

分类号：
学号：20232014120

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



肉苁蓉水提物在纳米二氧化钛致肾毒性中的保护作用及其分子机制研究

学位申请人	曹玉哲
指导教师	宋关玲 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	公共卫生与预防医学
研究方向	劳动卫生与环境卫生学
所在学院	公共卫生学院

中国·新疆·石河子
2026年5月

分类号：
学号：20232014120

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



肉苁蓉水提物在纳米二氧化钛致肾毒性中的保护作用及其分子机制研究

学位申请人	曹玉哲
指导教师	宋关玲 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	公共卫生与预防医学
研究方向	劳动卫生与环境卫生学
所在学院	公共卫生学院

中国·新疆·石河子
2026年5月

**Protective effect and molecular mechanism of water extract of
Cistanche tubulosa against nephrotoxicity induced by titanium dioxide
nanoparticles**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Cao Yu-zhe

(Occupational and Environmental Health)

Dissertation Supervisor: Prof. Song Guan-ling

May, 2026

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：曹玉哲

时间：2026 年 5 月 20 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：曹玉哲

时间：2026 年 5 月 20 日

导师签名：宋美玲

时间：2026 年 5 月 20 日

摘要

目的：基于实验动物和微流控肾单位器官芯片建立纳米二氧化钛（Titanium dioxide nanoparticles, TiO₂ NPs）染毒及肉苁蓉水提取物干预模型，探讨肉苁蓉水提取物对 TiO₂ NPs 诱导肾毒性的保护作用及其分子机制，为药物开发与相关疾病预防提供理论依据。

方法：1. 采用水提法提取肉苁蓉根部活性成分，利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 测定肉苁蓉水提取物成分。通过网络药理学筛选核心活性成分、靶点和通路，运用分子对接评估核心活性成分与关键靶点的结合亲和力，并利用分子动力学模拟评估核心复合物的结合稳定性。

2. 将 6-8 周龄 50 只雌雄各半的 SD 大鼠随机分为对照组（等体积双蒸水）、TiO₂ NPs 组（100 mg/kg BW）和 TiO₂ NPs 暴露下肉苁蓉水提取物干预组（TiO₂ NPs 剂量为 100 mg/kg BW；肉苁蓉水提取物以生药当量计，设 200、400 和 800 mg/kg BW 三个剂量组）。各组大鼠连续灌胃 8 周，每周测定各组大鼠的体重、饮食量与饮水量；实验结束后处死大鼠，测量大鼠肾脏重量并计算脏器系数，留取尿液、血清和肾组织样本，测定如下指标：采用试剂盒检测尿蛋白、血肌酐（Serum creatinine, SCr）、尿酸（Uric acid, UA）、血尿素氮（Blood urea nitrogen, BUN）等肾功能指标；通过 HE 染色和 PAS 染色观察肾脏组织病理学变化；采用 TUNEL 染色和免疫印迹实验（Western blot, WB）分别检测经网络药理学预测的肾组织细胞凋亡和半胱天冬酶 3（Caspase-3）表达水平；利用免疫组化和 WB 检测经网络药理学预测的肾组织磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B（Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B, PI3K/AKT）信号通路蛋白表达水平。

3. 构建含内皮细胞（HUVECs）和肾足细胞（MPC-5）共培养的肾小球腔室、肾小管上皮细胞（HK-2）培养腔室及原尿收集腔室的微流控肾单位器官芯片。以 100 μ L/h 流速灌注培养，分别于 0、24、48 和 72 h 后，利用荧光素异硫氰酸酯结合白蛋白（FITC-BSA）漏出量评估肾小球滤过功能，并检测葡萄糖重吸收率评估肾小管重吸收功能。设置对照组、TiO₂ NPs 组（75 μ g/mL）和 TiO₂ NPs 暴露下肉苁蓉水提取物干预组（生药当量浓度为 150、300 μ g/mL），采用细胞计数试剂盒检测细胞活力；WB 检测 PI3K/AKT 通路蛋白表达水平。此外，在 TiO₂ NPs 联合肉苁蓉水提取物处理基础上加入 20 μ M PI3K 抑制剂 LY294002 建立干预模型。采用 WB 检测 PI3K/AKT 通路蛋白表达水平；运用 TUNEL 染色法检测细胞凋亡水平；通过免疫荧光检测血小板-内皮细胞黏附分子（Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31）和肾母细胞瘤基因 1（Wilms tumor gene 1, WT1）表达水平，并测定 FITC-BSA 漏出量以评估细胞表型和肾小球滤过功能；采用酶联免疫吸附法测定肾损伤因子-1（Kidney injury molecule-1, KIM-1）浓度以评估肾小管损伤标志物水平，并利用试剂盒检测葡萄糖重吸收率以评估肾小管重吸收功能。

