

石斛碱通过上调 HSP90AA1 调节免疫细胞干预糖尿病肾病

姜运会¹, 唐传铁², 李 军¹, 张楠楠¹

(¹ 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025; ² 邹城市人民医院中医科, 济宁 273500)

摘要 目的 运用网络药理学、生物信息学和 Western blot 探究石斛碱通过干预免疫治疗糖尿病肾病的作用机制。方法 通过 Pharmmaper、Superpred 等数据库筛选石斛碱的靶点, 从 GeneCards、OMIM 等数据库筛选糖尿病肾病的疾病靶点, 在 Immport、InnateDB 等数据库中检索免疫相关靶点, 韦恩图获取上述三者之间的交集; STRING 软件结合 Cytoscape 软件构建交集靶点的 PPI 图, 使用 CytoHubba 插件挖掘互作网络中的核心靶点; 从 GEO 获取数据集 GSE142025, 使用 R 语言 CIBERSORT 包进行免疫浸润和 WGCNA 分析; 使用 GSE1009、GSE30122 和 GSE142025 进行基因差异表达分析和 ROC 验证, 将关键靶点与免疫细胞表型进行相关性分析, 并进行分子对接和分子动力学模拟分析; 使用 HK-2 细胞进行 Western blot 实验检测 HSP90AA1 的表达。结果 共得到 HSP90AA1、LCK、EGFR 等 128 个交集基因, 核心靶点涉及 HSP90AA1、LCK 和 STAT3; 分子对接及分子动力学模拟分析显示 HSP90AA1 的蛋白可以与石斛碱进行良好的结合; Western blot 实验表明: 与对照组相比, 高糖组中 HSP90AA1 显著下调; 与高糖组相比, 给药组中 HSP90AA1 显著上调。结论 石斛碱可以通过调节 HSP90AA1 的表达从而干预糖尿病肾病。

关键词 石斛碱; 糖尿病肾病; HSP90AA1; 免疫细胞; 网络药理学; 生物信息学; 靶点

中图分类号 R 285

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1599-11

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.015

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病常见的微血管并发症, 约 20%~40% 的糖尿病患者伴有 DKD, 最终发展为终末期肾病, 具有患病率高、病死率高、治疗费用高, 但对其认识程度低, 有效防治率低等特点^[1-2]。临床推荐 DKD 的治疗策略为: 降血糖、控血压、调血脂以及营养、运动等生活方式的干预^[3-4]。但这些策略大多数都难以延缓 DKD 的进展以及终止 DKD 的发生。缺乏有效的治疗靶点及药物是目前 DKD 临床面临的最主要问题^[5]。DKD 过去一直被视为是一种非炎症性肾小球疾病, 主要是长期暴露于高血糖引起的代谢和血流动力学变化而引起, 但现有的科学证据表明炎症被认为是 DKD 发生和发展的主要现象^[6], 免疫炎症反应在 DKD 的发生和发展中起着至关重要的作用^[7-8]。

中医药具有多成分、多靶点、多途径等特点。很

多中药可用于治疗 DKD, 明显降低蛋白尿水平^[9], 在临床实践中有着广泛应用^[10]。石斛碱(dendrobine, Den)是一种主要存在于药用铁皮石斛中的倍半萜生物碱, 被认为具有调节血糖和血压的能力^[11], 目前关于石斛碱调节免疫干预 DKD 的文献尚未见报道。因此, 该研究将探讨石斛碱、免疫与 DKD 三者之间的关系, 以期为 DKD 的治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HK-2 细胞株(USA, 美国典型培养物保藏中心), 200 U/ml 青霉素和 200 μ g/ml 链霉素(China, Solarbio)的 DMEM 培养基(USA, Hyclone)中; β -actin (PTM-5028)和一抗(HSP90AA1 PTM-5409)购自杭州景杰生物科技有限公司; 二抗(PAB37816, Bioswamp Life Science Lab); 显影剂(WBKLS0100, Merck Millipore); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(P1200-2, 北京索莱宝科技有限公司); 免疫蛋白印迹检测分析系统(型号: BIO-RAD Chemidoc Touch, 美国 Bio-Rad 公司); 倒置荧光显微镜(Olympus IX71, 日本 Olympus 公司)。

1.2 细胞分组及处理 HK-2 细胞株存放在含 10% 胎牛血清(USA, Gibco)、200 U/ml 青霉素和

2024-08-25 接收

基金项目: 贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目[编号: 贵中医大创合字(2023)30号]; 2023 年贵州省国家级大学生创新创业训练计划项目(编号: 202310662125); 贵州省科技计划项目(编号: 黔科合基础-ZK[2023]一般 428); 贵州中医药大学博士启动基金(编号: [2021]10号)

作者简介: 姜运会, 女, 本科生;

张楠楠, 女, 博士, 讲师, 通信作者, E-mail: doczn@sina.com

200 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 DMEM 培养基中。将 HK-2 细胞分为正常组、高糖组、给药组(分为低剂量、中剂量和高剂量)。使用低糖 DMEM 培养基培养,当细胞汇合度达到约 50% 时,加入 D-葡萄糖至终浓度为 40 mmol/L 建立模型组,1 h 后用不同浓度石斛碱干预(低剂量组:0.1 $\mu\text{mol/L}$;中剂量组:1.0 $\mu\text{mol/L}$;高剂量组:10.0 $\mu\text{mol/L}$),直至细胞长满,然后收集细胞用于 Western blot 实验检测 HSP90AA1 的表达。

1.3 Western blot 实验 收集以上实验的培养皿,弃去培养基,用预冷的 PBS 洗涤,加入含 PMSF 的细胞裂解液 150 μl 反复吹打,在冰上裂解 30 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液得到细胞总蛋白,用 BCA 定量试剂盒定量后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,用专用封闭液封闭 PVDF 膜,一抗孵育,一抗稀释比例 1:1 000,洗涤膜,二抗孵育,二抗稀释比例 1:8 000,洗涤膜,最后 ECL 显影,于化学发光成像分析仪中曝光。

1.4 DKD 相关靶点的获取 借助 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 和 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 4 个数据库,其中 GeneCards 以“Relavent score > 10”为筛选条件,4 个数据库均以“Diabetic Kidney Disease”为关键词检索 DKD 的疾病靶点。

1.5 石斛碱靶点的获取 利用 Pharmmapper (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>)、Superpred (<https://prediction.charite.de/>)、ChemMapper (<http://lilab-ecust.cn/chemmapper/help.html>)、BATMAN-TCN (<http://chemblhttp://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/index.php>) 和 SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>) 5 个在线数据库,以 Dendrobine 为关键词进行石斛碱靶点的检索,借助于 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库进行石斛碱靶点转换。

1.6 免疫基因的获取 利用 Import (<https://www.import.org/home>)、InnateDB (<https://innat-edb.com/>) 和 TISIDB (<http://cis.hku.hk/TISIDB/>) 3 个在线数据库获取免疫基因。

1.7 石斛碱-DKD-免疫交集靶点获取及构建 PPI 图和 Hub genes 筛选 利用 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 和 Cytoscape 3.9.1 软件对交集基因进行 PPI 分析,并利用 cytoHubba 插件进行 Hub genes 的筛选。

1.8 DKD 数据集的筛选 借助 NCBI 平台下的基

因表达综合数据库 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 以“Diabetic Kidney Disease”为关键词,人种限定为智人,样本为肾脏组织,共获取 3 个数据集,即 GSE142025、GSE1009 和 GSE30122。

1.9 免疫浸润和加权基因共表达网络分析 使用 R 语言的 CIBERSORT 包对 GSE142025 进行免疫浸润分析,将免疫浸润分析得到的具有显著差异的模块 ($P < 0.05$) 进行加权基因共表达网络分析 (WGCNA, Weighted correlation network analysis)。

