

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.22.011

中药药物性急性肾损伤的网络毒理学及免疫机制研究

杨硕¹, 栾相佳^{2△}, 王连心^{1✉}

1. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京市东城区东直门内南小街16号, 100700; 2. 中国中医科学院广安门医院

[摘要] **目的** 挖掘导致药物性急性肾损伤(DI-AKI)的潜在中药成分/中药并分析其致DI-AKI的可能机制,进一步探索中药导致DI-AKI与免疫系统的相关性。**方法** 采用网络毒理学研究方法,通过DisGeNET、MalaCards、TTD、OMIM数据库收集DI-AKI相关靶点,再通过本草组鉴数据库、中国知网、万方数据知识服务平台、维普资讯中文期刊服务平台、PubMed进行中药导致DI-AKI成分筛选,选择口服生物利用度(OB)值 $\geq 20\%$ 的致DI-AKI中药成分,通过中药系统毒理学数据库筛选致DI-AKI的中药。使用Cytoscape v3.9.1构建DI-AKI靶点-中药成分-中药网络,计算该网络的拓扑属性得到关键的靶点、致DI-AKI中药成分及对应中药,对核心子网络靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析,并使用免疫浸润分析及孟德尔随机化分析探索中药导致的DI-AKI与免疫系统的相关性。**结果** 筛选出OB $\geq 20\%$ 的致DI-AKI中药成分22个,其中生物碱类成分最多有5个,其次为萜醌类和二萜类成分各3个。最终共收集到21味潜在的致DI-AKI中药,其中含马兜铃酸/马兜铃内酰胺类中药成分如朱砂莲、关木通、广防己、青木香等是导致DI-AKI的主要中药。TNF、TP53、IL6、HIF1A、BCL2等10个基因是DI-AKI发生发展过程中的枢纽基因。对核心子网络29个靶点GO功能富集发现上皮细胞增殖、凋亡信号通路的调控、血管生成、缺氧和氧化应激、血管生成等显著富集。KEGG通路中信号转导通路富集到了23个靶点和17条通路。免疫浸润分析结果显示,致DI-AKI中药与常规树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等呈正相关,而与CD4⁺初始T细胞、CD8⁺初始T细胞、未成熟的树突状细胞等呈负相关。孟德尔随机化分析结果显示,CD14⁺、CD16⁺单核细胞上的CD64可能成为急性肾损伤的危险因素,T细胞依赖性的CD4⁺T细胞上的抗原受体为急性肾损伤的保护因素。**结论** 通过网络毒理学研究逆向推导出了21个潜在的致DI-AKI中药,其机制可能与氧化应激、自噬、凋亡等激活免疫系统导致炎症反应密切相关。中药导致DI-AKI的免疫机制可能与常规树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞的升高和自然杀伤T细胞、辅助性T细胞等免疫细胞的下降有关,单核细胞与急性肾损伤也有因果关系。

[关键词] 药物性急性肾损伤; 中药; 网络毒理学; 免疫浸润分析; 孟德尔随机化

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)指短时间内肾功能的急剧下降,主要表现为体内代谢废物潴留、水、电解质和酸碱平衡紊乱等^[1]。AKI作为最常见的危重症,死亡风险高。在中国成人住院患者中,约40%的AKI是由药物导致的,即药物性急性肾损伤(drug-induced kidney injury, DI-AKI)^[2],

其中与中药相关的DI-AKI约占12.6%~16.2%^[3]。中药其成分复杂、炮制讲究、作用机制多样,且常配伍/联合应用,因此当服用中药汤剂/中成药后机体发生DI-AKI时往往难以准确判断是何种中药导致^[4]。研究指出,肾脏损伤可能与免疫系统有关^[5-6],但中药导致的DI-AKI与免疫系统的相关性还有待明确。本研究通过网络毒理学研究方法逆向推导导致DI-AKI的中药成分/中药,并探讨可能作用机制,通过免疫浸润分析及孟德尔随机化研究探索中药导致的DI-AKI与免疫系统的相关性,为中药安全性精准研究及药物警戒实践提供参考。

基金项目:国家重点研发计划(2022YFC3502004);国家自然科学基金(81973982);国家药品监督管理局药品监管科学体系建设重点项目(RS2024Z008)

✉ 通讯作者:wlxing@126.com

△同等贡献

1 资料与方法

1.1 DI-AKI靶点收集

通过 DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>)、MalaCards 数据库 (<https://www.malacards.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org/>) 4 个疾病数据库收集 DI-AKI 相关靶点, 关键词包括 “drug induced acute kidney injury” “acute kidney injury” “acute kidney tubular necrosis” “acute interstitial nephritis” 等, 将各个数据库收集到的靶点合并去重后得到 DI-AKI 相关靶点。检索日期为各数据库建库至 2023 年 11 月 22 日。

1.2 中药导致 DI-AKI 成分筛选

目前尚无导致 AKI 相关的中药数据库, 无法直接通过 DI-AKI 靶点收集对应的致 DI-AKI 中药成分, 因此通过以下步骤收集 DI-AKI 靶点对应的致 DI-AKI 中药成分。

1.2.1 DI-AKI 靶点对应的全部中药成分收集 通过本草组鉴数据库 (HERB, <http://herb.ac.cn/>) 收集 DI-AKI 靶点对应的中药成分。最终得到 DI-AKI 靶点对应的全部中药成分, 并通过 Excel v12.1.0 表格的形式整理全部中药成分的信息, 包括英文名称、英文同义词等。

1.2.2 导致肾脏损伤的中药成分收集 首先通过系统检索中文数据库包括中国知网 (CNKI)、万方数据知识服务平台 (Wanfang)、维普资讯中文期刊服务平台 (VIP), 英文数据库 PubMed 数据库, 检索日期为各数据库建库至 2023 年 11 月 22 日 (检索策略详见附表 1, 请扫描本文二维码获取)。

文献纳入标准: 报道了中药成分导致肾脏损伤且通过动物实验、细胞实验等体内外实验证实; 重复发表的文献仅纳入发表内容最全面的文献。

文献排除标准: 1) 通过网络药理学研究推断得出的导致肾脏损伤的中药成分; 2) 无法明确具体成分的中药复合成分; 3) 会议通知、新闻、科技成果类文献。根据纳入标准和排标准对检索得到的文献进一步筛选, 最后以 Excel v12.1.0 表格的形式整理文献中的导致肾脏损伤的中药成分, 包括英文名称、中文名称等。