结果：1. 肉苁蓉水提取物共检测出 68 种化学成分，包括苯乙醇苷类、环萜类、黄酮类、脂肪酸和有机酸等，其中毛蕊花糖苷和松果菊苷总含量（以生药当量计）为 1.65%，符合《中华人民共和国药

典》标准。肉苁蓉预防肾毒性的关键活性成分包括蝙蝠葛碱、花生四烯酸、苏齐内酯和染料木素，其核心靶点涉及 AKT1、PIK3CA 等关键蛋白，主要富集于 PI3K/AKT 信号通路和凋亡的负调控。分子对接结果显示，AKT1 与 4 种关键活性成分结合能均最低，其中蝙蝠葛碱和苏齐内酯与 AKT1 结合能均低于-10 kcal/mol；分子动力学模拟证实，蝙蝠葛碱和苏齐内酯与 AKT1 均结合稳定。

2. 动物实验结果显示，大鼠的体重、饮食量和饮水量在各周次间均无统计学差异，各组间的肾脏器系数亦未见明显差异。TiO₂ NPs 暴露可显著升高大鼠尿蛋白、SCr、UA 和 BUN 水平，上调细胞凋亡和 Caspase-3 表达水平，同时降低 PI3K 和 p-AKT/AKT 表达水平，导致肾组织出现肾小球萎缩和肾小管上皮细胞脱落。与 TiO₂ NPs 组相比，肉苁蓉水提物干预后 BUN 和 SCr 水平呈剂量依赖性下降，均从 200 mg/kg BW 组开始差异有统计学意义 ($P < 0.05$; $P < 0.01$)；尿蛋白和 UA 水平均从 400 mg/kg BW 组开始明显降低 ($P < 0.01$)；凋亡水平和 Caspase-3 表达均在 800 mg/kg BW 组明显下降 ($P < 0.05$)；PI3K 总蛋白表达在 800 mg/kg BW 组明显升高 ($P < 0.05$)，p-AKT/AKT 水平呈剂量依赖性升高，从 400 mg/kg BW 组开始差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3. 构建的肾单位芯片可维持 HUVECs、MPC-5 及 HK-2 细胞在各自腔室内正常生长，保持特异性标志物表达，并具备肾小球滤过功能和肾小管重吸收功能。与对照组相比，75 μg/mL TiO₂ NPs 单独处理组细胞活力明显下降，而肉苁蓉水提物干预后，细胞活力在 300 μg/mL 组显著上升 ($P < 0.01$)。与对照组相比，TiO₂ NPs 组 PI3K 和 p-AKT/AKT 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；与 TiO₂ NPs 组相比，肉苁蓉水提物干预可显著升高 PI3K 和 p-AKT/AKT 水平，均在 300 μg/mL 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4. 经 PI3K 抑制剂 LY294002 干预后结果显示：与对照组相比，TiO₂ NPs 组 PI3K 和 p-AKT/AKT 水平降低，细胞凋亡水平升高，WT1 荧光强度减弱，FITC-BSA 漏出量增加，葡萄糖重吸收率下降，KIM-1 浓度升高；与 TiO₂ NPs 组相比，肉苁蓉水提物干预后 PI3K 和 p-AKT/AKT 水平升高，细胞凋亡水平下降，WT1 荧光强度恢复，FITC-BSA 漏出量减少，葡萄糖重吸收率回升，KIM-1 浓度降低；与 TiO₂ NPs + 肉苁蓉水提物组相比，加入 LY294002 干预后 PI3K 和 p-AKT/AKT 水平降低，细胞凋亡水平升高，WT1 荧光强度减弱，FITC-BSA 漏出量增加，葡萄糖重吸收率降低，KIM-1 浓度升高。

