, p-ERK1/2, MEK3/6, and p38MAPK, and downregulated Raf-1, FoxO3a, p-FoxO3a, and MnSOD expressions. Treatment with losartan and SQXZD (especially at the medium dose) obviously lessened renal pathologies, improved renal functions, alleviated oxidative stress and inflammation, and ameliorated abnormal changes in the Rap1/MAPK/FoxO3a signaling pathway in the rat models. **Conclusion** SQXZD alleviates RF and improves renal function in rats possibly by ameliorating renal oxidative stress and inflammation via regulating the Rap1/MAPK/FoxO3a signaling pathway.

收稿日期:2025-06-30

基金项目:国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyzdxx-2023033, zyzdxx-2023036);辽宁省科学技术计划面上项目(2024-MS-124);2022年全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号)

作者简介:卢晓宇,在读博士研究生,主治医师,E-mail:dfs1107@163.com

通信作者:何学红,主任医师,博士生导师,E-mail:lnzysnk@163.com;

郭 玲,硕士,主任医师,硕士生导师,E-mail:vivi\_gling@163.com

**Keywords:** Shenqi Xiezhuo Decoction; renal fibrosis; oxidative stress; inflammatory factors; Rap1/MAPK/FoxO3a signaling pathway

肾纤维化是包括慢性肾衰竭在内的多种慢性肾脏疾病的主要病理改变<sup>[1]</sup>,其本质为肾脏慢性持续性损伤后的过度修复,以细胞外基质(ECM)过度及病理性沉积在肾实质为特征,表现为肾小管细胞丢失、成纤维细胞聚集以及肾小管周围微血管网稀疏等<sup>[2,3]</sup>,最终导致终末期肾功能衰竭。2021年我国慢性肾脏病发病率为233.57/10万,患者约1.184亿<sup>[4]</sup>。成纤维细胞的活化是导致ECM过度沉积的主要原因之一<sup>[5]</sup>,该过程与氧化应激(OS)及炎症密切相关<sup>[6,7]</sup>。OS是由于体内氧化与抗氧化的失衡,表现为氧化物的大量堆积<sup>[8]</sup>。活性氧(ROS)的大量堆积可介导多个途径导致OS,包括纤维细胞或巨噬细胞的聚集、成纤维细胞到肌成纤维细胞的转化、内皮-间充质过渡及肾小管上皮细胞上皮间质转化(EMT)<sup>[6]</sup>,并释放促炎因子进一步加剧OS<sup>[9,10]</sup>。除ROS介导的炎症外,肌酐、尿素氮等毒素在体内的大量蓄积亦可导致慢性肾脏病患者体内促炎因子呈高水平状态<sup>[11]</sup>,可诱导或加剧OS以加速肾纤维化进程<sup>[7]</sup>。因此,干预OS及炎症是延缓肾纤维化进展的重要方向。

现代医学对肾纤维化暂无有效治疗手段,中药复方在延缓肾纤维化进展方面具有较大优势。参芪泄浊饮为课题组治疗慢性肾衰竭的经验方,前期实验已证实该方可调节MCP-1等炎症相关因子以延缓大鼠肾纤维化<sup>[12]</sup>,但中药复方成分复杂,具有多靶点、多途径发挥疗效的特点,尚需进一步探讨其调控OS及炎症途径的机制。因此,本研究采用UPLC-Q Exactive/MS技术分析参芪泄浊饮化学成分、网络药理学预测参芪泄浊饮延缓肾纤维化的可能信号通路,测定肾纤维化大鼠体内OS及炎症相关标志物水平,并对富集程度较强的OS及炎症相关信号通路加以验证,以期为该方减轻OS及炎症以延缓肾纤维化提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 数据库

通用蛋白质数据库(UniProt)<sup>[13]</sup>(网址:https://www.uniprot.org/)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)<sup>[14]</sup>(网址:https://omim.org)、GeneCards数据库<sup>[15]</sup>(网址:https://www.genecards.org)、DISGENET数据库<sup>[16]</sup>(网址:https://www.disgenet.com)、STRING数据库<sup>[17]</sup>(网址:https://cn.string-db.org/)、功能注释生物信息学分析数据库(DAVID)<sup>[18]</sup>(网址:https://david.ncicrf.gov/)。

### 1.2 实验试剂、仪器及动物

#### 1.2.1 药品及试剂 参芪泄浊饮小包装中药饮片(黄芪

30 g、太子参15 g、熟地黄15 g、佩兰10 g、山茱萸10 g、茯苓15 g、牡丹皮12 g、丹参10 g、大黄9 g、姜半夏10 g、炒白术15 g、陈皮15 g、藿香10 g、山药10 g、砂仁10 g、菟丝子10 g)由安徽普仁药业有限公司提供,购于辽宁中医药大学附属医院中草药局,所有饮片均经我院中草药局冷玉杰主任药师鉴定为正品,符合2020版《中国药典》标准。

氯沙坦钾片[(50 mg/片), Organon Pharma(UK) Limited]; 甲醇[色谱纯, Thermo Fisher(China) Limited]; 甲酸(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); NAKED2 抗体(Affinity);  $\alpha$ -SMA 抗体、Collagen I 抗体、Rap1 抗体、B-raf 抗体、Raf-1 抗体、MEK 抗体、MEK3/6 抗体、p38MAPK 抗体、ERK1/2 抗体、p-ERK1/2 抗体、FoxO3a 抗体、p-FoxO3a 抗体、MnSOD 抗体(bioworld); 免染 PAGE 凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶); PVDF 膜(0.45  $\mu$ m)(Solarbio);  $\beta$ -actin 抗体、强效 RIPA 裂解液、50 $\times$ Cocktail 蛋白酶抑制剂、PMSF(100 mmol/L)、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量检测试剂盒、5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、Prestained Protein Marker VII(8~195 000)、RNA 提取液、RNA 溶解液、SweScript All-in-One RT SuperMix for qPCR(One-Step gDNA Remover)、2 $\times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix、总超氧化物歧化酶(T-SOD)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)检测试剂盒、Rat TNF- $\alpha$  ELISA Kit、Rat IL-6 ELISA Kit(Servicebio)。

1.2.2 实验仪器 色谱仪, Q Exactive 高分辨质谱仪[Thermo Fisher(China) Limited]; 酶标仪(Rayto); 电子天平(千分之一)(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技); 低温离心机(湖南湘仪); 石蜡切片机(Leica); 垂直电泳仪、转印电泳仪、化学发光仪(Servicebio); 移液器(Eppendorf)。

1.2.3 实验动物 49 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 210 $\pm$ 10 g, 购于辽宁长生生物股份有限公司[SCXK(辽)2020-0001], 饲养于辽宁中医药大学 SPF 级动物中心[SYXK(辽)2024-0006]。本研究经实验动物伦理委员会批准(伦理批号:21000062024148), 严格遵循 3R 原则操作。

### 1.3 方法

1.3.1 参芪泄浊饮药液的制备 参照《中药汤剂煎煮技术规范》, 中药煎煮方法如下: 将 1 剂参芪泄浊饮组方药物除大黄、砂仁、广藿香及佩兰外全部生药以 10 倍量水浸泡 1 h。浸泡后武火加热至沸腾后文火慢煎 30 min 至

预定量,28 min时将砂仁捣碎后继续文火煎煮2 min后滤过。再以8倍量水煮沸后文火煎煮30 min至预定量,25 min时下入大黄、广藿香及佩兰继续文火煎煮5 min后滤过。合并2次滤液并浓缩至含1.94 g/mL生药的药液,分装后-20 °C保存。

1.3.2 UPLC-Q Exactive/MS测定参芪泄浊饮的化学成分 将1.3.1制备的药液混匀后取200  $\mu$ L,加入800  $\mu$ L甲醇,涡旋混匀10 min,13 000 r/min离心10 min,取上清上机分析。

1.3.2.1 色谱条件 Thermo Fisher Scientific AQ-C18色谱柱(150 $\times$ 2.1 mm,1.8  $\mu$ m,Welch),水相为0.1%甲酸/水溶液,有机相为甲醇。体积流量0.3 mL/min;柱温35 °C,进样量5  $\mu$ L。具体色谱梯度(表1)。

表1 色谱梯度

Tab.1 Chromatographic gradient

Time (min)	Aqueous phase proportion(%)	Organic phase proportion(%)
1	98	2
5	80	20
10	50	50
15	20	80
20	5	95
27	5	95
28	98	2
30	98	2

1.3.2.2 质谱条件 ESI离子源,正负离子切换扫描下检测,检测方式为Full mass/dd-MS2;质量扫描范围100~1500;电喷雾电压 $\pm$ 3.2 kV;碰撞气为高纯氦气,鞘气为氮气,40 Arb;辅助气为氮气,15 Arb,加热温度350 °C;毛细管温度300 °C;数据采集时间30 min。使用Compound Discoverer 3.3软件完成数据初步整理后与mzCloud数据库检索比对。

1.3.3 参芪泄浊饮活性成分相关靶点的筛选 将1.3.2中获得的活性成分导入SwissADME数据库,纳入分析的活性成分需满足下列条件:胃肠道吸收值为“high”,类药性5个指标中为“YES”的数量 $\geq$ 2<sup>[19]</sup>。将筛选后的活性成分导入Swiss Target Prediction数据库<sup>[20]</sup>,设置物种为“Homo Sapiens”预测靶点并保存所有Probability $>$ 0的靶点数据,UniProt数据库标准化、去除重复后建立靶点数据库。

