

基于网络药理学和动物验证探究健脾益肾方对大鼠肾性贫血的影响及机制



李常慧¹, 赖珍沁¹, 陈秋谷², 王 蕤¹, 张尚斌^{1, 2}, 李顺民¹, 刘志承¹, 陈剑平^{1, 2}

1. 广州中医药大学第四临床医学院 (广东深圳 518033)

2. 深圳市中医院/深圳市医院中药制剂研究重点实验室 (广东深圳 518033)

【摘要】目的 基于高效液相色谱-三重四极杆串联质谱 (HPLC-QQQ-MS/MS)、网络药理学、分子对接及实验验证研究健脾益肾方治疗肾性贫血的作用机制。**方法** 采用 HPLC-QQQ-MS/MS 技术, 测定健脾益肾方的化学成分, 运用 TCMIP v2.0 等数据库预测健脾益肾方化学成分与肾性贫血的靶点、通路, 绘制出“交集成分-交集靶点-通路”网络图, 筛选出健脾益肾方治疗肾性贫血的核心靶点及核心成分, 并通过分子对接和动物实验进一步验证核心靶点和成分。**结果** 从健脾益肾方中共鉴定出 11 个化学成分, 通过 Draw Venn Diagram 平台筛选得到 81 个交集靶点, 提示丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚单位 α (PIK3CA)、表皮生长因子受体 (EGFR)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (BCL2)、V-Ha-Ras 肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS) 等为核心靶点, 丹酚酸 A、迷迭香酸、大黄酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊异黄酮为核心成分。分子对接结果显示, 网络药理学预测的核心靶点和成分可靠性较高; 动物实验表明, 健脾益肾方显著改善慢性肾脏病大鼠肾损伤和血常规参数, 通过抑制 EGFR 从而治疗肾性贫血。**结论** 通过成分测定和网络药理学关联分析、分子对接及实验验证, 阐明健脾益肾方通过抑制 EGFR 治疗肾性贫血的作用机制, 为其临床应用提供参考依据。

【关键词】 健脾益肾方; 肾性贫血; 表皮生长因子受体; 网络药理学; 高效液相色谱-三重四极杆串联质谱; 慢性肾脏病

【中图分类号】 R969

【文献标识码】 A

Exploration of the effect and mechanism of Jianpi Yishen formula on renal anemia in rats based on the network pharmacology and animal validation

LI Changhui¹, LAI Zhenqin¹, CHEN Qiugu², WANG Rui¹, ZHANG Shangbin^{1,2}, LI Shunmin¹, LIU Zhicheng¹, CHEN Jianping^{1,2}

1. The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China

2. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen Key Laboratory of Hospital Chinese Medicine Preparation, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China

Corresponding authors: CHEN Jianping, Email: lycjp@126.com; LIU Zhicheng, Email: Liuzhch66@sohu.com

【Abstract】Objective To study the mechanism of Jianpi Yishen formula in the treatment

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202409088

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81804052); 深圳市医疗卫生三名工程项目 (SZZYSM202111002); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20240813152222028、ZDSYS201606081515458)

通信作者: 陈剑平, 博士, 教授, 主任中药师, 博士研究生导师, Email: lycjp@126.com

刘志承, 教授, 主任中药师, 硕士研究生导师, Email: Liuzhch66@sohu.com

of renal anemia based on HPLC-QQQ-MS/MS, network pharmacology, molecular docking and experimental verification. **Methods** The chemical constituents of Jianpi Yishen formula were analyzed by HPLC-QQQ-MS/MS. TCMIP v2.0 and other databases were used to predict the targets and pathways of chemical constituents and renal anemia, and the "intersection component-intersection target-pathway" connection network was drawn to predict the core targets and compounds in the treatment of renal anemia. The core targets and compounds were further validated by molecular docking and animal experiments. **Results** A total of 11 components were identified from Jianpi Yishen formula. Through Draw Venn Diagram, 81 targets in Jianpi Yishen formula related to renal anemia were screened, suggesting that AKT1、PIK3CA、EGFR、BCL2、HRAS, etc may be key targets and Salvianolic acid A, Rosmarinic acid, Rhein, Calycosin-7-glucoside and Calycosin may be key components. Molecular docking results showed that the core targets and components of network pharmacology prediction was of high reliability. Animal experiments showed that Jianpi Yishen formula significantly improved kidney injury and hematological parameters in chronic kidney disease rats and inhibited EGFR to treat renal anemia. **Conclusion** Through constituents characterization and network pharmacological association analysis, molecular docking and experimental verification, the mechanism of Jianpi Yishen formula in the treatment of renal anemia by inhibiting EGFR was clarified, which can provide a basis for its clinical application.

