

中图分类号: R965; R977.1*5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)13-0058-08
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.13.011



地黄苷 D 治疗糖尿病肾病作用机制网络药理学分析与体内实验研究*

黄淑敏^{1,2}, 谢保城¹, 刘国辉^{1,2Δ}

(1. 南方医科大学第十附属医院·广东省东莞市人民医院, 广东 东莞 523000; 2. 广东医科大学第一临床医学院, 广东 湛江 524000)

摘要:目的 探讨地黄苷 D 防治糖尿病肾病(DN)的作用及作用机制。方法 通过 PubChem, PharmMapper, Super-PRED, SEA 数据库获取地黄苷 D 的作用靶点, 通过 OMIM, DrugBank, TTD, GeneCards 数据库获取 DN 相关疾病靶点, 通过在线维恩图谱 2.1.0 平台筛选地黄苷 D 和 DN 的共有靶点; 通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建药物-疾病-靶点网络; 将共有靶点导入 String 数据库进行蛋白-蛋白互作(PPI)网络分析, 并通过网络拓扑分析筛选核心靶点; 采用 R 4.4.2 语言进行基因本体论(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析; 通过 AutoDock Tools v1.5.7 软件进行分子对接验证, 并通过 PyMOL 3.0.3 软件进行可视化分析。将转基因斑马鱼分为空白对照组(A组), 模型组(B组), 低、高剂量地黄苷 D 组(C组、D组, 10, 20 μmol/L), 达格列净组(E组, 5 μmol/L), 地黄苷 D + 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂多索吗啡组(F组, 20 μmol/L + 5 μmol/L), 各 15 条。A 组予斑马鱼培养液培养, 其余各组予 150 mmol/L 葡萄糖培养液诱导建立高糖致肾脏损伤模型。A 组持续予斑马鱼培养液, B 组在 A 组基础上持续予 150 mmol/L 葡萄糖, C 组至 F 组在 B 组基础上同步予相应药物干预。干预结束后, 采用倒置荧光显微镜观察转基因斑马鱼的荧光强度变化, 使用 Image J 1.54p 软件统计各组斑马鱼幼鱼的肾脏平均荧光强度。结果 共筛选出地黄苷 D 的作用靶点 403 个及 DN 相关疾病靶点 2 414 个, 药物与疾病共有靶点 62 个, 以及蛋白激酶 cAMP 激活的催化亚基 α(PRKACA)、磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚基 1(PIK3R1)、Toll 样受体 4(TLR4)、胰岛素样生长因子受体 1(IGF1R)、核因子-κB 亚基 1(NF-κB1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)等 15 个核心靶点。GO 分析结果显示, 地黄苷 D 治疗 DN 主要涉及蛋白质磷酸化、脂质代谢等通路。KEGG 通路富集分析结果显示, 主要富集在磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(Akt)、AMPK、表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂耐药等信号通路。动物实验结果显示, 与 B 组比较, C 组、D 组、E 组斑马鱼前肾小管平均荧光强度均显著增强($P < 0.01$); 与 D 组比较, F 组斑马鱼前肾小管平均荧光强度显著减弱($P < 0.01$)。结论 地黄苷 D 对 DN 的治疗作用可能与调控 AMPK 信号通路相关。

关键词: 糖尿病肾病; 地黄苷 D; 网络药理学; 体内实验; 斑马鱼; 作用机制

Network Pharmacology and *in vivo* Experimental Study on the Mechanism of Rehmannioside D in the Treatment of Diabetic Nephropathy

Huang Shumin^{1,2}, Xie Baocheng¹, Liu Guohui^{1,2Δ}

(1. The Tenth Affiliated Hospital, Southern Medical University · Dongguan People's Hospital, Dongguan, Guangdong 523000, China; 2. The First Clinical School of Medicine, Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of rehmannioside D in the treatment of diabetes nephropathy (DN). **Methods** The targets of rehmannioside D were obtained from PubChem, PharmaMapper, Super-PRED and SEA databases, and the targets of DN-related diseases were obtained from OMIM, DrugBank, TTD and GeneCards databases. The common targets of rehmannioside D and DN were screened through the online Venn 2.1.0 diagram platform. The drug-disease-targets network

*基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金联合基金(粤佛、粤莞、粤惠)项目[2024A1515140131]。

第一作者: 黄淑敏, 女, 硕士研究生在读, 研究方向为肾脏内科学, (电子信箱)shuminhuang@126.com。

Δ通信作者: 刘国辉, 男, 大学本科, 主任医师, 研究方向为肾脏内科学, (电子信箱)Liuguohui5@126.com。

中国药业, 2025, 34(2): 63-65.

[12] 何春慧, 程峰, 李万红. 某中医医院院内中药制剂应用现状及发展趋势分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2024, 24(11): 1386-1388.

[13] 韩达斌, 问静, 刘学良, 等. 青海省蒙藏医疗机构制剂室生产能力问题调研与对策研究[J]. 中国药业, 2025, 34(3): 1-5.

[14] 王英东, 彭皓洋, 王澳义, 等. 基于中药的转录谱和结构数

据揭示麻杏石甘汤治疗肺炎的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(21): 215-222.

[15] 石杨. 麻杏石甘汤加味治疗邪热壅肺型支气管炎的疗效观察[J]. 中国实用医药, 2024, 19(24): 136-138.

[16] 饶振华, 沈冬梅, 毛婷婷. 基于网络药理学研究喜炎平治疗急性支气管炎的作用机制[J]. 药品评价, 2024, 21(2): 165-168.