1.3.4 肾纤维化相关靶点的获取 在OMIM、Genecards、DisGeNet数据库中以“renal fibrosis”“kidney fibrosis”为关键词检索、整理后得到疾病靶点,Venny 2.1在线制作网站获取药物及疾病的交集靶点并保存。

1.3.5 参芪泄浊饮活性成分-靶点网络的构建 运用Cytoscape3.10.2软件构建“参芪泄浊饮活性成分-靶点”关系网络,依托软件内置工具Network Analyzer计算出参芪泄浊饮中有效活性成分的网络拓扑参数,并根据Degree值从大到小筛选出参芪泄浊饮延缓肾纤维化的关键靶点。

1.3.6 交集靶点的功能和通路富集分析 将1.3.4获得的交集基因集上传至DAVID数据库,以“homo sapiens”为研究物种进行GO功能和KEGG通路富集分析并可可视化处理。

1.3.7 动物分组及给药 将49只雄性SD大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、氯沙坦组(4.6 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>)及参芪泄浊饮低、中、高剂量(9.7、19.4、38.8 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>)组,7只/组。各给药组的药量均经药物等效剂量换算,于造模术后24 h开始给药(1 mL/100 g),连续给药14 d。空白组及假手术组予以灌胃等体积纯净水。

1.3.8 大鼠肾纤维化模型复制 参照文献[21],采用单侧输尿管结扎法(UUO)复制大鼠肾纤维化模型,具体操作如下:适应性喂养7 d后,模型组及各给药组大鼠行UUO手术。术前禁食12 h,自由饮水。大鼠称重后40 mg/kg腹腔注射1%戊巴比妥钠,麻醉满意后备皮左下腹,消毒后逐层剪开皮肤层、肌肉层以打开腹腔,分离左侧输尿管后4-0缝合线双栓结扎而不剪断。假手术组仅开腹游离左侧输尿管而不行结扎及剪断操作。操作结束后逐层关腹并消毒创口。术中、术后室温控制在24~25 °C,术后分笼观察喂饲1 d后进入药物干预阶段。造模后,共获取有效模型大鼠35只。

1.3.9 血清肾功能测定 取材前日禁食12 h,自由饮水。次日1%戊巴比妥钠麻醉大鼠后剪开腹部,穿刺腹主动脉取血,常温静置10~15 min,4 °C离心机预冷,3000 r/min离心15 min,移液器吸出血清后装于EP管中,全自动生化分析仪测定各组大鼠血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)水平。

1.3.10 血清SOD、MDA、GSH-px、IL-6、TNF- $\alpha$ 测定 将1.3.9中的大鼠血清行ELISA检测准备,并复温所需试剂盒,严格按照试剂盒说明书操作,标准品孔加100  $\mu$ L标准品,其余检测孔加等量各组待检测样品。10 min内,在酶标仪上以空白对照孔调零后测各孔 $A_{450nm}$ ,绘制标准曲线,依照标曲公式计算各孔血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平。

1.3.11 术侧肾组织病理学观察 各组大鼠取血后取术侧肾脏,剥去肾脏表面被膜并纵向剖开,生理盐水冲洗后1/2肾脏置于4%多聚甲醛中固定,经脱水、石蜡包埋、切片、HE及Masson染色、封片等步骤,于显微镜下观察

肾脏病理变化及胶原分布情况。剩余 1/2 肾脏置于 EP 管、液氮速冻后-80 °C 冰箱保存。

1.3.12 Western blotting 检测 取各组大鼠剩余 1/2 术侧肾脏,加入强效 RIPA 裂解液以提取蛋白,BCA 法测定浓度。调节各样本总蛋白至等浓度,经电泳、转膜后,分别加入一抗  $\alpha$ -SMA、Col- I、NAKED2、Rap1、B-raf、Raf-1、MEK3/6、p38MAPK、MEK、ERK1/2、p- ERK1/2、FoxO3a、p-FoxO3a 及 MnSOD(稀释比均为 1:1000),4 °C 孵育过夜,加入二抗(1:1000),孵育 1.5 h 后显影。以  $\beta$ -actin 为内参,Image J 软件计算蛋白相对表达量。

1.3.13 qRT-PCR 检测 称取各组大鼠 20 mg 术侧肾组织,Trizol 提取总 RNA,根据试剂盒说明书进行逆转录反应,2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法分析 qRT-PCR 数据。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成(表 2)。PCR 扩增程序如下:95 °C,30 s 使其预变性;95 °C、15 s 使其变性,60 °C、30 s 退火。如此循环 40 次,荧光定量 PCR 仪完成扩增;65 °C → 95 °C,每升温 0.5 °C,采集 1 次荧光信号。

#### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 30.0 软件进行数据统计分析,计量数据

以均数±标准差表示,符合正态分布者组间比较采用单因素方差分析或 *t* 检验,不符合正态分布则采用非参数检验法。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 参芪泄浊饮药液成分鉴定

采用 UPLC-Q Exactive/MS 对参芪泄浊饮药液样品进行分析,总离子流图(图 1)。质谱信息经与 mzCloud 数据库比对,从参芪泄浊饮药液样品中鉴定出 263 个化学成分。

### 2.2 网络药理学分析

2.2.1 组方药物、疾病靶点及共同靶点的筛选 将 2.1 中活性成分及疾病导入相关数据库并去重后,共得到 1283 个药物靶点及 819 个疾病靶点,取交集后得到 170 个共同靶点(图 2)。

2.2.2 PPI 网络构建及核心靶点分析 采用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点-疾病”网络图(图 3);构建参芪泄浊饮延缓肾纤维化靶点的 PPI 网络图(图 4)。

2.2.3 GO 分析 经交集基因分析,共识别出 925 条显著富集的通路,其中 BP 相关 661 条,CC 相关 85 条,MF 相关 179 条。选取各方面前 10 条通路绘制条形图(图 5)。其中 BP 方面,主要包括细胞迁移的正向调控、细胞群增殖的正向调控、表皮生长因子受体信号通路、胰岛素样生长因子受体信号通路及基因表达的正向调控等;CC 方面,主要涉及质膜、受体复合物、焦点粘连、胞质溶胶、细胞质等;MF 方面,主要包括蛋白酪氨酸激酶活性、酶结合、ATP 结合、组蛋白 H3Y41 激酶活性、组蛋白 H2AXY142 激酶活性等。

2.2.4 KEGG 分析 通过 DAVID 数据库进行 KEGG 富集分析,得到 164 条 KEGG 通路,选取前 20 条信号通路绘制气泡图(图 6)。

### 2.3 动物实验验证

2.3.1 参芪泄浊饮对 UUO 大鼠血清 BUN、Cr 的影响 与空白组比较,假手术组大鼠 BUN 及 Cr 水平轻度升高,差异无统计学意义(*P*>0.05);与假手术组比较,模型组大鼠 BUN 及 Cr 水平升高(*P*<0.01)。与模型组比较,各给药组大鼠 BUN 及 Cr 水平下降,参芪泄浊饮高剂量组及氯沙坦组差异具有统计学意义(*P*<0.05),参芪泄浊饮中剂量组差异具有统计学意义(*P*<0.01,表 3)。

### 2.3.2 参芪泄浊饮对 UUO 大鼠术侧肾组织形态的影响

2.3.2.1 HE 染色 空白组与假手术组大鼠术侧肾组织结构清晰,球、管形态正常,细胞排列整齐;与假手术组比较,模型组及各给药组大鼠术侧肾组织形态异常,表现为结构松散,肾小管腔体扩大,肾小管上皮细胞可见脱落现象及肾纤维化,偶见肾小球轻度硬化。与模型组比较,各给药组大鼠术侧肾组织结构异常程度有所改善,肾小管

表 2 引物序列

Tab.2 Primer sequences

Gene	Primer sequences (5'-3')	Fragment length (bp)
$\alpha$ -SMA	F:ACCATCGGAATGAACGCTT	191
	R:CTGTCAGCAATGCTGGGTA	
Coll1a1	F:CGTGAAACCTGATGATGCTTG	169
	R:CCTATGACTTCTGCGTCTGGTGA	
NAKED2	F:CGCCTCTGTCAATCATTCTC	205
	R:ATCTGTGTTGGGCTTCTGCTATA	
Rap1	F:GGATTGAAGGCACCAACCAT	144
	R:AGTAATTGAAGTGCTCCTTGCCG	
Raf-1	F:GATGCTGTCTACTCGGATTGGC	116
	R:GAAGTTGCTCTGGAGTTGGGTC	
B-raf	F:CGCAAGATGTGGTGTAAACGG	201
	R:AAGTTGTGGGTTGTCAAGAGAA	
MEK	F:CGTGATGTCAAACCCTCCAAC	135
	R:AGGAGCCATATAGGCAGCACAG	
MEK3	F:TGAAGATGTGCGACTTTGGC	141
	R:CATCAGACTTGACGTTGTAGCCC	
p38MAPK	F:ACCACGACCCTGATGATGAGC	94
	R:TAGGTCAGGCTCTTCCATTCTGT	
ERK	F:GAGACATCCTCAGAGCACCCA	216
	R:TGTTGATAAGCAGATTGGAGGG	
Foxo3a	F:AACAGTACCGTGTTCGGACC	119
	R:AGTGTCTGGTTGCCGTAGTG	
MnSOD	F:TCTGGACAAACCTGAGCCCTAA	133
	R:GAACCTTGACTCCACAGACA	
GAPDH	F:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	R:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	