1.2.3 DI-AKI 靶点对应的中药成分确定 将检索得到的导致肾脏损伤的中药成分与 DI-AKI 靶点对应的全部中药成分取交集, 从而得到 DI-AKI 靶点对应的致 DI-AKI 中药成分 (以下简称 “致 DI-AKI

中药成分”)。为进一步筛选易被人体吸收的致 DI-AKI 中药成分, 按照中药系统药理学数据库 (TCMSP) 的筛选标准, 选择口服生物利用度 (OB) 值 $\geq 20\%$ 的致 DI-AKI 中药成分进行下一步研究。

1.3 致 DI-AKI 中药收集

通过中药系统毒理学数据库 (TCMSTD, <https://www.bic.ac.cn/TCMSTD/>) 检索致 DI-AKI 中药成分, 纳入明确会导致肾脏损伤的中药作为潜在的致 DI-AKI 中药 (以下简称 “致 DI-AKI 中药”)。

1.4 DI-AKI 靶点-中药成分-中药网络构建及机制分析

使用 Cytoscape v3.9.1 构建 DI-AKI 靶点-中药成分-中药网络, 计算该网络的拓扑属性得到关键的靶点、致 DI-AKI 中药成分及对应中药。同时将与致 DI-AKI 中药相关的靶点导入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 进行蛋白质相互作用 (PPI) 分析, 使用 Cytoscape v3.9.1 进行可视化, 并利用插件 “CytoNCA” 计算该网络的拓扑属性, 利用插件 “cytoHubba” 获得枢纽基因, 利用 “MCODE” 获得该网络中紧密联系的子网络, 然后通过 “clusterProfiler” “org. Hs. eg. db” 及 “enrichplot” R 包对核心子网络靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 分析致 DI-AKI 中药导致 DI-AKI 的潜在机制。

1.5 免疫浸润分析

以 “drug induced acute kidney injury” 为关键词在 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 进行检索, 筛选出 DI-AKI 相关的基因芯片集并进行数据预处理。纳入的芯片集需要符合: 1) 数据类型为基于阵列或高通量测序获得的转录组数据; 2) 数据样本为人类组织, 包括从人体获得的组织样本或人肾 HK-2 细胞/人肾类器官等; 3) 数据分类为 DI-AKI 组与对照组 (健康人群)。

使用 “immunedeconv” R 包中 xCell 算法来估算基因芯片数据集中 DI-AKI 组和对照组的免疫细胞浸润程度, 使用 “ggpubr” R 包通过方差分析来比较 DI-AKI 组与对照组之间免疫细胞的差异, 当 $P < 0.05$ 时, 认为两组间免疫细胞存在显著性差异。基于致 DI-AKI 中药相关的靶点 (以下简称 “致 DI-AKI 中药靶点”), 从整理好的基因芯片集中获得这些靶点相关的基因表达数据, 得到致 DI-AKI 中药靶点表达矩阵文件。使用 “psych” R 包通过 Spearman 等级相关分析对致 DI-AKI 中药靶点表达矩阵与免疫细胞表达矩阵进行相关性分析,

相关系数 r 为正值时表示正相关, 负值为负相关, $|r|$ 越接近 1, 说明两者之间的相关关系越强, 当 $P < 0.05$ 时, 认为基因与免疫细胞/功能具有显著相关性。

1.6 孟德尔随机化分析

采用两样本双向孟德尔随机化分析来评估 731 个免疫细胞表型^[7]与 AKI 之间的因果关系, 其中 AKI 和免疫细胞表型的全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 数据均来自 IEU 数据库 (<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>)。选择合适的遗传变异即单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 作为工具变量, 其中将与免疫细胞表型显著相关的 SNP 阈值设定为 1×10^{-5} , 选择 $P < 1 \times 10^{-5}$ 的 SNP 作为工具变量; 使用软件 Plink v1.9 将参数设置为 $r^2 = 0.1$ 、 $kb = 500$ 去除连锁不平衡; 将与 AKI 显著相关的工具变量阈值设定为 1×10^{-5} , 纳入 $P > 1 \times 10^{-5}$ 的工具变量避免工具变量与结局强相关, 同时进行连锁不平衡检查并去除回文; 保留 F 统计量 > 10 的工具变量避免弱工具变量。

通过 “TwoSampleMR” 及 “MendelianRandomization” R 包采用逆方差加权法、加权中位数法、MR-Egger 回归、简单模型、加权模型等方法进行孟德尔随机化分析。使用 P 值来表示效应值的显著性水平, 当 $P < 0.05$ 时认为效应量具有显著水平; 使用比值比 OR 值及 95% 置信区间 (CI) 来表示暴露与结局之间的相关性, 当 $OR > 1$ 时表示暴露因素是结局的不利因素, 即疾病发生的概率会随着暴露因素的增强而增高, 当 $OR < 1$ 时则相反; 通过计算假发生率 (FDR) 来控制假阳性事件, 根据以往研究认为 $FDR < 0.2$ 时存在因果关系, $FDR < 0.05$ 时存在显著因果关系^[8]。使用 “phenoscanner” R 包去除混杂因素。使用 steiger 函数进行反向孟德尔随机化分析, 判断遗传变异是否仅通过暴露影响结局以及暴露是否对结局有方向性因果影响。

最后使用 Cochran's Q 统计量进行异质性检验, 当 $P < 0.05$ 时表示工具变量中存在异质性; 使用 MR-Egger 回归和 MR-PRESSO 进行水平多效性检验; 如果 MR-Egger 截距项显著即 $P < 0.05$ 则表明存在水平多效性, 需要重新选择工具变量, MR-PRESSO 可以剔除可能会严重影响因果关联的离群值, 如果剔除某一 SNP 后 $P < 0.05$ 则表明存在水平多效性。

2 结果

2.1 DI-AKI 相关靶点收集结果

通过数据库检索收集到 DI-AKI 相关靶点, DisGeNET 数据库 232 个, MalaCards 数据库 46 个, TTD 数据库 2 个, OMIM 数据库 0 个。将 4 个疾病数据库收集到的靶点合并去重后最终得到 255 个 DI-AKI 相关靶点 (详见附表 2, 请扫描本文二维码获取)。