【Keywords】 Jianpi Yishen formula; Renal anemia; Epidermal growth factor receptor; Network pharmacology; HPLC-QQQ-MS/MS; Chronic kidney disease

肾性贫血是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 最常见的并发症之一。CKD 是指肾脏结构或功能异常, 且病程超过 3 个月^[1]。研究表明, CKD 是全球预后不良的十大因素之一, 在过去 30 年中, 其患病率上升了 40%^[2]。肾性贫血是指各种肾脏病致肾功能下降时, 肾脏促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 生成减少及血浆中一些毒性物质干扰红细胞生成并缩短其寿命而导致的贫血, 其加速了 CKD 的进程, 大大提升了患者的死亡风险^[3]。肾性贫血的发病机制复杂, 包括铁代谢紊乱、EPO 缺乏和慢性炎症等。目前治疗肾性贫血的药物主要包括红细胞生成刺激剂 (erythropoiesis-stimulating agent, ESAs)、铁剂和低氧诱导因子脯氨酰羟化酶抑制剂。但高剂量的 ESAs 会导致心脑血管和癫痫等疾病^[4-5]; 长期使用铁剂存在依从性较差、胃肠道反应发生率高等问题^[6-7]; 低氧诱导因子脯氨酰羟化酶抑制剂会引起心血管事件、高钾血症和惊厥等不良反应, 其安全性仍需要更多的临床数据验证。因此, 目前仍需要寻找更安全有效的 CKD 肾性贫血治疗方案。

健脾益肾方由黄芪、白术、山药、酒苡蓉、豆蔻、丹参、大黄和炙甘草 8 味中药组成, 该方进一步研制成由广东省药品监督管理局批准的医疗机构中药制剂。健脾益肾方在临床上用于治疗 CKD 及肾性贫血, 疗效确切, 能显著改善肾功能,

有效降低患者血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 的水平^[8]。本课题组的前期研究表明, 健脾益肾方可通过胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 介导的缺氧诱导因子-2 α (hypoxia inducible factor-2 α , HIF-2 α) 诱导 EPO 的表达, 促进红细胞的生成^[9]。此外, 本课题组还发现 CKD 大鼠存在铁循环功能障碍, Janus 激酶 2 (janus kinase 2, JAK2) / 信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路可纠正 CKD 大鼠的肾性贫血症状, 能显著改善其血常规参数^[10]。而 JAK2/STAT3 信号通路是表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 下游的重要途径^[11]。

本研究通过高效液相色谱-三重四极杆串联质谱 (high performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry, HPLC-QQQ-MS/MS) 对健脾益肾方进行化学成分分析, 并在上述化合物的基础上, 通过网络药理学预测健脾益肾方治疗肾性贫血的潜在靶点、信号通路和核心成分。通过分子对接对预测的核心成分及靶点进行验证, 随后采用腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型验证健脾益肾方治疗肾性贫血的作用机制, 阐明健脾益肾方治疗肾性贫血和 CKD 的科学内涵, 为其临床应用提供依据, 以更好地指导中医临床实践。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 主要仪器

8045 HPLC-QQQ-MS/MS 液质联用仪（日本岛津公司）；A3S-10-10-CE 型超纯水机（美国艾科浦）；KQ5200DE 型数控超声波清洗器（昆山舒美公司）。

1.1.2 主要药品与试剂

健脾益肾方处方中各药味饮片由深圳市中医院药房提供，黄芪饮片（至信药业，批号：240201）、白术饮片（慧达康药业，批号：240301Z）、山药饮片（至信药业，批号：240102）、酒苁蓉饮片（永刚药业，批号：A231207）、豆蔻饮片（富兴通药业，批号：230601）、丹参饮片（永刚药业，批号：A231221）、大黄饮片（永刚药业，批号：A231128）和炙甘草饮片（永刚药业，批号：A240109）；对照品毛蕊异黄酮（批号：wkq19011810，纯度 $\geq 98\%$ ）、丹参酮 II A（批号：wkq16022805，纯度 $\geq 98\%$ ）、丹酚酸 A（批号：WP23050409，纯度 $\geq 98\%$ ）、迷迭香酸（批号：WP23020112，纯度 $\geq 98\%$ ）、黄芪甲苷（批号：wkq16042601，纯度 $\geq 98\%$ ）、芒柄花素（批号：wkq19013002，纯度 $\geq 98\%$ ）、甘草苷（批号：wkq16071504，纯度 $\geq 98\%$ ）、甘草酸（批号：wkq18011803，纯度 $\geq 98\%$ ）购自四川维克奇生物科技有限公司；对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号：111920-201606，纯度 97.6%）、毛蕊花糖苷（批号：111530-201914，纯度 95.2%）、大黄酸（批号：110757-201607，纯度 99.3%）购自中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈（色谱级）、甲酸（质谱级）购自德国默克公司；实验用水为超纯水，其余试剂均为分析纯；ELISA 试剂盒（上海江莱生物，批号：JL15743）。

1.1.3 动物

SPF 级 6~8 周龄雄性 SD 大鼠 18 只，体重 190~210 g，由广东维通利华实验动物技术有限公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK（粤）2022-0063，实验动物质量合格证号：44829700002038，本研究已获中科产业控股（深圳）有限公司动物实验伦理委员会批准（伦理审批号：20220081）。