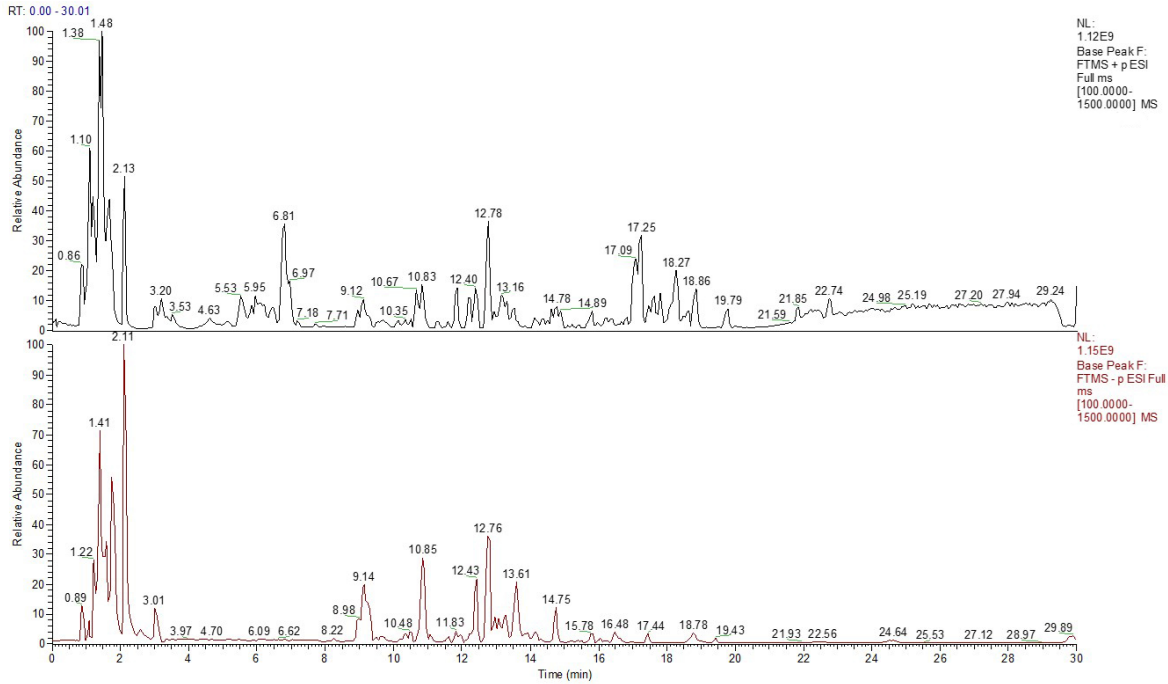


图1 参芪泄浊饮药液提取总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of Shenqi Xiezhuo Decoction (SQXZD) extract (Top: positive ion mode; Bottom: negative ion mode).

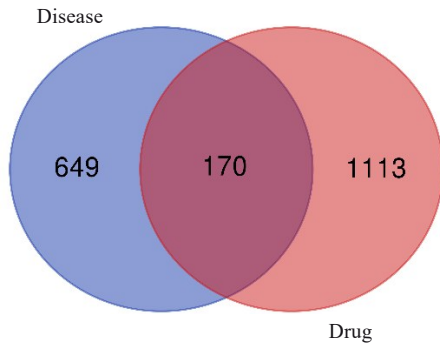


图2 参芪泄浊饮延缓肾纤维化的作用靶点 Venn图

Fig.2 Venn diagram of the targets of SQXZD for delaying RF.

腔体仅轻微扩张,纤维组织增生亦有所减轻(图7)。

2.3.2.2 Masson 染色 空白组与假手术组大鼠术侧肾组织内未见明显蓝色胶原纤维沉积,假手术组大鼠术侧肾组织局部偶见蓝染区域。与假手术组比较,模型组及各给药组大鼠术侧肾组织内可见蓝色胶原纤维沉积,其中模型组可见大量蓝色胶原纤维沉积。与模型组比较,各给药组大鼠术侧肾组织内蓝色胶原纤维沉积减少(图8)。

2.3.3 参芪泄浊饮对UUO大鼠血清SOD、MDA、GSH-px、IL-6、TNF-α的影响 与空白组比较,假手术组大鼠MDA、IL-6、TNF-α、SOD、GSH-px水平差异无统计学意义( $P>0.05$ );与假手术组比较,模型组大鼠MDA、IL-6、TNF-α水平升高,SOD、GSH-px水平下降( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组MDA、IL-6、TNF-α水平下降,

SOD、GSH-px水平升高,其中参芪泄浊饮低剂量组、高剂量组、氯沙坦组SOD与GSH-px的差异以及参芪泄浊饮高剂量组、氯沙坦组MDA、IL-6、TNF-α的差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),参芪泄浊饮中剂量组各指标差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,表4,5)。

2.3.4 参芪泄浊饮对UUO大鼠术侧肾组织α-SMA、Col-I、NAKED2表达的影响 与空白组比较,假手术组α-SMA、Col-I、NAKED2表达差异无统计学意义( $P>0.05$ );与假手术组比较,模型组α-SMA、Col-I、NAKED2表达上调( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组α-SMA、Col-I、NAKED2表达下调( $P<0.05$ ),参芪泄浊饮中剂量组差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,图9)。

2.3.5 参芪泄浊饮对UUO大鼠术侧肾组织α-SMA、Colla1、NAKED2 mRNA转录水平的影响 与空白组比较,假手术组α-SMA、Colla1、NAKED2 mRNA转录水平差异无统计学意义( $P>0.05$ );与假手术组比较,模型组α-SMA、Colla1、NAKED2 mRNA转录水平升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组α-SMA、Colla1、NAKED2 mRNA转录水平下降( $P<0.05$ ),参芪泄浊饮中剂量组差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,图10)。

2.3.6 参芪泄浊饮对UUO大鼠术侧肾组织Rap1、B-raf、Raf-1、MEK3/6、p38MAPK、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、FoxO3a、p-FoxO3a及MnSOD表达的影响 与假手术组比较,模型组Rap1、B-raf、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、MEK3/6、p38MAPK表达上调,Raf-1、FoxO3a、p-FoxO3a及MnSOD表达下调( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组Rap1、B-raf、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、

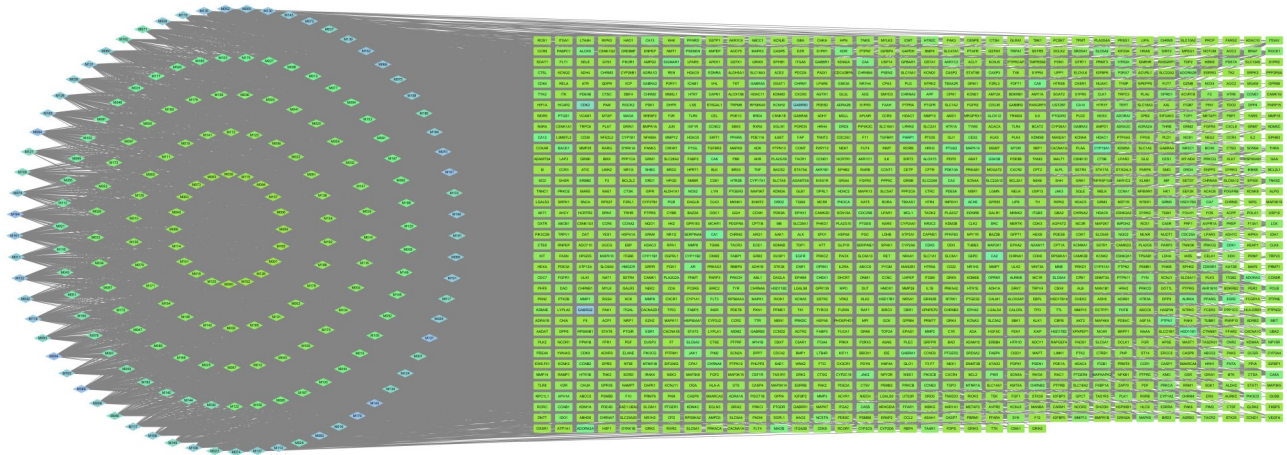


图3 "成分-靶点-疾病"网络图

Fig.3 "Component-Target-Disease" network diagram. Diamonds represent active components, and rectangles represent disease targets with a total of 1475 nodes and 11 241 edges.