结论：肉苁蓉水提物可改善 TiO₂ NPs 所致的大鼠肾功能指标异常，减轻肾脏组织病理学损伤，并修复肾小球滤过和肾小管重吸收功能；其分子机制与缓解 TiO₂ NPs 对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用，减少肾脏细胞凋亡有关。

关键词：纳米二氧化钛；肉苁蓉水提物；肾毒性；PI3K/AKT 信号通路；肾单位器官芯片

Abstract

Objective: This study aims to establish an experimental model involving animal subjects and a microfluidic nephron chip to investigate the effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) exposure and water extract of *Cistanche tubulosa* (CTE) intervention. Specifically, we seek to determine whether CTE can mitigate nephrotoxicity induced by TiO₂ NPs and to elucidate the underlying molecular mechanisms. The findings are intended to provide a theoretical foundation for drug development and disease prevention.

Methods: 1. The water extraction method was employed to isolate the active components of *Cistanche tubulosa* root, while UPLC-Q-TOF-MS/MS was utilized to identify these components. Network pharmacology was applied to screen for the core active components, targets, and pathways. Molecular docking assessed the binding affinity of the core active components to key targets, and molecular dynamics simulation was conducted to verify the binding stability of the core complex.

2. Fifty Sprague-Dawley rats, aged 6 to 8 weeks and evenly divided by sex, were randomly assigned to five groups: a control group receiving an equal volume of double-distilled water, a TiO₂ NPs group administered 100 mg/kg body weight (BW), and three CTE intervention groups exposed to TiO₂ NPs at a dose of 100 mg/kg BW, with CTE divided into three dosage groups of 200, 400, and 800 mg/kg BW based on the crude drug equivalent. Each group of rats received continuous oral administration for 8 weeks, during which their body weight, dietary intake, and water intake were measured weekly. Following the experiment, the rats were euthanized, and the weights of their kidneys were recorded to calculate organ coefficients. Kidney tissue, urine, and serum samples were collected for the measurement of the following indicators: renal function indices, including urinary protein, serum creatinine (SCr), uric acid (UA), and blood urea nitrogen (BUN), were assessed using commercial kits. Pathological changes in renal tissue were examined through hematoxylin and eosin (HE) staining and periodic acid-Schiff (PAS) staining. The expression level of apoptosis and Caspase-3, as predicted by network pharmacology, were evaluated using TUNEL staining and Western blot (WB) analysis, respectively. Additionally, the protein expression levels of the phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway, also predicted by network pharmacology, were assessed using immunohistochemistry and WB.

3. An *in vitro* microfluidic nephron chip was constructed, incorporating culture chambers for human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), renal podocytes (MPC-5), and renal tubular epithelial cells (HK-2). Perfusion culture was conducted at a flow rate of 100 μ L/h. Glomerular filtration function was assessed at 0, 24, 48, and 72 hours through the measurement of fluorescein isothiocyanate-conjugated

bovine serum albumin (FITC-BSA) leakage, while renal tubular reabsorption function was evaluated by determining the glucose reabsorption rate. Cells were divided into a control group, a TiO₂ NPs group (75 µg/mL), and intervention groups consisting of TiO₂ NPs exposed to CTE at drug equivalent concentrations of 150 and 300 µg/mL. Cell viability was detected using a cell counting kit, and the protein expression levels of the PI3K/AKT pathway were determined by WB. In addition, an intervention model was established by adding 20 µM PI3K inhibitor LY294002 to the treatment regimen combining TiO₂ NPs with CTE. The expression levels of PI3K/AKT pathway proteins were again evaluated by WB, and apoptosis levels were assessed using TUNEL staining. Additionally, the expression levels of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) and wilms tumor gene 1 (WT1) were determined through immunofluorescence, while FITC-BSA leakage was measured to evaluate cell phenotype and glomerular filtration function. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to quantify the concentration of kidney injury molecule-1 (KIM-1) as an indicator of renal tubular injury. Additionally, a reagent kit was utilized to assess the glucose reabsorption rate, thereby evaluating the function of renal tubular reabsorption.

