

网络药理学结合转录组学方法探讨防己黄芪汤治疗肾病综合征作用机制

万浩婷^{1,2,3}, 刘晴^{1,2,3}, 刘路瑶^{1,2,3}, 谢林彤^{1,2,3}, 朱慧^{1,2,3}, 刘晓^{1,2,3}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210023; 3. 南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 基于转录组学与网络药理学方法探讨防己黄芪汤治疗肾病综合征的作用机制。方法 收集网络药理学和转录组学的共同靶点, 进行 GO/KEGG 功能富集分析。构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 并进行网络拓扑分析, 确定潜在核心靶点。构建通路-靶点网络图, 确定发挥关键作用的信号通路。采用 qPCR、Western blot 法和免疫荧光染色验证大鼠肾脏组织中核心靶点的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 PPI 分析得到 7 个潜在核心靶点 AKT1、AMPK、CPT1B、NF- κ B1、P53、TGF- β 1 和 TLR4, 主要信号通路为 AMPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、PPAR 信号通路、NF- κ B 信号通路、TGF- β 信号通路、P53 信号通路、MAPK 信号通路、JAK-STAT 信号通路和 FoxO 信号通路。经动物体内实验验证, 防己黄芪汤显著下调 AKT1、CPT1B、NF- κ B1、P53、TGF- β 1、TLR4 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 上调 AMPK 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。结论 从网络药理学和转录组学角度初步阐明了防己黄芪汤治疗肾病综合征多成分、多靶点、多途径的整体调节特点, 可为后续的药理学研究和临床应用提供依据与参考。

关键词: 防己黄芪汤; 肾病综合征; 转录组学; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2023)04-0346-13

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2023.0346

引文格式: 万浩婷, 刘晴, 刘路瑶, 等. 网络药理学结合转录组学方法探讨防己黄芪汤治疗肾病综合征作用机制[J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(4): 346-358.

Mechanism of Fangji Huangqi Tang against Nephrotic Syndrome Based on Network Pharmacology and Transcriptomics

Methods

WAN Hao-ting^{1,2,3}, LIU Qing^{1,2,3}, LIU Lu-yao^{1,2,3}, XIE Lin-tong^{1,2,3}, ZHU Hui^{1,2,3}, LIU Xiao^{1,2,3}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China; 3. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the mechanism of Fangji Huangqi Tang (FHT) in the treatment of nephrotic syndrome (NS) based on transcriptomics and network pharmacology. **METHODS** Intersection target genes of network pharmacology and transcriptomics were collected for GO/KEGG functional enrichment analysis. Protein-protein interactions (PPI) were constructed and network topology analysis was performed to identify potential core targets. The pathway-target network map was constructed to identify the key signaling pathways. Finally, real-time quantitative PCR (qPCR), western blot and immunofluorescence staining were used to verify the mRNA and protein expression levels of core targets in kidney tissues of rats. **RESULTS** Seven potential core targets AKT1, AMPK, CPT1B, NF- κ B1, P53, TGF- β 1 and TLR4 were identified by PPI analysis. The main signaling pathways were AMPK, PI3K-Akt, PPAR, NF- κ B, TGF- β , P53, MAPK, JAK-STAT and FoxO. In animal experiments, FHT significantly down-regulated the mRNA and protein expression levels of AKT1, CPT1B, NF- κ B1, P53, TGF- β 1, TLR4 ($P < 0.05$), and up-regulated the mRNA and protein expression levels of AMPK ($P < 0.05$). **CONCLUSION** From the perspective of network pharmacology and transcriptomics, the overall regulation features of multi-component, multi-target and multi-pathway of FHT against NS were preliminaries elaborated, which could provide the basis and reference for subsequent pharmacological research and clinical application of FHT.

KEYWORDS: Fangji Huangqi Tang; nephrotic syndrome; transcriptomics; network pharmacology; mechanism

肾病综合征是一组肾小球疾病的临床综合征, 主要表现为大量蛋白尿、水肿、高脂血症、低蛋白血

收稿日期: 2022-11-01

基金项目: 江苏省高等学校基础科学(自然科学)重大项目(21KJA360008)

第一作者: 万浩婷, 女, 硕士研究生, E-mail: 15962763705@163.com

通信作者: 刘晓, 女, 副教授, 主要从事中药炮制机理与饮片质量控制研究, E-mail: 300999@njucm.edu.cn

症等。由于大量蛋白质通过尿液流失,患者体内蛋白质的含量下降,容易引起血浆胶体渗透压的降低^[1]。早期诊断和治疗可有效延缓肾病综合征进展。目前,免疫抑制剂和糖皮质激素类药物是治疗轻早期和中期肾病综合征的临床常用药物,但这些药物仅针对症状,无法根本改善肾病综合征病理状况,常伴有感染、器官衰竭等不良反应,且复发率高^[2-3]。

防己黄芪汤出自《金匱要略》,全方包括粉防己(*Stephaniae Tetrandrae Radix*)、黄芪(*Astragali Radix*)、白术(*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*)和甘草(*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*),具有益气利水,健脾祛湿之功效,临床常用于治疗肾病综合征、风湿性关节炎、心脏性水肿等^[4]。由于中药复方化学成分复杂,常通过多环节、多靶点联合发挥药效,故防己黄芪汤治疗肾病综合征的起效机制尚不够明确。近年来,网络药理学联合转录组学的研究策略,因兼具宏观性和微观性的显著特点而被认为是探索中药作用机制的合适方法^[5-8]。本文采用网络药理学对防己黄芪汤治疗肾病综合征的分子网络机制进行分析,应用转录组学对大鼠肾脏组织的RNA样本进行测序及生信分析,同时使用分子生物学技术对前期筛选出关键分子的表达量进行考察与验证,以期发现防己黄芪汤治疗肾病综合征的作用机制。

1 材料

1.1 试药与仪器

饮片购自安徽铜陵禾田中药饮片有限公司;粉防己饮片原产甘肃(批号:20210628),黄芪饮片原产甘肃(批号:20210406),白术饮片原产安徽(批号:20210618),甘草饮片原产新疆(批号:20210726),经南京中医药大学陈建伟教授鉴定均为正品,各项检查均符合《中国药典》2020年版要求。

盐酸阿霉素购于大连美仑生物技术有限公司(货号:20210814);BCA试剂盒(货号:20210422),尿素氮(BUN)试剂盒(货号:20210512),胆固醇(TC)试剂盒(货号:20210321),甘油三酯(TG)试剂盒(货号:20210326),半胱氨酸蛋白酶抑制剂C(Cys-C)试剂盒(货号:20210402)于南京建成生物研究所购买。超纯RNA提取试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司(货号:62387);AKT1抗体(货号:AF01510),p-AKT1抗体(货号:3033S)、AMPK抗体(货号:AF300361)、p-AMPK抗体(货号:AF00447)、CPT1B抗体(货号:AF300562)、NF-

κB1抗体(货号:AF02889)、P53抗体(货号:AF05780)、TGF-β1抗体(货号:AF03634)、TLR4抗体(货号:AF02459)均购于湖南艾方生物科技有限公司。β-actin抗体(货号:102419210608)购于上海碧云天生物技术有限公司。

BP211D电子天平(德国Sartorius公司);高速离心机(美国Thermo公司);组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司,型号:Tiss-24);多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司,型号:Specra Max j3X);涡旋震荡器(美国Thermo公司);电泳仪(中国BAYGENE公司);PCR仪(美国Thermo公司);超微量紫外分光光度计(美国Thermo Fisher公司,型号:NanoDrop OneC);凝胶成像系统(美国UVP公司);激光显微镜(美国Thermo公司)。

根据《金匱要略》记载,按照以下流程制备防己黄芪汤样品:将粉防己、黄芪、白术、甘草饮片按4:5:3:2质量比混合,10倍量纯水浸泡30 min,大火至沸,改中火20 min,4层纱布过滤,得药渣和8倍量水共煮,20 min后用4层纱布滤过,2次水煎液合并浓缩至浓度为1 g·mL⁻¹[9]。

