



三叶豆苷通过调控MAPK信号通路减轻高血压所致肾脏细胞凋亡的机制研究*

吴美珠^{1,2,3}, 郭智^{1,2,3}, 谢意^{1,2,3}, 刘红纾^{1,2,3}, 陈红^{1,2,3}, 林新标^{1,2,3},
陈榕基^{1,2}, 沈阿灵^{1,2,3}, 彭军^{1,2,3△}

1. 福建中医药大学 中西医结合研究院(福州 350122); 2. 福建中医药大学 中西医结合学院(福州 350122);
3. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室(福州 350122)

【摘要】 目的 探讨三叶豆苷对高血压所致肾损伤的潜在治疗作用及其关键靶点和通路。方法 利用高通量基因表达数据库(GEO)分析高血压患者外周血临床样本的mRNA转录图谱,采用网络药理学方法筛选三叶豆苷治疗高血压所致肾损伤的关键靶点,通过基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库对通路富集分析。取大鼠肾小管上皮细胞系NRK-52E,构建血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)刺激的NRK-52E细胞模型,流式细胞仪检测细胞凋亡率,Western blot法检测凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、caspase-3)以及MAPK通路关键蛋白(ERK、p38 MAPK、JNK)的磷酸化与总蛋白表达水平。结果 数据集GSE75360的分析结果显示,与正常人群相比,高血压患者外周血单核细胞中有3 331个基因上调,3 197个基因下调。网络药理学分析三叶豆苷具有472个潜在作用靶点(如CASP3、MAPK1)。蛋白质-蛋白质相互作用网络分析显示这些靶点与凋亡调控信号通路等密切相关。GO和KEGG通路富集分析提示:三叶豆苷在负向调控细胞凋亡过程、凋亡通路和MAPK信号通路等通路被显著富集。体外实验证实,与Ang II组相比,三叶豆苷干预能够抑制Ang II刺激后NRK-52E细胞的凋亡率,抑制Bax和cleaved caspase-3的表达,促进Bcl-2的表达以及抑制p38 MAPK、ERK、JNK的磷酸化($P<0.05$)。结论 三叶豆苷通过抑制Ang II刺激的NRK-52E细胞凋亡,并调控MAPK信号通路,可能是其抗高血压所致肾损伤的重要机制之一。

【关键词】 三叶豆苷 高血压性肾病 细胞凋亡 MAPK信号通路

Mechanism of Trifolin in Attenuating Hypertension-Induced Renal Cell Apoptosis via Modulation of the MAPK Signaling Pathway

WU Meizhu^{1,2,3}, GUO Zhi^{1,2,3}, XIE Yi^{1,2,3}, LIU Hongshu^{1,2,3}, CHEN Hong^{1,2,3}, LIN Xinbiao^{1,2,3}, CHEN Rongji^{1,2}, SHEN Aling^{1,2,3}, PENG Jun^{1,2,3△}. 1. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 3. Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, China
△ Corresponding author, E-mail: pjunlab@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the potential therapeutic effects of trifolin on hypertension-induced renal injury, as well as the key targets and pathways involved. **Methods** The mRNA transcriptional profiles of peripheral blood clinical samples from hypertensive patients were analyzed using Gene Expression Omnibus (GEO), a high-throughput gene expression database. The network pharmacology method was employed to screen key targets of trifolin in treating hypertension-induced renal injury. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were conducted. NRK-52E cells, a rat renal proximal tubular cell line, were used to construct an angiotensin II (Ang II)-stimulated cell model. Flow cytometry was performed to assess cell apoptosis rates and Western blotting was performed to determine the expression levels of apoptosis-related proteins, including Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3, and caspase-3, and the phosphorylation and total protein levels of the key MAPK pathway proteins, including ERK, p38 MAPK, and JNK. **Results** Analysis of the dataset GSE75360 revealed that, compared with healthy controls, 3 331 genes were upregulated and 3 197 genes were downregulated in peripheral blood mononuclear cells of hypertensive patients. According to network pharmacology analysis, 472 potential targets of trifolin were identified, including CASP3 and MAPK1. Protein-protein interaction network analysis showed that these targets were closely associated with apoptosis regulatory signaling pathways. GO and KEGG pathway enrichment analyses indicated that trifolin was significantly enriched in pathways associated with negative regulation of apoptosis, apoptotic signaling

* 国家自然科学基金(No. U22A20372)、福建中医药大学青年科研拔尖人才(No. XQB202202)、福建省卫生健康中青年领军人才研修培养项目(闽卫人函[2023]2841)、2024年度福建省中青年教育科研项目(No. JZ240026)和2024年度福建中医药大学校管课题(No. X2024008)资助

△ 通信作者, E-mail: pjunlab@hotmail.com

出版日期: 2025-09-20

pathways, and the MAPK signaling pathway. The *in vitro* experiments confirmed that, compared with the Ang II group, trifolin intervention inhibited apoptosis in Ang II-stimulated NRK-52E cells, suppressed the expression of Bax and cleaved caspase-3, promoted Bcl-2 expression, and inhibited the phosphorylation of p38 MAPK, ERK, and JNK ($P < 0.05$).

Conclusion Trifolin may exert its protective effect against hypertension-induced renal injury by inhibiting Ang II-induced NRK-52E cell apoptosis and regulating the MAPK signaling pathway, representing an important mechanism underlying its therapeutic action.