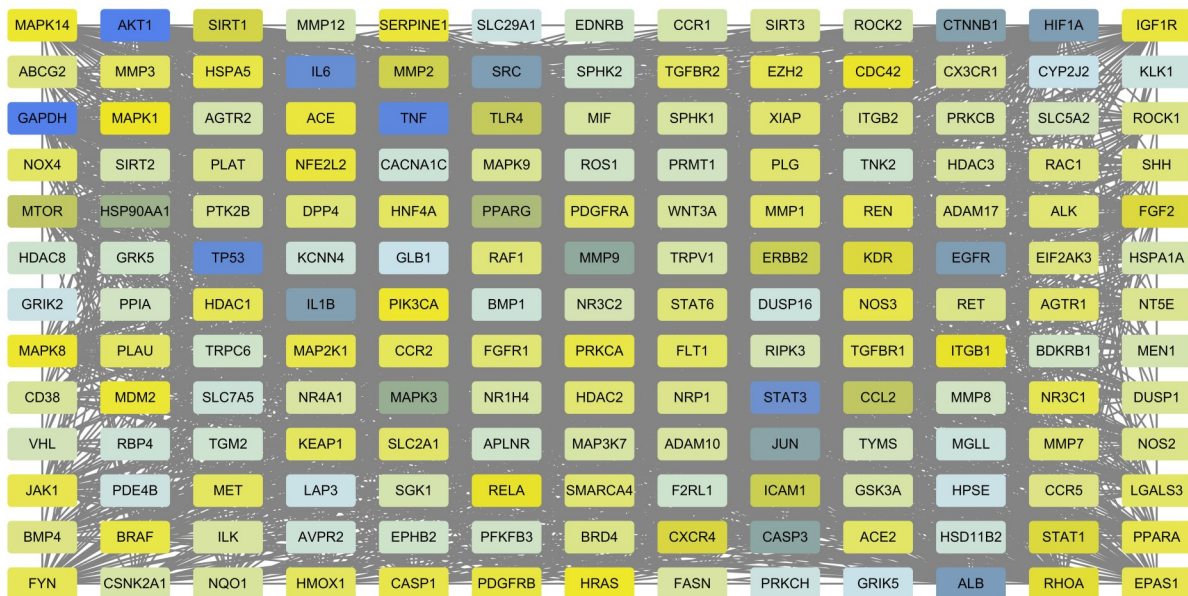


图4 参芪泄浊饮延缓肾纤维化靶点的PPI网络图

Fig.4 PPI network diagram of the targets of SQXZD for delaying RF. Node color intensity corresponds to the Degree value, and darker colors indicate higher Degree values (169 nodes and 3682 edges).

MEK3/6、p38MAPK 表达下调，Raf-1、FoxO3a、p-FoxO3a 及 MnSOD 表达上调( $P<0.05$ ),参芪泄浊饮中剂量组差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,图 11)。

2.3.7 参芪泄浊饮对UO大鼠术侧肾组织Rap1、B-raf、Raf-1、MEK3、p38MAPK、MEK、ERK、FoxO3a 及 MnSOD mRNA 转录水平的影响 与假手术组比较,模型组Rap1、B-raf、MEK、ERK、MEK3、p38MAPK mRNA 转录水平上调,Raf-1、FoxO3a 及 MnSOD mRNA 转录水平下调( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组Rap1、B-raf、MEK、ERK、MEK3、p38MAPK mRNA 转录水平下调,Raf-1、FoxO3a 及 MnSOD mRNA 转录水平上调( $P<0.05$ ),参芪泄浊饮中剂量组差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,图 12)。

### 3 讨论

肾纤维化可归为“肾络癥瘕”范畴<sup>[22]</sup>,该病以“虚气流滞、肾络瘀阻”为基本病机,自拟参芪泄浊饮以遵“补益脾肾、化瘀通络、化湿解毒”之法。方中重用黄芪,辅以太子参、熟地黄、白术、山药、山茱萸、菟丝子达补益之效;大黄、丹参、牡丹皮化瘀通络,茯苓、姜半夏、陈皮、藿香、佩兰、砂仁共用以芳香化湿解毒。诸药合用,共奏“补益、通络、化浊”之功。本研究基于UPLC-Q Exactive/MS技术,从参芪泄浊饮水煎液中鉴定出263个化学成分,结合网络药理学“成分-靶点-疾病”PPI网络图,参芪泄浊饮延缓肾纤维化的核心成分包括6-姜酚、(5S,6S)-5-羟基-4-甲氧基-6-(2-苯乙基)-5,6-二氢-2H-吡喃-2-酮、小檗碱等,作用于GABRG2、GABRB3、

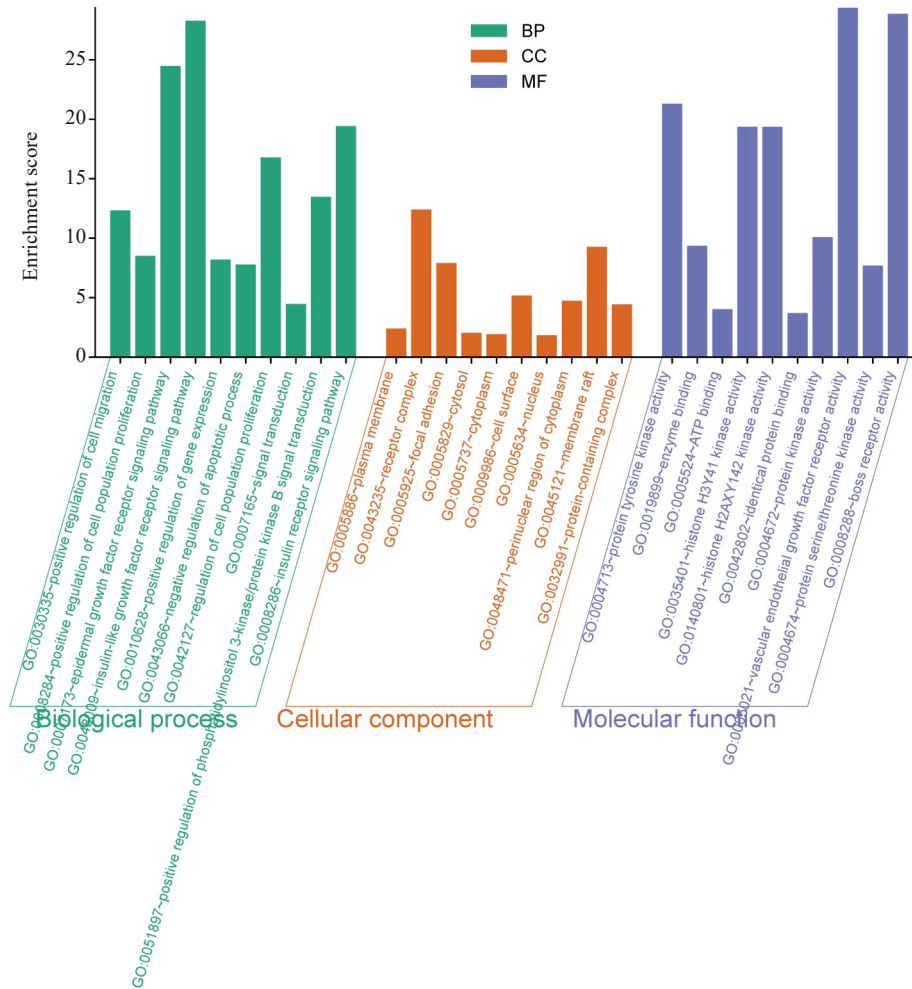


图5 参芪泄浊饮延缓肾纤维化的GO功能富集分析

Fig. 5 GO functional enrichment analysis of SQXZD in delaying RF. BP: Biological process; CC: Cellular component; MF: Molecular function.

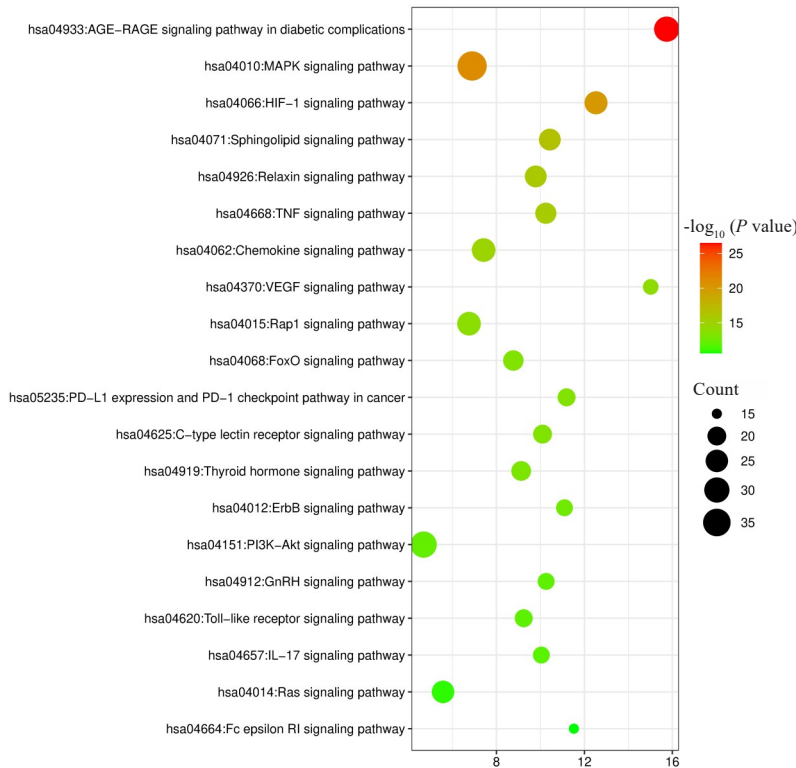


图6 参芪泄浊饮延缓肾纤维化的KEGG通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis of SQXZD in delaying RF.