1.2 动物

浙江省杭州医学院生产SD大鼠,雄性,体质量160~200 g,动物许可证号:SCXK(浙)2019-0002,置室温23~28℃,相对湿度45%±5%环境,自由饮水及摄食。实验操作获南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号:202201A013)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 防己黄芪汤药效活性成分、靶点的获取 参考本课题组前期采用典型相关性分析方法探讨大鼠多次给予防己黄芪汤后化学成分和肾病药效之间的相关性的结果^[10],即:根据不同时间点入血成分强度大小,在各时间点强度均低于100的入血成分不予考虑,选择29种入血原型成分并成功进行了谱效相关分析。基于此,本次防己黄芪汤活性成分选取这29种原型成分,并通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>),根据ADME原则进一步筛选,排除口服生物利用度(OB)<30%和类药性(DL)<0.18的成分,确定防己黄芪汤的活性成分及其靶点信息。通过TCMSP数据库获取每个活性成分对应的靶点信息,同时利用PubChem数据库获取各成分的简化分子线性输入规范并依次导入Swiss Target Predic-

tion 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 靶点预测,物种为“Homo sapiens”,Probability>0.5 的靶点蛋白作为活性成分作用靶点。两者进行合并去重,UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将靶点转换成人源基因名。

2.1.2 肾病综合征疾病靶点获取 以“Adriamycin Nephropathy”和“Nephrotic Syndrome”为关键词检索 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 和 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>),其中 GeneCards 数据库所得靶点以相关性分数由高到低排序,以分值>2 倍中位数为筛选条件筛选靶点,所得结果合并之后去除重复靶点。

2.1.3 构建中药活性成分-靶点相互作用网络 利用 Cytoscape 3.9.1 软件 (<https://cytoscape.org/>) 构建“中药活性成分-靶点”网络图。其中,边代表各节点的相互作用,节点代表中药活性成分和靶基因。节点度值和相连边的数量有关,度值越大,说明网络中与该节点相关的节点数量越多。

2.2 动物实验

2.2.1 造模、分组及给药 大鼠随机分为正常组、模型组和防己黄芪汤组,每组 10 只,适应 1 周,体质量约 300 g,模型组与防己黄芪汤组大鼠于 2 周内分 2 次尾静脉注射阿霉素 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 复制阿霉素肾病综合征大鼠模型^[11-12],正常组注射同体积生理盐水。依据《金匮要略》所载原方剂量和处方临床用量,根据人与大鼠等剂量换算公式折算大鼠给药剂量,将防己黄芪汤煎剂浓缩至 $0.7 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,按照 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药体积灌胃,折合生药量为 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。于第 22 天开始给药干预,连续 5 周。空白组和模型组均灌胃等量生理盐水。各组大鼠于第 0、5、12、17、22、23、24、25、36、44、49、54、57、58、59、60 天眼眶静脉丛取血约 0.5 mL,并于第 0、3、10、13、17、28、45、52 天,用代谢笼收集各组大鼠 24 h 尿液。于实验第 60 天摘取两侧肾脏,生理盐水清洗并吸干,称质量,置于液氮中备用。

2.2.2 血清生化指标测定与肾组织病理检查 24 h 大鼠尿液蛋白、血清 BUN 经比色法测定,血清 Cys-C、TC 和 TG 的含量均通过对应试剂盒测定。经 4% 多聚甲醛固定的大鼠肾脏组织,经脱水、包埋、切片、脱蜡等步骤,进行 HE 及 Masson 染色实验,观察肾间质纤维化、间质浸润、小管萎缩、小管细胞空泡变性等现象。

2.3 转录组测序及数据分析

按照 RNA 提取试剂盒说明书对正常组、模型组和防己黄芪汤组大鼠的肾脏组织进行 RNA 的提取,每组 3 只。将提取的 RNA 溶液委托杭州联川生物技术股份有限公司进行转录组学测序。以表达差异倍数 $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$ 、显著性 $P < 0.05$ 为 DEGs 筛选条件,得到正常组 vs. 模型组、防己黄芪汤组 vs. 模型组的差异表达基因,进一步取交集得到转录组测序的差异表达基因^[13-17]。

2.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

将上述网络药理学和转录组学的靶点基因导入到 Draw Venn Diagram 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 中绘制韦恩图,得到共同靶点。提交 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 并利用 Cytoscape 3.9.1 可视化分析软件的 Clue Go 数据库插件进行基因本体 (GO) 功能富集分析,包括生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 和细胞组分 (CC) 3 个水平;其中京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析设置 $P < 0.01$,得到防己黄芪汤治疗肾病综合征相关的生物学功能和信号通路。

2.5 蛋白质相互作用网络构建及核心靶点筛选

网络药理学和转录组学的共同靶点导入 STRING 在线数据库 (<http://string-db.org/>),物种设置为“Homo sapiens”,设定最低相互作用阈值为高置信度“high confidence = 0.7”,其余参数保持默认设置进行蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 分析,将分析所得结果保存为 *tsv* 格式导入 Cytoscape 3.9.1 软件中,运用“Network Analysis”进行网络拓扑属性分析,最后依据“节点度值”“中介中心性”和“接近中心性”明确潜在核心靶点,3 个参数均大于平均值的蛋白即为防己黄芪汤治疗肾病综合征的潜在核心靶点。最后,利用 Cytoscape 3.9.1 绘制通路-核心靶点网络图并进行网络拓扑属性分析。

2.6 核心靶点基因表达验证

2.6.1 qPCR 实验 Trizol 一步法提取肾脏组织总 RNA,并按逆转录试剂盒说明书操作,构成体积为 20 μL 的 PCR 反应体系,反转录产物 2 μL 、SYBR Green Mix 10 μL 、上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL 。mRNA 定量检测用 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算各基因 mRNA 相对表达量。以 GAPDH 作为内参基因,所有实验共进行 3 次。目的基因的引物序列见表 1。

表1 目的基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of target genes

基因	序列(5'-3')	产物长度/bp
AKT	F: GCTTCTACGGTGC GGAGATTGTGT R: GTCCGTTATCTTGATGTGCCCGTC	125
AMPK	F: GACCTCGGTCAAGTGTCCGATTC R: AACGGGCTAAAGCACTGATAAGA	168
CPT1B	F: ATGTAAGTGACTGGTGGGAAGA R: TGGGATGCGTGTAGTGTGAA	260
NF- κ B1	F: AGATGTGCTGGAGGACTTGCT R: CCGTTGGGGTGTTGATAA	162
P53	F: AAGGAAATCCGTATGCTGAGTAT R: GCACAAACACGAACCTCAAAG	235
TGF- β 1	F: CATTGGAGCCTGGACACACA R: GCTTGGACCCACCTAGTAGAC	136
TLR4	F: AAGACTATCATCACTGTATCGGTGG R: CGTTTCTCACCCAGTCCTCATT	181
GAPDH	F: CGTATCGGACGCCTGGTT R: AGGTCAATGAAGGGTTCGTT	83

2.6.2 Western blot 实验 利用 BCA 试剂盒对肾脏总蛋白定量, SDS-PAGE 电泳, 每孔 30 μ g 蛋白量, 蛋白转印到 PVDF 膜上, 封闭 2 h (5% 脱脂奶粉溶液)。加入相应一抗 AKT (1:1 000), p-AKT (1:1 000), AMPK (1:1 000), p-AMPK (1:1 000), CPT1B (1:1 000), NF- κ B1 (1:1 000), P53 (1:1 000), TGF- β 1 (1:1 000), TLR4 (1:1 000), β -actin (1:3 000), 孵育过夜, TBST 洗膜 4 次, 后加入 IgG-HRP (1:1 000 0) 孵育 2 h; TBST 洗膜 4 次后显影并采集图像, 分度值分析, 计算各个蛋白条带的相

对表达水平。化学发光法检测蛋白条带, 以 β -actin 作为蛋白载量对照, 所有实验共进行 3 次。

2.6.3 免疫荧光染色实验 组织切片脱蜡, 于柠檬酸盐-EDTA 抗原修复液中微波炉加热修复, 5% 的牛血清白蛋白封闭 15 min, AKT (1:1 000), p-AKT (1:1 000), AMPK (1:1 000), p-AMPK (1:1 000), CPT1B (1:1 000), NF- κ B1 (1:1 000), P53 (1:1 000), TGF- β 1 (1:1 000), TLR4 (1:1 000), β -actin (1:3 000) 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日, 荧光二抗于室温下孵育 1 h, 封片用含有 DAPI 的抗荧光淬灭剂, 激光共聚焦显微镜下观察。

2.7 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.03 软件, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示统计结果, 组间的两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 防己黄芪汤药效活性成分及靶点的获取