1.10 关键基因的鉴定和验证 利用数据集 GSE142025、GSE1009 和 GSE30122,使用 GraphPad Prism 9 软件和微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 在线工具分析 Hub genes 在该数据集的差异表达和 ROC 曲线验证。

1.11 临床相关性分析 使用 Nephroseq v5 (<http://v5.nephroseq.org/>) 在线数据库对 3 个关键靶点进行临床相关性分析,以评估免疫相关基因与 DKD 的临床指标相关性。其中数值以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示,并且 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。再使用微生信在线工具 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化。

1.12 生存预后分析 利用肾脏疾病的预后标志物数据库 dbPKD (<http://115.28.66.83/dn/index.php>) 用于验证 DKD 的预后价值,选择了网站的默认参数。

1.13 关键基因与免疫细胞表型的相关性分析 将 1.9 项得到的具有显著意义的免疫细胞表型与上述 3 个关键基因利用 GraphPad Prism 9.4.1 软件进行相关性分析,初步判定关键基因和各种免疫细胞表型之间的相关性。

1.14 分子对接 将关键基因与石斛碱进行分子对接。根据 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>) 和 Uniprot 数据库中检索出关键基因所编码的蛋白的 3D 结构,与此同时利用 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 数据库以获取活性化合物的小分子结构,导入到 DS BIOVIA Discovery Studio 2016 软件进行分子对接。

1.15 分子动力学模拟分析 分子对接完成后,挑选打分靠前的配体,在 Protein Data Bank (PDB 数据库) 中保存其与蛋白质结合的 PDB 结构,使用 Schordinger 2019 软件“Desmond”模块进行操作。采用预定义的 Simple point charge water model (SPC 水模型),利用 Optimized potentials for liquid simulations 2005 (OPLS2005) 力场模拟水分子。加入适量

的 Na^+ 和 Cl^- 随机取代水分子使系统呈电中性来平衡系统电荷,使用与 Desmond 模块集成的默认参数对系统进行能量最小化。能量最小化后采用 Nose-Hoover 温度耦合和各向同性标度,将温度和压力保持在 300 K 和 1 个大气压。运行 100 ns(脉冲宽度)的 constant-pressure, constant-temperature (NPT) 模拟,并以 100 ps 的间隔进行轨迹保存。

1.16 统计学处理 用 SPSS 27.0 统计软件进行数据分析,对于符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,组内两两比用 LSD-*t* 检验。以 Pearson 相关系数进行相关性分析,Pearson 相关系数的取值范围在 -1 到 1 之间,其中 0 表示不相关,正值表示正相关,负值表示负相关。Pearson 相关系数的平方即为 R^2 ,即决定系数,表示一个变量能够被另一个变量解释的比例,以上统计学分析均以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 交集靶点的获取、PPI 分析及 Hub genes 的筛

选 基于 1.4 - 1.6 的方法和条件共得到 DKD 的靶点 4 261 个,石斛碱的靶点 504 个,免疫的靶点 2 707 个。借由 Venny 2.1.0 在线辅助工具获取上述三者的交集,共得到 ESR1、STAT3、LCK 等 128 个交集靶点,如图 1A;利用 STRING 与 Cytoscape 3.9.1 构建出交集靶点的 PPI 图,去除游离靶点后得到一个具有 67 个节点和 351 条边的交叉靶向 PPI 图,如图 1B。将该网络利用 CytoHubba 插件中的 MCODE 方式进行计算,结果得到 HSP90AA1、LCK、IL2、MAP2K2 等 15 个 Hub genes,其结果如图 1C 所示。

2.2 免疫浸润及 WGCNA 分析 将数据集 GSE142025 利用 CIBERSORT 进行免疫浸润分析,得到了 8 个具有显著差异的表型,结果如图 2A 所示,分别为 B cells naive(幼稚 B 细胞)、Macrophages M0(M0 巨噬细胞)、Macrophages M2(M2 巨噬细胞)、Mast cells resting(静息肥大细胞)、NK cells activated(活化的 NK 细胞)、T cells CD4 memory resting(静息的记忆 T 细胞)、T cells CD4 naive(CD4 幼稚 T 细胞)和 T cells CD8(CD8T 细胞)。

为了更进一步地了解基因与免疫细胞群丰度的

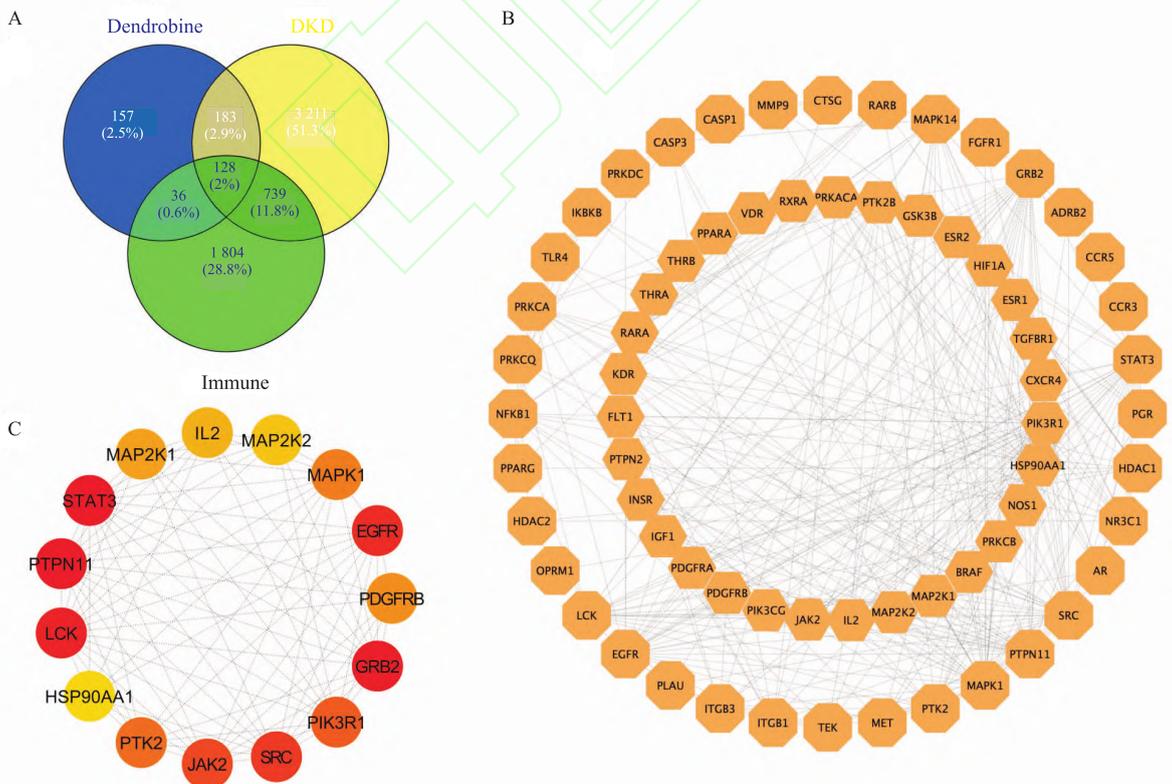


图 1 石斛碱调控 DKD 靶点

Fig. 1 Dendrobine regulates DKD targets

A: Dendrobine-DKD-immune to intersection; B: PPI image; C: Hub genes screening

关系,对 GSE142025 进行 WGCNA 分析,将免疫浸润得到的 8 个有显著差异的表型进行显著性关联分析,最终获得了 14 个免疫细胞表型相关的重要基因模块,如图 2B;随即提取这 14 个模块中的免疫相关基因,共得到 3 588 个免疫相关基因,将这 3 588 个基因与 15 个 Hub genes 取交集,共得到 HSP90AA1、STAT3 和 LCK 三个交集基因,如图 2C。