表3 参芪泄浊饮对UUO大鼠血清BUN、Cr的影响

Tab.3 Effects of SQXZD on serum BUN and Cr levels in rats with unilateral ureteral obstruction (UUO) (Mean±SD, n=5)

Group	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)
Control	4.94±0.29	47.48±2.62
Sham	7.18±0.32	55.48±1.10
Model	28.08±2.35**	196.11±12.88**
Losartan	18.97±1.01 <sup>#</sup>	166.99±4.07 <sup>#</sup>
SQXZD low-dose	23.49±1.09	178.97±6.42
SQXZD medium-dose	16.79±0.55 <sup>▲</sup>	149.92±2.57 <sup>▲</sup>
SQXZD high-dose	19.03±1.01 <sup>#</sup>	171.32±3.68 <sup>#</sup>

\*\*P<0.01 vs Sham group; <sup>▲</sup>P<0.01, <sup>#</sup>P<0.05 vs Model group.

CDK2、CA2、CYP19A1等169个潜在靶点，并介导MAPK、HIF-1、TNF、Rap1、FoxO等OS及炎症相关信号通路。6-姜酚具有正性肌力、抗炎和抗氧化等重要作用<sup>[23]</sup>，可显著下调α-SMA及Col-I表达以延缓肾纤维化进展<sup>[24]</sup>。(5S,6S)-5-羟基-4-甲氧基-6-(2-苯乙基)-5,6-

二氢-2H-吡喃-2-酮为阿江榄仁的主要成分之一，具有良好的抗氧化活性<sup>[25]</sup>。小檗碱为大黄的成分之一，可显著改善不同肾纤维化动物模型的肾功能、下调OS标志物水平及α-SMA表达以延缓肾纤维化<sup>[26]</sup>。

GABRG2、GABRB3均属GABA<sub>A</sub>受体家族，敲除GABRG2基因可上调肾组织内MMP3表达、介导组织内OS及DNA损伤从而加速肾纤维化进展<sup>[27,28]</sup>，且课题组前期实验证实参芪泄浊饮可调控MMP3表达延缓肾纤维化<sup>[12]</sup>；敲除内皮GABRB3可导致组织内血管密度下降及血流异常<sup>[29]</sup>，介导血管内皮损伤而加速肾纤维化进展<sup>[30]</sup>。CDK2在肝纤维化动物模型中呈高表达状态，药物干预后可下调CDK2表达，进而抑制α-SMA表达以延缓肝纤维化进展<sup>[31]</sup>。CA2可在肾小管上皮细胞中表达，抑制该靶点可促进内皮NO释放、改善血管内OS以提高血流量<sup>[32,33]</sup>。CYP19A1的低表达可激活TGFBR3/Smad2/3通路、介导炎症及EMT过程，上调α-SMA表达<sup>[34]</sup>。

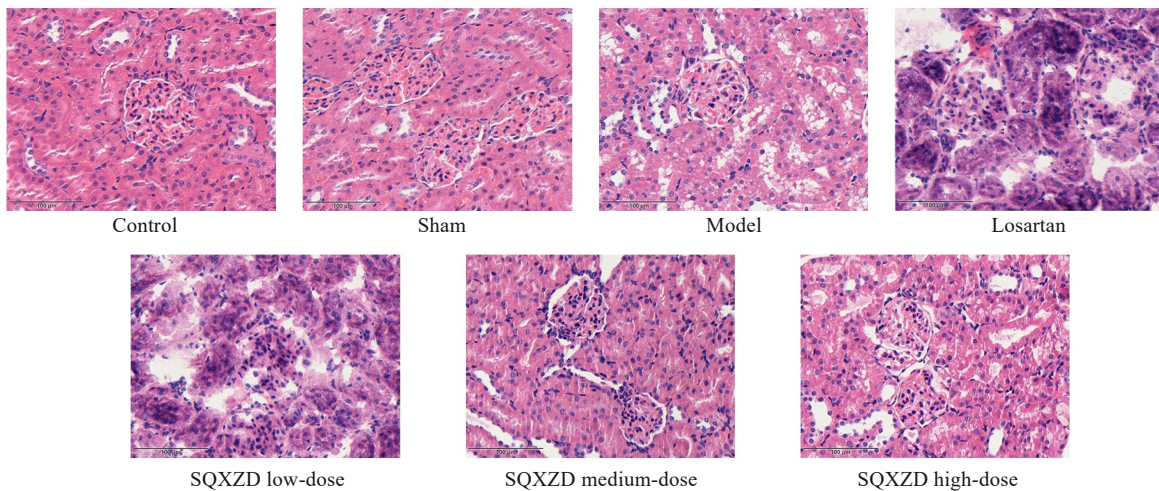


图7 各组大鼠术侧肾脏HE染色

Fig.7 HE staining of the surgical-side kidney in each group of the rats (Original magnification: ×400).

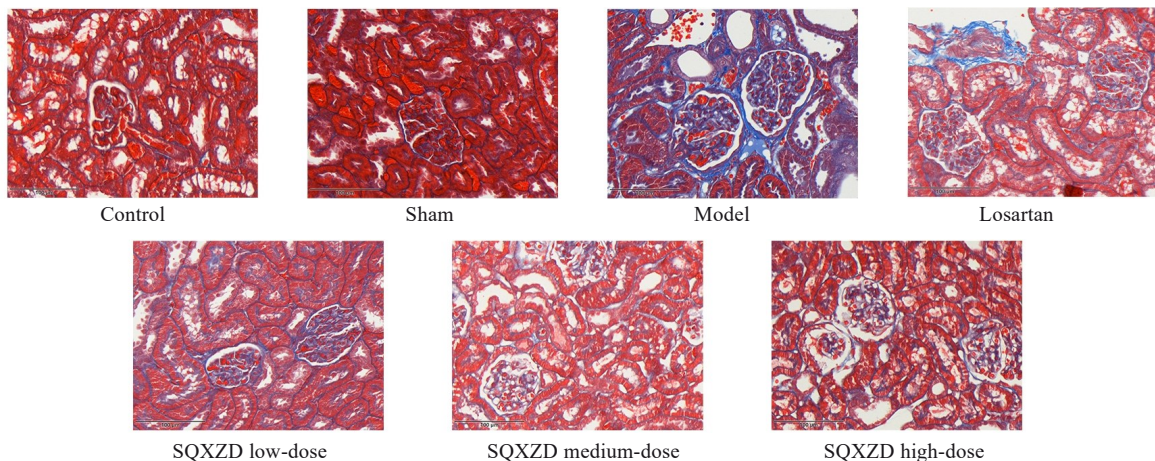


图8 各组大鼠术侧肾脏Masson染色

Fig.8 Masson staining of the surgical-side kidney in each group of rats (×400).

表4 参芪泄浊饮对UUO大鼠血清SOD,MDA,GSH-px的影响

Tab.4 Effects of SQXZD on serum SOD, MDA and GSH-px levels in UUO rats (Mean±SD, n=5)

Group	SOD (U/mL)	MDA (μmol/L)	GSH-px (U/mL)
Control	325.42±6.59	2.03±0.14	2582.35±54.22
Sham	257.27±16.71	2.36±0.05	2238.14±105.60
Model	87.01±2.08**	8.92±0.94**	668.21±6.81**
Losartan	212.38±5.19 <sup>#</sup>	4.26±0.38 <sup>#</sup>	2048.18±45.04 <sup>#</sup>
SQXZD low-dose	183.70±5.04 <sup>#</sup>	7.50±0.52	1516.04±66.02 <sup>#</sup>
SQXZD medium-dose	270.46±5.87 <sup>▲</sup>	2.90±0.11 <sup>▲</sup>	2218.58±51.31 <sup>▲</sup>
SQXZD high-dose	209.35±5.60 <sup>#</sup>	5.42±0.20 <sup>#</sup>	1684.99±52.96 <sup>#</sup>

\*P<0.01 vs Sham group; <sup>▲</sup>P<0.01, <sup>#</sup>P<0.05 vs Model group.

表5 参芪泄浊饮对UUO大鼠血清IL-6,TNF-α的影响

Tab.5 Effects of SQXZD on serum IL-6 and TNF-α levels in UUO rats (Mean±SD, n=5)

Group	IL-6	TNF-α
Control	0.159±0.001	0.038±0.0003
Sham	0.177±0.005	0.040±0.0004
Model	0.309±0.010**	0.056±0.0011**
Losartan	0.243±0.004 <sup>#</sup>	0.051±0.0004 <sup>#</sup>
SQXZD low-dose	0.273±0.006	0.053±0.0006
SQXZD medium-dose	0.228±0.002 <sup>▲</sup>	0.049±0.0003 <sup>▲</sup>
SQXZD high-dose	0.252±0.005 <sup>#</sup>	0.051±0.0005 <sup>#</sup>

\*\*P<0.01 vs Sham group; <sup>▲</sup>P<0.01, <sup>#</sup>P<0.05 vs Model group.