(收稿日期: 2025-03-24; 修回日期: 2026-05-07)

was constructed by the Cytoscape 3.7.2 software. The common targets were imported into the String database for protein - protein interaction (PPI) network analysis, and the core targets were screened through network topology analysis. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were conducted by the R 4.4.2 language. Molecular docking validation was performed by the AutoDock Tools v1.5.7 software, and visualization analysis was performed by the PyMOL 3.0.3 software. The genetically modified zebrafishes were divided into the blank control group (group A), model group (group B), low - dose and high - dose rehmannioside D groups (group C, group D; 10, 20 $\mu\text{mol} / \text{L}$), dapagliflozin group (group E, 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$), and rehmannioside D + adenosine monophosphate - activated protein kinase (AMPK) inhibitor dorsomorphin group (group F, 20 $\mu\text{mol} / \text{L}$ + 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$), with 15 zebrafishes in each group. The zebrafishes in group A were only treated with zebrafish culture medium for cultivation, the zebrafishes in the other groups were treated with 150 mmol / L glucose culture medium for the establishment of high - glucose - induced kidney injury models. The zebrafishes in group A were maintained in culture medium, the zebrafishes in group B were continued to receive 150 mmol / L glucose on the basis of group A, and the zebrafishes in groups C, D, E, and F were given corresponding drug interventions simultaneously on the basis of group B. After the intervention, the fluorescence intensity changes of transgenic zebrafish were observed under the microscope, and the average fluorescence intensity of the kidney of zebrafish larvae in each group was calculated by the Image J 1.54p software. **Results** A total of 403 targets of rehmannioside D and 2 414 DN disease - related targets were screened. There were 62 drug - disease common targets, among which 15 core targets were identified, including protein kinase cAMP - activated catalytic subunit alpha (PRKACA), phosphoinositide - 3 - kinase, regulatory subunit 1 (PIK3R1), Toll - like receptor 4 (TLR4), insulin - like growth factor - receptor 1 (IGF1R), nuclear factor - κB subunit 1 (NF - κB 1), and mammalian target of rapamycin (mTOR). The GO analysis results showed that rehmannioside D in the treatment of DN mainly involved protein phosphorylation and lipid metabolism pathways. The KEGG pathway enrichment analysis results showed that it was mainly enriched in signaling pathways such as phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K) / serine threonine protein kinase (Akt), AMPK, and resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors. The animal experiment results showed that compared with those in group B, the average fluorescence intensity of the anterior renal tubules of zebrafishes in groups C, D, and E significantly increased ($P < 0.01$); compared with those in group D, the average fluorescence intensity of the anterior renal tubules of zebrafishes in group F significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** The effect of rehmannioside D in the treatment of DN may be related to the regulation of the AMPK signaling pathway.

Key words: diabetes nephropathy; rehmannioside D; network pharmacology; *in vivo* experiment; zebrafish; mechanism

糖尿病肾病(DN)是糖尿病的严重微血管并发症,已成为终末期肾病(ESRD)的主要驱动因素。慢性高血糖可引起全肾病变,范围累及肾小球、肾小管间质、肾血管等部位,其发生可能涉及炎症反应、氧化应激反应、脂质代谢紊乱等多种病理生理机制,临床表现主要为持续性白蛋白尿和肾小球滤过率进行性下降^[1]。据流行病学调查显示,2000年至2015年,全球因糖尿病引起的ESRD发病率从22.1%升至31.3%^[2]。近年来,中药处方、中草药及其活性成分对DN的治疗作用和机制在新药开发中受到广泛关注^[3]。在中医理论中,DN多归属“消渴病”范畴,病程迁延可累及肾脏,其临床表现与尿液排泄异常、体液代谢紊乱等特征相对应^[4]。地黄可通过降低血糖、调节脂质紊乱、抗氧化、减少炎症等多种机制发挥肾脏保护作用^[5],地黄苷D是从地黄中提取的天然苷类化合物,其化学性质稳定,药理学活性多样,其对DN的药理学作用近年来日益受到关注,但其治疗DN的作用机制目前尚未明确。近年来,斑马鱼被发现具有胚胎透明、发育快速、遗传操作简单高效的优势,是研究发育生物学和人类疾病机制的理想脊椎动物模型^[6],其中*Eco. Tshb:EGFP*转基因斑马鱼通过荧光蛋白

标记前肾小管结构可直观观察到肾脏结构的变化。因此,本研究中通过网络药理学研究揭示地黄苷D治疗DN的潜力与分子机制,同时参考文献^[7],采取葡萄糖浸泡法构建高糖致*Eco. Tshb:EGFP*转基因斑马鱼幼鱼肾脏损伤模型,通过检测肾脏的平均荧光强度,以评价前肾小管结构的变化^[8],旨在探讨地黄苷D防治DN的作用及作用机制。现报道如下。

1 网络药理学分析

1.1 资料与方法

地黄苷D作用靶点筛选:通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得地黄苷D的SMILE格式,将其分别导入PharmMapper数据库(<https://omictools.com/pharmmapper-tool>)、Super - PRED数据库(<https://prediction.charite.de/>)、SEA数据库(<https://sea.bkslab.org/>),获得地黄苷D的潜在靶点基因名称和UniProt ID,将获得的UniProt ID导入UniProt数据(<https://www.uniprot.org/>),剔除重复靶点,得到标准化基因名,即得。

疾病靶点预测:以“Diabetic Nephropathy”为关键词,通过OMIM数据库(<https://omim.org/>)、DrugBank数据

库(<https://go.drugbank.com>)、TTD数据库(db.idrblab.net/)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org>)检索DN相关靶点,将所得靶点整理、合并、去重,即得。