1.1.4 数据库名称及网址

本文所用到的数据库名称及网址见表 1。

表1 数据库名称及网址

Table 1. Database name and web address

数据库	网址
TCMIP v2.0	http://cn/www.tcmip
Swiss Target Prediction	http://www.swisstargetprediction.ch/
Uniprot	https://www.uniprot.org
Genecards	http://www.genecards.org
OMIM	http://www.omim.org
DisGeNET	http://www.disgenet.org/
Draw Venn Diagram平台	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/
DAVID	https://david.ncicrf.gov/
微生信在线	http://www.bioinformatics.com.cn/
数据分析平台	
PDB	https://www.rcsb.org
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
CB-Dock2平台	https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php

1.2 方法

1.2.1 健脾益肾方化学成分表征

①供试品溶液制备。取黄芪 300 g、白术 100 g、山药 300 g、酒苁蓉 100 g、豆蔻 100 g、丹参 150 g、大黄 100 g、甘草 60 g，加入 8 倍量的水，煮 2 次，每次 1 h，合并煎液，浓缩成 1 g/mL（以生药材计）的溶液，通过喷雾干燥制备成粉末。将健脾益肾粉末置于 -80°C 冰箱储存，使用时加入超纯水溶解，超声 10 min，涡旋 1 min，离心取上清液。取健脾益肾粉末 0.55 g，置于离心管中，加入甲醇 50 mL，超声提取 30 min，离心 10 min，取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

②色谱条件。色谱柱：Thermo Scientific Hypersil GOLD（150 mm $\times$ 4.6 mm，3 μm ）；流动相为乙腈（A）-0.1% 甲酸水（B），梯度洗脱（为 0~20 min，28%~40% A；20~25 min，40%~70% A；25~26 min，70%~90% A；26~36 min，90% A；36~37 min，90%~28% A）；柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ ；流速为 0.40 mL/min；进样体积为 5 μL ^[12]。

③质谱条件。质谱采用电喷雾离子源；多反应监测模式；正负离子同时检测；检测器电压 1.74 kV；离子源温度 300 $^{\circ}\text{C}$ ；离子源电压 4.0 kV；雾化气流量 3.0 L/min；干燥气流量 10.0 L/min；加热气流量 10.0 L/min。

1.2.2 网络药理学分析

①靶点预测及标准化。借助 TCMIP v2.0 和 Swiss Target Prediction 对质谱鉴定的化学成分进行靶点预测。采用 OMIM、Genecards 和 DisGeNET 平

台,以“CKD anemia”“Renal anemia”为关键词,筛选疾病靶点。将得到的药物成分靶点和疾病靶点名称通过 Uniport 数据库使其标准化为基因名。

②交集靶点的筛选。利用 Draw Venn Diagram 将成分与疾病的靶点取交集,并绘制韦恩图,得到健脾益肾方与肾性贫血的交集靶点,并筛选出交集靶点对应的交集成分。

③GO 分析和 KEGG。将健脾益肾方与肾性贫血的交集靶点导入 DAVID 数据库,进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析,采用微生信在线数据分析平台对结果进行可视化,结果分别以柱状图和气泡图形式呈现。

④“交集靶点-交集成分-通路”相互作用网络构建。选取上述筛选得到的交集靶点、交集成分和 KEGG 富集的前 20 条通路,采用 CytoScape 3.8.0 软件构建“交集靶点-交集成分-通路”相互作用网络,并进行拓扑分析,设置靶点大小与度(degree)值成正比。在网络图中,“节点”分别代表交集靶点、交集成分、通路。“边”表示上述节点之间的关系。根据 degree 值的大小,筛选核心靶点和核心成分。

1.2.3 分子对接验证

基于“交集成分-交集靶点-通路”相互作用网络,选取网络中 degree 值排名前 5 的核心靶点与核心成分进行分子对接验证。分别在 PDB 数据库、PubChem 数据库下载核心靶点的蛋白晶体结构和核心成分的 3D 结构,将其分别导入 CB-Dock2 平台进行分析处理,并使用 PyMol 2.4 软件进行可视化分析。

1.2.4 实验验证

将 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组和给药组,每组 6 只。正常对照组:不进行干预处理;模型组:使用含 0.75% 腺嘌呤的饲料喂养大鼠 4 周,以建立腺嘌呤诱导的 CKD 模型;给药组:用含 0.75% 腺嘌呤的饲料喂养 4 周,第 3 周起开始以灌胃的方式给予健脾益肾方(3.92 g/kg)进行干预^[10, 13]。给药结束后,使用 20% 乌拉坦溶液对大鼠进行麻醉,通过腹主动脉取血,收集血液用于血常规分析和 ELISA 检测,同时摘取大鼠的肾脏。大鼠肾脏组织在 10% 中性福尔马林溶液中固定 48 h 后,经过常规脱水和石蜡包埋,切片后进行 Masson 和 PAS 染色。