MAPK 通路在真核生物体中存在 ERK、p38 及 JNK3 条分支,均以 MKKK-MKK-MAPK 的顺序依次激活<sup>[35]</sup>。ERK 分支在肾纤维化动物模型及人类中呈激活状态<sup>[36, 37]</sup>,细胞外生长因子可激活 Ras、磷酸化 Raf,进一步磷酸化 MEK1、激活 ERK1/2<sup>[35, 38]</sup>,抑制该途径可改善肾纤维化<sup>[39]</sup>;炎症刺激后 p38 被磷酸化而激活并入核<sup>[40, 41]</sup>以调控核内转录因子、促进炎症因子释放以参与

肾纤维化进程<sup>[42, 43]</sup>。Rap1 属于 Ras 小 G 蛋白家族<sup>[44]</sup>,受到 GEFs 及 GAPs 的双向调控,二者的动态平衡决定了 Rap1 及 Ras 活性以调控 MAPK 通路的 ERK 及 p38 分支<sup>[45]</sup>;亦可调节线粒体 ROS 代谢以调控 OS<sup>[46]</sup>。FoxO3a 与 OS 密切相关<sup>[47]</sup>,其表达受到 ERK 及 p38 的调控,并进一步调控 MnSOD 表达抑制 OS 以延缓肾纤维化<sup>[47, 48]</sup>。TNF 通路及 HIF-1 通路与炎症途径密切相关<sup>[49, 50]</sup>。因此,参芪泄浊饮延缓肾纤维化与 OS 及炎症途径关系密切。

成纤维细胞、上皮细胞等多种细胞活化后增殖并分泌大量 ECM 沉积在肾间质导致肾纤维化<sup>[51, 52]</sup>,增殖过程中表达 α-SMA<sup>[1]</sup>及 NAKED2<sup>[53]</sup>,伴随 I、III 两型胶原蛋白在肾间质的显著沉积<sup>[54, 55]</sup>,导致肾功能受损。课题组前期实验已证实参芪泄浊饮可下调 Col-III 表达以延缓肾纤维化<sup>[12]</sup>。本研究采用 UUO 法<sup>[21]</sup>复制肾纤维化大鼠模型,术后 24 h 予参芪泄浊饮水煎液干预 2 周并检测相关指标,实验结果表明模型组大鼠 BUN、Cr 明显升高,提示肾功能受损;Masson 染色显示模型组大鼠术侧肾组织中可见大量胶原沉积,Western blotting 结果显示术侧肾组织 α-SMA、Col-I、NAKED2 表达上调,提示

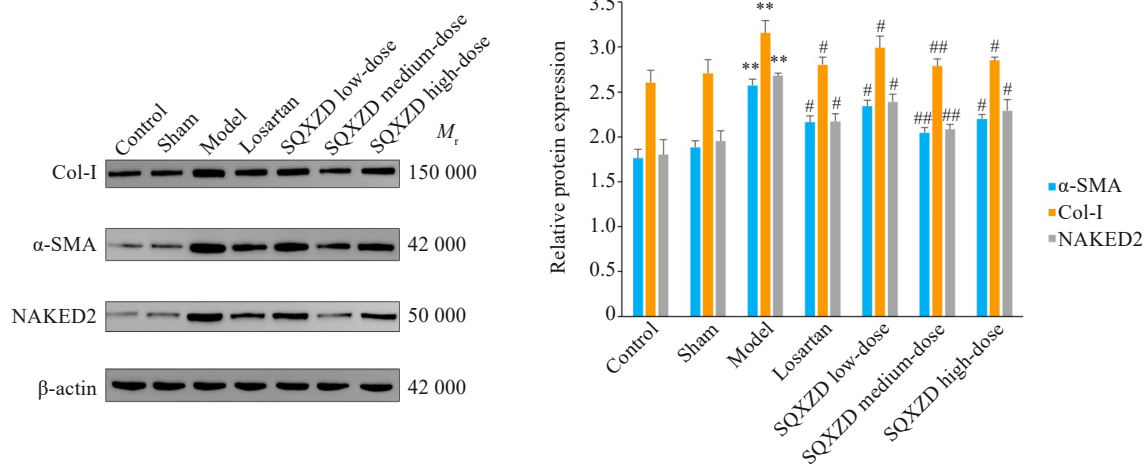


图9 参芪泄浊饮对UUO大鼠术侧肾组织α-SMA、Col-I、NAKED2表达的影响

Fig.9 Effects of SQXZD on expressions of α-SMA, Col-I and NAKED2 in the surgical-side kidneys of UUO rats. \*\*P<0.01 vs Sham group; <sup>#</sup>P<0.01, <sup>\*</sup>P<0.05 vs Model group.

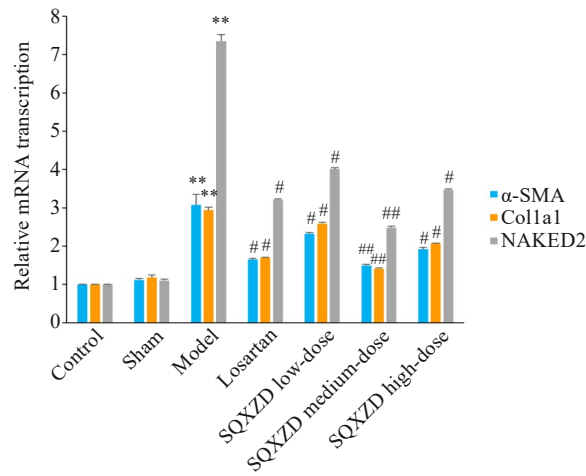


图 10 参芪泄浊饮对UUO大鼠术侧肾组织α-SMA、Colla1、NAKED2 mRNA 转录水平的影响

Fig.10 Effects of SQXZD on mRNA transcription levels of α-SMA, Colla1 and NAKED2 in the surgical-side kidneys of UUO rats. \*\*P<0.01 vs Sham group; ##P<0.01, #P<0.05 vs Model group.

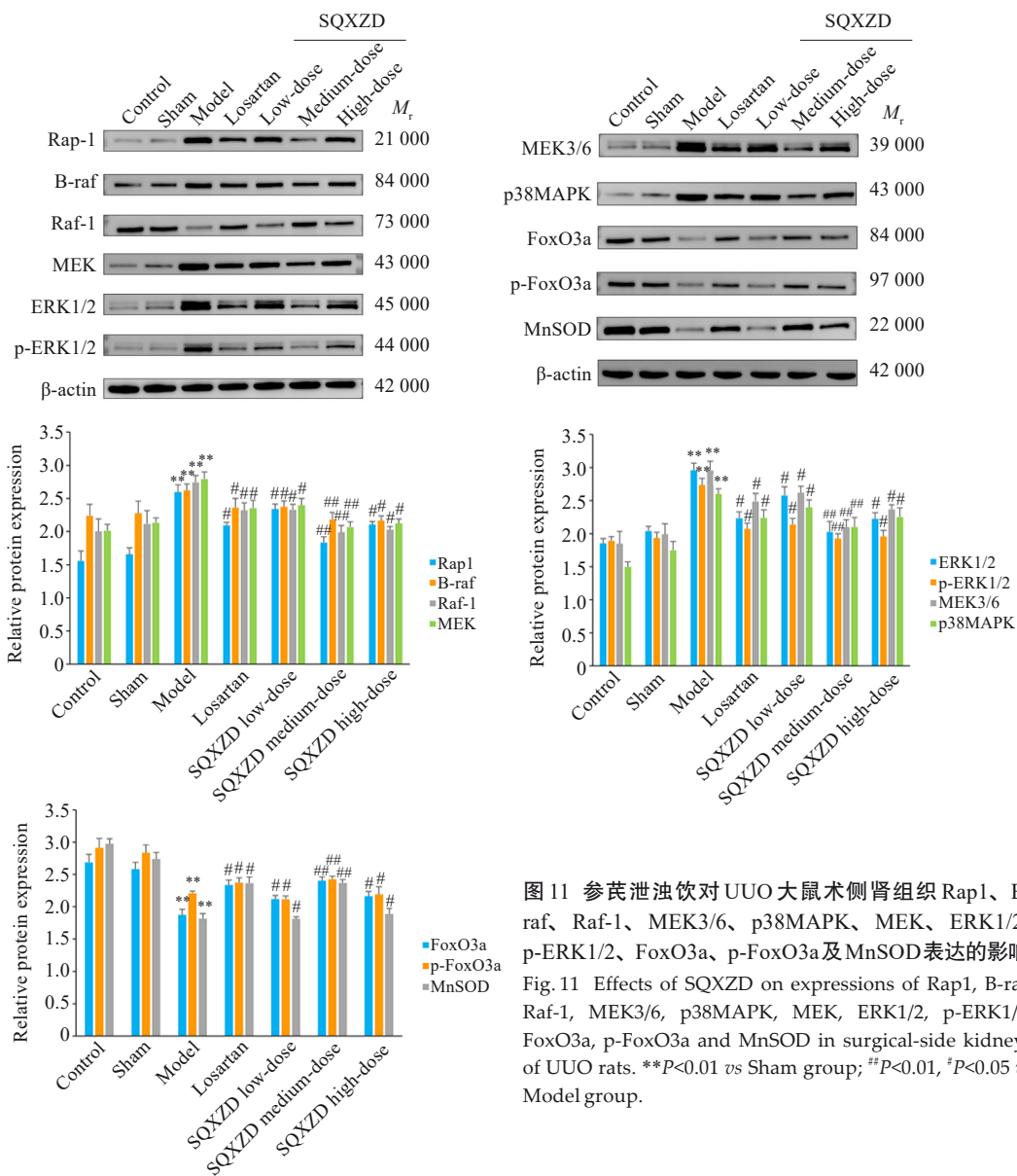


图 11 参芪泄浊饮对UUO大鼠术侧肾组织 Rap1、B-raf、Raf-1、MEK3/6、p38MAPK、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、FoxO3a、p-FoxO3a及MnSOD表达的影响

Fig.11 Effects of SQXZD on expressions of Rap1, B-raf, Raf-1, MEK3/6, p38MAPK, MEK, ERK1/2, p-ERK1/2, FoxO3a, p-FoxO3a and MnSOD in surgical-side kidneys of UUO rats. \*\*P<0.01 vs Sham group; ##P<0.01, #P<0.05 vs Model group.