药物-疾病-靶点网络构建:通过在线维恩图谱(Venny) 2.1.0平台(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)筛选地黄苷D作用靶点和DN疾病靶点的共有靶点,即得地黄苷D治疗DN的潜在靶点。将地黄苷D、DN和共有靶点的信息导入Cytoscape 3.7.2软件,构建药物-疾病-靶点网络。

蛋白-蛋白互作(PPI)网络构建:将共有靶点导入String数据库(<https://cn.string-db.org/>),构建地黄苷D治疗DN共有靶点的PPI网络,限定物种为“Homo sapiens”,置信度阈值设为0.4,其余参数均为默认设置,获得tsv格式文件,将文件导入Cytoscape 3.7.2软件中的cytoNCA插件,对网络拓扑参数进行筛选,以度(degree)值 ≥ 2 倍中位数节点的靶点作为核心靶点。

基因本体论(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析:采用R 4.4.2语言的clusterProfiler, enrichplot, org.Hs.eg.db, ggplot2, stringr包对共有靶点进行GO分析和KEGG通路富集分析。GO分析分为生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF),按 P_{value} 值大小排序,分别对BP, CC, MF排名前10的基因进行GO分析,并下载、保存分析结果。根据 P_{value} 值大小排序,选取信号通路排名前30的条目作为KEGG通路富集分析的主要通路,采用微生信网(<http://bioinformatics.com.cn/>)作图,并进行可视化分析。

分子对接验证:采用AutoDock Tools v1.5.7软件对筛选出的核心靶点和地黄苷D进行分子对接,通过PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载核心靶点的蛋白质结构,通过PubChem数据库下载地黄苷D的3D结构。将目标蛋白分子和地黄苷D分别设为受体和配体,并通过AutoDockTools v1.5.7软件进行分子对接,并在PyMOL 3.0.3软件中进行可视化分析。结合能 < -5 kcal/mol表明能自发结合,结合能负值越高提示构象越稳定。

1.2 结果

地黄苷D作用靶点与DN靶点筛选:在PharmMapper数据库、Super-PRED数据库、SEA数据库中共筛选出地黄苷D作用靶点403个。在GeneCards, OMIM, DrugBank, TTD数据库中分别筛选出疾病靶点1810个(relevance score ≥ 5)、694个、45个、25个,整理、合并、去重后共获得DN靶点2414个。

药物-疾病-靶点网络构建:将403个地黄苷D作用靶点与2414个DN靶点导入Venny 2.1.0平台,共筛选出共有靶点62个。详见图1。采用Cytoscape 3.7.2软件绘制药物-疾病-靶点网络。详见图2。

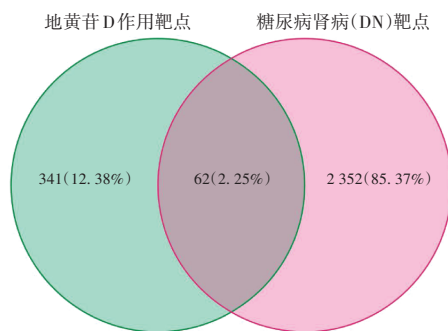


图1 地黄苷D与糖尿病肾病共有靶点维恩图

Fig. 1 Venn diagram of common targets of rehmannioside D and DN

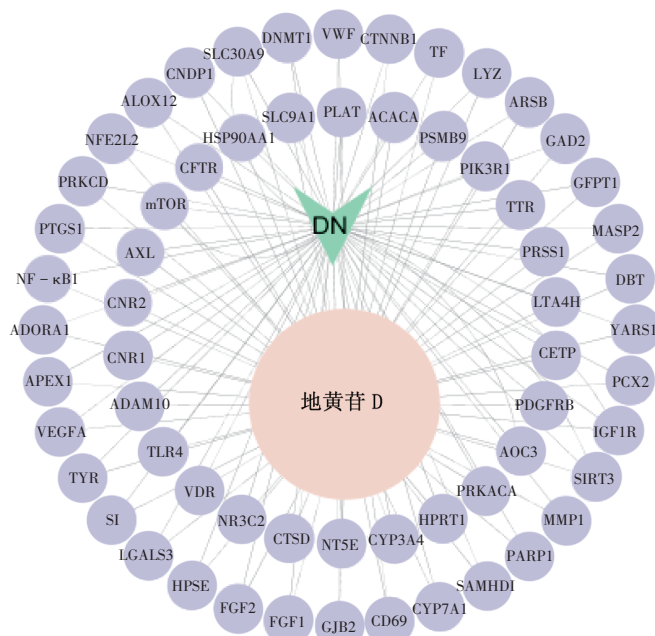


图2 药物-疾病-靶点网络

Fig. 2 Network of drug - disease - targets

共有靶点PPI网络构建与核心靶点筛选:共有靶点的PPI网络见图3A,筛选出蛋白激酶cAMP激活的催化亚基 α (PRKACA)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)调节亚基1(PIK3R1)、Toll样受体4(TLR4)、胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)、核因子- κ B亚基1(NF- κ B1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)等15个核心靶点。详见图3B。

GO分析与KEGG通路富集分析:GO分析结果显示,共得到条目953个,主要涉及蛋白质磷酸化、脂质代谢等通路。其中,包括BP条目875个,主要包括体液水平调节、正向调控脂质代谢过程、正向调控脂质生物合成、细胞对肽类激素刺激的反应等;CC条目34个,主要包括分泌颗粒腔、细胞质囊泡腔、囊泡腔、液泡腔、溶酶体腔等;MF条目44个,主要包括胰岛素受体底物结合、糖苷键水解酶活性、PI3K结合活性、蛋白磷酸酶结合等。 P_{value} 值排名前10的通路见图4A。KEGG通路富集分析结果显示,共得到信号通路63条,主要涉及PI3K/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(Akt)、腺苷酸活