2.2 DI-AKI 靶点对应的致 DI-AKI 中药成分分析结果

通过 HERB 对 255 个 DI-AKI 靶点检索后得到 6522 个中药成分。根据 CNKI、Wanfang、VIP、PubMed 文献检索策略, 得到与导致肾脏损伤中药成分相关的中文文献 611 篇, 英文文献 399 篇, 共计 1010 篇文献。将全部文献导入 NoteExpress v3.9.0 后合并去重, 得到 964 篇文献, 最终根据文献纳入和排除标准获得 55 篇文献, 收集到 55 个导致肾脏损伤的中药成分 (详见附表 3, 请扫描本文二维码获取)。

将 55 个导致肾脏损伤的中药成分与 DI-AKI 靶点对应的全部 6522 个中药成分取交集, 得到 32 个 DI-AKI 靶点对应的致 DI-AKI 中药成分 (详见附表 4), 其中 $OB \geq 20\%$ 的致 DI-AKI 中药成分有 22 个, 具体信息见表 1。对 22 个致 DI-AKI 中药成分进行分类, 结果显示 DI-AKI 靶点对应的致 DI-AKI 中药成分中生物碱类成分最多, 有 5 个中药成分, 其次为蒽醌类和二萜类成分各 3 个。

2.3 致 DI-AKI 中药分析结果

使用 TCMSTD 检索致 DI-AKI 中药成分, 查找对应中药, 最终共收集到 21 味中药, 分别是吴茱萸、大黄、何首乌、巴豆、山豆根、苦豆子、八角莲、雷公藤、斑蝥、闹羊花、穿心莲、艾叶、蛇床子、朱砂莲、关木通、广防己、青木香、独活、泽泻、防己、白果。通过中药成分与中药的对应关系发现, 马兜铃酸/马兜铃内酰胺类中药成分对应的中药最多, 因此含马兜铃酸/马兜铃内酰胺类中药成分如朱砂莲、关木通、广防己、青木香等是导致 DI-AKI 的主要中药, 其次是含蒽醌类的中药成分, 对应的中药有大黄和何首乌。

2.4 DI-AKI 靶点-中药成分-中药网络构建

以 DI-AKI 靶点、致 DI-AKI 中药成分及对应的中药为点, 以两两之间的相互作用为边, 使用 Cytoscape v3.9.1 构建 DI-AKI 靶点-中药成分-中药网络。255 个 DI-AKI 相关靶点中, 致 DI-AKI 中药

表 1 22 种致药物性急性肾损伤中药成分的分类、对应中药情况

Table 1 Classification of 22 drug-induced acute kidney injury Chinese herbal medicine components and their corresponding Chinese herbal medicines

序号	中药成分	分类	OB 值	对应中药	序号	中药成分	分类	OB 值	对应中药
1	吴茱萸碱	生物碱类	86.02	吴茱萸	12	吴茱萸次碱	生物碱类	40.30	吴茱萸
2	芦荟大黄素	蒽醌类	83.38	大黄、何首乌	13	桉叶素	单萜类	39.73	艾叶
3	巴豆醛	鞣酸类	64.99	巴豆	14	蛇床子素	香豆素类	38.75	蛇床子
4	苦参碱	生物碱类	63.77	山豆根、苦豆子	15	马兜铃酸 B	马兜铃酸类	37.56	朱砂莲、关木通、广防己、青木香
5	槐定碱	生物碱类	60.07	苦豆子	16	欧前胡素	香豆素类	34.55	蛇床子、独活
6	鬼臼毒素	木脂素类	59.94	八角莲	17	泽泻醇 C	三萜类	32.70	泽泻
7	雷公藤甲素	二萜类	51.29	雷公藤	18	粉防己碱	生物碱类	26.64	防己
8	斑蝥素	单萜类	51.23	斑蝥	19	马兜铃酸 A	马兜铃酸类	24.80	朱砂莲、关木通、广防己、青木香
9	大黄酸	蒽醌类	47.07	大黄、何首乌	20	大黄素	蒽醌类	24.40	大黄、何首乌
10	木藜芦毒素Ⅲ	二萜类	47.01	闹羊花	21	马兜铃内酰胺Ⅰ	马兜铃内酰胺类	24.15	朱砂莲、关木通、广防己
11	穿心莲内酯	二萜类	46.96	穿心莲	22	银杏酸	酚类	20.18	白果

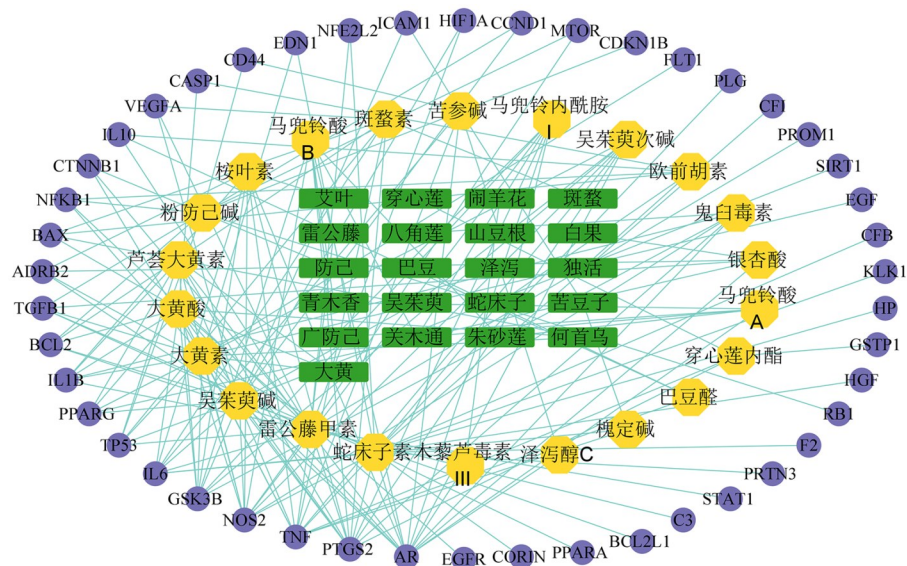
注：OB，口服生物利用度。

靶点有 46 个，见图 1。大多数致 DI-AKI 中药可能通过 AR、PTGS2、TNF、NOS2、GSK3B 等靶点导致 DI-AKI，蛇床子素、雷公藤甲素、吴茱萸碱、大黄素、大黄酸等可通过多个靶点导致 DI-AKI，大黄、何首乌、朱砂莲、关木通、广防己等中药引起 DI-AKI 的潜在风险很高。将 46 个致 DI-AKI 中药靶点导入 String 数据库进行 PPI 分析并使用 Cytoscape v3.9.1 进行可视化，同时计算该网络的拓扑属性并筛选枢纽基因及密切联系的子网络。TNF、TP53、IL6、HIF1A、BCL2、NFKB1、TGFB1、EGFR、