2.3 关键基因的鉴定和验证 利用数据集 GSE1009 和 GSE30122 对上述 3 个基因进行基因差异表达分析,GSE142025 对上述 3 个基因进行 ROC 曲线分析。结果如图 3A - 3D 所示,HSP90AA1 在 GSE1009 中显著表达 ($P < 0.05$),LCK 和 STAT3 在数据集 GSE30122 中显著表达 ($P < 0.05$);ROC 的具体结果如表 1。在数据集 GSE142025 中 HSP90AA1 (AUC = 0.930)、STAT3 (AUC = 0.765)、

LCK (AUC = 0.852) 中的表达值对 DKD 和健康样品表现出优异的诊断价值,表明 STAT3、LCK 和 HSP90AA1 在 DKD 的发病机制中具有潜在的作用。

表 1 HSP90AA1、STAT3、LCK 诊断 DKD 的效能
Tab.1 Efficacy of HSP90AA1, STAT3, and LCK in diagnosing DKD

Test variables	AUC	P	Confidence interval	
			Lower limit	Upper limit
HSP90AA1	0.930 041	0.000 135 ***	0.837 880	1.000 000
STAT3	0.765 432	0.018 454 *	0.600 178	0.930 686
LCK	0.851 852	0.001 787 **	0.724 379	0.979 325

2.4 临床相关性分析 将上述 3 个交集基因用 Nephroseq v5 进行临床相关性分析,其结果如图 4A - 4E 所示。其中 LCK 和 HSP90AA1 的表达均与血

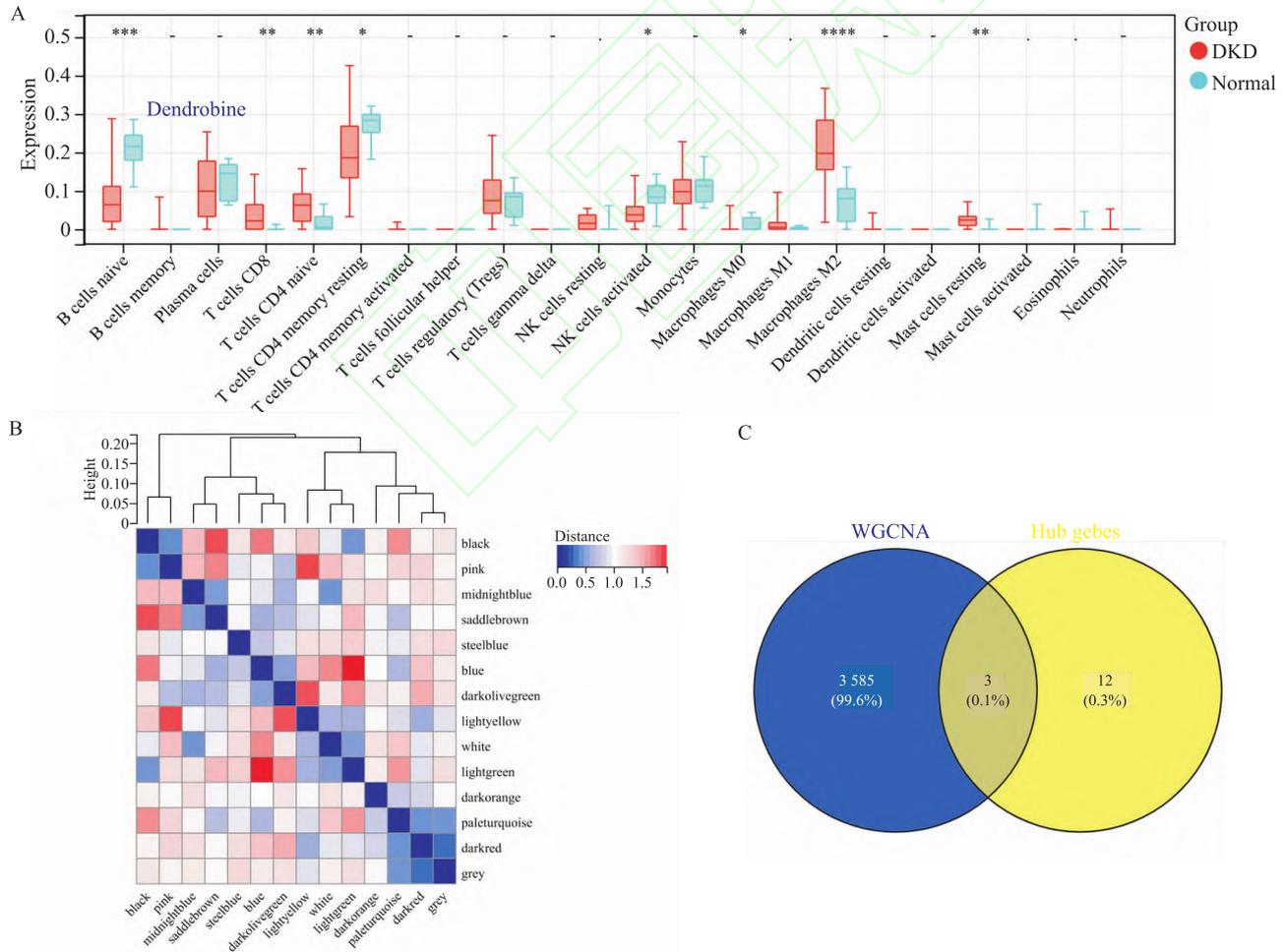


图 2 石斛碱调节免疫干预 DKD 靶点

Fig.2 DKD targets are regulated by dendrobine

A: Immune infiltration; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Normal; B: WGCNA module feature vector clustering; C: The intersection of immune genes extracted by WGCNA and Hub genes