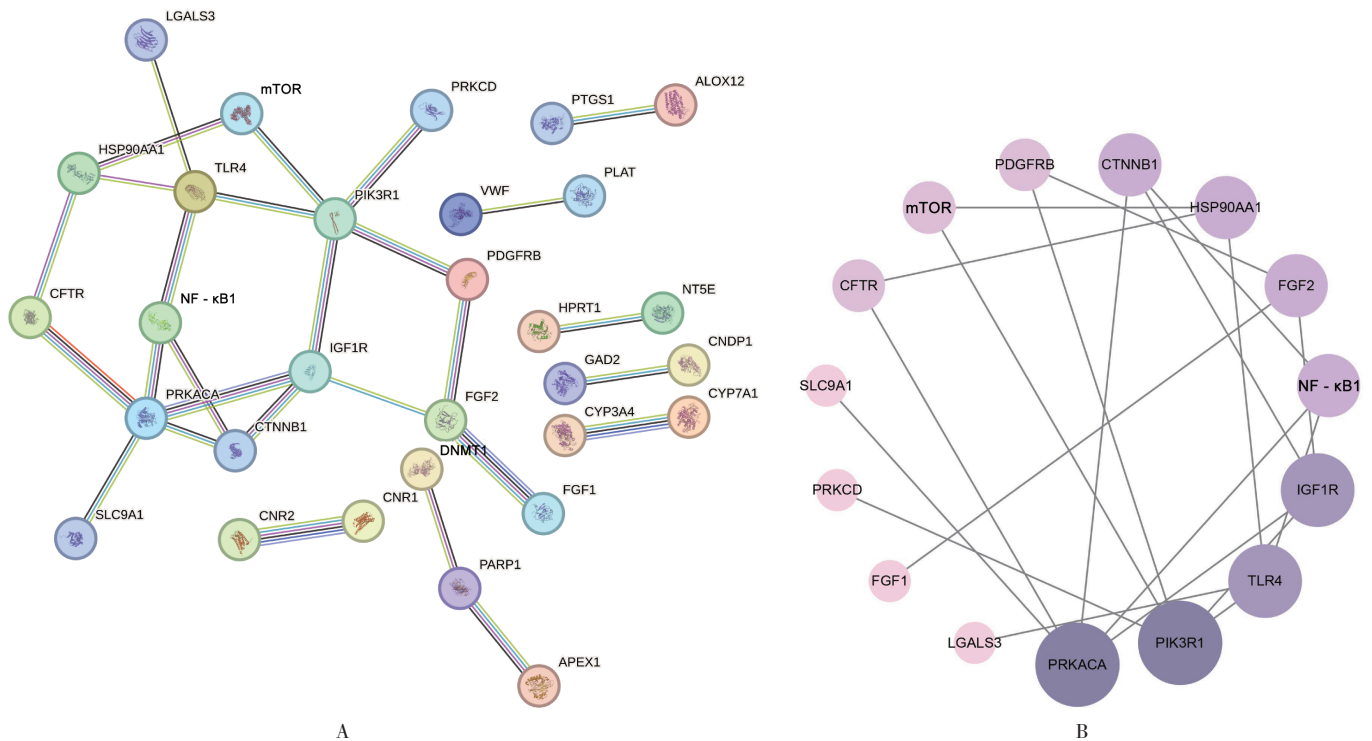


图3 地黄苷D治疗糖尿病肾病共有靶点的PPI网络与核心靶点网络
A. PPI network B. Core target network

Fig. 3 PPI network and core target network of common targets of rehmansiide D in the treatment of DN