GSK3B、IL1B 这 10 个基因是 DI-AKI 的发生发展过程中的枢纽基因。共得到 3 个具有密切联系的子网络，其中子网络 1 包含了 29 个基因，涵盖了全部枢纽基因，故为核心子网络（见图 2），子网络 2 和子网络 3 各包含 3 个基因。

2.5 核心子网络靶点 GO 功能和 KEGG 通路富集分析结果

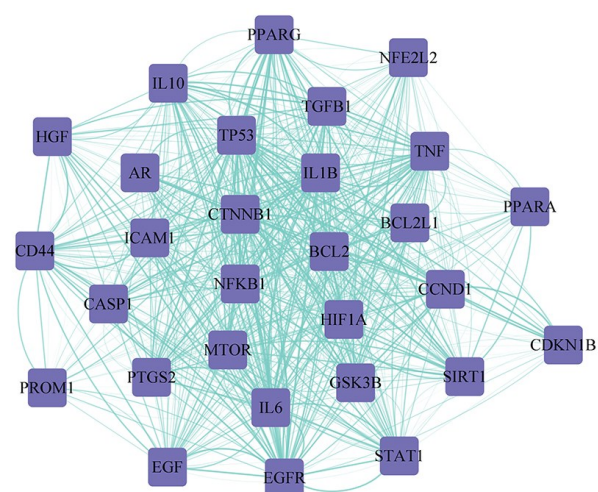
对核心子网络包含的 29 个靶点进一步研究，使用“clusterProfiler”R 包进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。根据富集的靶点数目由大到小展示



注：药物性急性肾损伤靶点-中药成分-中药网络，紫色表示靶点，黄色表示中药成分，绿色表示中药，其中靶点、中药成分、中药均按照度值以顺时针降序排列，起点分别为 AR、蛇床子素、大黄。

图 1 药物性急性肾损伤靶点-中药成分-中药网络图

Figure 1 Construction of drug-induced acute kidney injury target-Chinese herbal medicine component-Chinese herbal medicine network



注：线条越粗、颜色越深代表该基因与其他基因之间的相互作用越多。

图2 药物性急性肾损伤靶点核心子网络图
 Figure 2 Target core subnetwork of drug-induced acute kidney injury

GO 功能富集中前 20 条生物过程（详见附表 5，请扫描本文二维码获取），发现上皮细胞增殖、凋亡信号通路的调控、血管生成、缺氧和氧化应激、血管生成等显著富集。KEGG 通路富集分析共得到 137 条通路，将 137 条通路按照 KEGG 通路数据库中的分类标准进行分类并详细分析信号转导通路和免疫系统通路富集情况，其中信号转导通路富集到了 23 个靶点和 17 条通路（详见附表 6，请扫描本文二维码获取），包括 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、JAK-STAT 信号通路、FoxO 信号通路、NF-κB 信号通路等（按照 *P* 值由低到高排序，下同）；免疫系统富集到了 15 个靶点和 14 条通路（详见附表 7，请扫描本文二维码获取），包括 C 型凝集素受体信号通路、Th17 细胞分化、NOD 样受体信号通路、IL-17 信号通路、Toll 样受体信号通路等。

2.6 免疫浸润分析结果

2.6.1 数据来源及预处理 以“drug induced acute kidney injury”为检索词，在 GEO 数据库中进行检索和筛选，最终得到 DI-AKI 相关的基因芯片集 GSE145085^[9]。该基因芯片集为高通量测序数据，包括 4 例 DI-AKI 组（顺铂诱导）和 4 例对照组，数据类型为人肾脏类器官。通过对该基因芯片集进行数据清理、探针 ID 和基因名称转换、数据标准化等预处理，最终获得基因芯片数据集。从基因芯片数据集中获得 46 个致 DI-AKI 中药靶点相关的基因表达情况，得到致 DI-AKI 中药靶点的表达矩阵文件。

2.6.2 两组间免疫细胞浸润程度及差异性分析 通过 xCell 算法估算 64 种免疫细胞在 DI-AKI 组和对照组中的浸润程度，由图 3 可知，巨噬细胞、M2 型巨噬细胞等免疫细胞和上皮细胞、系膜细胞等肾脏相关细胞在 DI-AKI 组中的浸润程度远高于对照组；而自然杀伤 T 细胞、2 型辅助性 T 细胞等免疫细胞远低于对照组。进一步比较两组间免疫细胞的差异性。由图 4 可知，与对照组相比，DI-AKI 组中常规树突状细胞、上皮细胞、巨噬细胞、M1 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞、系膜细胞、中性粒细胞等显著升高；而 CD4⁺ 初始 T 细胞、CD8⁺ 初始 T 细胞、不成熟的树突状细胞、自然杀伤 T 细胞、γδ T 细胞、1 型辅助性 T 细胞、2 型辅助性 T 细胞等显著下降。

2.6.3 致 DI-AKI 中药靶点与免疫细胞的相关性分析 基于筛选出的 DI-AKI 组和对照组具有显著差异的免疫细胞，对致 DI-AKI 中药靶点与具有显著差异的免疫细胞进行相关性分析。由图 5 可知，从整体来看，致 DI-AKI 中药与常规树突状细胞、巨噬细胞（包括 M1 型和 M2 型）、中性粒细胞、共同淋巴祖细胞、上皮细胞呈正相关，而与 CD4⁺ 初始 T 细胞、CD8⁺ 初始 T 细胞、未成熟的树突状细胞、自然杀伤 T 细胞、辅助性 T 细胞呈负相关。