[Key words] Trifolin Hypertensive nephropathy Cell apoptosis MAPK signaling pathway

高血压性肾病(hypertensive nephropathy)是慢性肾病的重要原因之一,严重威胁人类健康^[1]。随着高血压患病率的不断攀升,高血压肾损害已成为导致终末期肾病的第二大病因,显著增加了心血管事件的发生率和死亡率^[2]。高血压性肾病通常伴随着肾小球硬化、肾小管萎缩及间质纤维化等病理变化,这些病变与慢性炎症、氧化应激和细胞凋亡等病理生理过程密切相关^[3-4]。其中,肾小管上皮细胞的凋亡在高血压肾病中扮演了关键角色。研究表明,过度的细胞凋亡不仅会导致肾小管结构和功能的破坏,还会进一步加剧肾脏纤维化和功能丧失^[2, 5]。因此,能否有效抑制肾小管上皮细胞的凋亡至关重要。

中医药在治疗高血压性肾病方面展现出独特的优势^[6-7]。诸多中药如淫羊藿、川芎和人参等已被广泛应用于高血压肾损害的治疗中^[7-8]。这些中药通过多途径、多靶点的方式发挥肾脏保护作用,主要机制包括抗炎、抗氧化、抗纤维化、免疫调节及改善微循环等^[6]。三叶豆苷(trifolin)是一种天然黄酮类化合物(CAS: 23627-87-4,分子式: $C_{21}H_{20}O_{11}$),广泛存在于人参、淫羊藿、钩藤等多种中药中,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡、保护心血管和肾脏等多种药理作用^[9-10]。尤为重要的是,近期研究发现三叶豆苷干预能有效降低Ang II诱导的高血压模型小鼠的血压水平,并改善其腹主动脉功能、抑制血管过度收缩^[11-13]。此外,研究证实三叶豆苷具有心脏保护作用,能够通过调控多条信号通路减轻Ang II诱导心肌细胞的氧化应激和凋亡^[14]。这些发现提示三叶豆苷在干预高血压及其并发症方面具有直接潜力。然而,三叶豆苷对高血压性肾病的影响尚未见报道。为此,本研究拟通过GEO数据库和网络药理学分析,系统探讨三叶豆苷对高血压肾病的潜在治疗作用及其关键靶点和通路,并采用细胞模型进行验证,为三叶豆苷在临床上的新应用提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

Bax(货号: 2772S)、cleaved caspase-3/caspase-3(货号: 9662S)、p-p38 MAPK(货号: 4511S)、p38 MAPK(货号: 8690S)、p-ERK(货号: 4370S)、ERK(货号: 4695S),上述抗

体均购自美国Cell Signaling Technology公司。Bcl-2抗体(货号: ABM0010)购自美国Abbkine公司,p-JNK(货号: 13371)、JNK(货号: 4108)、 β -actin抗体(货号: 52901)、羊抗兔二抗(货号: L3012)及羊抗鼠二抗(货号: L3032)均购自美国Signalway Antibody公司。DMEM培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶及BCA蛋白检测试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司。Annexin V-AbFluor™ 647细胞凋亡检测试剂盒(货号: 2116)购自中国武汉亚科因生物技术有限公司。

1.2 实验药物及配制

三叶豆苷(Trifolin, 货号: B21104-20 mg)购自中国上海源叶生物科技有限公司。以二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解三叶豆苷,配制浓度为100 mmol/L的储备液,分装后储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,以备后续实验使用。

1.3 生信分析

1.3.1 疾病靶点及成分-疾病交集靶点的获取

在高通量基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中,以“Hypertension”为关键词,针对人类物种进行检索,获取相关基因表达矩阵数据。以校准 P 值 < 0.05 , $\text{Log}_2[\text{fold change}] > 1$ 为筛选条件筛选差异表达基因。并通过微生物信数据库(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制聚类分析图和火山图进行可视化处理。

三叶豆苷的潜在作用靶点通过PharmMapper和SwissTargetPrediction两个数据库进行预测。将从GEO数据库中筛选出的高血压相关差异基因与三叶豆苷的潜在作用靶点进行映射,取其交集,所得靶点即为三叶豆苷对高血压的潜在治疗靶点。

1.3.2 三叶豆苷治疗核心靶点的获取

以 $\text{degree} > \text{median}$ 、 $\text{closeness centrality} > \text{median}$ 、 $\text{betweenness centrality} > \text{median}$ 为筛选条件,获取三叶豆苷治疗高血压的潜在核心靶点,并进行可视化处理。

1.3.3 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建及关键靶点

将潜在治疗靶点和核心靶点导入GeneMANIA和STRING数据库,构建PPI网络并绘制网络图。计算网络

的拓扑属性,并将结果以TSV格式导出。将TSV文件导入Cytoscape软件进行进一步的拓扑分析,以评估各靶点在PPI网络中的重要性及其潜在功能。

1.3.4 基因本体(Gene Ontology, GO)富集分析与京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析

通过David平台(<https://david.ncifcrf.gov>)对核心靶点进行GO及KEGG富集分析($P < 0.05$, $FDR < 0.05$),其中GO分析涵盖生物学过程、细胞成分和分子功能三大类别。依据 P 值,选取前10富集通路进行可视化处理。

1.4 细胞培养和三叶豆苷干预

大鼠肾小管上皮细胞系NRK-52E(货号:CL-0174)购自中国武汉普诺赛生命科技有限公司。依据前期研究^[45],通过Ang II诱导NRK-52E构建高血压肾损伤细胞模型。细胞培养于含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中,培养条件为37℃、5% CO₂。实验分为以下五组:Control组、Ang II组、Ang II+Trifolin(25 μmol/L)组、Ang II+Trifolin(50 μmol/L)组、Ang II+Trifolin(100 μmol/L)组。Control组细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,其余各组细胞则在含1 μmol/L Ang II的培养基中培养。同时,实验组分别给予不同浓度(25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L)的Trifolin处理,对照组与Ang II组加入等体积的DMSO作为溶剂对照。所有组别细胞均置于37℃、含体积分数5% CO₂的培养箱中培养24 h。