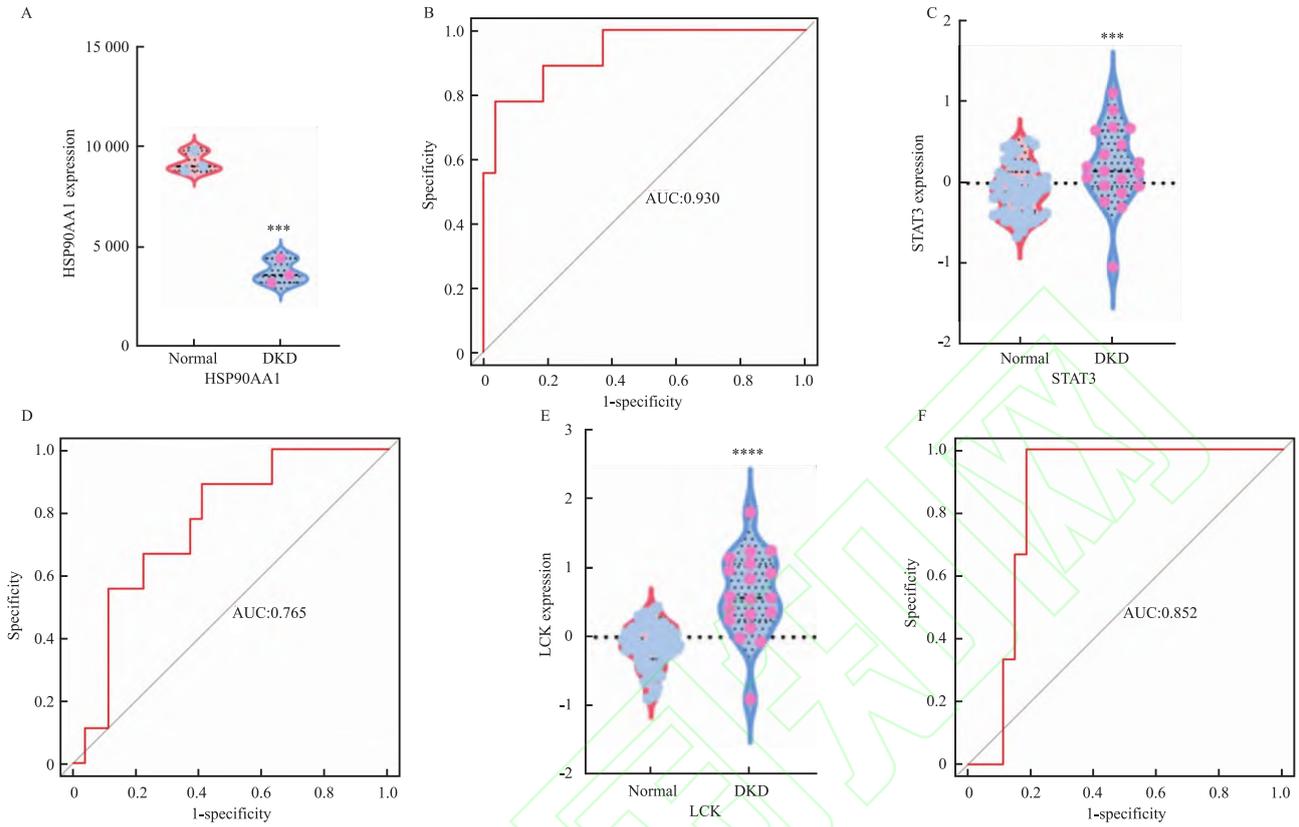


图3 关键基因的验证

Fig.3 Verification of Hub genes

A: Gene difference expression of HSP90AA1; B: ROC curve of HSP90AA1; C: Gene difference expression of STAT3; D: ROC curve of STAT3; E: Gene difference expression of LCK; F: ROC curve of LCK; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Normal group.

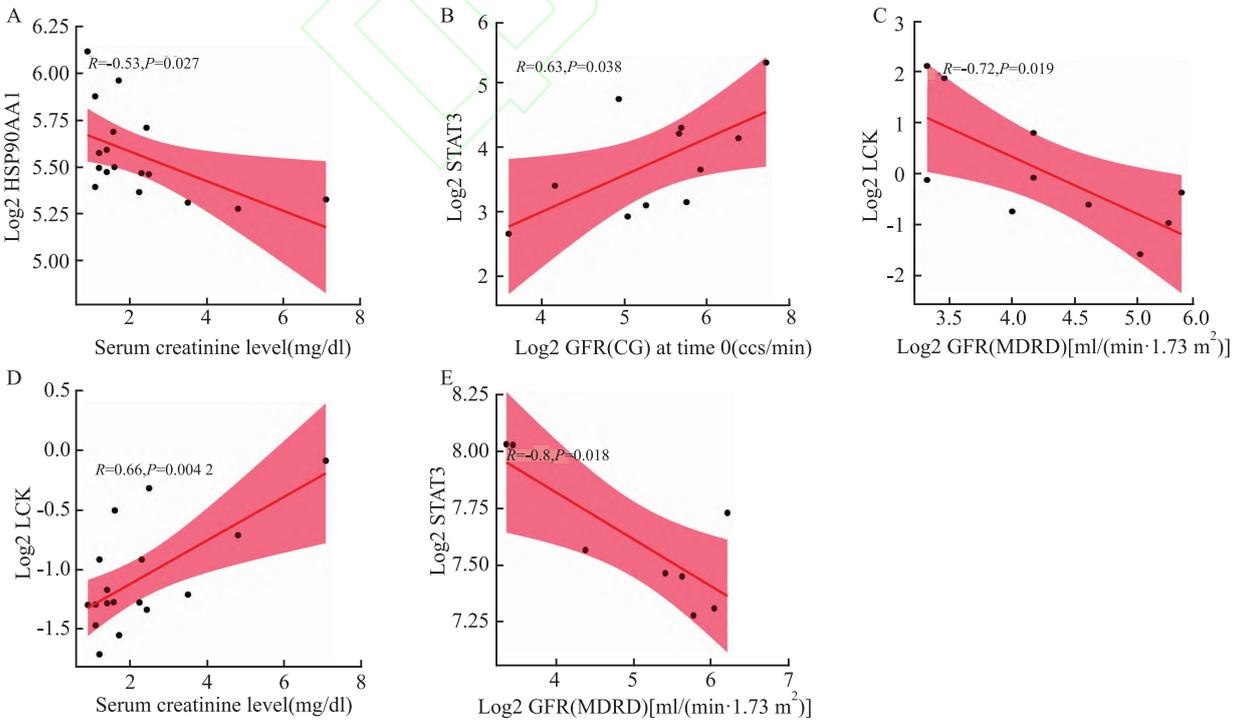


图4 HSP90AA1、LCK、STAT3 的临床相关性分析

Fig.4 Clinical correlation analysis of HSP90AA1, LCK and STAT3

A, B: The clinical correlation analysis of HSP90AA1; C, D: The clinical correlation analysis of LCK; E: The clinical correlation score of STAT3.

清肌酐水平和 GFR 水平显著相关,STAT3 的表达与 GFR 显著相关。

2.5 生存预后分析 使用 dbPKD 数据库对 HSP90AA1、STAT3、LCK 进行预后价值分析。结果如图 5A - 5C, 红色分别表示基于 HSP90AA1、STAT3、LCK 高表达的高风险组,黑色分别表示基于 HSP90AA1、STAT3、LCK 低表达的低风险组。3 个关键基因在 DKD 的预后分析中均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 关键基因与免疫细胞表型的相关性分析 相关性分析显示,在 DKD 中,HSP90AA1 与 M2 巨噬细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞呈负相关,与初始 B 细胞呈正相关,如图 6A - 6C;LCK 与 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、M2 巨噬细胞和静息肥大细胞呈正相关,与初始 B 细胞、活化的自然杀伤细胞和 M0 巨噬细胞呈负相关,如图 6D - 6K;STAT3 与活化的自然杀伤细胞和初始 B 细胞呈负相关,与 CD8⁺T 细胞和静息肥大细胞呈正相关,如图 6L - 6O。

2.7 分子对接 将 STAT3、LCK 和 HSP90AA1 三个交集基因编码的蛋白和对应的化合物结构导入 DS BIOVIA Discovery Studio 2016 软件进行分子对接,对接分数如表 2。HSP90AA1 编码的蛋白质与石斛碱能够进行较为良好的结合,将其对接结果进行展示,如图 7。

表 2 分子对接分数表

Tab. 2 Molecular docking score table

Targets	Ingredients	Docking score
HSP90AA1	Dendrobine	80.472 0
STAT3	Dendrobine	62.210 6
LCK	Dendrobine	No docking result