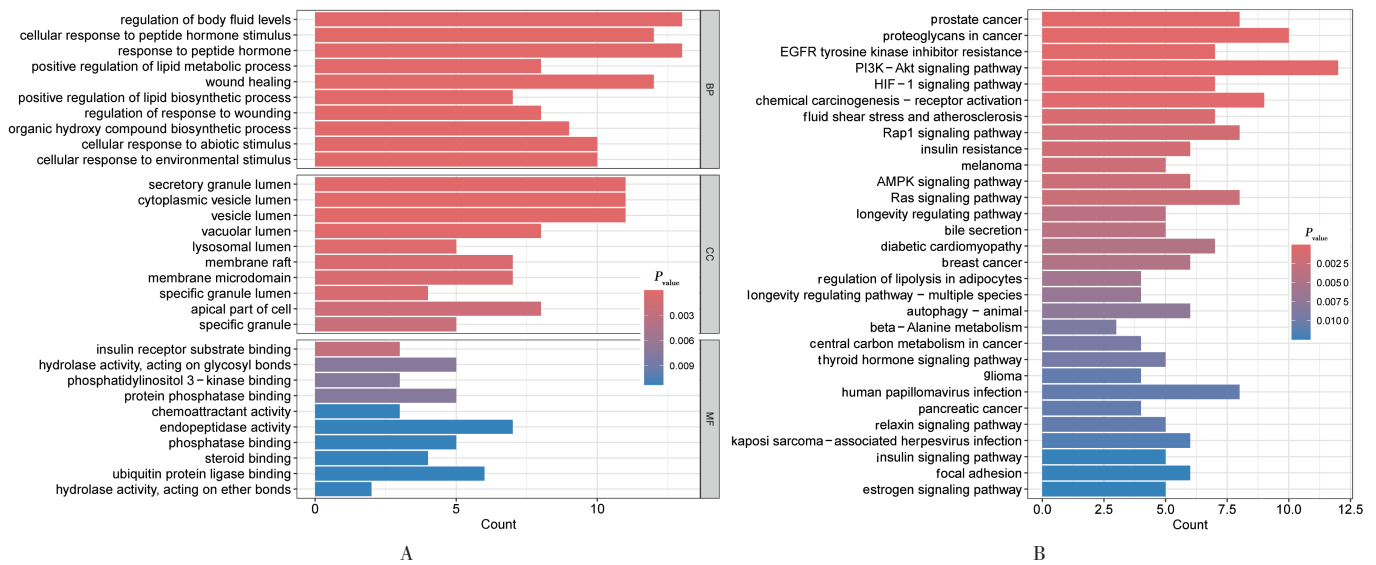


图4 GO分析与KEGG通路富集分析条形图
A. GO analysis B. KEGG pathway enrichment analysis

Fig. 4 Bar chart of GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis

化蛋白激酶(AMPK)、表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂耐药等信号通路。 P_{value} 值排名前30的信号通路见图4B。

分子对接:结果显示,地黄苷D和核心靶点NF- κ B1, IGF1R, TLR4, PIK3R1的结合能分别为-10.1, -6.1, -10.9, -10.2 kcal/mol,均<-5 kcal/mol,表明对接

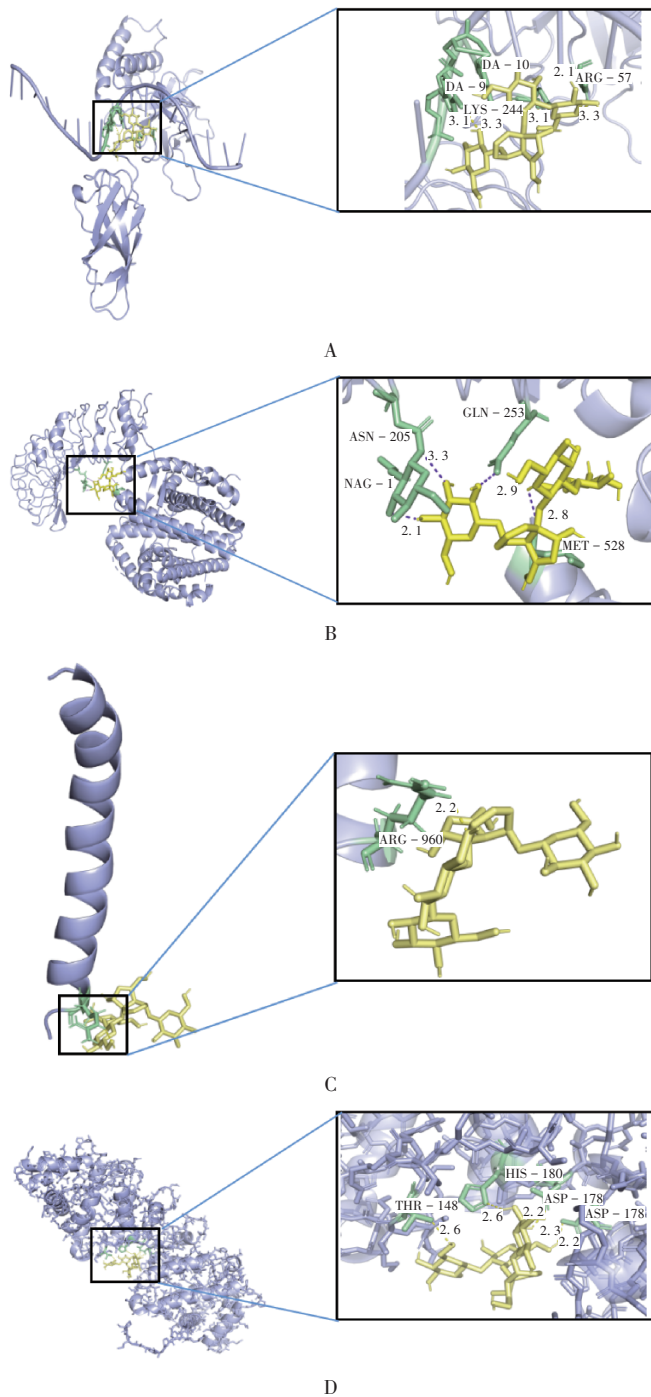
结果活性良好。详见图5。

2 动物实验验证

2.1 资料与方法

2.1.1 仪器、试药与动物

仪器:SH-100型斑马鱼生化培养箱(上海精其仪器有限公司);ME204型电子分析天平(瑞士Mettler



A. 地黄苷D - NF - κ B1 B. 地黄苷D - TLR4 C. 地黄苷D - IGF1R D. 地黄苷D - PIK3R1

图5 地黄苷D治疗糖尿病肾病的分子对接可视化图谱

A. Rehmannioside D - NF - κ B1 B. Rehmannioside D - TLR4
C. Rehmannioside D - IGF1R D. Rehmannioside D - PIK3R1

Fig.5 Molecular docking visualization of rehmannioside D in the treatment of DN

Toledo公司,精度为0.1 mg);AO - HK830 - 0318型4K大景深拍照测量电子显微镜(深圳市奥斯微光学仪器有限公司);EVOS™ M5000 Imaging System型科研级倒置荧光显微镜(美国Thermo Fisher Scientific公司);EQ7000型台式超纯水机(广州黄河仪器科技有限公司)。