1.5 流式细胞仪检测三叶豆苷干预对Ang II刺激后NRK-52E细胞凋亡的影响

NRK-52E以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞密度接种于6孔板中。待药物干预结束后,使用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰蛋白酶消化细胞并收集。使用100 μL Annexin V结合缓冲液重悬细胞,并加入5 μL Annexin V-Abflour™ 647和2 μL碘化丙啶(propidium iodide, PI)溶液。将重悬后的细胞在室温下避光孵育30 min,随后加入400 μL Annexin V结合缓冲液重悬。采用流式细胞仪(美国BD Biosciences公司)检测并分析细胞凋亡情况。

1.6 Western blot检测三叶豆苷干预对Ang II刺激NRK-52E细胞凋亡、潜在富集通路等相关蛋白的表达

NRK-52E以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞密度接种于6孔板中。药物干预结束后,使用Western及IP细胞裂解液裂解细胞。裂解液在4℃条件下以12 000 r/min离心20 min,收集上清液并采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白样品,经10% SDS-PAGE凝胶进行电泳分离,随后通过湿转法将分离后的蛋白转移至PVDF膜上。转膜完成后,使用5%脱脂奶粉在室温下封闭膜2 h,在4℃下

孵育相应稀释的一抗(稀释比例1:1 000)过夜。一抗孵育结束后,使用TBST缓冲液洗膜3次,于室温下使用相应稀释的二抗(稀释比例1:5 000)孵育1 h。采用增强型化学发光(ECL)试剂盒检测蛋白表达水平。通过ImageJ软件分析目的蛋白与内参(β -actin)灰度值,计算相对表达量,实验重复3次取均值。

1.7 统计学方法

采用SPSS 26.0软件(SPSS/PC+)进行统计分析。数据的正态性通过Shapiro-Wilk检验进行检验。当数据符合正态分布时,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。当比较三组或更多组之间的差异时,若数据满足正态分布,则采用单因素方差分析。当方差齐性检验通过时,使用Bonferroni法进行事后多重比较;若方差齐性检验不通过,则采用Games-Howell法进行事后比较。对于不符合正态分布的数据,则使用非参数Kruskal-Wallis H 检验进行组间差异比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高血压的疾病靶点及三叶豆苷潜在作用靶点的获取

本研究选取GEO数据库中的GSE75360数据集作为核心数据来源。如图1A所示,与正常人群相比,高血压患者外周血单核细胞中共检测出6 528个差异表达基因,其中包括3331个上调基因(红色)和3197个下调基因(蓝色)。如图1B所示,两组样本在基因表达水平上均表现出良好的组内均一性,其中红色代表高表达基因,蓝色代表低表达基因。通过PubChem数据库获取三叶豆苷的化学结构式(附图1)。利用PharmMapper和SwissTargetPrediction数据库对三叶豆苷的潜在作用靶点进行预测(附图2),经过靶点去重后,共获得472个潜在作用靶点。所有附图见网络资源附件。

2.2 三叶豆苷治疗高血压的疾病靶点分析及PPI网络构建

如图2A所示,将三叶豆苷的472个潜在作用靶点与GSE41453数据集中鉴定的6 528个差异表达基因进行交集分析,共识别出147个共同靶点(潜在治疗靶点)。根据筛选条件,进一步筛选出47个核心治疗靶点。潜在治疗靶点的PPI网络包含138个节点和1 642条边(附图3),而核心治疗靶点的PPI网络包含47个节点和692条边(图2B)。其中,Degree值排名前三的核心治疗靶点为HSP90AA1、CASP3和SRC(图2C、图2D)。通过GeneMINIA数据库分析发现(附图4),核心靶点构成的PPI网络主要与ERK1和ERK2级联反应(ERK1 and ERK2 cascade)、MAP激酶活性调控(regulation of MAP kinase activity)以及JNK级联反应(JNK cascade)等功能相关。

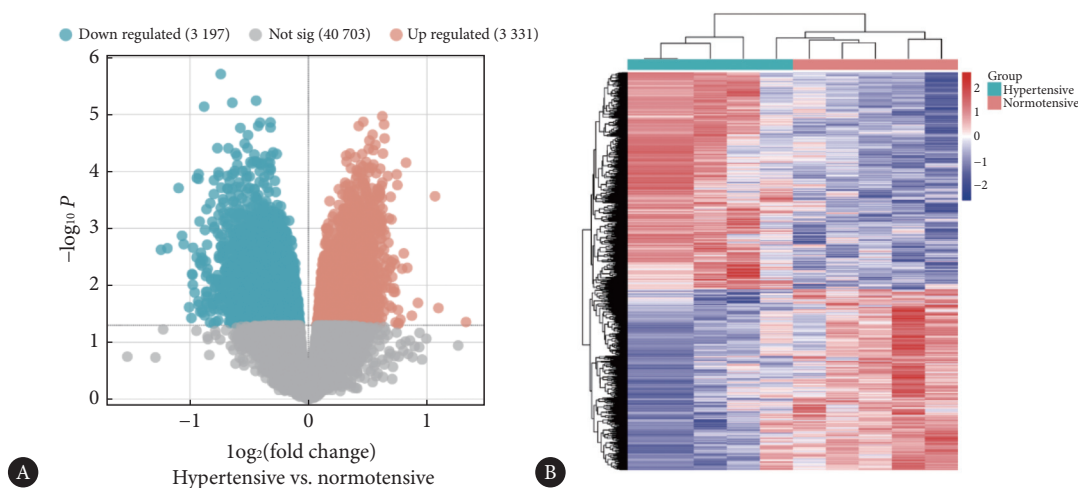


图 1 高血压的疾病靶点的分析

Fig 1 Analysis of hypertension-related targets

A, Heatmap showing the clustering analysis of differentially expressed transcripts (DETs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals and hypertensive patients. B, Volcano plot depicting DETs in PBMCs between healthy individuals and hypertensive patients, highlighting significantly upregulated and downregulated genes.