各中药药效活性成分为粉防己 8 个、黄芪 7 个、白术 3 个和甘草 11 个, 共 29 种, 口服生物利用度和类药性均较高, 基本信息见表 2。通过检索, 29 种活性成分通过 Swiss Target Prediction 数据库查找潜在关联靶点 463 个, 由 GeneCards、DisGeNET 数据库检索得肾病综合征相关靶点 635 个, 将中药活性成分靶点和疾病靶点取交集, 去重, 获得 247 个共同靶点, 即网络药理学预测防己黄芪汤治疗肾病综合征的关键靶点。利用 Cytoscape 3.9.1 构建中药活性成分-靶点网络 (图 1)。

表2 防己黄芪汤活性成分基本信息

Table 2 Basic information of active ingredients of Fangji Huangqi Tang

序号	成分名称	口服生物利用度 (OB)/%	类药性 (DL)	归属药物
1	Calycosin-7-O-D-glucoside	36.52	0.23	防己
2	Corydine	37.16	0.55	防己
3	Isoliquiritigenin	33.64	0.26	防己
4	Fangchinoline	41.73	0.21	防己
5	(-)-Tetrahydropalmatine	73.94	0.64	防己
6	(+)-Tetraandrine	36.64	0.20	防己
7	Liquiritigenin	32.76	0.18	防己
8	Isoliquiritin	38.61	0.60	防己
9	Glycycomarin	43.56	0.44	黄芪
10	Attractylenolide III	35.95	0.21	黄芪
11	Attractylenolide I	37.37	0.19	黄芪
12	Isolicoflavonol	45.17	0.42	黄芪
13	Licoricone	63.58	0.47	黄芪

(续表)

序号	成分名称	口服生物利用度(OB)/%	类药性(DL)	归属药物
14	Atractylenolide II	52.36	0.19	黄芪
15	Licoricidin	30.99	0.62	黄芪
16	(+)-Cassythicine	32.64	0.20	白术
17	Nantenine	35.49	0.74	白术
18	Cyclanoline	42.64	0.57	白术
19	Liquiritin	39.20	0.52	甘草
20	Astragaloside IV	41.78	0.63	甘草
21	Licochalcone B	76.76	0.19	甘草
22	Methylnissofin 3-O-β-D-glucoside	36.22	0.18	甘草
23	Calycosin	45.75	0.24	甘草
24	Fenfangjine F	43.30	0.23	甘草
25	Astragaloside VII	30.94	0.45	甘草
26	Formononetin	69.67	0.22	甘草
27	Vestitol	74.66	0.24	甘草
28	Glycyrrhizin	39.62	0.21	甘草
29	Astragaloside II	46.06	0.23	甘草

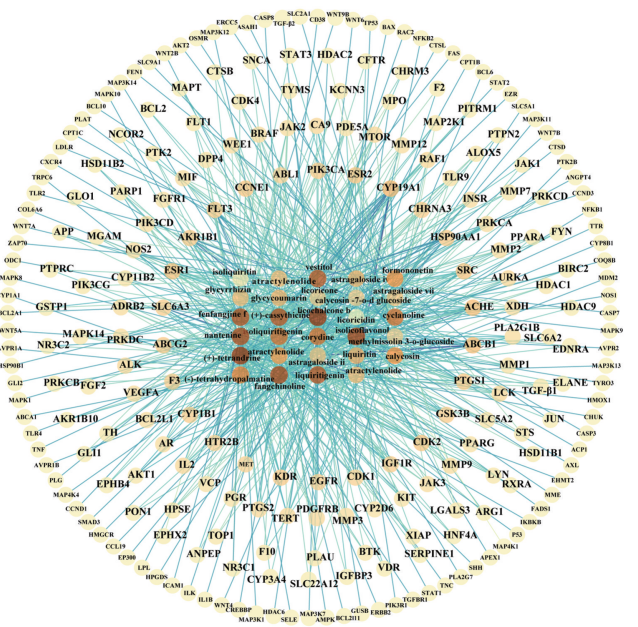


图 1 中药活性成分-靶点网络

Fig. 1 Active ingredient-target network of traditional Chinese medicine

3.2 大鼠肾病综合征相关指标评价

如图 2 所示,模型组和防己黄芪汤组第 17 天大鼠 24 h 尿蛋白含量大于 100 mg,说明阿霉素肾病大鼠模型复制成功。自第 22 天给药防己黄芪汤后,于实验第 28、45、52 天可观察到,相对于正常组,模型组大鼠的 24 h 尿蛋白含量呈现显著升高的趋势 ($P < 0.001$);相对于模型组,防己黄芪汤组大鼠的 24 h 尿蛋白含量呈现显著降低的趋势 ($P < 0.001$)。

给药后(实验第 23、24、25、36、44、49、54、57、58、59、60 天),相对于正常组,模型组大鼠血清中 BUN、TC、TG 和 Cys-C 水平有显著升高的趋势 ($P < 0.001$);相对于模型组,防己黄芪汤组大鼠血清中 BUN、TC、TG 和 Cys-C 水平有显著降低的趋势 ($P < 0.001$)。实验结束时(第 60 天),相对于正常组,模型组大鼠的肾脏指数显著升高 ($P < 0.001$);相对于模型组,防己黄芪汤组大鼠的肾脏指数显著降低 ($P < 0.001$)。

3.3 大鼠肾皮质 HE 和 Masson 染色

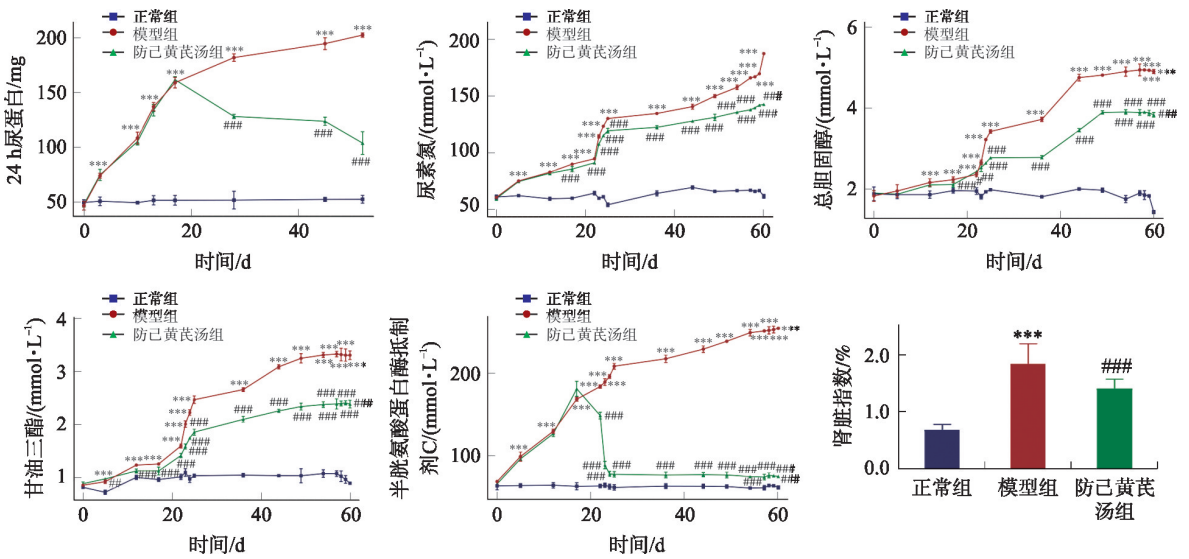
HE 染色显示:正常组结构排列整齐,结构正常,模型组肾脏病变明显,部分肾小球基底膜增厚和上皮细胞肿胀,防己黄芪汤干预后病理有一定的改善。Masson 染色显示:正常组存在较少蓝色的胶原纤维,模型组中存在较多胶原纤维,说明阿霉素造模促使肾组织发生明显的肾纤维化,防己黄芪汤组干预后胶原纤维较模型组变少,肾脏损伤情况有所改善(图 3)。

3.4 转录组测序的差异表达基因

转录组测序显示正常组 vs. 模型组筛选后共得到 2 090 个差异表达基因(上调 1 441 个,下调 949 个)。防己黄芪汤组 vs. 模型组筛选后共得到 1 877 个差异表达基因(上调 694 个,下调 1 183 个)(图 4)。将正常组 vs. 模型组筛选到的 2 090 个差异表达基因和防己黄芪汤组 vs. 模型组筛选得到的 1 877 个差异表达基因进一步取交集,得到 323 个共同差