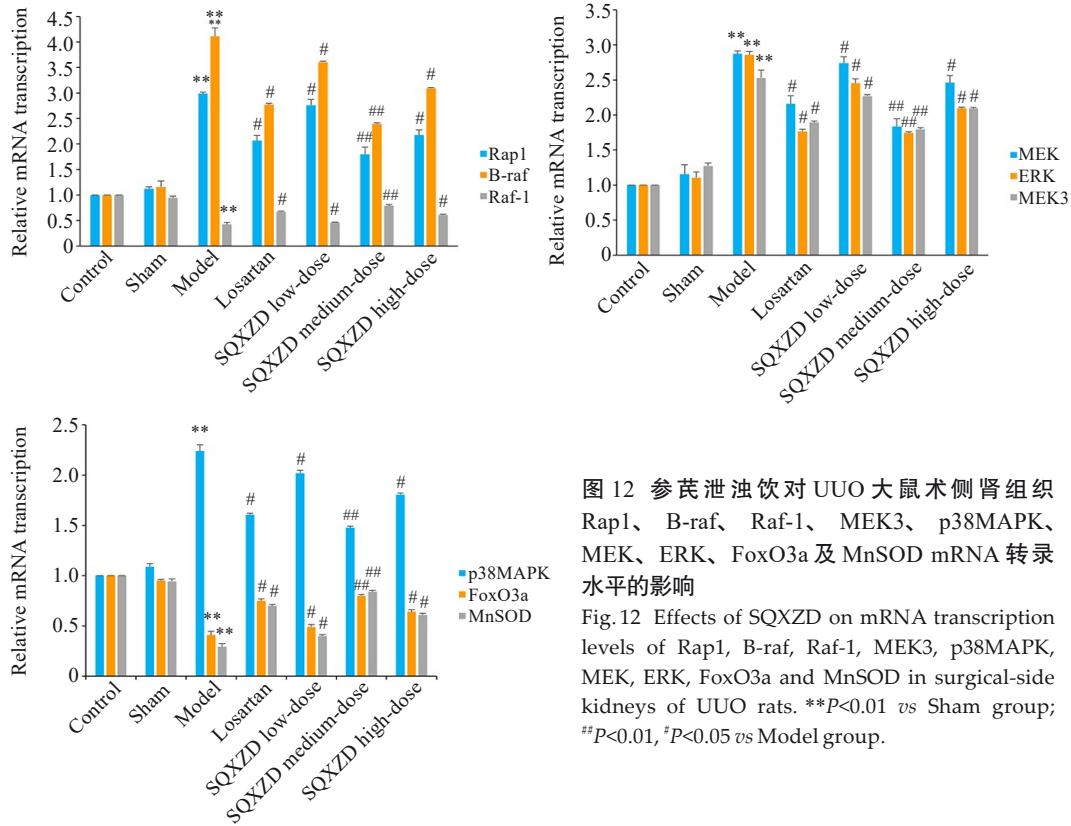


图 12 参芪泄浊饮对 UUO 大鼠术侧肾组织 Rap1、B-raf、Raf-1、MEK3、p38MAPK、MEK、ERK、FoxO3a 及 MnSOD mRNA 转录水平的影响

Fig. 12 Effects of SQXZD on mRNA transcription levels of Rap1, B-raf, Raf-1, MEK3, p38MAPK, MEK, ERK, FoxO3a and MnSOD in surgical-side kidneys of UUO rats. \*\* $P < 0.01$  vs Sham group; # $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs Model group.

大鼠术侧肾脏纤维化相关蛋白沉积;药物干预后大鼠肾功能改善、胶原沉积面积减少、相关纤维化蛋白表达下调,表明参芪泄浊饮对 UUO 大鼠肾纤维化有延缓作用。

肾纤维化与 OS 和炎症密切相关<sup>[6,7]</sup>。炎症可诱导或加剧 OS 以响应信号通路激活<sup>[7]</sup>导致 ROS 大量堆积,ROS 的蓄积亦引起促炎因子的释放,二者互为因果,OS 与炎症相互促进而加重肾脏损伤<sup>[9,10]</sup>。SOD、GSH-px 及 MDA 与体内 ROS 代谢关系密切,其中 SOD 可减少体内超氧阴离子水平,是抗氧化的首道防线<sup>[8,56]</sup>;GSH-px 合成于肾脏,临床试验证实慢性肾脏病患者体内 GSH-px 水平下降<sup>[57]</sup>,无法催化过氧化氢还原为水以实现抗氧化作用<sup>[58]</sup>;MDA 水平与 OS 程度密切相关<sup>[59]</sup>。IL-6、TNF- $\alpha$  与肾纤维化进展密切相关<sup>[60,61]</sup>。故本研究检测了大鼠血清中 SOD、MDA、GSH-px、IL-6、TNF- $\alpha$  水平,结果表明参芪泄浊饮可提高血清 SOD、GSH-px 水平,下调 MDA 水平,减少 TNF- $\alpha$  及 IL-6 生成,提示参芪泄浊饮可提高 UUO 大鼠抗氧化能力以减轻 OS 并下调体内炎症因子水平,这可能是参芪泄浊饮延缓 UUO 大鼠肾纤维化的机制。

为进一步探究参芪泄浊饮对网络药理学富集程度较高的 OS 及炎症相关信号通路的调控机制,本研究检测了各组大鼠术侧肾组织 Rap1、B-raf、Raf-1、MEK3/6、p38MAPK、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、FoxO3a、p-FoxO3a 及 MnSOD 表达,结果显示参芪泄浊饮可下调 Rap1、B-raf、MEK、ERK1/2、p-ERK1/2、

MEK3/6 及 p38MAPK 表达,上调 Raf-1、FoxO3a、p-FoxO3a 及 MnSOD 表达,表明参芪泄浊饮延缓肾纤维化的机制可能是通过调控 Rap1/MAPK/FoxO3a 信号通路以改善肾脏内 OS 及炎症水平实现的。有研究表明,激活 Rap1 可降低白细胞的迁移以减轻炎症反应以延缓肾纤维化进展<sup>[62,63]</sup>;调控 MAPK 通路的 ERK 分支及 p38 分支可抑制肾小管 EMT 以延缓肾纤维化进展<sup>[64]</sup>;调控 FoxO3a 通路可上调 MnSOD 表达,提高组织内 SOD 水平以提高抗氧化能力<sup>[65]</sup>,与本研究结果一致。在 FoxO3a 的调控方面,本研究结果表明,药物干预后 p-FoxO3a 蛋白表达上调,与研究<sup>[65]</sup>一致;但亦有研究表明,在 MAPK 信号通路不同分支对 FoxO3a 的调控过程中,ERK 分支可直接磷酸化 FoxO3a,导致 p-FoxO3a 表达上调,FoxO3a 表达下调而促纤维化,药物干预后可下调组织内 p-FoxO3a 表达以延缓或干预纤维化进程<sup>[66,67]</sup>。究其原因,可能为同一通路内不同分支的激活程度不同,根据本次实验结果,推测 p38 分支对 p-FoxO3a 的调控水平或较 ERK 分支更为显著。此外,Rap1 受到 GEFs 及 GAPs 的双向调控<sup>[45]</sup>以调控 ERK 分支及 p38 分支;由于 GEFs 及 GAPs 存在不同水平的平衡状态,Rap1 的表达水平亦可能有不同,故 Rap1 通过 MAPK 通路对 FoxO3a 的调控亦存在双向可能,课题组未来会深入探索,并结合后续实验加以验证。

综上所述,本研究选用 UUO 模型模拟人体肾纤维化,观察参芪泄浊饮对 UUO 大鼠肾功能及肾纤维化的

改善作用,并结合UPLC-Q Exactive/MS与网络药理学探讨其潜在作用机制,结果表明参芪泄浊饮可改善UUO大鼠肾功能,减轻OS及炎症反应以延缓肾纤维化,其作用机制可能与调控Rap1/MAPK/FoxO3a信号通路相关。后续将通过进一步实验探讨其深层次作用靶点、不同分支之间的动态调控机制,以及对筛选出的关键成分及靶点进行深入研究,为临床新药开发提供实验依据。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