2.7 孟德尔随机化分析结果

2.7.1 工具变量筛选 严格遵守工具变量筛选流程，最终 731 个免疫细胞表型共得到 7509 个 SNP，*F* 值均大于 10（20.32~99.13）。

2.7.2 免疫细胞表型与 AKI 之间的因果关系 以逆方差加权法（IVW）法作为主要分析方法分析免疫细胞表型对 AKI 的因果影响，有 58 个免疫细胞表型与 AKI 有显著因果影响（*P* < 0.05），经过 FDR 校正后（FDR < 0.2），有 2 个免疫细胞表型与 AKI 有显著因果影响，具体见图 6。其中 CD14⁺ CD16⁺ 单核细胞上的 CD64，作为一种特殊的单核细胞亚群，可以同时表达 CD14、CD16 和 CD64，因而具有特殊的免疫功能和活化状态，成为 AKI 的危险因素；T 细胞依赖性的 CD4⁺ T 细胞上的抗原受体，其具有抗原受体，能够识别特定的抗原，并在适当的刺激下被激活，从而参与免疫反应，成为 AKI 的保护因素。通过 steiger 函数分析免疫细胞表型与 AKI 之间的反向因果关系，尚未发现免疫细胞表型对 AKI 的反向因果关系。

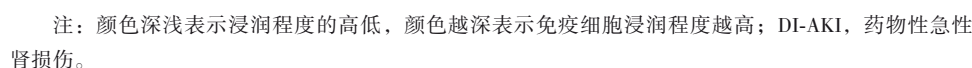
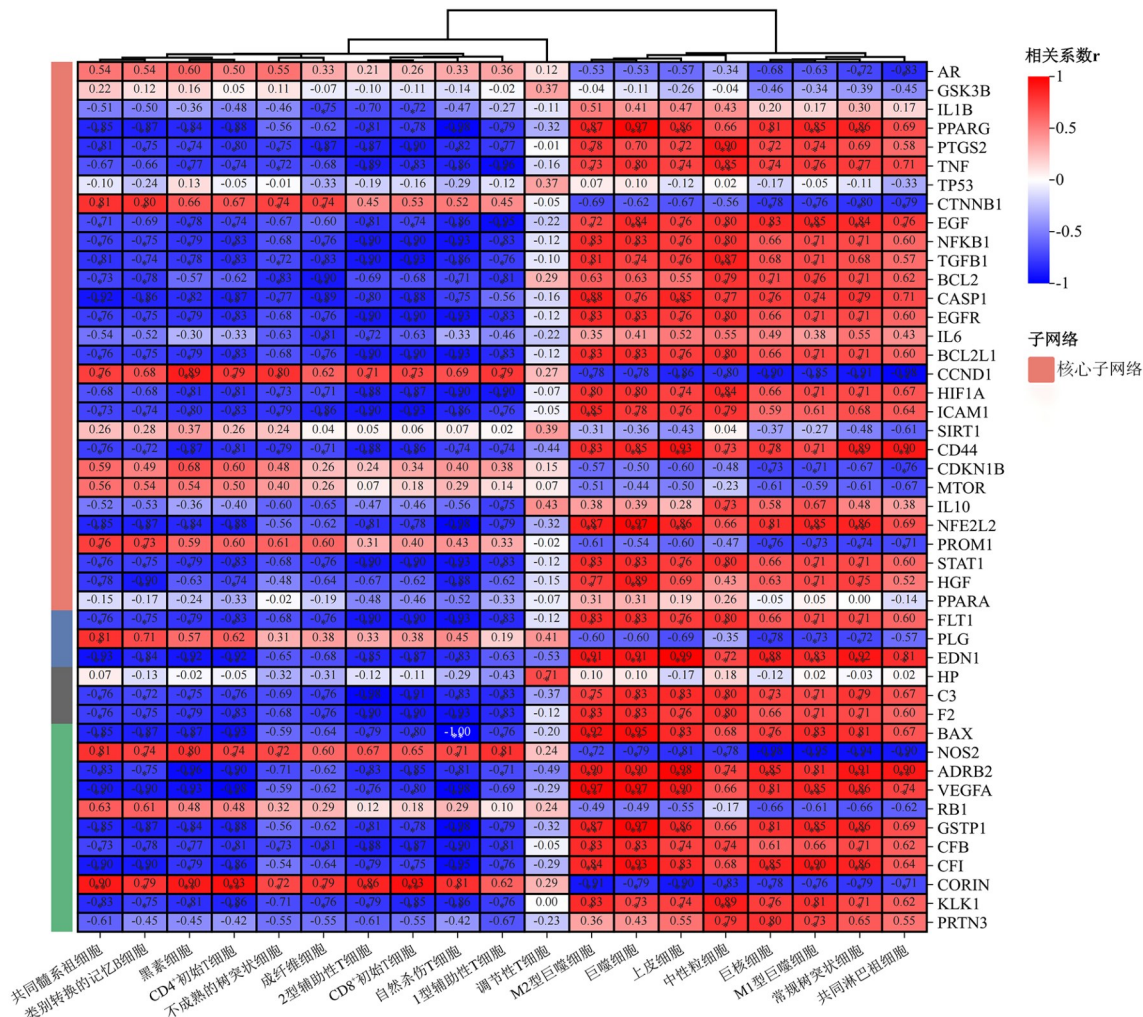


Figure 3 Heat map of the degree of immune cell infiltration in the DI-AKI and control groups in drug-induced acute kidney injury-related gene chip set GSE145085 and immune cells

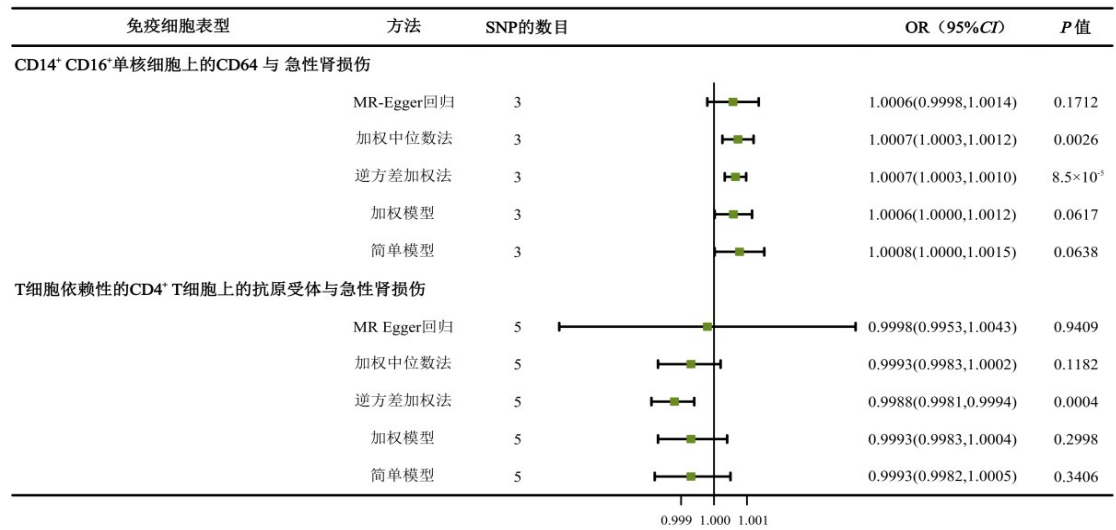


Figure 4 Box line plot of differential analysis of immune cells in DI-AKI and control groups in drug-induced acute kidney injury-related gene chip set GSE145085 and immune cells