异表达基因。差异表达基因的热图分析显示,与正常组比较,模型组肾脏组织内上调基因 243 个,下调

基因 80 个。给药防己黄芪汤后,造模大鼠肾脏差异基因的表达量向正常组显著回调(图 5)。



注:与正常组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 10$ 。

图 2 防己黄芪汤对各组小鼠肾病综合征相关指标的影响

Fig. 2 Effects of Fangji Huangqi Tang on indexes related to nephrotic syndrome

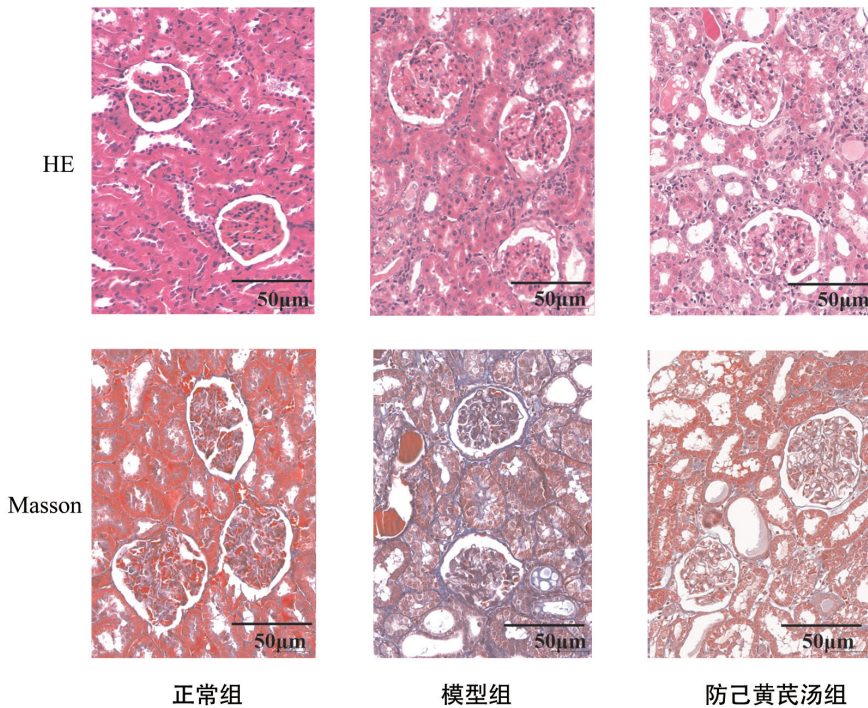


图 3 防己黄芪汤对各组大鼠肾脏组织的病理学影响(HE,×200;Masson,×200)

Fig. 3 Effects of Fangji Huangqi Tang on histopathological morphology of kidneys in all groups (HE,×200; Masson,×200)

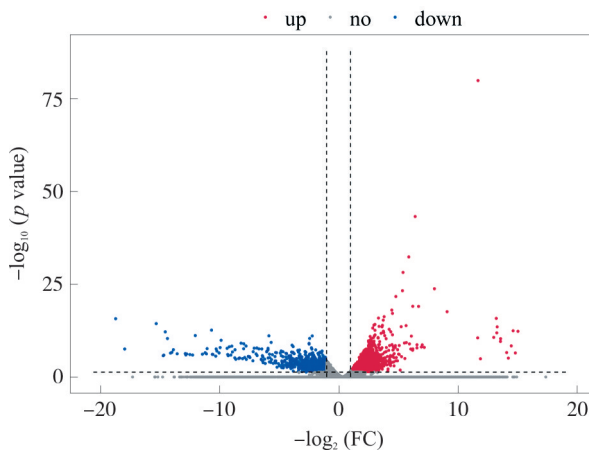


图 4 正常组 vs. 模型组、防己黄芪汤组 vs. 模型组差异基因表达的火山图

Fig. 4 Volcano diagram of differential expression gene of control group vs. model group and Fangji Huangqi Tang group vs. model group

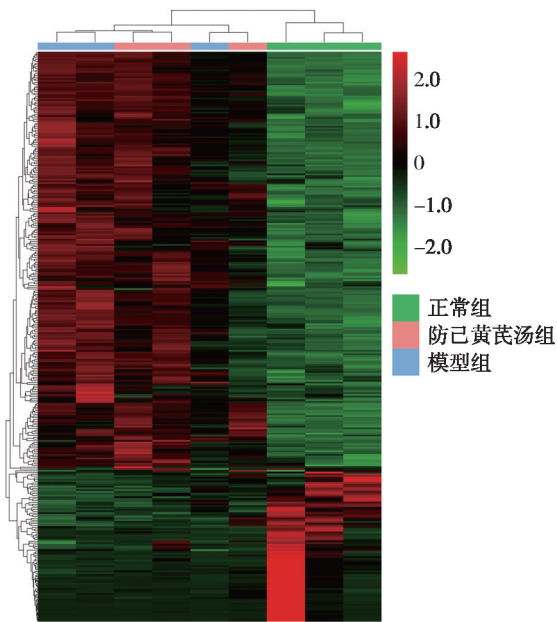
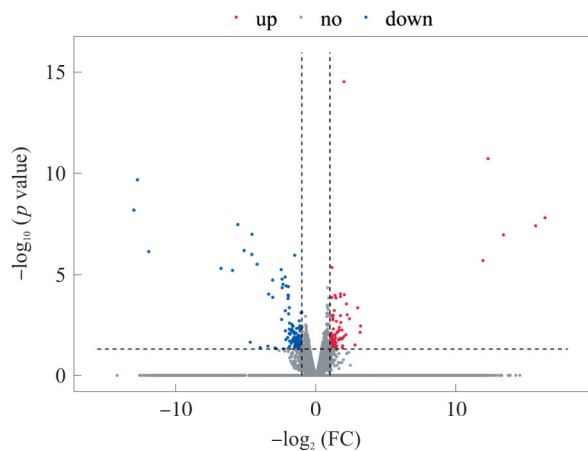


图 5 转录组学差异基因表达热图

Fig. 5 Heat map of differential expression genes by transcriptomics

3.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

将转录组测序的 323 个差异表达基因 (DEGs) 与网络药理学的 247 个靶点取交集,共获得 79 个共同靶点(图 6)。为了研究防己黄芪汤干预后差异表达的 mRNA 的生物学功能,对这 79 个共同靶点进行 GO 功能富集分析,以 $P < 0.05$ 为条件共筛选得到 523 个显著富集条目,其中 BP 分析 236 个、CC 分析 121 个、MF 分析 166 个。根据所得条目的显著性 P 值由小到大进行排列,对 BP、CC、MF 中前 10 位的条目绘制条形图(图 7)。图中纵坐标代表具体的条目,横坐标代表富集在条目的基因个数。GO 功能

富集分析中排名较前的条目主要有:①BP 分析:炎症应答 (Inflammatory response)、对药物的反应 (Response to drug)、蛋白质磷酸化 (Protein phosphorylation)、细胞增殖的正向调节 (Positive regulation of cell proliferation)、基因表达的正向调节 (Positive regulation of gene expression) 等;②CC 分析:细胞质 (Cytoplasm)、细胞外区域 (Extracellular region)、细胞外空间 (Extracellular space)、薄膜 (Membrane)、细胞外来体 (Extracellular exosome) 等;③MF 分析:相同蛋白结合 (Identical protein binding)、ATP 结合 (ATP binding)、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性 (Protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、受体结合 (Receptor binding)、蛋白激酶结合 (Protein kinase binding) 等。KEGG 通路富集分析结果显示 79 个共同靶点显著富集在 61 条通路上,选取 $P < 0.01$ 的前 40 条通路,绘制气泡图,见图 7。图中气泡大小表示富集靶点数量,颜色代表 P 值大小,颜色越红则显著性越大。KEGG 通路富集结果提示,防己黄芪汤治疗肾病综合征的过程与 AMPK 信号通路 (AMPK signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、PPAR 信号通路 (PPAR signaling pathway)、NF- κ B 信号通路 (NF- κ B signaling pathway)、TGF- β 信号通路 (TGF- β signaling pathway)、P53 信号通路 (P53 signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、Jak-STAT 信号通路 (Jak-STAT signaling pathway)、FoxO 信号通路 (FoxO signaling pathway) 等密切相关。