2.8 分子动力学模拟分析 本研究使用了 100 ns 的分子动力学模拟,评估了 HSP90AA1 蛋白在结合底物时的整体稳定性和构象变化并计算了 HSP90AA1 蛋白和 HSP90AA1-Den 复合物系统的均方根偏差 (root-mean-square deviation, RMSD)、均方根波动 (root mean square fluctuation, RMSF)。图 8A、8B 表示 RMSF 结果,RMSF 峰值表示在模拟过程中波动最大的蛋白质区域。配体在整个模拟过程中的波动 $< 2\text{Å}$ 说明蛋白的 RMSF 波动较小,因此 HSP90AA1 与 Den 的结合过程是稳定的;图 8C 表示 RMSD,其是用于测量特定坐标系中相对于参考坐标系的一组原子的位移的平均变化,监测蛋白质的 RMSD 可以在整个模拟过程中洞察其结构构象。对于蛋白质 RMSD 的分析可以表明模拟是否已达到平衡。由图可知,在模拟过程中,蛋白一开始波动较大但是逐渐趋于稳定,如果 RMSD 波动小于 1Å ,说明结合稳定, $1 \sim 3\text{Å}$ 量级的变化对于小的球状蛋白质是完全可以接受的。大于 $1 \sim 3\text{Å}$ 量级这个范围的变化表明蛋白质在模拟过程中发生了较大的构象变化,但值得注意的是本研究的 RMSD 值稳定在一个固定值附近,也在一定程度上说明了 HSP90AA1 与 Den 结合稳定;图 8D - 8E 表示蛋白 - 配体相互作用,如图所示蛋白质 - 配体相互作用分为 4 种类型:氢键(绿色)、疏水键(紫色)、离子键(红色)和水桥(蓝色)。在模拟过程中表现出更多的疏水作用,水桥和离子键、氢键和疏水键、水桥和疏水键作用相互补充。

2.9 HSP90AA1 的表达分析 采用 Western blot 实验验证石斛碱是否可通过调控 HSP90AA1 而干预糖尿病肾病。结果如图 9 所示,在 $0.1 \times$ 石斛碱干

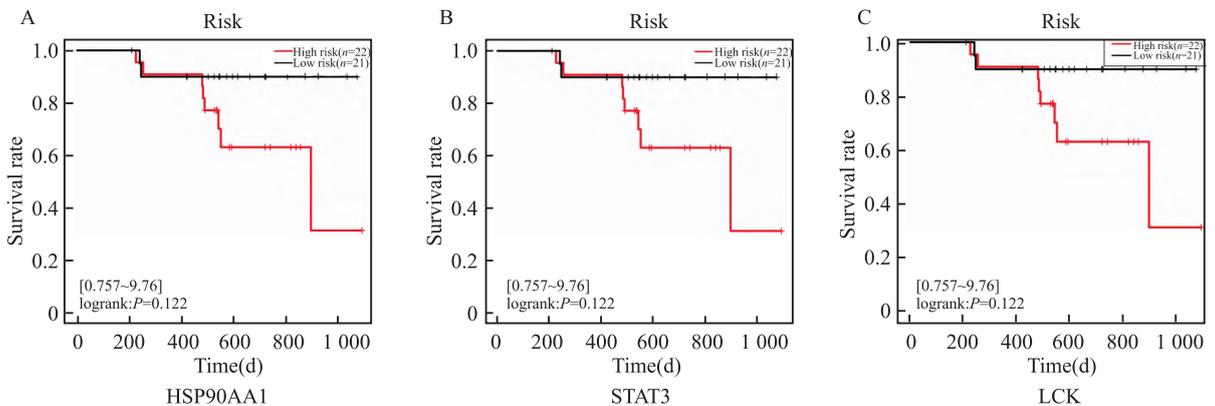


图 5 HSP90AA1、LCK、STAT3 的生存预后分析

Fig. 5 Survival prognostic analysis of HSP90AA1, LCK, STAT3

A: Survival prognosis analysis of HSP90AA1; B: Survival prognosis analysis of STAT3; C: Survival prognosis analysis of LCK

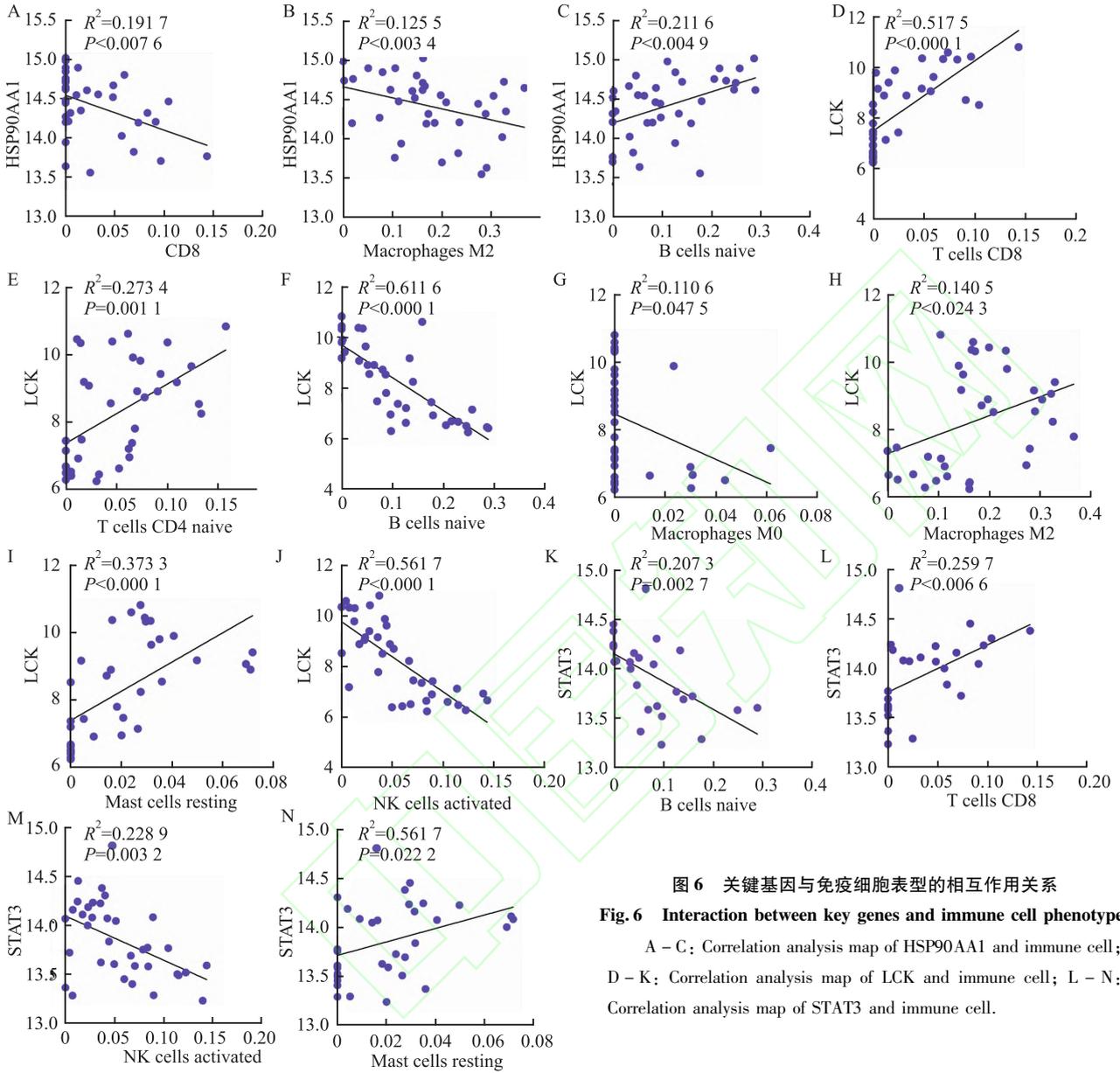


图 6 关键基因与免疫细胞表型的相互作用关系
Fig. 6 Interaction between key genes and immune cell phenotypes
 A - C: Correlation analysis map of HSP90AA1 and immune cell;
 D - K: Correlation analysis map of LCK and immune cell;
 L - N: Correlation analysis map of STAT3 and immune cell.