根据网络药理学预测的核心靶点及分子对

接的情况,结合文献检索,使用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清的 EGFR 的表达。往预先包被有大鼠 EGFR 抗体的微孔中,依次加入待测样品或不同浓度标准品,随后向各孔内添加生物素标记的检测抗体及 HRP 酶结合物,经过温育和洗涤后,使用 TMB 作为底物进行显色反应,利用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值,计算样品浓度。

2 结果

2.1 化合物的鉴定

本研究利用 HPLC-QQQ-MS/MS 技术,采用正、负离子扫描模式采集数据,总离子色谱图见图 1,通过高分辨质谱数据分析、结合课题组前期研究^[12]对健脾益肾方成分进行快速、全面的定性分析,初步鉴定出健脾益肾方中 11 种化学成分。

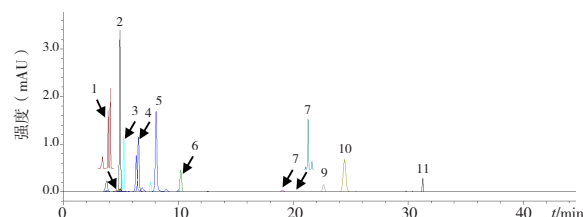


图1 健脾益肾方总离子色谱图

Figure 1. Total ion chromatography of Jianpi Yishen formula

注: 1. 毛蕊花糖苷; 2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 3. 甘草苷; 4. 迷迭香酸; 5. 丹酚酸A; 6. 毛蕊异黄酮; 7. 芒柄花素; 8. 黄芪甲苷; 9. 甘草酸; 10. 大黄花酸; 11. 丹参酮IIA。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 健脾益肾方化学成分治疗肾性贫血交集靶点

本研究通过数据库筛选共获得健脾益肾方化学成分相关靶点 475 个,肾性贫血相关靶点 866 个。将健脾益肾方化学成分作用靶点和肾性贫血相关靶点导入 Draw Venn Diagram 在线作图网站绘制韦恩图,筛选出健脾益肾方治疗肾性贫血靶点 81 个(图 2)。

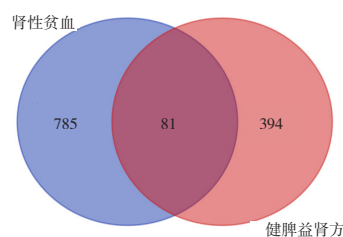


图2 健脾益肾方成分与肾性贫血交集靶点的韦恩图

Figure 2. Venn diagram of intersection targets of Jianpi Yishen formula constituents and renal anemia

说明结合活性越好。如图6所示,核心成分与核心靶点均有较好的结合活性,提示网络药理预测的核心靶点及核心成分具有较高的可靠性。将结合活性最强的前6个成分靶点的对接结果利用 PyMol 2.4 进行可视化,如图7所示。

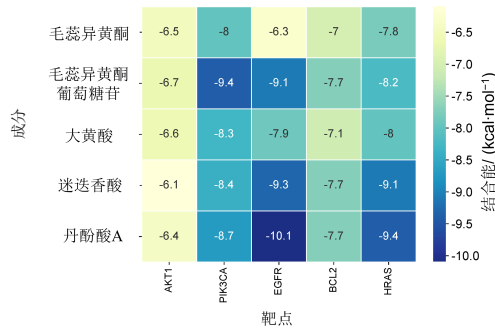


图6 分子对接评分热图

Figure 6. Heatmap of the molecular docking score

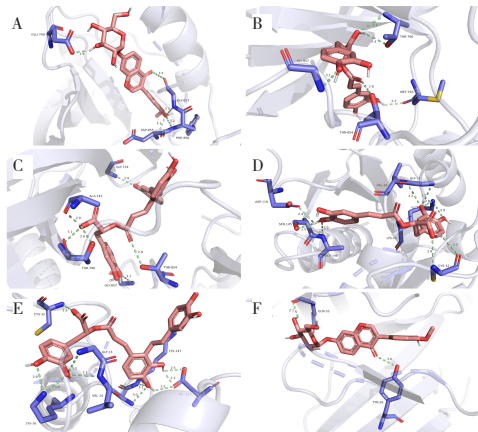


图7 分子对接示意图

Figure 7. Schematic representation of the molecular docking

注: A. EGFR (8A27) - 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; B. EGFR (8A27) - 迷迭香酸; C. EGFR (8A27) - 丹酚酸A; D. HRAS (2CE2) - 迷迭香酸; E. HRAS (2CE2) - 丹酚酸A; F. PIK3CA (7L1C) - 毛蕊异黄酮葡萄糖苷。