3.6 PPI 网络的构建和核心靶点的筛选

首先把 79 个共有靶点导入 STRING 在线数据库,以获取 PPI 网络图(图 8),图中有 79 个节点,703 条边(其中 5 个靶点不连接其他蛋白,故不显示)。将此结果以 *tsv* 格式下载并导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行核心蛋白分析,得该 PPI 网络的平均节点度值为 18.02,平均中介中心性为 0.052 3,平均接近中心性为 0.413 2,平均拓扑系数为 0.234 6。以“节点度值”“中介中心性”和“接近中心性”3 个主要参数筛选关键基因,筛选阈值为节点度值 ≥ 18.02 ,接近中心性 $\geq 0.413 2$,中介中心性 $\geq 0.052 3$,筛选后得 7 个潜在核心靶点,分别为 AKT1、AMPK、CPT1B、NF- κ B1、P53、TGF- β 1 和

TLR4,各项参数见表 3。

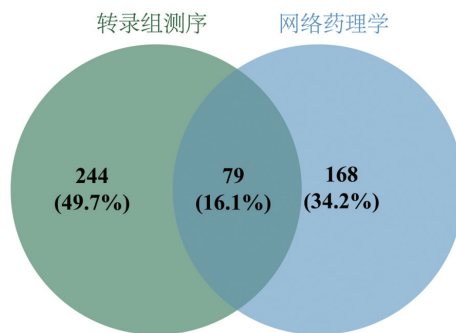


图 6 网路药理学和转录组学交集靶点基因的韦恩图
Fig. 6 Venn diagram of intersection target genes of network pharmacology and transcriptomics

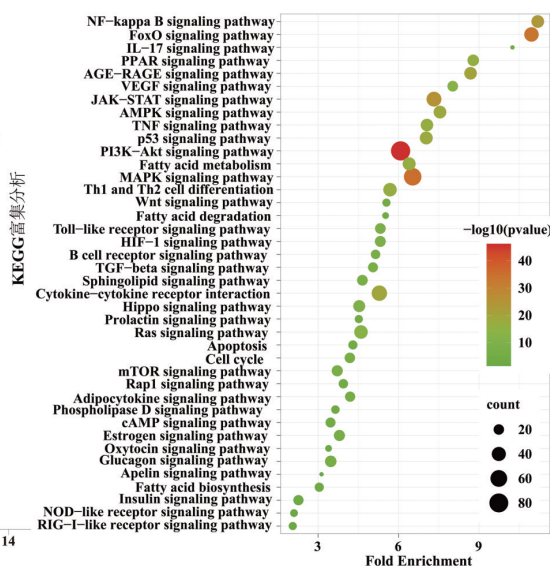
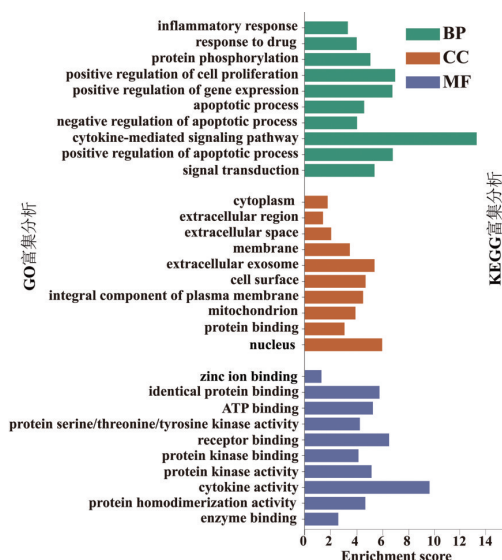


图 7 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis

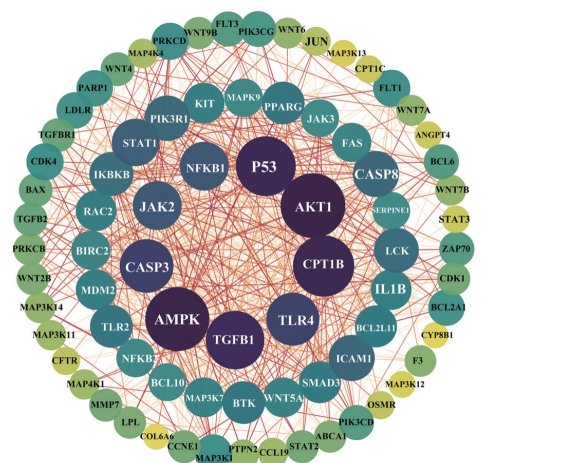


图 8 蛋白质相互作用网络图

Fig. 8 Protein-protein interaction (PPI) network

表 3 潜在核心靶点在蛋白互作网络中的参数

Table 3 Parameters of potential core targets in protein-protein interaction (PPI)

基因名称	度值	接近中心性	中介中心性	拓扑系数
AKT1	57	0.793 8	0.154 3	0.261 8
AMPK	56	0.763 2	0.132 5	0.300 5
P53	52	0.725 4	0.113 6	0.313 0
TLR4	41	0.623 8	0.096 5	0.380 4
CPT1B	32	0.526 9	0.075 3	0.443 3
NF- κ B1	30	0.503 2	0.072 1	0.435 8
TGF- β 1	26	0.472 5	0.063 8	0.506 7

查阅文献后利用“3.5”项下与本次研究方向较为相关的 KEGG 富集通路和 7 个核心靶点绘制通路-靶点网络图(图 9)。图中涉及 16 个节点,21 条边,蓝色长方形代表靶点,橙色三角形代表通路,靶

点与通路之间代表该靶点位于对应连线的通路上；图中与靶点相连的直线越多，代表该靶点涉及的通路越多，在通路-靶点网络图中越重要。7 个核心靶点 AKT1、AMPK、CPT1B、NF- κ B1、P53、TGF- β 1、TLR4 与 AMPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、PPAR 信号通路、NF- κ B 信号通路、TGF- β 信号通路、P53 信号通路、MAPK 信号通路、Jak-STAT 信号通路和 FoxO 信号通路密切相关，提示这 9 条信号通路和 7 个核心靶点在防己黄芪汤治疗肾病综合征中发挥关键作用。

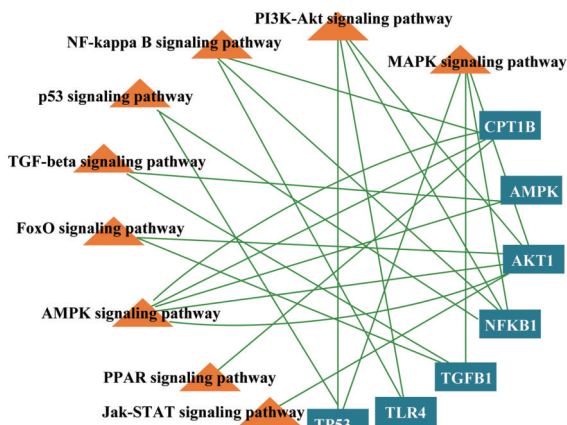


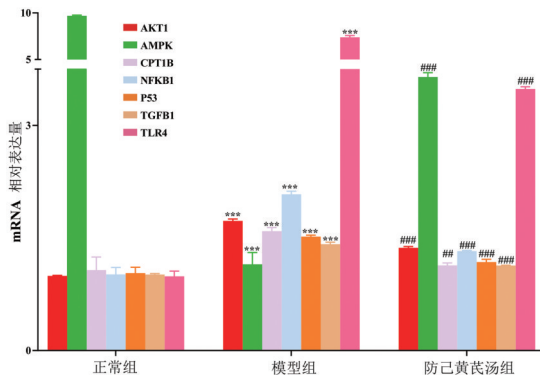
图 9 潜在核心靶点-通路网络图

Fig. 9 Potential core target-pathway network

3.7 核心靶点基因的实验验证

qPCR 结果显示，与正常组比较，模型组 AKT1、CPT1B、NF- κ B1、P53、TGF- β 1、TLR4 mRNA 表达升高 ($P < 0.001$)，AMPK mRNA 表达降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，防己黄芪汤组 AKT1、CPT1B、NF-