### 参考文献:

- [1] Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(12): 684-96.
- [2] Conway B, Hughes J. Cellular orchestrators of renal fibrosis[J]. *Qjm*, 2012, 105(7): 611-5.
- [3] Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(11): 1819-34.
- [4] 卞帅博,张亮,杨璇. 1990~2021年中国慢性肾脏病疾病负担变化趋势及发病预测分析[J]. *实用临床医药杂志*, 2025, 29(6): 89-93, 98.
- [5] Kramann R, DiRocco DP, Maarouf OH, et al. Matrix-producing cells in chronic kidney disease: origin, regulation, and activation[J]. *Curr Pathobiol Rep*, 2013, 1(4): 301-11.
- [6] Su H, Wan C, Song A, et al. Oxidative stress and renal fibrosis: mechanisms and therapies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 585-604.
- [7] Papaconstantinou J. The role of signaling pathways of inflammation and oxidative stress in development of senescence and aging phenotypes in cardiovascular disease[J]. *Cells*, 2019, 8(11): E1383.
- [8] Kao MP, Ang DS, Pall A, et al. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options[J]. *J Hum Hypertens*, 2010, 24(1): 1-8.
- [9] Davì G, Guagnano MT, Ciabattini G, et al. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress[J]. *JAMA*, 2002, 288(16): 2008-14.
- [10] Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, et al. Oxidative stress in the pathogenesis and evolution of chronic kidney disease: untangling *Ariadne's* thread[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): E3711.
- [11] Lee OYA, Wong ANN, Ho CY, et al. Potentials of natural antioxidants in reducing inflammation and oxidative stress in chronic kidney disease[J]. *Antioxidants: Basel*, 2024, 13(6): 751.
- [12] 梁亮. 何学红教授学术思想总结及肾衰方治疗慢性肾脏病的临床与实验研究[D]. 辽宁中医药大学, 2015.
- [13] Consortium UniProt. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(d1): D523-31.
- [14] Amberger JS, Hamosh A. Searching online mendelian inheritance in man (OMIM): a knowledgebase of human genes and genetic phenotypes[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2017, 58: 1.2.1-1.2.12.
- [15] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.
- [16] Piñero J, Ramirez-Angueta JM, Saüch-Pitarch J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(d1): D845-55.
- [17] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(d1): D638-46.
- [18] Sherman BT, Hao M, Qiu J, et al. DAVID a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update)[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(w1): W216-21.
- [19] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42717.
- [20] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(w1): W357-64.
- [21] 马园园,刘成海,陶艳艳. 肾纤维化动物模型特点与研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 398-403.
- [22] 李建省,王英明,闫燕顺,等. “肾虚络瘀,肾络癥瘕”病机观与肾间质纤维化中自噬不足的相关性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(2): 186-94.
- [23] Li W, Zhang Y, Wang Q, et al. 6-Gingerol ameliorates ulcerative colitis by inhibiting ferroptosis based on the integrative analysis of plasma metabolomics and network pharmacology[J]. *Food Funct*, 2024, 15(11): 6054-67.
- [24] 邓婷,傅强,李志樑,等. 6-姜酚对心肾综合征大鼠心肾功能的影响[J]. *实用医学杂志*, 2025, 41(11): 1627-36.
- [25] Wadekar PP, Salunkhe VR. Formulation and evaluation of nanobiotherapeutics of *Terminalia arjuna* through plant tissue culture for atherosclerosis[J]. *Future J Pharm Sci*, 2024, 10(1): 42.
- [26] Nie R, Yuan Z, Wu Y, et al. Time-dose response and mechanistic specificity of berberine in renal fibrosis from a multi-model integration perspective: a systematic review and meta-analysis on animal models[J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1600408.
- [27] 陈章平,李信晓,郭胜楠,等. GABRG2基因敲除小鼠和HT22细胞通过激活PKA/NF-κB信号通路影响MMP3的表达[J]. *宁夏医科大学学报*, 2022, 44(7): 656-62.
- [28] 刘星辰,王璟,刘博阳,等. PTH缺失通过诱导肾脏细胞衰老和衰老相关分泌型分子表达而加速肾脏纤维化[J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24(16): 3006-12.
- [29] Agrud A, Subburaju S, Goel P, et al. Gabrb3 endothelial cell-specific knockout mice display abnormal blood flow, hypertension, and behavioral dysfunction[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 4922.
- [30] 秦一冰,吕静,战丽彬,等. 基于“脉络-血管系统”理论探讨肾纤维化的发病机制[J]. *世界中西医结合杂志*, 2024, 19(6): 1256-9, 1264.
- [31] 张晓珣,王俊,赵宇,等. 牛蒡子苷元对四氯化碳致大鼠肝纤维化的治疗作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(1): 53-60.
- [32] García-Llorca A, Carta F, Supuran CT, et al. Carbonic anhydrase, its inhibitors and vascular function[J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1338528.
- [33] Krishnan D, Liu L, Wiebe SA, et al. Carbonic anhydrase II binds to and increases the activity of the epithelial sodium-proton exchanger, NHE3[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 309(4): F383-92.
- [34] Fang Z, Wang Q, Duan H, et al. 17β-Estradiol mediates TGFBR3/Smad2/3 signaling to attenuate the fibrosis of TGF-β1-induced bovine endometrial epithelial cells via GPER[J]. *J Cell Physiol*,

- 2024, 239(1): 166-79.
- [35] Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2): 211-8.
- [36] Akhtar S, Al-Zaid B, El-Hashim AZ, et al. Impact of PAMAM delivery systems on signal transduction pathways *in vivo*: Modulation of ERK1/2 and p38 MAP kinase signaling in the normal and diabetic kidney[J]. *Int J Pharm*, 2016, 514(2): 353-63.
- [37] Cheng X, Gao W, Dang Y, et al. Both ERK/MAPK and TGF- $\beta$ /Smad signaling pathways play a role in the kidney fibrosis of diabetic mice accelerated by blood glucose fluctuation[J]. *J Diabetes Res*, 2013, 2013: 463740.
- [38] Wei X, Wang J, Deng YY, et al. Tubiechong patching promotes *Tibia* fracture healing in rats by regulating angiogenesis through the VEGF/ERK1/2 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115851.
- [39] Wu Y, Wang L, Deng D, et al. Renalase protects against renal fibrosis by inhibiting the activation of the ERK signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): E855.
- [40] Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(3): 1741-8.
- [41] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 537-49.
- [42] 阮颖新, 刘素雁, 李春媚, 等. p38MAPK通路参与肾间质纤维化的实验研究[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2007, (1): 63-6.
- [43] 霍振霞, 王保兴. p38MAPK在氧化应激诱导肾间质纤维化中的研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2016, 10(7): 1029-32.
- [44] Sari-Ak D, Torres-Gomez A, Yazicioglu YF, et al. Structural, biochemical, and functional properties of the Rap1-interacting adaptor molecule (RIAM)[J]. *Biomed J*, 2022, 45(2): 289-98.
- [45] Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, et al. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1[J]. *Nature*, 2001, 411(6841): 1065-8.
- [46] 朱雪婧. Rap1b对糖尿病肾病肾小管上皮细胞氧化损伤及凋亡的影响与机制研究[D]. 中南大学, 2011.
- [47] Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress[J]. *Nature*, 2002, 419(6904): 316-21.
- [48] 李安琪, 祝晓梅, 黄九九, 等. 乳源六肽通过FoxO3a-MnSOD通路减少酒精诱导的氧化应激缓解肝损伤[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(12): 1864-9.
- [49] 龚武清, 彭书生, 杜海林. 基于TNF- $\alpha$ /PI3K-Akt/NF- $\kappa$ B信号通路研究瑞舒伐他汀介导MCP-1对深静脉血栓大鼠模型凝血功能、炎症因子及纤溶指标的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(13): 3272-6.
- [50] 李玮怡, 江露, 张宗星, 等. 强骨康疏方通过抑制HIF-1 $\alpha$ /BNIP3自噬信号通路减少类风湿性关节炎大鼠的破骨细胞分化[J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(7): 1389-96.
- [51] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 4-27.
- [52] Lv W, Booz GW, Fan F, et al. Oxidative stress and renal fibrosis: recent insights for the development of novel therapeutic strategies[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 105.
- [53] Kupce C, Ibrahim MM, Kranz J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis[J]. *Nature*, 2021, 589(7841): 281-6.
- [54] Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, et al. The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis[J]? *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2014, 7(1): 4.
- [55] Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, et al. Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy[J]. *Kidney Int*, 1993, 44(4): 774-88.
- [56] Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(7): 1272-80.
- [57] Fassett RG, Robertson IK, Ball MJ, et al. Effects of atorvastatin on oxidative stress in chronic kidney disease[J]. *Nephrology: Carlton*, 2015, 20(10): 697-705.
- [58] Zachara BA. Chapter five selenium and selenium-dependent antioxidants in chronic kidney disease[J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 68: 131-51.
- [59] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges[J]. *Anal Biochem*, 2017, 524: 13-30.
- [60] Su H, Lei CT, Zhang C. Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 405.
- [61] Meldrum KK, Misseri R, Metcalfe P, et al. TNF- $\alpha$  neutralization ameliorates obstruction-induced renal fibrosis and dysfunction[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 292(4): R1456-64.
- [62] Wittchen ES, Worthylake RA, Kelly P, et al. Rap1 GTPase inhibits leukocyte transmigration by promoting endothelial barrier function[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(12): 11675-82.
- [63] 吴华英, 邓凯, 李静, 等. 益气活血方调控cAMP/Epac1/Rap1信号改善冠心病气虚血瘀证大鼠的验证[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(18): 107-16.
- [64] 沈鑫蕾, 朱清如, 余文凯, 等. 盐炙车前子调控肾小管上皮-间充质转化改善肾纤维化的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(5): 1195-208.
- [65] 郭锦晨. 健脾化湿清热通络法改善类风湿关节炎患者SOD的数据挖掘研究及对AMPK-FoxO3a-MnSOD信号通路的影响[D]. 安徽中医药大学, 2018.
- [66] 孙荣嵘, 冯小华, 王婷婷, 等. AKT/FoxO3a通路在白藜芦醇抑制大鼠肾脏间质纤维化中的作用[J]. *药物评价研究*, 2019, 42(11): 2165-8.
- [67] 杨伟源, 李理, 郑林鑫, 等. EGFR/Foxo3a/Snail1通路在博来霉素肺纤维化小鼠中的作用机制探讨[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2020, 19(4): 371-8.

(编辑:林萍)