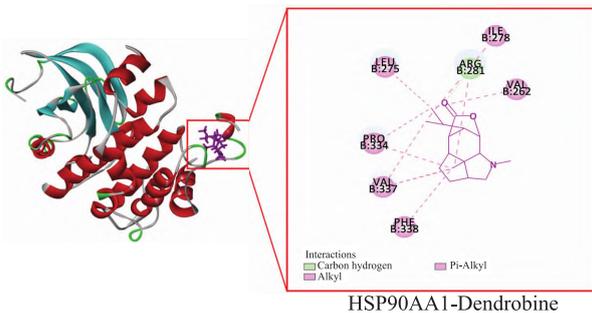


图 7 分子对接结果图
Fig. 7 Molecular docking results

< 0.01), 10 × 石斛碱中的 HSP90AA1 相比于 HG 组的增高是最为明显的 ($P < 0.001$)。根据 Western blot 结果, 将归一化的数据利用 SPSS 软件对组间进行单因素方差分析, 组内用 LSD-t 检验, 结果如表 3、表 4 所示。HG 组与对照组比较, HSP90AA1 在模型组中表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 给药组与模型组相比, HSP90AA1 在给药组中表达水平增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.001$)。

3 讨论

愈来愈多的证据表明, DKD 的发病机制和进展与肾脏炎症有关, 抗炎疗法可能对 DKD 具有肾保护作用^[12]。有研究表明石斛碱通过 miR-499-5p 调控

预的组别中, HSP90AA1 的表达相比于 HG 组明显增高 ($P < 0.01$), 在 1 × 石斛碱干预的组别中, HSP90AA1 的表达相比于 HG 组增高的更加明显 (P

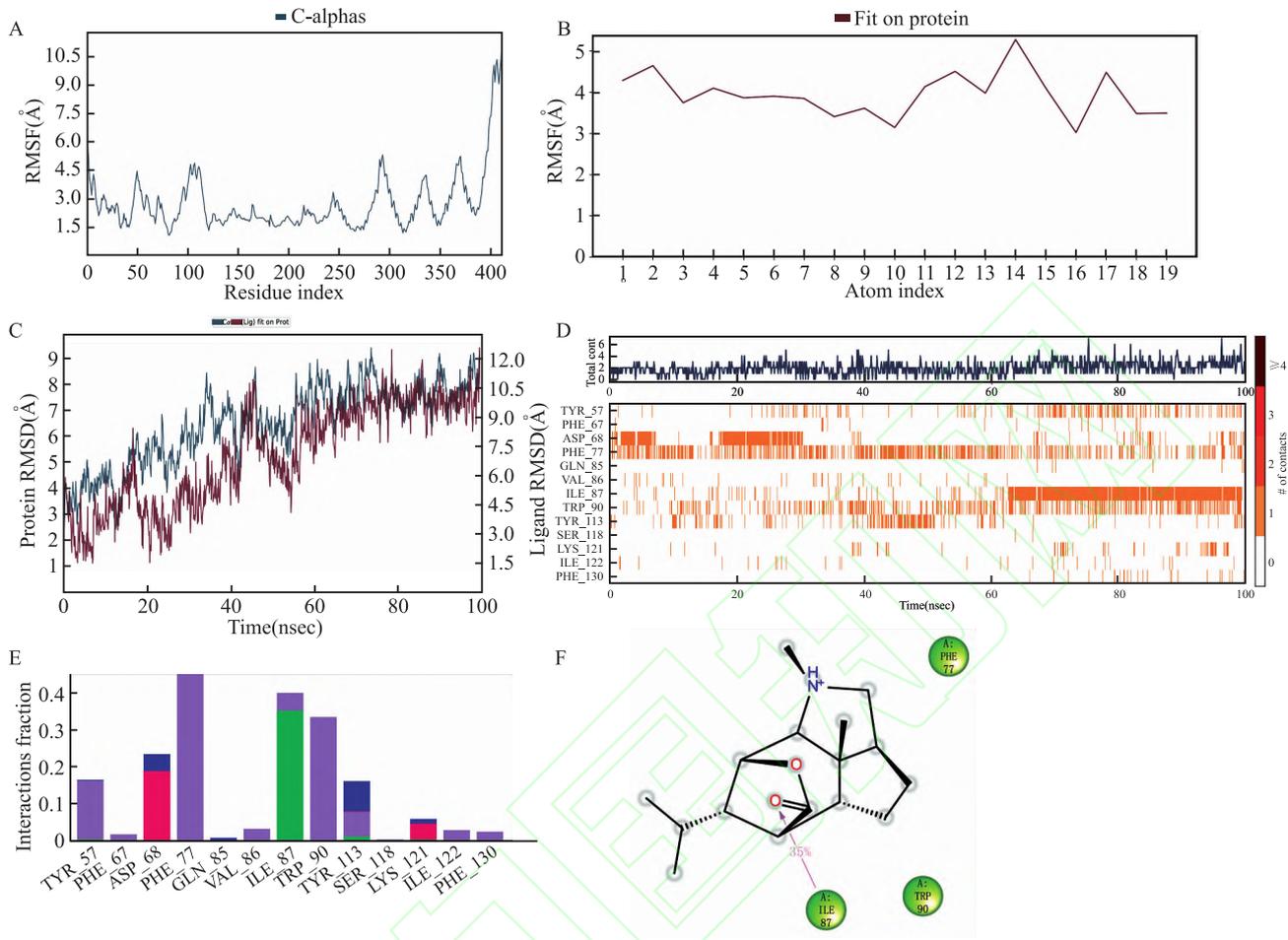


图 8 分子动力学模拟分析

Fig. 8 Molecular dynamics simulation analysis

A, B: RMSF diagram; C: RMSD diagram; D, E: Protein-ligand interaction diagram; F: Protein molecular interaction diagram

表 3 HSP90AA1 单因素方差分析 (ANOVA)

Tab. 3 Single factor variance analysis of HSP90AA1 (ANOVA)

Project	Equal square	F	P
Interblock	0.108	8.816	0.003
Linear term comparison	0.133	10.884	0.008
Deviation	0.100	8.126	0.005

表 4 HSP90AA1 LSD-t 检验

Tab. 4 LSD-t test of HSP90AA1

Group1	Group 2	Difference of average value	The standard deviation of the average value of the sample	P	95% Confidence interval	
					Lower limit	Upper limit
Con	HG	0.367 98	0.090 41	0.002 0	0.166 5	0.569 4
Con	0.1 ×	0.048 81	0.090 41	0.601 0	-0.152 6	0.250 3
Con	1.0 ×	-0.052 86	0.090 41	0.572 0	-0.254 3	0.148 6
Con	10.0 ×	-0.123 08	0.090 41	0.203 0	-0.324 5	0.078 4
HG	Con	-0.367 98	0.090 41	0.002 0	-0.569 4	-0.166 5
HG	0.1 ×	-0.319 17	0.090 41	0.005 0	-0.520 6	-0.117 7
HG	1.0 ×	-0.420 83	0.090 41	0.001 0	-0.622 3	-0.219 4
HG	10.0 ×	-0.491 05	0.090 41	0.000 1	-0.692 5	-0.289 6

DKD 系膜细胞增殖、上皮间质转化和纤维化^[13], 并对 DKD 大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及足细胞功能障碍有影响^[14]。本研究临床相关性分析显示, LCK 和 HSP90AA1 的表达与血清肌酐水平和 GFR 水平显著相关, STAT3 的表达与 GFR 显著相关; 免疫浸润分析发现, 初始 B 细胞、M0 巨噬细胞、M2 巨噬细胞、静息肥大细胞、活化的自然杀伤细胞、静息的记忆 T 细胞、CD4 幼稚 T 细胞和 CD8T 细胞, 与 STAT3、HSP90AA1 以及 LCK 三个关键基因具有相关性, 说明在石斛碱调节免疫干预 DKD 的过程中, 这三个基因均具有潜在的作用, 但是在临床相关性分析时发现只有 HSP90AA1 和 LCK 的表达均与血清肌酐水平和 GFR 水平显著相关, 而 STAT3 只与 GFR 水平显著相关, 另外在诊断 HSP90AA1、STAT3、LCK 对 DKD 的效能时发现, HSP90AA1 的综合诊断效能最好 (AUC = 0.930, P = 0.000 135), 且分子对接的最优结果也聚焦到了 HSP90AA1, 基