2.4 实验验证

图8的PAS染色显示,与正常对照组相比,CKD大鼠肾脏表现出肾小球肥大、肾小管上皮细胞萎缩和脱落;与模型组相比,健脾益肾方给药组显著减轻肾脏损伤。Masson染色显示,CKD大鼠肾脏的纤维化面积较正常大鼠明显增大;与模型组相比,健脾益肾方给药组显著减少CKD大鼠肾脏的纤维化面积。以上结果表明,健脾益肾方对CKD大鼠具有肾保护作用。

此外,实验结果显示,与正常对照组相比,模型组显著降低血液中红细胞 (red blood cell, RBC)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB) 和红细胞压积 (hematocrit, HCT) 水平 ($P<0.05$), 表明

CKD大鼠具有贫血并发症;与模型组相比,健脾益肾方给药组明显提高CKD大鼠的红细胞、血红蛋白和红细胞压积水平 ($P<0.01$) (图9)。以上结果表明,健脾益肾方可纠正CKD大鼠贫血的状态。

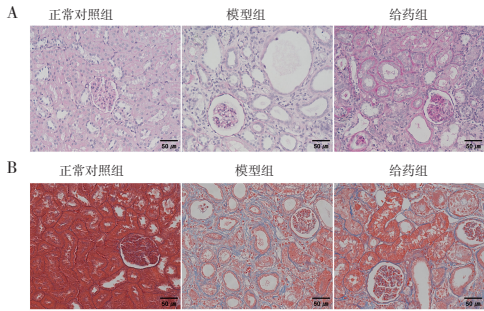


图8 健脾益肾方对CKD大鼠肾脏损伤的影响

Figure 8. Effects of Jianpi Yishen formula on kidney function in CDK rats

注: A. PAS染色; B. Masson染色。

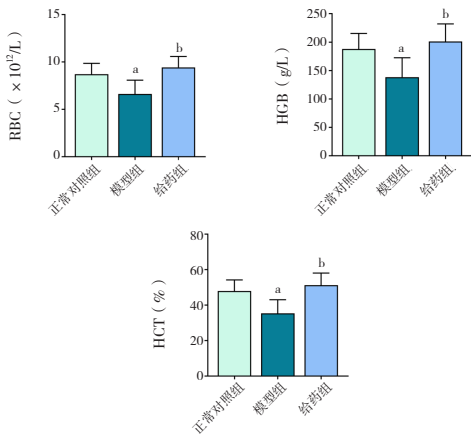


图9 健脾益肾方对CKD大鼠贫血的影响 ($n=6$)

Figure 9. Effect of Jianpi Yishen formula on anemia in CKD rats ($n=6$)

注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.01$ 。

根据分子对接的结果,结合查阅的相关文献,本研究选择EGFR核心靶点进行验证。结合说明书,采用试剂盒检测大鼠血清的EGFR (图10)。结果表明,与正常对照组相比,CKD大鼠的EGFR水平显著增加 ($P<0.01$),健脾益肾方给药组显著降低EGFR的表达 ($P<0.05$)。

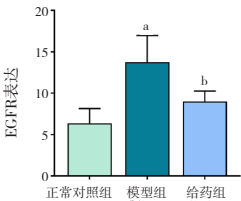


图10 大鼠血清EGFR水平 ($n=6$)

Figure 10. Serum EGFR level in CKD rats ($n=6$)

注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.01$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$ 。

3 讨论

网络药理学是一个多学科研究体系,通过整合大量信息提出新的发现,融合了计算和实验方法。HPLC-QQQ-MS/MS 与其他分析技术相比,具有灵敏度高、分辨率高、检测限低、分析快速等优点,能够对化合物进行高效地分离和筛选^[14],从而识别中药复杂体系中的各类成分及其化学结构。因此,本研究采用 HPLC-QQQ-MS/MS 对健脾益肾方的化学成分进行表征,将检测到的化合物用于网络药理学的分析,根据该成分的结构式检索对应的靶点,将传统的“单靶点、单个药”的研究模式转变为“多靶点、多组分”的研究模式,更好地适应中药方剂“多靶点、多通路、多环节”的特点,使结果更可靠、更有说服力。

健脾益肾方重用黄芪益气健脾、升阳固表为君;山药、白术健脾补肾,以助肾脏气化为臣;酒苁蓉温肾扶阳、润肠通便,豆蔻温中化湿行气共为佐药,助膀胱气化,利水消肿;丹参、大黄活血祛瘀为使,可开启脾胃升降之枢,通腑泻浊,清解血分之毒;炙甘草调和诸药。诸药合用,攻补兼施,共奏健脾益肾、活血化浊之功,用于脾肾气虚,兼有湿浊、水气和瘀毒。研究表明,黄芪的黄酮类成分具有保肝、调节免疫系统、抗炎、抗感染、抗心肌缺血和消除自由基等药理作用^[15];从黄芪中提取的毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素和芒柄花苷的新型组合,可以激活 EPO 转录的调节因子并缓解环磷酸腺苷诱导的贫血^[16];崔运浩发现黄芪甲苷、毛蕊异黄酮及其配伍能上调 EPO 的表达,促进化疗性骨髓抑制小鼠骨髓干细胞的增殖^[17];毛蕊异黄酮和丹参酮 II A 配伍具有促血管生成的作用,可提高缺血损伤肾小球内皮细胞的迁移能力^[18]。白术能改善 CKD 大鼠的骨骼肌萎缩,减轻氧化应激和自噬^[19]。研究发现,大黄酸能改善微循环,降低机体的内毒素水平,减少炎症细胞因子的产生^[20]。迷迭香酸通过提高氧化酶活性、增强清除自由基能力等发挥抗心肌缺血损伤的作用^[21];小鼠腹腔注射迷迭香酸可减轻脑缺血再灌注损伤^[22]。丹参已被广泛用于治疗心血管疾病^[23-24],其中丹参素具有改善心血管功能的作用^[25];丹酚酸 A、丹参酮 I 以及两者联合具有促进缺血下肢血管正常化、降低血管渗漏、增强血管灌注等作用^[26];丹酚酸 A 可通过抗氧化