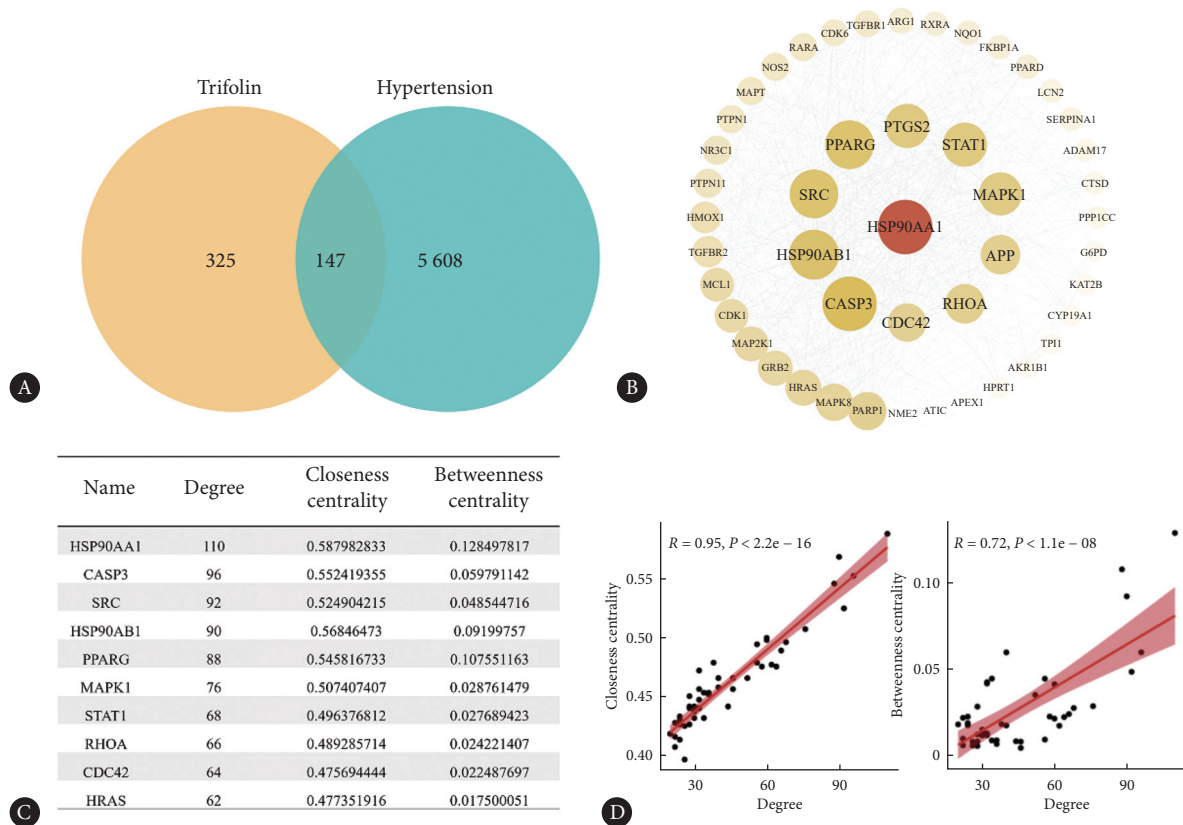


图 2 三叶豆苷治疗高血压疾病的关键治疗靶点及PPI网络图

Fig 2 Key Therapeutic targets and PPI network of trifolin in hypertension treatment

A, Venn diagram showing the overlap between hypertension-related targets and trifolin’s predicted targets. B, Refined PPI network of 47 core therapeutic targets identified for trifolin in hypertension treatment, constructed using the STRING database. C, Degree value table summarizing the top 47 core therapeutic targets of trifolin for hypertension treatment. D, Correlation analysis of the 47 core therapeutic targets of trifolin in hypertension treatment.

2.3 GO富集分析与KEGG富集分析

将核心治疗靶点导入DAVID数据库进行生物信息学

分析(附图5)。共获得192个生物过程(biological process)、41个细胞成分(cell component)和69个分子功

能(molecular function)。其中,生物过程主要包括蛋白磷酸化(protein phosphorylation)、凋亡过程的负调控(negative regulation of apoptotic process)和对异生物刺激的反应(response to xenobiotic stimulus)等;细胞成分主要涉及细胞基质(cytosol)、细胞质(cytoplasm)和细胞外泌体(extracellular exosome)等;分子功能则主要与相同蛋白质结合(identical protein binding)、ATP结合(ATP binding)和蛋白质丝氨酸激酶活性(protein serine kinase activity)等相关。如所示,通过KEGG数据库分析,共识别出125条显著富集的通路,包括代谢通路(metabolic pathways)、库欣综合征(Cushing syndrome)和MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)等。