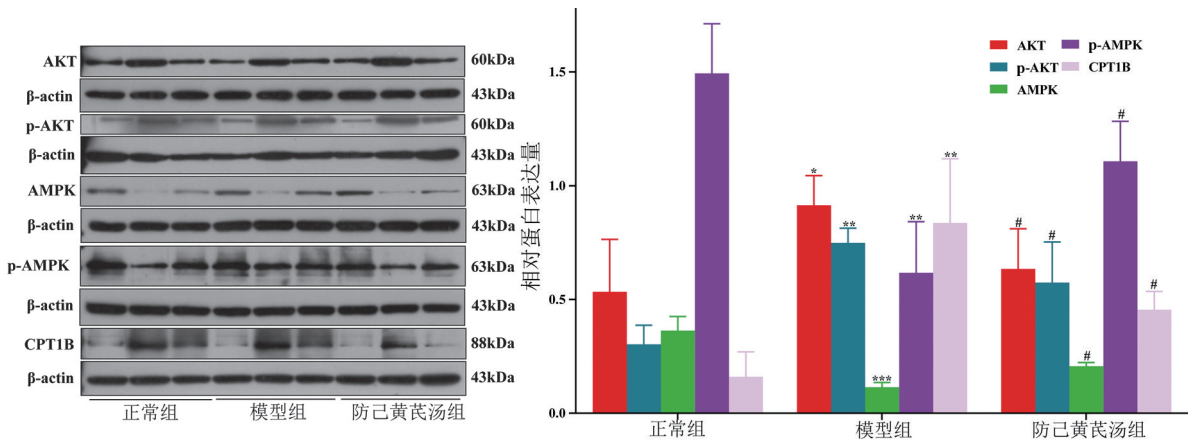
κ B1、P53、TGF- β 1、TLR4 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)，AMPK mRNA 表达升高 ($P < 0.001$) (图 10)。表明这 7 个核心靶点基因的相对定量值与转录组测序数据趋势一致，证明转录组学的结果可靠且重复性好。Western blot 分析结果显示，与正常组比较，模型组 AKT1、p-AKT1、CPT1B、NF- κ B1、P53、TGF- β 1、TLR4 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)，AMPK 和 p-AMPK 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，防己黄芪汤组 AKT1、p-AKT1、CPT1B、NF- κ B1、P53、TGF- β 1、TLR4 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，AMPK 和 p-AMPK 蛋白表达升高 ($P < 0.05$) (图 11~12)。免疫荧光染色的趋势与 Western blot、qPCR 的结果保持一致。

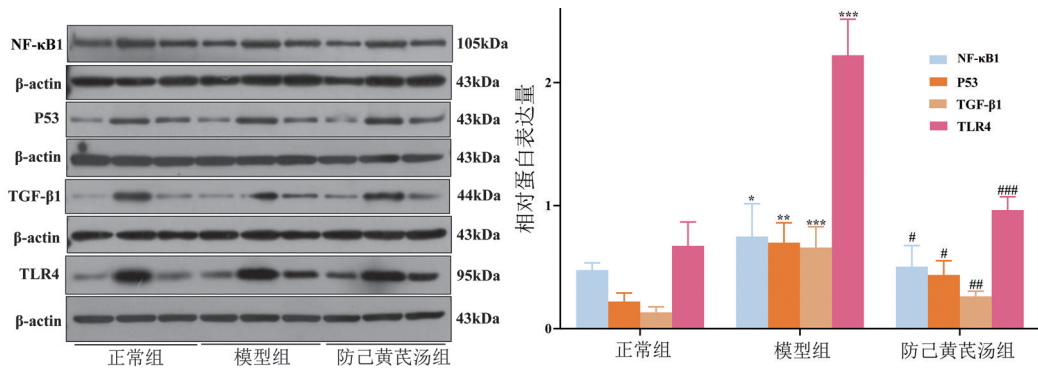


注：与正常组比较，*** $P < 0.001$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$ 。

图 10 qPCR 检测肾组织中 AKT1、AMPK、CPT1B、NF- κ B1、P53、TGF- β 1、TLR4 的 mRNA 表达

Fig. 10 Expressions of AKT1, AMPK, CPT1B, NF- κ B1, P53, TGF- β 1 and TLR4 mRNA in kidney tissues by qPCR





注;与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$ 。

图 11 Western blot 检测肾组织中 AKT1、p-AKT1、AMPK、p-AMPK、CPT1B、NF-κB1、P53、TGF-β1、TLR4 的蛋白表达

Fig. 11 Expressions of AKT1, p-AKT1, AMPK, p-AMPK, CPT1B, NF-κB1, P53, TGF-β1 and TLR4 protein in kidney tissues by Western blot

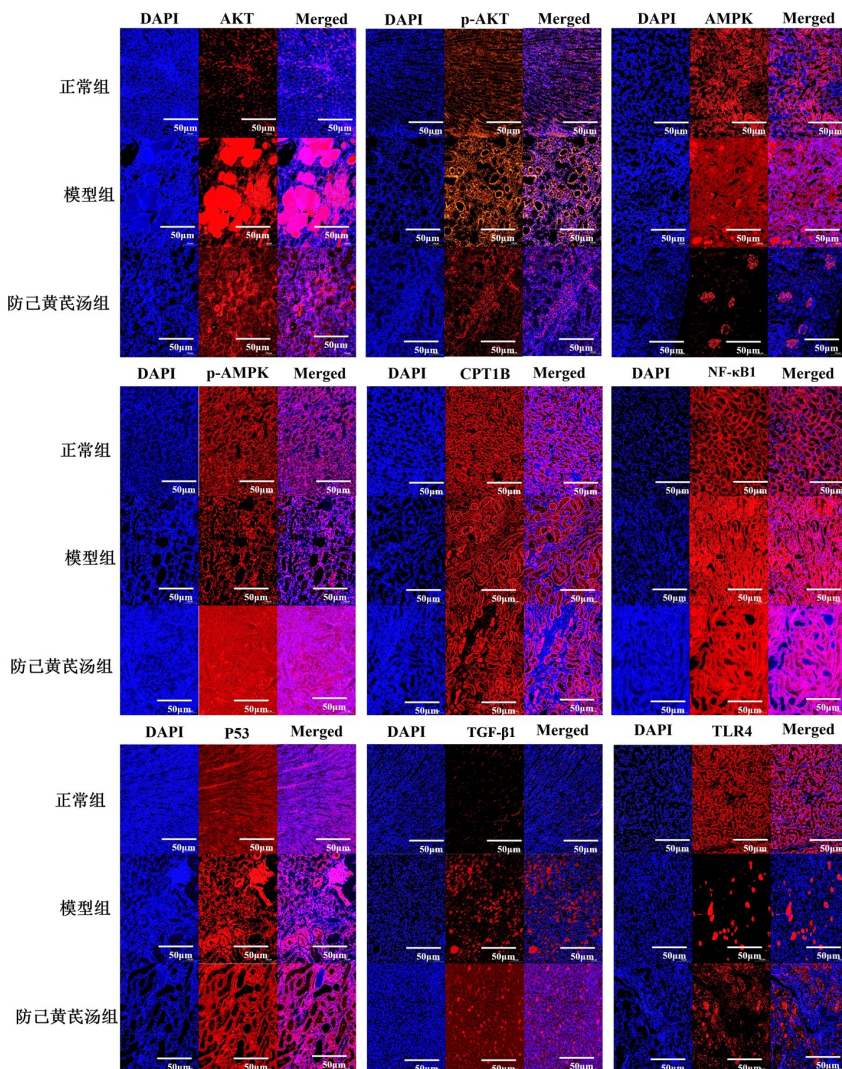


图 12 免疫荧光染色法检测肾组织中 AKT1、AMPK、CPT1B、NF-κB1、P53、TGF-β1、TLR4 的蛋白表达 (×200)

Fig. 12 Expressions of AKT1, AMPK, CPT1B, NF-κB1, P53, TGF-β1 and TLR4 protein in kidney tissues by immunofluorescence (×200)

3.8 靶点通路分析图

着重选取“3.6”项下与本次研究密切相关的 9 条信号通路(AMPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、PPAR 信号通路、NF-κB 信号通路、TGF-β 信号通路、P53 信号通路、MAPK 信号通路、Jak-STAT 信号通路和 FoxO 信号通路)与经验证的 7 个核心靶点 (AKT1、AMPK、CPT1B、NF-κB1、P53、TGF-β1 和

TLR4), 利用 KEGG Mapper 网站 (<https://www.kegg.jp/kegg/mapper/>) 绘制防己黄芪汤抗肾病综合征作用的通路图(图 13)。图中潜在核心靶点标记为红色,防己黄芪汤治疗肾病综合征的信号通路标记为绿色。图中提示防己黄芪汤治疗肾病综合征的靶点主要分散于这 9 条通路中,通过调节核心靶点发挥作用。