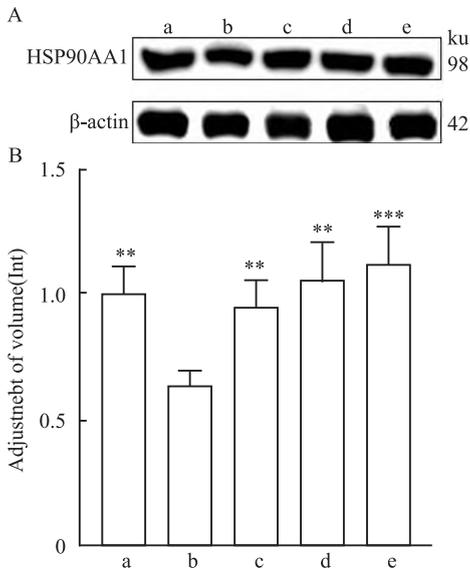


图9 HSP90AA1 蛋白表达比较

Fig.9 HSP90AA1 protein expression comparison

A: HSP90AA1 protein imprint strip diagram; B: HSP90AA1 protein imprinted bar chart; Comparison with HG group; a: Control group; b: HG group; c: 0.1 × group; d: 1 × group; e: 10 × group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs HG group.

于以上结果进行 Western blot 实验,结果证实与 HG 组相比,石斛碱含药血清组的 HSP90AA1 蛋白表达明显上调。

根据生信分析发现,在 DKD 中,HSP90AA1 与 M2 巨噬细胞、CD8 T 细胞细胞呈负相关;LCK 与 CD8T 细胞、CD4 T 细胞、M2 巨噬细胞呈正相关,与 NK 细胞呈负相关;STAT3 与 T cells CD8 呈正相关,与 NK 细胞呈负相关,说明 HSP90AA1、STAT3 和 LCK 三个关键基因在调节免疫干预 DKD 的发生和发展中具有重要意义。炎症过程由巨噬细胞根据其分化状态介导:M1 巨噬细胞通过促炎细胞因子和活性氧来启动炎症,而后一阶段由 M2 巨噬细胞控制,以解决炎症并通过释放生长因子促进组织重塑^[15]。在慢性炎症反应中,例如 DKD、M1 和 M2 巨噬细胞可能共存,导致持续性炎症和纤维化^[16]。Rodacki et al^[17] 的研究表明 NK 细胞可能是 1 型糖尿病发展的重要参与者;终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)与感染倾向增加、疫苗接种反应减弱、细胞介导免疫受损和 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值降低有关^[18],CD8T 细胞在组织的各个部位都有很强的促炎作用^[19],早在 3 期慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)时肾功能下降时,T 细胞,尤其是 CD8 亚群,表现出免疫衰老加重的特征^[20],这与本研究生信分析以及实验的结果一致,生信分析中

HSP90AA1 与 T cells CD8 呈负相关,推测在经过石斛碱干预后表达量明显增加的 HSP90AA1 会与 CD8 T 细胞相互作用,引起 CD8 T 细胞的数量降低从而减少炎症的发生。免疫浸润的结果显示,M2 巨噬细胞($P < 0.0001$)、NK 细胞($P < 0.01$)、CD8T 细胞($P < 0.01$)和 CD4 T 细胞($P < 0.01$)细胞在正常组织和 DKD 组织中的表达具有显著差异,说明上述免疫细胞在 DKD 的发病机制中起着关键作用,结果与现有的文献^[21]报道相符合。另外基于生信部分的分析,STAT3、LCK 和 HSP90AA1 三个更高层次的基因被确定为石斛碱抗 DKD 的枢纽基因。这些基因与肾脏纤维化^[22]、炎症^[23]等密切相关。其中热休克蛋白 C(heat shock protein90, HSP90)主要在肾小球的足细胞和系膜细胞中表达,尽管 HSP90 在 2 型糖尿病小鼠的肾皮质和高血糖孵育的肾小球细胞中没有任何变化^[24],但 HSP90 抑制已被证明在调节脂质稳态和抑制肾脏炎症方面具有有益的作用^[25]。在生信分析中,根据对 HSP90AA1 进行基因差异表达分析和 ROC 曲线分析,结果表明 HSP90AA1 在正常组织中显著高表达,在 DKD 组织中显著低表达($P < 0.001$),且 HSP90AA1 的 ROC 诊断曲线下的面积高达 0.930,说明本实验结果灵敏度较高,误判率较低,实验结果可靠。Western blot 实验证实,石斛碱干预 DKD 细胞模型后,HSP90AA1 在高糖干预组中的表达明显下调,而在对照组和给药组中的表达明显上调,这与本研究生信分析结果是一致的。初步提示 HSP90AA1 有可能参与了 DKD 的发生、发展过程。

由于分子对接为静态分析,缺少对时间维度上原子运动以及水分子直接作用的分析,所以本研究应用分子动力学方法动态分析在水溶液系统中所有原子之间的相互作用以及运动状态,从而验证小分子配体与 HSP90AA1 的相互作用强弱和结合的稳定性。虽然在模拟过程中 RMSD 有大于 1~3Å 量级这个范围的变化,但这是由于蛋白质在模拟过程中发生了较大的构象变化。因为在模拟过程中,RMSD 值最终稳定在一个固定值附近;对于 RMSF 两端的波动远远大于 2Å,这是蛋白质首尾端(N 端和 C 端)比蛋白质的任何其他部分波动更大的原因,但蛋白整体的 RMSF 波动较小,对 RMSD 和 RMSF 的分析表明,在模拟过程中 HSP90AA1 与 Den 的结合是稳定的,且表现出更多的水桥和离子键、氢键和疏水键、水桥和疏水键作用相互补充。

DKD 的发病机制复杂,是多种因素综合作用的

结果,本研究结果仅提示 HSP90AA1 在 DKD 中表达降低,而在经过石斛碱干预后其表达显著增高。迄今为止,HSP90AA1 在 DKD 的发生、发展过程中的具体机制还不清楚,根据本研究中的生信分析以及实验结果推测,在经过石斛碱干预后,表达量明显增加的 HSP90AA1 会与 Macrophages M2、CD8 T 细胞等免疫细胞相互作用从而减轻 DKD 的发生和发展。