基于文献挖掘,发现303个基因与肾损伤疾病密切相关。通过KEGG数据库分析,共识别出50条显著富集的信号通路,这些通路被视为与肾损伤疾病相关,其中包括PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、肾细胞癌(renal cell carcinoma)和mTOR信号通路(mTOR

signaling pathway)等。进一步的联合分析显示,共有34条信号通路在两组分析中被共同富集,这些通路被认为是三叶豆苷治疗高血压性肾病的潜在调控途径,其中包括MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)等。通过富集通路类别分析发现,环境信息处理(environmental information processing)类别中的PI3K-Akt信号通路、mTOR信号通路和MAPK信号通路主要与细胞凋亡过程密切相关。

2.4 三叶豆苷干预抑制Ang II 诱导的NRK-52E细胞的凋亡

如图3A所示,Annexin V检测结果表明,与Control组相比,Ang II 刺激显著增加了NRK-52E细胞的凋亡率。而经不同剂量三叶豆苷预处理后,NRK-52E细胞的凋亡率明显降低。如图3B~3G所示,与Control组相比,Ang II 刺激导致NRK-52E细胞中促凋亡蛋白Bax与抗凋亡蛋白Bcl-2的比值和裂解型caspase-3(cleaved caspase-3)与caspase-3的比值显著上调、抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平则明显下调,而caspase-3蛋白水平未见明显变化。经不同剂量

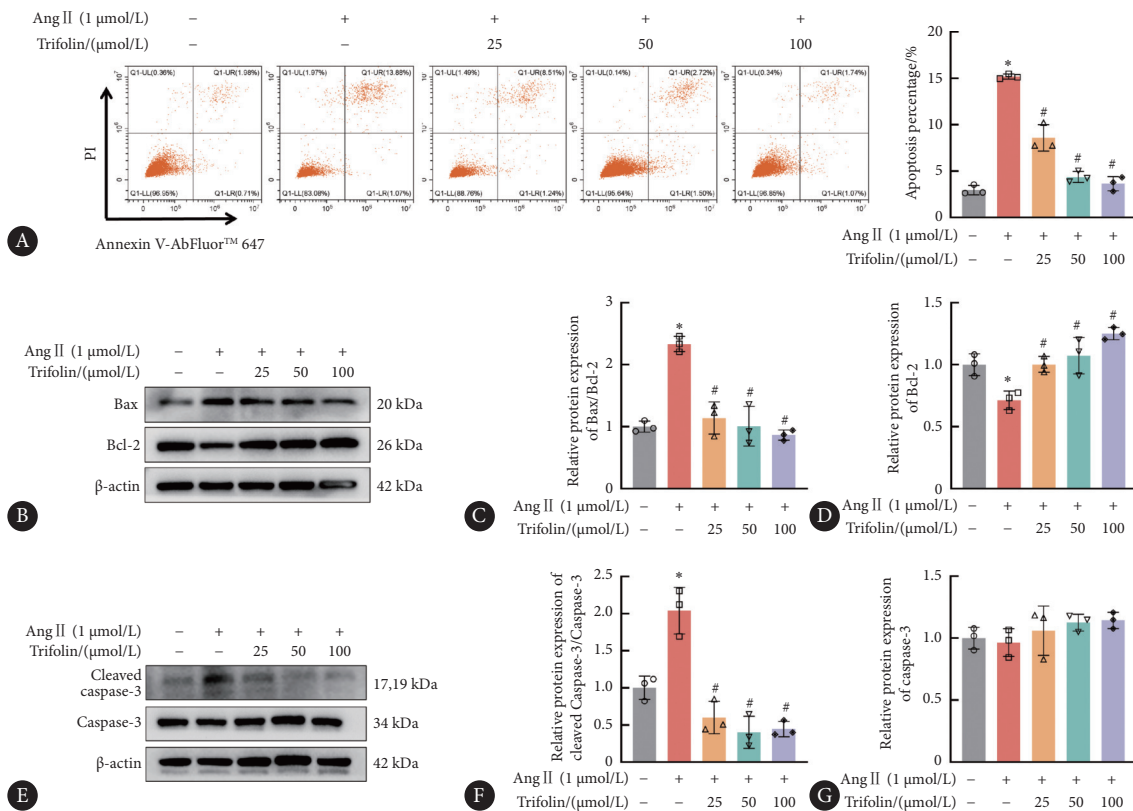


图 3 三叶豆苷干预对Ang II 诱导的NRK-52E细胞凋亡的影响

Fig 3 Effects of trifolin on Ang II -induced apoptosis in NRK-52E cells

A, Flow cytometry analysis using Annexin V staining to evaluate the effects of trifolin on apoptosis in Ang II -stimulated NRK-52E cells. B, Western blot analysis of pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2 levels in NRK-52E cells treated with trifolin following Ang II stimulation. C and D, Quantitative analysis of Bax and Bcl-2 protein expression levels after trifolin intervention in Ang II -stimulated NRK-52E cells. E, Western blot analysis of cleaved caspase-3 protein levels in NRK-52E cells treated with trifolin following Ang II stimulation. F and G, Quantitative analysis of cleaved caspase-3 protein levels in NRK-52E cells after trifolin intervention in response to Ang II stimulation. $n = 3$, * $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. Ang II group.