试剂:地黄苷D(成都曼思特生物科技有限公司,货号为A1129);MS - 222麻醉剂(湖北创歌生物科技有限公司,货号为MI - 222);AMPK通路抑制剂多索吗啡(美国Med Chemexpress公司,货号为HY - 13418A);达格列净片(阿斯利康药业<中国>有限公司,批号为2412B17);10 × PBST缓冲液(货号为P1033),二甲基亚砜(DMSO,货号为D8371),D - 无水葡萄糖(货号为G8150),均购自北京索莱宝科技有限公司。

动物:转基因斑马鱼*Eco. Tshb:EGFP*胚胎(上海费曦生物科技有限公司),本研究方案经南方医科大学第十附属医院动物伦理学委员会审批(批号:IACUC - AWEC - 202511003)。

2.1.2 方法

溶液制备:1)斑马鱼培养液。取氯化钾(KCl)126.735 mg、氯化钙(CaCl_2)366.234 mg、氯化钠(NaCl)2.922 g、硫酸镁(MgSO_4)397.221 mg,溶于10 L超纯水中,即得。2)150 mmol/L葡萄糖培养液。称取2.7 g D - 无水葡萄糖粉末,溶于100 mL斑马鱼培养液中,充分混匀,调整至终浓度为150 mmol/L,0.22 μm 无菌滤膜过滤,现配现用,即得。3)10 μmol /L地黄苷D培养液。取地黄苷D适量,加DMSO制成质量浓度为1 mg/mL的地黄苷D母液。取地黄苷D母液55 μL ,加150 mmol/L葡萄糖培养液,定容至8 mL,充分混匀,使地黄苷D终浓度为10 μmol /L,0.22 μm 无菌滤膜过滤,现配现用,即得。4)20 μmol /L地黄苷D培养液。取地黄苷D母液110 μL ,加150 mmol/L葡萄糖培养液,定容至8 mL,充分混合,使地黄苷D终浓度为20 μmol /L,0.22 μm 无菌滤膜过滤,现配现用,即得。5)达格列净组培养液。取达格列净片,加DMSO制成质量浓度为1 mg/mL的达格列净母液。取达格列净母液16.4 μL ,加150 mmol/L葡萄糖培养液,定容至8 mL,充分混匀,使达格列净终浓度为5 μmol /L,0.22 μm 无菌滤膜过滤,现配现用,即得。6)20 μmol /L地黄苷D + 多索吗啡培养液。取多索吗啡适量,加DMSO制成浓度为10 mmol/L的多索吗啡母液。取地黄苷D母液和多索吗啡母液各适量,加150 mmol/L葡萄糖培养液,定容至8 mL,充分混匀,使地黄苷D和多索吗啡终浓度分别为20,5 μmol /L,0.22 μm 无菌滤膜过滤,现配现用,即得。

斑马鱼培养:经电子显微镜仔细筛查,确保转基因斑马鱼*Eco. Tshb:EGFP*胚胎发育正常后,将其置培养皿内,加斑马鱼培养液,置恒温[(28.5 \pm 0.5)°C]生化培养箱中培养。培养过程中及时挑除坏死鱼卵,每日更换培养液2次。持续培养4 d,直至幼鱼肾脏发育至适合后续实验观察和分析的阶段。

分组、建模与给药:将转基因斑马鱼分为空白对照组

(A组),模型组(B组,150 mmol/L葡萄糖),低、高剂量地黄苷D组(C组、D组,10,20 μmol/L),达格列净组(E组,5 μmol/L),地黄苷D+多索吗啡组(F组,20 μmol/L+5 μmol/L),各15条。A组予斑马鱼培养液培养,其余各组予150 mmol/L葡萄糖培养液诱导,建立高糖致肾脏损伤模型。A组持续予斑马鱼培养液,B组在A组基础上持续予150 mmol/L葡萄糖,C-F组在B组基础上予相应药物干预。干预结束后,通过转基因斑马鱼荧光成像观察荧光强度变化,对模型建立情况及药物干预效果进行评价^[7,9]。

地黄苷D对高糖致斑马鱼幼鱼肾脏结构的影响:将斑马鱼置恒温[(28.5 ± 0.5)°C]生化培养箱中培养,每日更换等体积培养液。将给药处理受精后8 d的斑马鱼幼鱼置MS-222麻醉剂(质量浓度为100 mg/L)中麻醉,吸弃麻醉剂,将斑马鱼幼鱼置载玻片上,滴加3%甲基纤维素固定体位,采用倒置荧光显微镜观察和采集幼鱼侧位的荧光显微图像,选取肾脏区域作为感兴趣区,采用Image J 1.54p软件测定斑马鱼幼鱼肾脏的平均荧光强度,以评价前肾小管结构的变化^[8]。