作用延缓慢性肾衰竭大鼠肾损伤^[27]。

临床研究发现,健脾益肾方不仅能显著改善慢性肾功能衰竭营养不良患者的营养状况,且在口服氯沙坦基础上加服健脾益肾方比单服氯沙坦的疗效更为显著,能明显降低 Scr 及 BUN 的水平^[8];杨曙东等^[28]发现,健脾益肾方能显著提高慢性肾功能衰竭营养不良患者血清中的血清白蛋白、前白蛋白、转铁蛋白、血清胆固醇浓度,缓解临床症状。实验方面,Liu 等^[13,29]发现,健脾益肾方可通过调节色氨酸代谢和芳基羟受体信号通路改善肾功能损伤和纤维化以及通过激活 SIRT3、调节线粒体动力学和抗氧化作用增强培哚普利对 CKD 的抑制作用。此外,有研究表明健脾益肾方可通过抑制炎症反应和细胞凋亡,缓解核因子 E2 相关因子 2 信号通路激活所介导的氧化损伤^[30]。

肾性贫血作为 CKD 的严重并发症之一,本课题组前期研究表明,健脾益肾方具有双向免疫调节作用,在不同条件下可调节 RAW 264.7 细胞的促炎细胞因子水平及通过激活 HEK293T 细胞内人表皮生长因子受体介导的转录活性,促进 EPO 的表达,具备一定的造血功能^[31];此外,本研究发现 CKD 大鼠存在铁循环功能障碍,健脾益肾方可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路,改善铁代谢紊乱,从而治疗 CKD 和肾性贫血^[10]。而 JAK2/STAT3 信号通路是 EGFR 下游的重要途径。本研究表明,健脾益肾方能显著降低肾性贫血大鼠 EGFR 的表达,与课题组前期研究的改善铁代谢紊乱的作用机制相契合,表明健脾益肾方通过抑制 EGFR 诱导的 JAK2/STAT3 通路,降低铁调素的表达,促进铁的动员和利用,有利于血红蛋白的合成,为健脾益肾方在临床上的应用提供了科学依据。

参考文献

- 1 Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline[J]. *Ann Intern Med*, 2013, 158(11): 825-830. DOI: [10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007](https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007).
- 2 Li Y, Ning YC, Shen B, et al. Temporal trends in prevalence and mortality for chronic kidney disease in China from 1990 to 2019: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Clin Kidney J*, 2023, 16(2): 312-321. DOI: [10.1093/ckj/sfac218](https://doi.org/10.1093/ckj/sfac218).