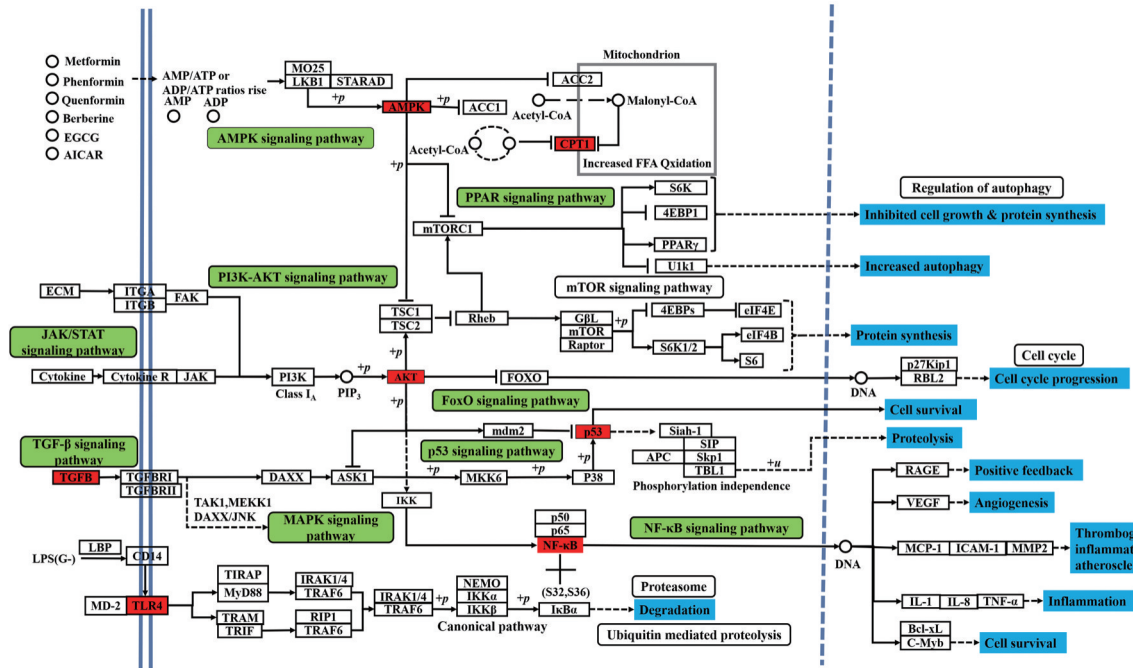


图 13 防己黄芪汤治疗肾病综合征的靶点通路分析图

Fig. 13 Target pathway analysis of Fangji Huangqi Tang against nephrotic syndrome

4 讨论

中医认为肾病综合征发病病机主要是正虚与邪实两个方面,病机中心是风湿内扰于肾。现代临床在本虚标实的辨证思路下,采用健脾益气、利水渗湿等治法。防己黄芪汤作为固表益气、祛风利湿的代表方剂,防治肾病综合征的效果已在临床上得到验证。但中药复方作用的复杂性,使其发挥作用的机制仍不明确。因此,本研究基于网络药理学与转录组学,在系统和分子水平综合分析防己黄芪汤中的药物活性成分对应靶点、肾病综合征疾病靶点、富集通路、生物过程对其治疗肾病综合征的作用机制,并通过分子生物学技术对潜在核心靶点进行验证。

本次研究中,利用生物信息学分析发现防己黄芪汤的治疗作用是通过 7 个核心靶点 AKT1、AMPK、CPT1B、NF-κB1、P53、TGF-β1、TLR4 来介导 AMPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、PPAR 信号通路、NF-κB 信号通路、TGF-β 信号通路、P53 信

号通路、MAPK 信号通路、Jak-STAT 信号通路和 FoxO 信号通路。AMPK 是生物体内重要的蛋白激酶,能够协调能量代谢,激活 AMPK 可以降低炎症反应而阻止或延缓输尿管梗阻造成的肾脏纤维化进程,也可抑制由 NF-κB 信号诱导的炎症反应。在肾脏纤维化的发病机制中,炎症反应起着至关重要的作用^[18-20]。Toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路调控炎症应答反应,肾受到损伤刺激时可被激活,促进大量炎症因子和趋化因子的分泌、氧化应激、巨噬细胞表型的转化,加快肾纤维化的疾病进展。急慢性肾纤维化发展过程中,在 TLR4 活化的状态下,下游 NF-κB 信号通路被激活,导致炎症因子和趋化因子大量分泌^[21-23]。激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路的作用为抑制细胞凋亡,且活化后加入到 NF-κB P65 的磷酸化、核转位过程中,促使炎症反应的加重。PI3K/Akt 信号通路的中心环节 AKT 是 PI3K 下游的重要的信号传导标志物和

效应分子,通过阻断 Bcl2 和 Bad 的结合,进而抑制细胞凋亡^[24-26]。TGF- β 1 能够降低组织蛋白水解酶 mRNA 的合成,抑制细胞外基质降解,使某些蛋白水解酶抑制剂的合成增加,细胞外基质集聚,导致肾小球硬化^[27-31]。肉毒碱棕榈酰基转移酶 1B(CPT1B) 调控脂质代谢,是 β -氧化的底物,能够使线粒体肉毒碱含量增加,是诊断和预测肾病综合征疾病进程的重要标志物^[32]。P53 蛋白是重要的细胞周期、凋亡调节蛋白,参与调控肾小管上皮细胞衰老、肾小球系膜细胞增殖和凋亡及肾脏纤维化中^[33-35]。上述 7 个核心靶点经实验验证,防己黄芪汤能降低 AKT1、CPT1B、NF- κ B1、P53、TGF- β 1、TLR4 的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$),升高 AMPK 的 mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$)。由此可见,防己黄芪汤通过以上关键通路及靶点调节肾病综合征过程中的炎症、免疫、凋亡等来达到防治肾脏损伤的效果。

综上所述,通过网络药理学与转录组学研究发现,防己黄芪汤可能通过多成分、多靶点、多途径来协调发挥防治肾病综合征的作用,可为后续防己黄芪汤抗肾病综合征的药理学研究和临床应用提供理论依据与参考线索。

参考文献:

[1] AGRAWAL S, ZARITSKY JJ, FORNONI A, et al. Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: Mechanisms and treatment [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(1): 57-70.

[2] AL-AZZAWI HF, OBI OC, SAFI J, et al. Nephrotic syndrome-induced thromboembolism in adults [J]. *Int J Crit Illn Inj Sci*, 2016, 6(2): 85-88.

[3] YILMAZ S, ATESSAHIN A, SAHNA E, et al. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity [J]. *Toxicology*, 2006, 218(2/3): 164-171.

[4] 汪小莉, 刘晓, 夏春燕, 等. 防己黄芪汤药理作用及各单味药化学成分研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(19): 3527-3534.

WANG XL, LIU X, XIA CY, et al. Research progress in chemical constituents in single herbs of Fangji Huangqi Decoction and its pharmacological activities [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(19): 3527-3534.

[5] ZHANG RZ, ZHU X, BAI H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: Review and assessment [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 123.

[6] TAMAN H, FENTON CG, HENSEL IV, et al. Transcriptomic landscape of treatment—Naïve ulcerative colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2018, 12(3): 327-336.

[7] 贡磊磊, 许海玉, 王岚, 等. 基于 RNA-Seq 高通量测序分析脑心通胶囊抑制炎症反应转录组学特征 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(1): 149-156.

GONG LL, XU HY, WANG L, et al. Analysis on transcriptionomic

characteristics of Naoxintong Capsules in prevention of post-ischemic inflammation based on RNA-Seq technology [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(1): 149-156.

[8] 汪硕浩, 高继海, 陈海媚, 等. 转录组学探讨附子治疗急性心衰大鼠的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(1): 131-140.

WANG QH, GAO JH, CHEN HM, et al. Transcriptomics study on mechanism of Aconiti Lateralis Radix Praeparata in treatment of rats with acute heart failure [J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(1): 131-140.

[9] 张仲景, 王叔和. 新编金匮要略方论 [M]. 北京: 学苑出版社, 2008: 39.

ZHANG ZJ, WANG SH. Synopsis of New Golden Chamber [M]. Beijing: Xueyuan press, 2008: 39.