注：相关性系数 r 表示药物性急性肾损伤中药靶点与免疫细胞之间的相关性，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。
图5 药物性急性肾损伤相关的基因芯片集GSE145085中具有显著差异中药靶点表达矩阵与免疫细胞表达矩阵的相关性分析图

Figure 5 Correlation analysis chart of Chinese herbal medicine target expression matrix with significantly difference in drug-induced acute kidney injury-related gene chip set GSE145085 and immune cells



注：SNP，单核苷酸多态性。
图6 来源于IEU数据库的731个免疫细胞表型与急性肾损伤的孟德尔随机化分析结果森林图

Figure 6 Results of Mendelian randomisation analysis of 731 immune cell phenotypes with acute kidney injury from IEU database

3 讨论

《黄帝内经》首次提出药物之毒和毒药的概念,《神农本草经》将中药划分为上、中、下三品并提出十八反、十九畏的配伍禁忌,《雷公炮炙论》指明炮制可以使中药增效减毒等等,无不体现了古代医者对中药毒性的认识与理解^[10]。中药毒性有广义和狭义之分,其中广义指药物的偏性,是用以阐明药物奏效机制的理论依据;狭义则单指有毒药物对机体的伤害性^[11]。目前通行的中药毒性分级方法以《中华人民共和国药典》^[12]为主,采用大毒、有毒、小毒三级分类方法。

近年来中药的安全性研究尤其是对心、肝、肾等重要脏器的损伤受到广泛关注。有研究通过对 AKI 患者的回顾性分析发现,中草药/中药汤剂/中成药是导致 DI-AKI 的一大类别^[2-3]。中药往往通过君、臣、佐、使的组方配伍针对患者疾病进行辨证论治,因此 DI-AKI 发生时,无法明确是由哪味中药或哪几味中药相互作用导致的,这使得研究中药与 DI-AKI 的关系具有一定难度。本研究通过网络毒理学研究逆向推导出 22 个致 DI-AKI 中药成分及对应的 21 味中药有导致 DI-AKI 的潜在风险。生物碱类中药成分对应的致 DI-AKI 中药中,除吴茱萸^[13]外,其他中药均可导致明显的肾脏损伤^[14-16],临床使用时要谨慎。既往有临床报道服用含蒽醌类成分的中草药导致 DI-AKI 的病例^[17],大黄和何首乌作为含蒽醌类成分的中药^[18-19],已有基础实验证明两者会引起 HK-2 细胞毒性导致肾脏损伤^[20-21],但是目前临床上大黄及其制剂也常用于治疗 AKI^[22];何首乌制剂的不良反应以药物性肝损伤^[23]为主,尚无导致 AKI 的报道,还需要进一步研究。二萜类中药成分对应的致 DI-AKI 中药中,雷公藤制剂已将急性肾功能衰竭这一不良反应纳入说明书中^[24],穿心莲制剂中莲必治注射液常导致 AKI,国家药品监督管理局已发布注销莲必治注射液药品注册证书的公告^[25],临床使用时应密切监测。此外,马兜铃酸 A、马兜铃酸 B 及马兜铃内酰胺 I 对应的中药关木通、青木香、广防己、朱砂莲引起的“马兜铃肾病”已被广泛熟知^[26]。马兜铃肾病患者个体差异较大,与使用疗程、剂量无明显关系,且进展迅速,停止用药后病情依然不能缓解^[27],临床使用时需密切监测患者肾功能。致 DI-AKI 中药引起的肾脏损伤通常表现为肾小管的损害,大多数致 DI-AKI 中药成分对肾脏的损害与剂量、疗程明显

有关,这与既往文献研究^[28]一致,提示临床医师在使用这些致 DI-AKI 中药时要密切关注由于剂量过大或疗程过长导致的 AKI。此外,上述致 DI-AKI 中药中临床未出现 AKI 报道者也需要密切监测,进行药物警戒,具体可参照《中成药药物警戒指南》^[29]及《医疗机构中药药物警戒体系建设指南》^[30]。

导致 DI-AKI 潜在风险中药的免疫机制研究结果中 GO 功能、KEGG 通路富集结果表明,氧化应激、炎症因子、自噬、凋亡、免疫反应与 AKI 的发生密切相关。致 DI-AKI 中药成分进入体内后,可能与肾脏细胞内的分子相互作用,产生大量的活性氧,这些自由基超出肾脏细胞的抗氧化能力后使得细胞内氧化还原平衡失调,进而引发氧化应激^[31-32]。线粒体是氧化应激的靶点,线粒体损伤后膜通透性变化、线粒体肿胀,使得肾小管坏死和活性氧进一步释放。此外氧化应激还诱导免疫细胞释放大量的炎症因子导致局部炎症反应,同时这些炎症因子还可以激活肾脏中的免疫细胞,加重氧化应激,影响细胞自噬,进一步导致肾小管细胞坏死或凋亡从而加速 AKI^[6, 31-35]。