2.1.3 统计学处理

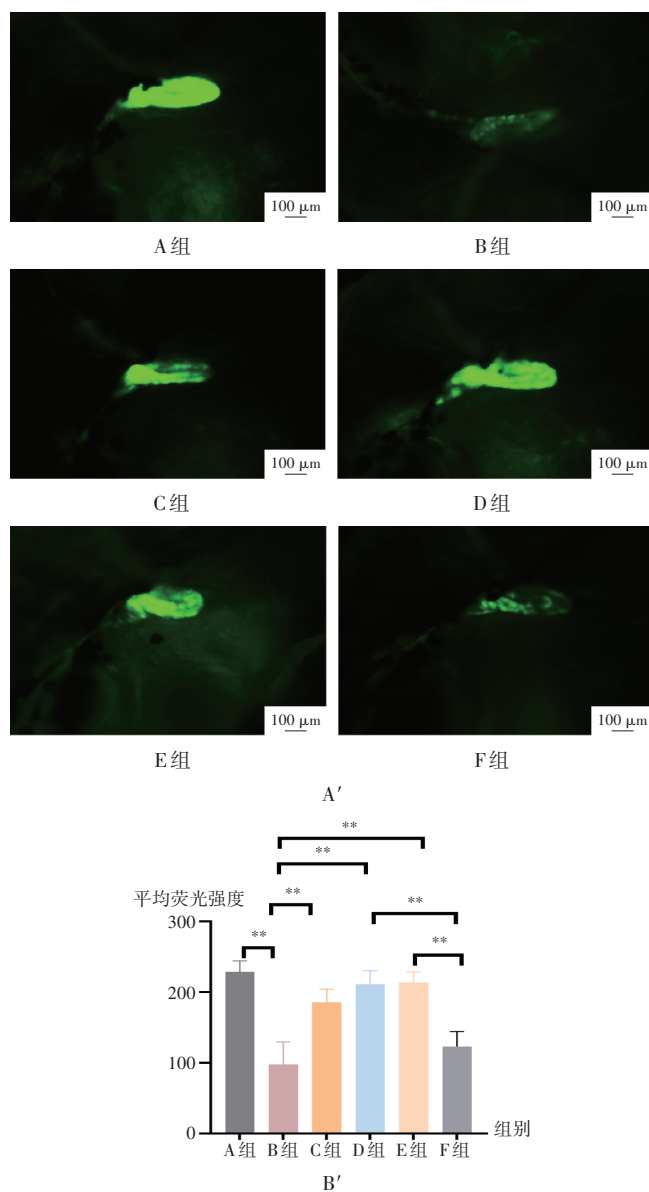
采用GraphPad Prism 10.1.2软件进行统计学分析及作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较行单因素方差分析,进一步组间比较行Tukey多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2 结果

与A组比较,B组斑马鱼前肾小管平均荧光强度显著减弱($P < 0.01$),表明B组斑马鱼前肾小管结构损伤;与B组比较,C组、D组、E组斑马鱼前肾小管平均荧光强度均显著增强($P < 0.01$),表明地黄苷D、达格列净均能缓解高糖致前肾小管结构受损;与D组比较,F组斑马鱼前肾小管平均荧光强度显著减弱($P < 0.01$),表明多索吗啡可逆转地黄苷D的缓解作用。详见图6。提示地黄苷D可能通过AMPK信号通路改善高糖致斑马鱼前肾小管结构损伤。

3 讨论

DN是在长期代谢异常背景下逐渐形成的复杂病理过程^[10]。地黄在糖尿病及并发症的应用中具有较长的历史,其作用及作用机制近年来逐渐通过现代药理学和动物实验研究得到进一步阐释^[11-13]。地黄苷D为地黄的关键活性成分,其化学性质稳定,且生物利用度高,在抗炎、抗氧化及抑制肾脏纤维化方面具有显著优势,成为治疗糖尿病的潜在药物。有研究发现,地黄苷D可通过信号转导与转录激活蛋白3(STAT3)有效抑制高糖致肾小管上皮细胞上皮间质转化(EMT)相关蛋白表达,改善肾小管损伤^[14]。DN发病机制复杂,涉及多种病



A'. 显微图($\times 40$) B'. 定量分析柱状图

注:两组比较,** $P < 0.01$ 。

图6 地黄苷D对高糖致斑马鱼幼鱼肾脏结构的影响($n = 15$)
A'. Microscopic image ($\times 40$) B'. Bar chart of the quantitative analysis
Note: Comparison between the two groups, ** $P < 0.01$.

Fig. 6 Effect of rehmannioside D on the renal structure of zebrafish larvae induced by high glucose ($n = 15$)
生理机制,而地黄苷D治疗DN的研究尚处于初步阶段,其具体作用机制和临床应用仍需深入探索。

本研究中的网络药理学分析结果显示,地黄苷D可能通过作用于PRKACA,PIK3R1,TLR4,IGF1R,NF- κ B1,mTOR等核心靶点参与多个GO分析生物学过程;KEGG富集通路分析结果显示,地黄苷D通过参与调控AMPK,PI3K/Akt等多个信号通路治疗DN。其中,AMPK作为细胞能量稳态的核心调节因子,在DN发病机制中有关键作用^[15]。高糖及代谢紊乱会抑制AMPK的活性,在加剧氧化应激反应的同时,还通过解除对

NF- κ B炎症信号通路和转化生长因子- β (TGF- β)纤维化信号通路的抑制,共同促进肾小球硬化和肾小管间质纤维化^[16]。研究证实,激活AMPK信号通路能有效改善肾脏病理学改变,这使AMPK信号通路成为极具潜力的治疗靶点^[17]。因此,深入探索AMPK的肾脏保护机制,对DN防治策略的开发具有重要意义。