Results: 1. A total of 68 chemical components were identified in the extract of CTE, including phenylethanoid glycosides, cyclic terpenoids, flavonoids, fatty acids, and organic acids. The combined content of verbascoside and echinacoside (expressed as medicinal equivalent) reached 1.65%, aligning with the standards set forth in the "Pharmacopoeia of the People's Republic of China". The primary active components responsible for preventing nephrotoxicity include dauricine, arachidonate, suchilactone and genistein. The principal targets comprise key proteins such as AKT1 and PIK3CA, which are predominantly enriched in the PI3K/AKT signaling pathway and are involved in the negative regulation of apoptosis. Molecular docking analyses revealed that AKT1 exhibited the lowest binding energy with the four active ingredients, with the binding energies of dauricine and suchilactone with AKT1 being lower than -10 kcal/mol. Furthermore, molecular dynamics simulation confirmed the stability of the dauricine-AKT1 and suchilactone-AKT1 complexes.

2. The results of the animal experiments indicated no statistically significant differences in the weight, diet, or water intake of rats across the weeks, nor were there significant differences in the renal organ coefficients among the groups. Exposure to TiO₂ NPs significantly elevated levels of urinary protein, serum creatinine (SCr), uric acid (UA), and blood urea nitrogen (BUN) in rats. This exposure also led to glomerular atrophy and shedding of tubular epithelial cells in renal tissue, increased apoptosis, and enhanced expression of Caspase-3. Additionally, there was a notable reduction in the expression levels of PI3K and p-AKT/AKT. In comparison to the TiO₂ NPs group, the levels of BUN and SCr decreased in a dose-dependent manner following intervention with CTE. Specifically, BUN and SCr began to show a statistically significant difference at the 200 mg/kg BW group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). The levels of urinary

protein and UA were significantly reduced beginning at the 400 mg/kg BW group ($P < 0.01$). Furthermore, the level of apoptosis and expression of Caspase-3 were significantly decreased in the 800 mg/kg BW group ($P < 0.05$). After intervention with CTE, the expression of PI3K was significantly increased in the 800 mg/kg BW group ($P < 0.05$), and p-AKT/AKT levels increased in a dose-dependent manner, with a statistically significant difference observed from the 400 mg/kg BW group ($P < 0.01$).

3. The engineered nephron chip supports the normal growth of HUVECs, MPC-5, and HK-2 cells within their designated chambers. It also sustains the expression of specific markers while exhibiting both glomerular filtration and tubular reabsorption functions. Cell viability significantly decreased in the 75 $\mu\text{g/mL}$ TiO₂ NPs treated group compared to the control group. Conversely, cell viability significantly increased in the 300 $\mu\text{g/mL}$ group after treatment with CTE ($P < 0.01$). The expression levels of PI3K and p-AKT/AKT proteins were significantly reduced in the TiO₂ NPs group compared to the control group ($P < 0.05$). However, intervention with CTE significantly increased the levels of PI3K and p-AKT/AKT compared to the TiO₂ NPs group, with statistical significance observed in the 300 $\mu\text{g/mL}$ group ($P < 0.05$).

4. The validation results of PI3K inhibitor LY294002 intervention show that the TiO₂ NPs group exhibited decreased expression levels of PI3K and p-AKT/AKT, increased apoptosis, reduced fluorescence intensity of WT1, heightened leakage of FITC-BSA, diminished glucose reabsorption rates, and elevated concentrations of KIM-1 compared to the control group. In contrast, following the intervention with CTE, the TiO₂ NPs group showed increased expression of PI3K and p-AKT/AKT, decreased apoptosis, restored fluorescence intensity of WT1, reduced leakage of FITC-BSA, enhanced glucose reabsorption rates, and decreased concentrations of KIM-1. Furthermore, compared to the TiO₂ NPs + CTE group, the TiO₂ NPs + CTE + LY294002 group demonstrated decreased expression of PI3K and p-AKT/AKT, increased apoptosis, reduced fluorescence intensity of WT1, heightened leakage of FITC-BSA, diminished glucose reabsorption rates, and elevated concentrations of KIM-1.