肾小管上皮的损害是肾脏功能下降程度的关键指标^[5]。研究表明,由程序性死亡、凋亡等导致的肾小管上皮坏死是 AKI 的起始事件,肾小管上皮细胞和免疫系统的固有反应和适应性反应参与了 AKI 的发病机制^[6]。免疫浸润分析表明,中性粒细胞、树突状细胞、巨噬细胞(包括 M1 和 M2 型)等免疫细胞显著浸润,说明在 DI-AKI 情况下,这些免疫细胞会被激活释放炎症因子导致炎症反应;图 5 显示,致 DI-AKI 中药与这些免疫细胞呈正相关,说明致 DI-AKI 中药的暴露可以使这些免疫细胞激活/增加,从而导致 AKI。相反地,自然杀伤 T 细胞和辅助性 T 细胞浸润程度显著低于对照组。自然杀伤 T 细胞是一类特殊的淋巴细胞群,自然杀伤 T 细胞的减少会加重肾脏损伤^[36],CD4⁺ T 细胞可分化为 1 型辅助性 T 细胞和 2 型辅助性 T 细胞,1 型辅助性 T 细胞会产生肿瘤坏死因子等炎症因子,而 2 型辅助性 T 细胞会产生抗炎因子^[37]。图 5 结果显示,致 DI-AKI 中药的暴露可以使这些免疫细胞抑制/减少,其具体机制还需要进一步研究。通过孟德尔随机化分析进一步明确了单核细胞的暴露会增加 AKI 发生的风险,而辅助性 T 细胞的暴露会降低 AKI 发生的风险,推断致 DI-AKI 中药成分可能通过与巨噬细胞、中性粒细胞表面的 CD14、CD16 抗原

受体结合从而激活巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞,引发一系列的免疫炎症反应,但还需要实验验证该推断。

综上,本研究通过网络毒理学研究逆向推导出了 21 个潜在的致 DI-AKI 中药,致 DI-AKI 中药导致肾脏损伤的机制可能与氧化应激、自噬、凋亡等激活免疫系统导致炎症反应密切相关;基于免疫浸润分析明确了中药导致 DI-AKI 的免疫机制可能与常规树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞的升高和自然杀伤 T 细胞、辅助性 T 细胞(包括 1 型和 2 型)等免疫细胞的下降有关;基于孟德尔随机化明确了单核细胞与 AKI 的因果关系,为致 DI-AKI 中药导致肾脏损伤的免疫机制研究提供了理论支撑。但由于目前尚无导致肾脏损伤相关的中药数据库,无法直接通过 DI-AKI 靶点收集对应的致 DI-AKI 中药成分,不可避免会损失一些潜在的致 DI-AKI 中药成分,未来还需要在致 DI-AKI 中药成分不断确证的基础上进一步更新结论。此外,本研究采用 GEO 数据库中顺铂导致的 DI-AKI 基因芯片数据集,由于尚无中药相关的 DI-AKI 数据且样本量有限,研究结果可能存在一定的局限性和不确定性,未来需要进行中药相关的 DI-AKI 的实验并通过高通量测序获得基因表达数据以进一步验证该结论。

参考文献

- [1] 国家慢性肾病临床医学研究中心,中国医师协会肾脏内科医师分会,中国急性肾损伤临床实践指南专家组. 中国急性肾损伤临床实践指南[J]. 中华医学杂志, 2023, 103(42): 3332-3366.
- [2] XU X, NIE S, LIU Z, et al. Epidemiology and clinical correlates of AKI in Chinese hospitalized adults[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2015, 10(9): 1510-1518.
- [3] 王俊锋. 2007—2014 年我国药物性急性肾损伤文献调查与分析[J]. 临床误诊误治, 2014, 27(10): 54-57.
- [4] 胡欣燕,李璐,郭桂明. 高警示中药品种的安全性分析和归纳[J]. 中国初级卫生保健, 2021, 35(5): 6-8.
- [5] KUMAR S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury[J]. Kidney Int, 2018, 93(1): 27-40.
- [6] RADI ZA. Immunopathogenesis of acute kidney injury[J]. Toxicol Pathol, 2018, 46(8): 930-943.
- [7] ORRÙ V, STERI M, SIDORE C, et al. Complex genetic signatures in immune cells underlie autoimmunity and inform therapy[J]. Nat Genet, 2020, 52(10): 1036-1045.
- [8] HAO X, REN C, ZHOU H, et al. Association between circulating immune cells and the risk of prostate cancer: a mendelian randomization study[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2024, 15: 1358416. doi: 10.3389/fendo.2024.1358416.
- [9] DIGBY JLM, VANICHAPOL T, PRZEPIORSKI A, et al. Evaluation of cisplatin-induced injury in human kidney organoids[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020, 318(4): F971-F978.
- [10] 商海涛,庞欣欣,张晴晴,等. 中草药致肾损伤及其相关成分毒性机制研究进展[J]. 医药导报, 2021, 40(9): 1210-1215.
- [11] 周祯祥,吴庆光. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2023: 28-30.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [13] 黄伟,赵燕,孙蓉. 吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性试验比较研究[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(3): 129-134.
- [14] 蔡浙毅,周锦明,葛缘仁. 中药木通、防己、益母草对肾功能和肾组织形态影响的实验研究[C]//中国中西医结合学会. 全国第七届农村基层中西医结合学术暨工作交流会议论文集. 上海:中国中西医结合学会, 2002: 6.
- [15] 何倩倩,刘畅,权伟,等. 基于网络毒理学和实验验证探讨山豆根致大鼠肾毒性机制[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(4): 766-773.
- [16] 刘学楠,贾娅倩,华永丽,等. 苦豆子不同提取物对小鼠急性毒性的“谱-毒”关系研究[J]. 中草药, 2019, 50(11): 2656-2664.
- [17] 陶明宝,张乐,刘飞,等. 含蒽醌类成分中药的安全性研究进展[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 238-243.
- [18] 王玉,杨雪,夏鹏飞,等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4821-4837.
- [19] 王浩,杨健,周良云,等. 何首乌化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 192-205.
- [20] 兰洁,文海若,黄芝瑛,等. 何首乌蒽醌类单体成分致 HK-2 细胞毒性研究[J]. 中国药物警戒, 2023, 20(6): 616-622, 628.
- [21] 任历,曾滨阳,张诗缙,等. 大黄总蒽醌对人肾小管上皮细胞毒性作用及相关机制研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 79-83.
- [22] 谢顺岚. 大黄制剂联合参麦注射液治疗脓毒血症合并急性肾功能损伤 32 例[J]. 西部中医药, 2019, 32