PRKACA负责编码蛋白激酶A(PKA)的催化亚基,而PKA可通过促进肝激酶B1(LKB1)的活化,间接增强AMPK的磷酸化水平^[18]。NF- κ B通过调控慢性炎症反应、氧化应激反应和纤维化过程,在DN肾小球及肾小管间质病理损伤中发挥核心调控作用。有研究表明,可通过减少炎症因子释放、抑制氧化应激反应、肾纤维化及细胞凋亡而降低NF- κ B表达水平,从而改善DN的肾脏损伤和功能异常^[19]。Zhang等^[15]的研究发现,在DN中,NF- κ B和AMPK信号通路扮演着相互拮抗的核心角色,AMPK信号通路被激活后通过抑制NF- κ B的活性,发挥抗炎、抗纤维化、减轻氧化应激反应的作用,从而缓解DN的进展。IGF1R不仅在糖尿病患者的葡萄糖代谢中有重要作用,也是治疗DN的重要靶点^[20]。高血糖通过激活IGF1R启动上游信号,经PI3K/Akt信号通路传导并放大,最终通过mTOR复合物1(mTORC1)的持续活化执行其病理效应,驱动肾脏细胞肥大、促炎因子释放及细胞外基质沉积,从而导致肾小球硬化和间质纤维化的发生与发展^[21-22]。PIK3R1负责编码p85 α 蛋白,其是PI3K的重要调节亚基,在细胞信号传导、生长、代谢等过程中起关键作用,与多种疾病相关。mTOR靶点的激活是促进肾脏结构与功能损伤的核心环节^[22]。有研究发现,通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路参与DN进展,其表达异常可加剧胰岛素抵抗下的肾脏损伤,导致肾小球促细胞凋亡、氧化应激反应及纤维化反应的异常激活^[23]。AMPK能抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路,恢复Unc-51样激酶1(ULK1)介导的自噬流,改善线粒体功能,并缓解氧化应激反应与炎症反应^[24-25]。

目前,地黄苷D治疗DN的研究主要集中在体外细胞模型,尚缺乏体内实验的验证。刘瑞嶂等^[14]研究发现,10,20 μ mol/L地黄苷D均可改善肾小管损伤,抑制肾脏纤维化的发生。故本研究中的前期实验选取10,20 μ mol/L这2个浓度作为干预剂量,观察了斑马鱼幼鱼的存活率、体表形态、活动能力及肾脏荧光强度变化,结果显示,10,20 μ mol/L地黄苷D均未导致斑马鱼出现明显毒性反应,表明安全性良好。KEGG通路富集分析结果显示,AMPK信号通路可能是地黄苷D治疗DN的信号通路,推测地黄苷D可能通过AMPK信号通路治疗DN。因此,本研究中选择AMPK通路抑制剂多索吗啡来阻断AMPK信号通路的表达。多索吗啡用于斑马

鱼模型及人胚肾细胞时多以5 μ mol/L作为抑制浓度,既能稳定下调磷酸化AMPK(p-AMPK)水平,又未见明显的药物毒性^[26-27]。因此,本研究中多索吗啡浓度选择5 μ mol/L,以验证地黄苷D是否依赖AMPK信号通路。当使用多索吗啡处理转基因斑马鱼*Eco. Tshb:EGFP*幼鱼后发现,斑马鱼幼鱼前肾小管荧光强度均下降,逆转了地黄苷D对高糖致斑马鱼幼鱼肾脏结构的保护作用,推断地黄苷D至少是部分通过AMPK信号通路来缓解高糖致斑马鱼幼鱼肾脏损伤,揭示地黄苷D在治疗DN上具有一定开发潜力。

综上所述,本研究中采用网络药理学分析法预测了地黄苷D防治DN的潜在作用机制,初步明确了其可能发挥治疗效应的关键靶点及相关信号通路。通过体内实验揭示了地黄苷D可能通过AMPK信号通路改善高糖致肾脏损伤。

参考文献

- [1] Thomas M C, Brownlee M, Susztak K, et al. Diabetic kidney disease[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2015, 1: 15018.
- [2] Naaman S C, Bakris G L. Diabetic Nephropathy: Update on Pillars of Therapy Slowing Progression [J]. Diabetes Care, 2023, 46(9): 1574 - 1586.
- [3] Liu X J, Hu X K, Yang H, et al. A Review of Traditional Chinese Medicine on Treatment of Diabetic Nephropathy and the Involved Mechanisms [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2022, 50(7): 1739 - 1779.
- [4] 沈双,魏聪,常丽萍,等. 糖尿病肾病从络论治研究进展[J]. 天津中医药, 2021, 38(6): 689 - 694.
- [5] 王之,简桂花,汪年松. 地黄治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(4): 363 - 365.
- [6] 范琦琦,李芝奇,陈美琳,等. 基于斑马鱼模型的中药安全性评价研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(1): 278 - 287.
- [7] Ahmed I, Ziab M, Da'As S, et al. Network - based identification and prioritization of key transcriptional factors of diabetic kidney disease [J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2023, 21: 716 - 730.
- [8] Wang Y, Sun Z H, Zhou L, et al. Grouper tsh β promoter - driven transgenic zebrafish marks proximal kidney tubule development [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e97806.
- [9] 张梦悦,刘慧茹,金雨萌,等. 基于斑马鱼模型与网络药理学的西洋参抗糖尿病肾病关键活性成分研究[J]. 药物评价研究, 2025, 48(9): 2494 - 2506.
- [10] 陈慧楠,林敏. 糖尿病肾病从络病论治研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 265 - 271.
- [11] 李鑫,刘乐亮,严会娇,等. 鲜地黄、生地黄、熟地黄在消渴病中辨证用药浅析[J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(23): 6 - 8.
- [12] 王胜娟. 地黄调节AQP2效应与其改善微炎症状态(热瘀)的关系研究[D]. 西安:第四军医大学, 2016: 1 - 3.
- [13] Quan Y H, Jia F F, Hao H, et al. Rehmannia glutinosa Libosch ameliorates diabetic nephropathy in Sprague - Dawley rats by