参考文献

- [1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183:109119. doi: 10.1016/j.diabres. 2021.109119.
- [2] Haneda M, Utsunomiya K, Koya D, et al. A new classification of diabetic nephropathy 2014: a report from joint committee on diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Investig*, 2015, 6(2): 242 - 6. doi:10.1111/jdi.12319.
- [3] ElSayed N A, Aleppo G, Aroda V R, et al. 2. classification and diagnosis of diabetes: standards of care in diabetes - 2023 [J]. *Diabetes Care*, 2023, 46 (suppl 1): S19 - 40. doi:10.2337/dc23 - s002.
- [4] Tesch G H. Diabetic nephropathy - is this an immune disorder? [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131 (16): 2183 - 99. doi:10.1042/CS20160636.
- [5] Jiang W, Wang J, Shen X, et al. Establishment and validation of a risk prediction model for early diabetic kidney disease based on a systematic review and meta-analysis of 20 cohorts [J]. *Diabetes Care*, 2020, 43(4): 925 - 33. doi:10.2337/dc19 - 1897.
- [6] Reidy K, Kang H M, Hostetter T, et al. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(6): 2333 - 40. doi:10.1172/JCI72271.
- [7] Donate-Correa J, Luis-Rodríguez D, Martín-Núñez E, et al. Inflammatory targets in diabetic nephropathy [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2):458. doi: 10.3390/jem9020458.
- [8] Jun W, Makino H. Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(1): 13 - 26. doi: 10.1038/nrneph.2015.175.
- [9] Xiao Y, Liu Y, Yu K, et al. The effect of Chinese herbal medicine on albuminuria levels in patients with diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 937549. doi: 10.1155/2013/937549.
- [10] Wang Y Y, Zhao H L, Wang Q, et al. Chinese herbal medicine in ameliorating diabetic kidney disease *via* activating autophagy [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019:9030893. doi: 10.1155/2019/9030893.
- [11] Chen C, Liu F, Zhang K, et al. MeJA-responsive bHLH transcription factor LjbHLH7 regulates cyanogenic glucoside biosynthesis in *Lotus japonicus* [J]. *J Exp Bot*, 2022, 73(8): 2650 - 65. doi:10.1093/jxb/erac026.
- [12] Tang S C W, Yiu W H. Innate immunity in diabetic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16: 206 - 22. doi:10.1038/s41581 - 019 - 0234 - 4.
- [13] 陈玉凤,孔亚坤,李江雁,等. 石斛碱通过 miR-499-5p 调控糖尿病肾病系膜细胞增殖、上皮间质转化和纤维化 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(2): 211 - 5.
- [13] Chen Y F, Kong Y K, Li J Y, et al. Dendrobium regulates the proliferation, epithelial interstitial transformation and fibrosis of diabetic nephrotic mesenterial cells through miR-499-5p [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2023, 39(2): 211 - 5. doi:10.13699/j.cnki.1001 - 6821.2023.02.013.
- [14] 樊小宝,丁通,孙燕,等. 石斛碱对糖尿病肾病大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及足细胞功能障碍的影响 [J]. *河北医药*, 2021, 43(11): 1631 - 4, 1639.
- [14] Fan X B, Ding T, Sun Y, et al. Effect of dendrobium alkali on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and foot cell dysfunction in DKD rats [J]. *Hebei Med*, 2021, 43(11): 1631 - 4, 1639.
- [15] Landis R C, Quimby K R, Greenidge A R. M1/M2 macrophages in diabetic nephropathy: Nrf2/HO-1 as therapeutic targets [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(20): 2241 - 9. doi:10.2174/1381612824666180716163845.
- [16] Li H D, You Y K, Shao B Y, et al. Roles and crosstalks of macrophages in diabetic nephropathy [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1015142. doi: 10.3389/fimmu.2022.1015142.
- [17] Rodacki M, Svoren B, Butty V, et al. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients [J]. *Diabetes*, 2007, 56(1): 177 - 85. doi: 10.2337/db06 - 0493.
- [18] Chiu Y L, Tsai W C, Hung R W, et al. Emergence of T cell immunosenescence in diabetic chronic kidney disease [J]. *Immun Ageing*, 2020, 17:31. doi: 10.1186/s12979 - 020 - 00200 - 1.
- [19] Huang J, Zhou Q. CD8⁺ T cell-related gene biomarkers in macular edema of diabetic retinopathy [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 907396. doi:10.3389/fendo.2022.907396.
- [20] Wang B, Liu B C, Lv L L, et al. CD8 T cells induce the peritubular capillary rarefaction during AKI to CKD transition [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(8): 2980 - 93. doi: 10.7150/ijbs.96812.
- [21] 陈志超,林巧妮,孙立亚,等. 巨噬细胞激活与极化在糖尿病及其相关并发症的作用及中医药干预 [J]. *中国实验方剂学杂志*. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20242398>. doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20242398.
- [21] Chen Z C, Lin Q N, Sun L Y, et al. The role of macrophage activation and polarization in diabetes and its related complications and traditional Chinese medicine intervention [J]. *Chin J Exp Symol*, <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20242398>. doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20242398.
- [22] Zheng C, Huang L, Luo W, et al. Inhibition of STAT3 in tubular epithelial cells prevents kidney fibrosis and nephropathy in STZ-induced diabetic mice [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 848. doi:10.1038/s41419 - 019 - 2085 - 0.
- [23] Lu K, Wang L, Fu Y, et al. Bioinformatics analysis identifies immune-related gene signatures and subtypes in diabetic nephropathy [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 1048139. doi:10.3389/fen-

do.2022.1048139.

- [24] Bellini S, Barutta F, Mastrocola R, et al. Heat shock proteins in vascular diabetic complications: Review and future perspective [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (12): 2709. doi:10.3390/ijms18122709.

- [25] Wang Y, Liu T, Ma F, et al. A network pharmacology-based strategy for unveiling the mechanisms of *Tripterygium wilfordii* hook F against diabetic kidney disease[J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 2421631. doi:10.1155/2020/2421631.

Dendrobine interferes with diabetic kidney disease by up-regulating HSP90AA1 to regulate immune cells

Jiang Yunhui¹, Tang Chuantie², Li Jun¹, Zhang Nannan¹

(¹*School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025;*

²*Dept of Traditional Chinese Medicine, People's Hospital of Zoucheng, Jining 273500)*

Abstract Objective To explore the mechanism of dendrobine in the treatment of diabetic kidney disease (DKD) by intervening immunity using network pharmacology, bioinformatics and Western blot. **Methods** The targets of dendrobine were screened by Pharmmaper, Superpred and other databases. The disease targets of DKD were screened from GeneCards, OMIM and other databases. The immune-related targets were searched in Import, InnateDB and other databases. The intersection of the above three was obtained *via* Venn diagram. The PPI map of intersection targets was constructed by STRING software combined with Cytoscape software, and the core targets in the interaction network were mined by CytoHubba plug-in. The data set GSE142025 was obtained from GEO, and immune infiltration and WGCNA analysis were performed using the R language CIBERSORT package. GSE1009, GSE30122 and GSE142025 were used for gene differential expression analysis and ROC verification. The correlation between core targets and immune cell phenotype was analyzed. Molecular docking and molecular dynamics simulation analysis were used to test the binding force of dendrobine to key targets. Western blot was used to detect the expression of HSP90AA1 in HK-2 cells. **Results** A total of 128 intersecting genes, including HSP90AA1, LCK and EGFR, were obtained, and the core targets involved HSP90AA1, LCK and STAT3; molecular docking and molecular dynamics simulation analyses showed that the protein of HSP90AA1 could bind well with dendrobine. Western blot experiments showed that compared with the control group, HSP90AA1 was significantly down-regulated in the high glucose group. Compared with the high glucose group, HSP90AA1 was significantly up-regulated in the dendrobine group. **Conclusion** Dendrobine can intervene in diabetic kidney disease by regulating the expression of HSP90AA1.

Key words dendrobine; diabetic kidney disease; HSP90AA1; immune cells; network pharmacology; bioinformatics; target

Fund programs College Student Innovation and Entrepreneurship Training Project in Guizhou University of Traditional Chinese Medicine [No. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (2023) 30]; 2023 National College Student Innovation and Entrepreneurship Training Project in Guizhou Province (No.202310662125); Scientific and Technological Project of Guizhou Province (No. Qiankehe Basic-ZK [2023] General 428); Doctoral Start - up Foundation of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine Doctor (No. [2021]10)

Corresponding author Zhang Nannan, E-mail: doczn@sina.com