- 3 王霞, 薛凌宇. 肾性贫血发病机制研究进展 [J]. 山东第一医科大学 (山东省医学科学院) 学报, 2022, 43(2): 142–147. [Wang X, Xue LY. Advances in the pathogenesis of renal anemia[J]. Journal of Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, 2022, 43(2): 142–147.] DOI: [10.3969/j.issn.2097-0005.2022.02.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.2097-0005.2022.02.013).
- 4 成水芹, 周婷婷, 张志宏, 等. 罗沙司他和重组人促红细胞生成素对腹膜透析患者血压及心脑血管并发症的影响 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2022, 31(1): 9–14. [Cheng SQ, Zhou TT, Zhang ZH, et al. Roxadustat and recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and cardio-cerebrovascular complications in patients undergoing peritoneal dialysis[J]. Chinese Journal of Nephrology, Dialysis & Transplantation, 2022, 31(1): 9–14.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-298X.2022.01.002](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-298X.2022.01.002).
- 5 李璐璐, 黄铁花, 卫四宝, 等. 重组人促红细胞生成素不良反应 149 例文献分析 [J]. 中国药师, 2018, 21(3): 438–441. [Li LL, Huang TH, Wei SB, et al. Literature analysis of adverse reactions induced by recombinant human erythropoietin in 149 case reports[J]. Frontiers in Pharmaceutical Sciences, 2018, 21(3): 438–441.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-049X.2018.03.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-049X.2018.03.016).
- 6 陈玲伟, 柯颖杰, 李云生, 等. 罗沙司他在 ESAs 治疗无效的透析患者中的应用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2021, 22(11): 1011–1013. [Chen LW, Ke YJ, Li YS, et al. Application of Roxadustat in dialysis patients with ineffective ESAs therapy[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2021, 22(11): 1011–1013.] DOI: [10.3969/j.issn.1009-587X.2021.11.022](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-587X.2021.11.022).
- 7 赵卫红, 裴小华. 铁剂在肾性贫血的应用体会 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2018, 27(1): 52–53. [Zhao WH, Pei XH. Experiences on the application of iron agents in renal anemia[J]. Chinese Journal of Nephrology, Dialysis & Transplantation, 2018, 27(1): 52–53.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-298X.2018.01.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-298X.2018.01.011).
- 8 易铁钢, 祁爱蓉, 易无庸. 健脾益肾方治疗慢性肾衰竭 62 例临床观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2004, 5(3): 149–151. [Yi TG, Qi AR, Yi WY, et al. The clinical study of the Jianpiyishen fang in treating chronic renal failure[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2004, 5(3): 149–151.] DOI: [10.3969/j.issn.1009-587X.2004.03.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-587X.2004.03.009).
- 9 Wang FC, Yu HM, Huang SY, et al. Jian-Pi-Yi-Shen regulates EPO and iron recycling protein expressions in anemic rats with chronic kidney disease: accumulation of hypoxia inducible factor-2 α via ERK signaling[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 8894257. DOI: [10.1155/2020/8894257](https://doi.org/10.1155/2020/8894257).
- 10 Li CH, Huang HP, Wang R, et al. Jian-Pi-Yi-Shen formula restores iron metabolism from dysregulation in anemic rats with adenine-induced nephropathy[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 312: 116526. DOI: [10.1016/j.jep.2023.116526](https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116526).
- 11 Colomiere M, Findlay J, Ackland L, et al. Epidermal growth factor-induced ovarian carcinoma cell migration is associated with JAK2/STAT3 signals and changes in the abundance and localization of α 6 β 1 integrin[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(5): 1034–1045. DOI: [10.1016/j.biocel.2008.09.018](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.018).
- 12 Wang F, Huang S, Chen Q, et al. Chemical characterisation and quantification of the major constituents in the Chinese herbal formula Jian-Pi-Yi-Shen pill by UPLC-Q-TOF-MS/MS and HPLC-QQQ-MS/MS[J]. Phytochem Anal, 2020, 31(6): 915–929. DOI: [10.1002/pca.2963](https://doi.org/10.1002/pca.2963).
- 13 Liu XH, Deng RY, Chen YL, et al. Jian-Pi-Yi-Shen formula improves adenine-induced chronic kidney disease via regulating tryptophan metabolism and aryl hydrocarbon receptor signaling[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 922707. DOI: [10.3389/fphar.2022.922707](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.922707).
- 14 雷慧博, 余雅婷, 韩璐, 等. 基于 HPLC-QQQ-MS 技术探讨炮制对肉苁蓉中 5 个活性成分的含量影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(1): 86–93. [Lei HB, Yu YT, Han L, et al. Influence of processing on the content of five active components in Cistanche tubulosa based on HPLC-QQQ-MS technology[J]. Natural Product Research and Development, 2024, 36(1): 86–93.] DOI: [10.16333/j.1001-6880.2024.1.010](https://doi.org/10.16333/j.1001-6880.2024.1.010).
- 15 陈建真, 吕圭源, 叶磊, 等. 黄芩黄酮的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 医药导报, 2009, 28(10): 1314–1316. [Chen JZ, Lyu GY, Ye L, et al. Advances in research on chemical constituents and pharmacological effects of Astragalus Flavonoids[J]. Herald of Medicine, 2009, 28(10): 1314–1316.] DOI: [10.3870/ydyb.2009.10.030](https://doi.org/10.3870/ydyb.2009.10.030).
- 16 Zhang L, Gong AGW, Riaz K, et al. A novel combination of four flavonoids derived from Astragali Radix relieves the symptoms of cyclophosphamide-induced anemic rats[J]. FEBS Open Bio, 2017, 7(3): 318–323. DOI: [10.1002/2211-5463.12146](https://doi.org/10.1002/2211-5463.12146).
- 17 崔运浩. 黄芩甲苷、毛蕊异黄酮调控化疗性骨髓抑制小鼠骨髓干细胞机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016. <https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10162-1016309750.htm>.
- 18 齐振强. 慢性肾脏病证素特征及黄芩丹参有效单体干预缺血损伤肾小球内皮细胞血管生成的机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019. DOI: [10.27282/d.cnki.gsdu.2019.000131](https://doi.org/10.27282/d.cnki.gsdu.2019.000131).
- 19 Wang MQ, Hu R, Wang YJ, et al. Atractylenolide III attenuates muscle wasting in chronic kidney disease via the oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 1875471. DOI: [10.1155/2019/1875471](https://doi.org/10.1155/2019/1875471).
- 20 马超英, 彭春荣, 耿耘, 等. 大黄酸对内毒素血症小鼠保护作用实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 288–289. [Ma CY, Peng CR, Geng Y, et al. Experimental study on protective effects of rhein treating endotoxemia in rats[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2012, 30(2): 288–289.] DOI: [10.13193/j.archtem.2012.02.66.machy.042](https://doi.org/10.13193/j.archtem.2012.02.66.machy.042).
- 21 刘锡强, 李丽, 田京伟. 迷迭香酸对大鼠心肌缺血损伤保护作用机制的探讨 [J]. 中成药, 2011, 33(7): 1232–1234. [Liu XQ, Li L, Tian JW. Exploration of the protective mechanism of Rosmarinic acid on myocardial ischemic injury in rats[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2011, 33(7): 1232–1234.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-1528.2011.07.039](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1528.2011.07.039).
- 22 刘勇, 杨涛, 梁艳山, 等. 迷迭香酸通过抑制 ROS/NLRP-3 炎症小体信号通路对脑缺血再灌注小鼠的保护作用 [J]. 重庆