三叶豆苷干预后,促凋亡蛋白Bax与抗凋亡蛋白Bcl-2的比值和裂解型caspase-3与caspase-3的比值显著降低,同时Bcl-2的表达水平明显升高。

2.5 三叶豆苷干预抑制Ang II诱导的NRK-52E细胞中MAPK通路的异常活化

如图4A~4C所示,与Control组相比,Ang II刺激显著上调了NRK-52E细胞中磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)与总蛋白的比值,而总p38 MAPK蛋白水平未见明显变化。经不同剂量三叶豆苷干预后,磷酸化p38 MAPK(p-

p38 MAPK)与总蛋白的比值显著下调。如图4D~4F所示,与Control组相比,Ang II刺激导致NRK-52E细胞中磷酸化ERK(p-ERK)与总蛋白的比值显著上调,而总ERK蛋白水平明显下调。不同剂量三叶豆苷干预后,上述蛋白水平的改变被有效逆转。如图4G~4I所示,与Control组相比,Ang II刺激显著上调了NRK-52E细胞中磷酸化JNK(p-JNK)与总蛋白的比值,而总JNK蛋白水平未发生明显变化。经不同剂量三叶豆苷干预后,p-JNK蛋白水平显著下调。

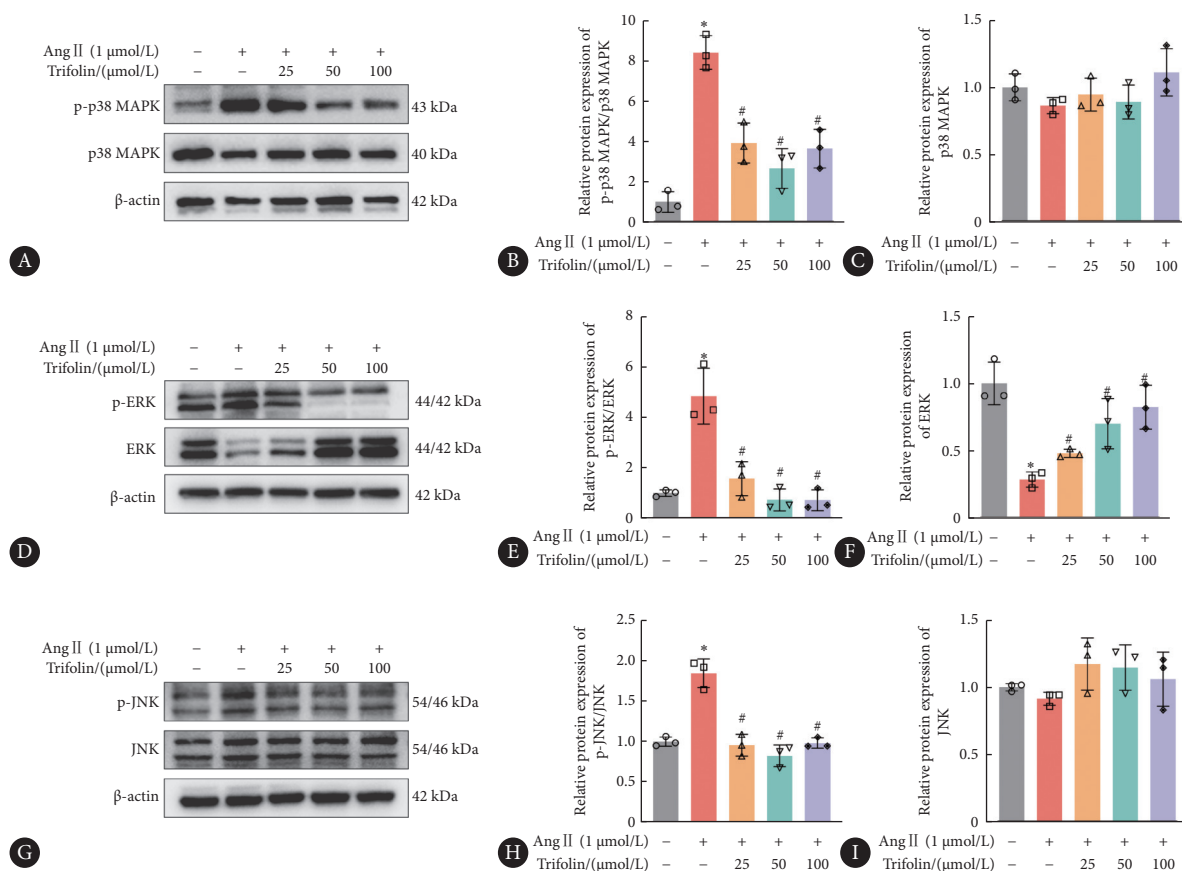


图4 三叶豆苷干预对Ang II诱导的NRK-52E细胞中MAPK通路活化的影响

Fig 4 Effects of trifolin on MAPK pathway activation in Ang II-induced NRK-52E cells

A-C, Western blot analysis and quantitative results of p-p38 MAPK/p38 MAPK protein levels in NRK-52E cells treated with trifolin after Ang II stimulation. D-F, Western blot analysis and quantitative results of p-ERK/ERK protein levels in NRK-52E cells treated with trifolin after Ang II stimulation. G-I, Western blot analysis and quantitative results of p-JNK/JNK protein levels in NRK-52E cells treated with trifolin after Ang II stimulation. $n = 3$, * $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. Ang II group.