[10] LIU X, WANG XL, ZHU TT, et al. Study on spectrum-effect correlation for screening the effective components in Fangji Huangqi Tang basing on ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Phytomedicine*, 2018, 47: 81-92.

[11] 俞东容, 杨汝春, 林宜, 等. 防己黄芪汤对阿霉素肾病大鼠蛋白尿及足细胞病变的影响 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(4): 295-298, 377.

YU DR, YANG RC, LIN Y, et al. Impact of fangjihuangqi decoction on proteinuria and podocyte in nephrotic rats induced by adriamycin [J]. *Chin J Integr Tradit West Nephrol*, 2009, 10(4): 295-298, 377.

[12] 李星瑶, 赵延红, 蔡子墨, 等. 温阳化浊方对阿霉素肾病大鼠保护作用及 TRPC6 表达的影响 [J]. *中医药学报*, 2021, 49(9): 36-42.

LI XY, ZHAO YH, CAI ZM, et al. Protection effect of Wenyang Huazhuo formula on adriamycin-induced nephropathy in rats and its influence to expression of TRPC6 [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2021, 49(9): 36-42.

[13] PERTEA M, PERTEA GM, ANTONESCU CM, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(3): 290-295.

[14] WANG K, LI MY, HAKONARSON H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(16): e164.

[15] FLOREA L, SONG L, SALZBERG SL. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues [J]. *F1000Research*, 2013, 2: 188.

[16] ROBINSON MD, MCCARTHY DJ, SMYTH GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.

[17] PERTEA M, PERTEA GM, ANTONESCU CM, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(3): 290-295.

[18] 王秀阁, 闫冠池, 金迪, 等. 基于 AMPK/mTOR/ULK1 通路探讨解毒通络保肾方改善糖尿病肾脏疾病的作用机制 [J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45(12): 1213-1222.

WANG XG, YAN GC, JIN D, et al. Based on AMPK/mTOR/

- ULK1 pathway, the mechanism of Jiedu Tongluo Baoshen recipe in improving diabetic kidney disease was discussed[J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2022, 45(12): 1213-1222.
- [19] 李雅纯, 方敬, 杨帆, 等. 化痰通络中药对糖尿病肾病大鼠肾脏和 AMPK/Nox4 信号通路的作用研究[J]. *中草药*, 2021, 52(11): 3278-3285.
- LI YC, FANG J, YANG F, et al. Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on kidney and AMPK/Nox4 signaling pathway of rats with diabetic nephropathy[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(11): 3278-3285.
- [20] 马思齐, 许骏尧, 郑亚威, 等. 基于 AMPK/mTOR 信号通路探讨潜阳育阴颗粒对高血压肾损伤的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(6): 3559-3563.
- MA SQ, XU JY, ZHENG YW, et al. Effects of Qianyang Yuyin Granules on renal injury of spontaneously hypertensive rats based on AMPK/mTOR signal pathway[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(6): 3559-3563.
- [21] 杨秀芳, 白秀云, 聂浩坤, 等. 肾消通络方对糖尿病 db/db 小鼠肾脏 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 723-727.
- YANG XF, BAI XY, NIE HK, et al. Effects of Shenxiao Tongluo Formula on TLR4/NF- κ B signaling pathway in kidney of diabetic db/db mice[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(2): 723-727.
- [22] 陈飞, 罗惠民, 谢瑜, 等. 姜黄素通过调控 miR-29-3p 和 TLR4/NF- κ B 信号通路改善肾间质纤维化[J]. *甘肃科学学报*, 2022, 34(5): 26-34.
- CHEN F, LUO HM, XIE Y, et al. Curcumin improves renal interstitial fibrosis by regulating miR-29-3p and TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *J Gansu Sci*, 2022, 34(5): 26-34.
- [23] 熊刚, 邹华, 胡承莲, 等. 基于 HMGB1/TLR4 信号通路评价五味子乙素对 2 型糖尿病肾病大鼠肾脏功能的保护作用[J]. *医学研究杂志*, 2019, 48(3): 140-143.
- XIONG G, ZOU H, HU CL, et al. Evaluation of renal function protection of schisandrin B in rates with type 2 diabetic nephropathy based on HMGB1/TLR4 pathway[J]. *J Med Res*, 2019, 48(3): 140-143.
- [24] 刘伟, 朴元林. 中药对糖尿病肾病 PI3K/Akt 信号通路影响的研究进展[J]. *北京中医药*, 2022, 41(8): 935-938.
- LIU W, PIAO YL. Research progress on the effect of Chinese herbal medicine on PI3K/Akt signal pathway in diabetic nephropathy[J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2022, 41(8): 935-938.
- [25] 列倍锋, 程芳, 段婷婷, 等. 黄芪散微丸对糖尿病肾病大鼠肾脏 PI3K/Akt/mTOR 通路及自噬的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 11-17.
- LIE BF, CHENG F, DUAN TT, et al. Effect of huangqisan pellets on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and autophagy in kidney of diabetic nephropathy rats[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(7): 11-17.
- [26] 齐平平, 徐祖清, 金华. 芦荟素对大鼠肾缺血再灌注损伤的作用机制[J]. *中成药*, 2022, 44(4): 1272-1276.
- QI PP, XU ZQ, JIN H. Mechanism of aloin on renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(4): 1272-1276.
- [27] 昂格力玛, 宝苏日高, 孟永梅. 基于 TGF- β /Smad 信号通路探讨蒙药大黄-3 汤对慢性肾功能衰竭大鼠的肾脏保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(7): 1099-1106.
- ANG G, BAO S, MENG YM. On the renal protective effect of Mongolian medicine rhubarb-3 decoction on rats with chronic renal failure based on TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2022, 38(7): 1099-1106.
- [28] 汪四海, 方朝晖, 倪英群, 等. 丹蛭降糖胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏 TGF- β 1/Smad3 信号通路和 AGEs/RAGE 水平的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(4): 2019-2024.
- WANG SH, FANG ZH, NI YQ, et al. Effects of Danzhi Jiangtang Capsules on renal TGF- β 1/Smad3 signaling pathway and AGEs/RAGE level in diabetic nephropathy rats[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(4): 2019-2024.
- [29] 张爱莉, 任宗涛. 转化生长因子 β 受体 I 及 Smad4 蛋白在肾癌中的表达及意义[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2013, 28(11): 819-821, 825.
- ZHANG AL, REN ZT. Expression and clinical significance of transforming growth factor β receptor I and Smad4 in renal carcinoma[J]. *J Clin Urol*, 2013, 28(11): 819-821, 825.
- [30] 任苗苗, 杜玄一. 转化生长因子 β 在慢性肾脏病中的作用[J]. *临床荟萃*, 2012, 27(24): 2184-2188.
- REN MM, DU XY. Role of transforming factor β in chronic kidney disease[J]. *Clin Focus*, 2012, 27(24): 2184-2188.
- [31] 郑栓. 白藜芦醇对慢性肾衰竭大鼠肾脏组织 BMP-7、TGF- β 1、Smads 信号通路表达的影响[J]. *中医学报*, 2018, 33(4): 616-619.
- ZHENG S. Effect of resveratrol on the expression of BMP-7, TGF- β 1 and Smads signaling pathway in renal tissue of rats with chronic renal failure[J]. *Acta Chin Med*, 2018, 33(4): 616-619.
- [32] 张王宁, 李爱平, 刘少博, 等. 基于代谢组学的阿霉素肾病大鼠模型损伤程度评价[J]. *中草药*, 2018, 49(2): 360-367.
- ZHANG WN, LI AP, LIU SB, et al. Evaluation of injury degree of rat nephropathy model induced by doxorubicin based on metabolomics[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(2): 360-367.
- [33] 郭晓芳, 顾勤, 刘宁, 等. P53 在急性肾损伤小鼠肾脏的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(11): 1971-1975.
- GUO XF, GU Q, LIU N, et al. Relationship between apoptosis and change of P53 expression in mouse renal tissues after acute kidney injury[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2012, 28(11): 1971-1975.
- [34] HIGGINS SP, TANG Y, HIGGINS CE, et al. TGF- β 1/p53 signaling in renal fibrogenesis[J]. *Cell Signal*, 2018, 43: 1-10.
- [35] MA ZW, LI L, LIVINGSTON MJ, et al. p53/microRNA-214/ULK1 axis impairs renal tubular autophagy in diabetic kidney disease[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(9): 5011-5026.