- (12): 67-70.
- [23]牛晓强. 何首乌及其制剂相关药物性肝损伤临床分析[J]. 海峡药学, 2022, 34(1): 181-183.
- [24]马庆峰, 曾涛. 雷公藤中成药制剂说明书修订要求[J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(6): 19.
- [25]王丽丽, 赵汉毅, 王小荣, 等. 莲必治注射液致急性肾损害 3 例病例报道[J]. 中国当代医药, 2019, 26(33): 195-197.
- [26]鲜中. 常用马兜铃科中药中代表性马兜铃酸(AA-I, AA-IVa)的肾毒性差异及其机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2023.
- [27]史文慧, 王艳梅, 蒋黎, 等. 111 例马兜铃酸肾病调查分析[J]. 药学实践与服务, 2024, 42(1): 38-42.
- [28]沈义兰, 汪年松, 桂定坤. 植物药相关急性肾损伤的研究进展[J]. 世界临床药物, 2021, 42(10): 819-828.
- [29]王连心, 王萌萌, 黎元元, 等. 中成药药物警戒指南[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(16): 4261-4265.
- [30]刘福梅, 张力, 黎元元, 等. 医疗机构中药药物警戒体系建设指南[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(16): 4266-4272.
- [31]HOSOHATA K. Role of oxidative stress in drug-induced kidney injury[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11): 1826.
- [32]SURESHBABU A, RYTER SW, CHOI ME. Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury[J]. Redox Biol, 2015, 4: 208-214. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.001.
- [33]WANG Y, ZHANG H, CHEN Q, et al. TNF- α /HMGB1 inflammation signalling pathway regulates pyroptosis during liver failure and acute kidney injury[J]. Cell Prolif, 2020, 53(6): e12829.
- [34]KURTS C, PANZER U, ANDERS HJ, et al. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(10): 738-753.
- [35]TÁBARA LC, POVEDA J, MARTIN-CLEARY C, et al. Mitochondria-targeted therapies for acute kidney injury[J]. Expert Rev Mol Med, 2014, 16: e13. doi: 10.1017/erm.2014.14.
- [36]YANG SH, LEE JP, JANG HR, et al. Sulfatide-reactive natural killer T cells abrogate ischemia-reperfusion injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(7): 1305-1314.
- [37]GHARAIE FATHABAD S, KURZHAGEN JT, SADASI-VAM M, et al. T lymphocytes in acute kidney injury and repair[J]. Semin Nephrol, 2020, 40(2): 114-125.

Studies on the Network Toxicology and Immunological Mechanism of Chinese Herbal Medicine-Induced Acute Kidney Injury

YANG Shuo¹, LUAN Xiangjia², WANG Lianxin¹

1. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing, 100700; 2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science

ABSTRACT Objective To explore potential herbal components/Chinese herbal medicines (CHM) leading to drug-induced acute kidney injury (DI-AKI) and analyse the possible mechanisms of DI-AKI, and to further explore the correlation between DI-AKI caused by Chinese herbal medicines and the immune system. **Methods** Using network toxicology research methods, DI-AKI-related targets were collected through DisGeNET, MalaCards, TTD, and OMIM databases, and then screened CHM components that caused DI-AKI through HERB database, China National Knowledge Infrastructure (CNKI), Wanfang Data Knowledge Service Platform, Wikipedia Chinese Journal Service Platform, and PubMed, selected with an oral bioavailability (OB) value $\geq 20\%$, and screened CHM caused DI-AKI through traditional Chinese medicine system toxicology database. Cytoscape v3.9.1 was used to construct a DI-AKI target-CHM component-CHM network, and the topological properties of the network were calculated to obtain the key targets, DI-AKI-causing CHM components and the corresponding CHM, and the core sub-network targets were subjected to GO function and KEGG pathway enrichment analyses were conducted. The correlation between DI-AKI caused by CHM and the immune system was also explored using immune infiltration analysis and Mendelian randomisation analysis. **Results** There are 22 CHM components causing DI-AKI with OB $\geq 20\%$ were identified, among which alkaloids are the most abundant contained in 5 CHM components, followed by anthraquinones and diterpenes contained in 3 CHM components each. A total of 21 CHMs causing DI-AKI were finally collected, among which CHMs

containing components of aristolochic acid/aristolactam such as Zhusha (*Cinnabaris*), Guanmutong (*Isotrema manshuriense*), Guangfangji (*Isotrema fangchi*) and Qingmuxiang (*Inula helenium L.*) were the main CHMs leading to DI-AKI. Ten genes including TNF, TP53, IL6, HIF1A, and BCL2 were the pivotal genes in the development of DI-AKI. GO functional enrichment of 29 targets in the core sub-network revealed significant enrichment in epithelial cell proliferation, regulation of apoptotic signalling pathways, angiogenesis, hypoxia and oxidative stress, and angiogenesis. Signal transduction pathways in the KEGG pathway were enriched to 23 targets and 17 pathways. The results of immune infiltration analysis showed that CHMs causing DI-AKI were positively correlated with conventional dendritic cells, macrophages, and neutrophils, and negatively correlated with CD4⁺ initial T cells, CD8⁺ initial T cells, and immature dendritic cells. Mendelian randomisation analysis showed that CD64 on CD14⁺ and CD16⁺ monocytes may be a risk factor for acute kidney injury, and T-cell-dependent antigen receptor on CD4⁺ T cells is a protective factor for acute kidney injury. **Conclusion** Network toxicology studies identified 21 potential CHMs associated with DI-AKI, suggesting that their mechanisms may be closely linked to immune system activation through oxidative stress, autophagy, and apoptosis, which lead to inflammatory responses. The immune mechanism of DI-AKI induced by CHMs may involve elevated levels of immune cells, such as conventional dendritic cells, macrophages, and neutrophils, alongside a decline in natural killer T cells, helper T cells (types I and II), and monocytes, which have shown a causal relationship with acute kidney injury. The study provides a theoretical support for the study of CHM causing DI-AKI and also offers references for the CHM safety precise study and pharmacovigilance.

Keywords drug-induced acute kidney injury; Chinese herbal medicine; network toxicology; immunoinfiltration analysis; Mendelian randomization

(收稿日期: 2024-06-19; 修回日期: 2024-09-15)

[编辑: 邓媛]

广告

欢迎订阅 2024 年《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R)是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 中医药科技期刊分级目录 T1 级期刊。荣获第五届中国出版政府奖期刊奖, 第二届、第三届、第四届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、循证中医药、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 40.00 元, 全年 960 元。国内读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632, 010-64089195。国外发行: 中国国际图书贸易集团有限公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: SM140)。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。

网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