- 医学, 2023, 52(19): 2905–2911. [Liu Y, Yang T, Liang YS, et al. Rosmarinic acid protected against brain injury in mice with cerebral ischemia reperfusion via oxidative stress and ROS/NLRP-3 signal pathway inhibition[J]. Chongqing Medical Journal, 2023, 52(19): 2905–2911.] DOI: [10.3969/j.issn.1671-8348.2023.19.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-8348.2023.19.005).
- 23 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 609–618. [Feng KR, Li WX, Wang XY, et al. Chemical components and pharmacological action for *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and predictive analysis on quality markers[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(2): 609–618.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.031](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.031).
- 24 Zhou J, Zhang L, Zheng B, et al. *Salvia miltiorrhiza* bunge exerts anti-oxidative effects through inhibiting KLF10 expression in vascular smooth muscle cells exposed to high glucose[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 262: 113208. DOI: [10.1016/j.jep.2020.113208](https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113208).
- 25 舒菁菁, 李菲, 董雅芬, 等. 丹参素药理作用及机制的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2012, 30(4): 266–268, 298. [Shu JJ, Li F, Dong YF, et al. Progress on the pharmacological actions and mechanism of Danshensu[J]. Journal of Pharmaceutical Practice and Service, 2012, 30(4): 266–268, 298.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-0111.2012.04.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-0111.2012.04.006).
- 26 张珊. 基于血管正常化探讨丹参调控肿瘤血管和下肢缺血疾病血管的作用及机制 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2022. DOI: [10.27253/d.cnki.gnjzu.2022.000031](https://doi.org/10.27253/d.cnki.gnjzu.2022.000031).
- 27 Zhang GM, Cui GH, Tong SX, et al. Salvianolic acid A alleviates the renal damage in rats with chronic renal failure[J]. Acta Cir Bras, 2019, 34(2): e201900204. DOI: [10.1590/s0102-8650201900204](https://doi.org/10.1590/s0102-8650201900204).
- 28 杨曙东, 易无庸, 唐新征, 等. 健脾益肾方治疗慢性肾功能衰竭营养不良 40 例临床研究 [J]. 湖南中医药导报, 2004, 10(7): 3–5, 16. [Yang SD, Yi WY, Tang XZ, et al. Clinical study of jianpiyishen decoction for the treatment of 40 cases of malnutrition caused by chronic renal failure[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2004, 10(7): 3–5, 16.] DOI: [10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2004.07.002](https://doi.org/10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2004.07.002).
- 29 Liu XH, Deng RY, Wei X et al. Jian-Pi-Yi-Shen formula enhances perindopril inhibition of chronic kidney disease progression by activation of SIRT3, modulation of mitochondrial dynamics, and antioxidant effects[J]. Biosci Rep, 2021, 41(10): BSR20211598. DOI: [10.1042/BSR20211598](https://doi.org/10.1042/BSR20211598).
- 30 Zhou FY, Zou XH, Zhang J, et al. Jian-Pi-Yi-Shen formula ameliorates oxidative stress, inflammation, and apoptosis by activating the Nrf2 signaling in 5/6 nephrectomized rats[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 630210. DOI: [10.3389/fphar.2021.630210](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.630210).
- 31 Chen JP, Gong AGW, Liu XY, et al. A Chinese herbal decoction, Jian-Pi-Yi-Shen, regulates the expressions of erythropoietin and pro-inflammatory cytokines in cultured cells[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1): 119. DOI: [10.1186/s12906-018-2146-4](https://doi.org/10.1186/s12906-018-2146-4).
- 收稿日期: 2024 年 09 月 25 日 修回日期: 2025 年 01 月 02 日
本文编辑: 李 阳 钟巧妮