3 讨论

高血压作为心血管疾病患者死亡的首要危险因素,其发病机制复杂,涉及多基因、多通路的交互作用,至今尚未完全阐明,仍需进一步深入研究^[16]。本研究通过GEO数据库筛选并选取GSE75360数据集作为研究数据来源,分析发现高血压患者外周血单核细胞中共有6528个基因

的表达发生了显著变化。这一发现不仅为揭示高血压的发病机制提供了重要的基因表达依据,也为进一步探索其潜在的分子机制奠定了基础。

中医药在治疗高血压性肾病方面具有多途径、多靶点的独特优势^[6,17]。已有研究证实,三叶豆苷对心肌梗死后的氧化应激和细胞凋亡具有保护作用,然而其对高血压肾损伤的影响尚未见报道^[14]。本研究通过网络药理学

分析,初步筛选出147个潜在作用靶点,并进一步聚焦于47个核心治疗靶点,其中HSP90AA1、CASP3和SRC基因的功能调控与三叶豆苷的治疗作用密切相关。利用STRING和GeneMINIA数据库的进一步分析表明,三叶豆苷的核心调控网络功能涉及ERK1/2级联反应以及MAPK对JNK级联反应的调控。这些结果提示,三叶豆苷可能通过调控上述信号通路发挥其抗高血压的作用。

在GO生物过程分析中,本研究发现三叶豆苷的潜在调控作用可能与蛋白磷酸化、凋亡过程的负调控等生物学过程密切相关。KEGG富集分析进一步表明,MAPK信号通路和PI3K/AKT信号通路等被显著富集,提示三叶豆苷可能通过这些通路发挥其抗高血压的作用。然而,这些发现仍有待进一步的体内实验和临床研究验证,以探讨三叶豆苷在高血压性肾病治疗中的具体疗效和机制。

随着血压的持续升高,心、脑、肾等靶器官会受到严重损害,高血压已成为导致慢性肾病的主要危险因素^[5]。SHENG等^[18]的研究表明,在慢性肾病患者的肾脏中,有303个基因与肾损伤密切相关。在本研究中,KEGG通路富集分析表明,共有50条信号通路被显著富集,包括肾细胞癌、mTOR信号通路等。进一步的通路联合分析,发现三叶豆苷治疗高血压性肾病的调控机制可能与细胞凋亡和MAPK信号通路密切相关。

在肾脏中,肾小管细胞的凋亡是高血压性肾病的重要特征之一。肾素-血管紧张素-醛固酮系统的过度激活,尤其是血管紧张素II的增加,是引发肾小管细胞凋亡的重要机制^[19]。本研究首次证实三叶豆苷干预可抑制Ang II刺激后NRK-52E细胞的凋亡,提示三叶豆苷可能通过减轻肾小管上皮细胞凋亡发挥保护高血压所致肾损伤的作用。

MAPK信号通路主要包括3个关键的亚家族:ERK、JNK和p38 MAPK。这些亚家族通过激活转录因子c-Jun,促进多种促凋亡基因(如Bax和TNF- α)的表达,从而诱导细胞凋亡^[20-21]。本研究首次证实三叶豆苷可抑制Ang II刺激后NRK-52E细胞中MAPK信号通路的激活,提示三叶豆苷抑制MAPK信号通路的异常活化可能是其发挥肾脏保护作用的重要机制之一。尽管本研究证实了三叶豆苷对MAPK信号通路的调控作用,但尚未使用通路抑制剂对三叶豆苷调控MAPK通路的机制进行直接验证。因此,未来的研究应进一步探索MAPK通路在三叶豆苷抗高血压肾病中的具体作用,并通过使用特异性抑制剂或基因敲除技术,验证该通路在其中的关键作用。

综上所述,本研究采用GEO芯片数据挖掘和网络药理学方法,对三叶豆苷进行了潜在靶点预测和信号通路

分析,探讨了其抗高血压性肾病的潜在作用机制,通过体外实验进一步验证。本研究揭示了三叶豆苷通过抑制MAPK信号通路的异常活化,减轻高血压肾病的潜在机制。这一发现不仅拓展了研究者对三叶豆苷药理作用的认识,也为高血压性肾病的治疗提供了新的思路和候选药物。通过后续深入的研究和验证,三叶豆苷有望在临床实践中发挥其重要的治疗价值。

总之,抑制Ang II诱导的NRK-52E细胞凋亡及MAPK信号通路的异常激活,可能是三叶豆苷发挥抗高血压性肾病作用的重要机制之一。本研究不仅进一步揭示了三叶豆苷抑制肾小管上皮细胞凋亡的具体机制,还为其在临床上的应用提供了更为坚实的理论基础和实验依据。

* * *

作者贡献声明 吴美珠负责论文构思、数据审编、正式分析、经费获取、调查研究、研究方法、验证、可视化和初稿写作,郭智、谢意和刘红纾负责数据审编、正式分析、调查研究和验证,陈红、林新标和陈榕基负责正式分析、调查研究和验证,彭军和沈阿灵负责经费获取、项目管理、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution WU Meizhu is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, validation, visualization, writing original draft. GUO Zhi, XIE Yi, and LIU Hongshu are responsible for data curation, formal analysis, investigation, and validation. CHEN Hong, LIN Xinbiao, and CHEN Rongji are responsible for formal analysis, investigation, and validation. PENG Jun and SHEN Aling are responsible for funding acquisition, project administration, supervision, and writing review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] HAO X M, LIU Y, HAILAITI D. Mechanisms of inflammation modulation by different immune cells in hypertensive nephropathy. *Front Immunol*, 2024, 15: 1333170. doi: 10.3389/fimmu.2024.1333170.
- [2] ZHANG Y, ZHANG N, ZOU Y, et al. Deacetylation of Septin4 by SIRT2 (silent mating type information regulation 2 homolog-2) mitigates damaging of hypertensive nephropathy. *Circ Res*, 2023, 132(5): 601-624. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.321591.
- [3] CHU Q, LI Y, WU J, et al. Oxysterol sensing through GPR183 triggers endothelial senescence in hypertension. *Circ Res*, 2024, 135(7): 708-721. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.124.324722.
- [4] COSTANTINO V V, GIL LORENZO A F, BOCANEGRA V, et al. Molecular mechanisms of hypertensive nephropathy: renoprotective effect of Losartan through Hsp70. *Cells*, 2021, 10(11): 3146. doi: 10.3390/cells10113146.
- [5] FAN Y, CHENG J, YANG Q, et al. Sirt6-mediated Nrf2/HO-1 activation alleviates angiotensin II-induced DNA DSBs and apoptosis in podocytes. *Food Funct*, 2021, 12(17): 7867-7882. doi: 10.1039/d0fo03467c.
- [6] DONG Z, DAI H, FENG Z, et al. Mechanism of herbal medicine on hypertensive nephropathy (review). *Mol Med Rep*, 2021, 23(4): 234. doi:

- 10.3892/mmr.2021.11873.
- [7] XIE T, BAI Z, CHEN Z, *et al.* Inhibition of ferroptosis ameliorates hypertensive nephropathy through p53/Nrf2/p21 pathway by Taohongsiwu decoction: based on network pharmacology and experimental validation. *J Ethnopharmacol*, 2023, 312: 116506. doi: 10.1016/j.jep.2023.116506.
- [8] CHEN Z, PENG Y, YANG F, *et al.* Traditional Chinese medicine injections combined with antihypertensive drugs for hypertensive nephropathy: a network meta-analysis. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 740821. doi: 10.3389/fphar.2021.740821.
- [9] 吴笑雪, 叶益平, 雷振东, 等. 淫羊藿苷通过Cx32-Nox4信号通路改善高血压肾纤维化和损伤. *中国临床药理学与治疗学*, 2024, 29(8): 870-878. doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2024.08.004.
- WU X X, YE Y P, LEI Z D, *et al.* Icaritin improves hypertensive renal fibrosis and injury through Cx32-Nox4 signaling pathway. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2024, 29(8): 870-878. doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2024.08.004.
- [10] 吴雯丹, 陈洪, 黄桂琼. 基于网络药理学探讨钩藤-桑寄生治疗原发性高血压的作用机制. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22(9): 1537-1546. doi: 10.12102/j.issn.1672-1349.2024.09.001.
- WU W D, CHEN H, HUANG G Q. Mechanism of Uncaria and Mulberry Parasitism for the treatment of essential hypertension based on network pharmacology. *Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis*, 2024, 22(9): 1537-1546. doi: 10.12102/j.issn.1672-1349.2024.09.001.
- [11] KIM M J, KWON S B, KIM M S, *et al.* Trifolin induces apoptosis via extrinsic and intrinsic pathways in the NCI-H460 human non-small cell lung-cancer cell line. *Phytomedicine*, 2016, 23(10): 998-1004. doi: 10.1016/j.phymed.2016.05.009.
- [12] REN C, ZHU Y, LI Q, *et al.* *Lespedeza bicolor* Turcz. Honey prevents inflammation response and inhibits ferroptosis by *Nrf2/HO-1* pathway in DSS-induced human Caco-2 Cells. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(8): 900. doi: 10.3390/antiox13080900.
- [13] ZAI M J, CHEESMAN M J, COCK I E. *Terminalia petiolaris* A. Cunn ex Benth. Extracts have antibacterial activity and potentiate conventional antibiotics against β -lactam-drug-resistant bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 2023, 12(11): 1643. doi: 10.3390/antibiotics12111643.
- [14] ZHANG F, GUO Z, WU M, *et al.* Trifolin attenuates hypertension-mediated cardiac injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis: mechanistic insights and therapeutic potential. *Eur J Pharmacol*, 2024, 985: 177125. doi: 10.1016/j.ejphar.2024.177125.
- [15] LONG L, ZHANG X, WEN Y, *et al.* Qingda granule attenuates angiotensin II-induced renal apoptosis and activation of the p53 pathway. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 770863. doi: 10.3389/fphar.2021.770863.
- [16] NGUYEN B A, ALEXANDER M R, HARRISON D G. Immune mechanisms in the pathophysiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol*, 2024, 20(8): 530-540. doi: 10.1038/s41581-024-00838-w.
- [17] 郭智, 谢意, 刘红纾, 等. 汉黄芩苷通过调控MAPK信号通路减轻高血压所致肾脏损伤的机制研究. *四川大学学报(医学版)*, 2025, 56(1): 41-50. doi: 10.12182/20250160103.
- GUO Z, XIE Y, LIU H S, *et al.* Wogonoside attenuates hypertension-induced renal injury through modulation of the MAPK signaling pathway: a mechanism study. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2025, 56(9): 41-50. doi: 10.12182/20250160103.
- [18] SHENG X, GUAN Y, MA Z, *et al.* Mapping the genetic architecture of human traits to cell types in the kidney identifies mechanisms of disease and potential treatments. *Nat Genet*, 2021, 53(9): 1322-1333. doi: 10.1038/s41588-021-00909-9.
- [19] SONG Y, BAI Z, ZHANG Y, *et al.* Protective effects of endothelial progenitor cell microvesicles on Ang II-induced rat kidney cell injury. *Mol Med Rep*, 2022, 25(1): 4. doi: 10.3892/mmr.2021.12520.
- [20] MEIJLES D N, CULL J J, MARKOU T, *et al.* Redox regulation of cardiac ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) controls p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase) and orchestrates cardiac remodeling to hypertension. *Hypertension*, 2020, 76(4): 1208-1218. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14556.
- [21] GUO M, ZHANG M, CAO X, *et al.* Notch4 mediates vascular remodeling via ERK/JNK/P38 MAPK signaling pathways in hypoxic pulmonary hypertension. *Respir Res*, 2022, 23(1): 6. doi: 10.1186/s12931-022-01927-9.

(2025-01-19收稿, 2025-07-16修回)

编辑 刘华



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*