Conclusion: CTE can mitigate the abnormal renal function indices in rats induced by TiO₂ NPs, reduce renal histopathological damage, and restore glomerular filtration and renal tubular reabsorption functions. The underlying molecular mechanism is associated with the reversal of the inhibitory effects of TiO₂ NPs on the PI3K/AKT signaling pathway, thereby decreasing renal cell apoptosis.

Key words: Titanium dioxide nanoparticles; Water extract of *Cistanche tubulosa*; Nephrotoxicity; PI3K/AKT signaling pathway; Nephron organ-on-a-chip

目录

摘要	I
Abstract	III
中英文缩略词表	VIII
1 前言	1
2 实验材料与方法	5
2.1 实验材料	5
2.2 肉苁蓉水提物的成分测定	9
2.3 网络药理学、分子对接及分子动力学模拟	10
2.5 动物实验染毒及干预模型	13
2.6 微流控肾单位芯片染毒及干预模型	17
2.7 统计学方法	21
2.8 技术路线	21
3 结果	22
3.1 肉苁蓉水提物的成分	22
3.2 网络药理学、分子对接和动力学模拟预测肉苁蓉预防肾毒性潜在机制	23
3.2.1 网络药理学结果	23
3.2.2 分子对接结果	26
3.2.3 分子动力学模拟结果	27
3.3 TiO ₂ NPs 的表征	31
3.4 动物实验验证肉苁蓉水提物减轻 TiO ₂ NPs 所致肾毒性	31
3.4.1 肉苁蓉水提物和 TiO ₂ NPs 对大鼠体重、饮食、饮水和脏器系数的影响	31
3.4.2 肉苁蓉水提物和 TiO ₂ NPs 对大鼠肾功能指标的影响	33
3.4.3 肉苁蓉水提物和 TiO ₂ NPs 对大鼠肾脏组织病理学的影响	34
3.4.4 肉苁蓉水提物和 TiO ₂ NPs 对大鼠肾组织细胞凋亡的影响	36
3.4.5 肉苁蓉水提物和 TiO ₂ NPs 对大鼠肾组织 PI3K/AKT 通路蛋白的影响	37
3.5 肾单位芯片验证肉苁蓉水提物减轻 TiO ₂ NPs 所致肾毒性的分子机制	39
3.5.1 芯片的构建及功能验证	39
3.5.2 肉苁蓉水提物对 TiO ₂ NPs 暴露下 PI3K/AKT 信号通路的影响	39
3.5.3 LY294002 干预下肉苁蓉水提物和 TiO ₂ NPs 对 PI3K/AKT 通路的影响	42
3.5.4 LY294002 干预下肉苁蓉水提物和 TiO ₂ NPs 对芯片中细胞凋亡的影响	44

3.5.5 LY294002 干预下肉苁蓉水提物和 TiO ₂ NPs 对肾小球细胞表型及滤过功能的影响	45
3.5.6 LY294002 干预下肉苁蓉水提物和 TiO ₂ NPs 对肾小管损伤标志物及重吸收功能的影响	46
4 讨论	48
4.1 基于网络药理学、分子对接和分子动力学模拟的肉苁蓉防治肾毒性机制研究	48
4.2 TiO ₂ NPs 的粒径及肉苁蓉干预剂量	51
4.3 肉苁蓉水提物对 TiO ₂ NPs 所致肾功能损伤的保护作用	51
4.4 肉苁蓉水提物对 TiO ₂ NPs 所致肾细胞凋亡的抑制作用	53
4.5 肉苁蓉水提物通过调控 PI3K/AKT 信号通路缓解 TiO ₂ NPs 所致肾毒性	54
5 结论	57
6 局限性及展望	58
7 文献综述	59
参考文献	64
附录	72
致谢	77
作者简介	78
导师评阅表	79

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
Acr	Acrylamide	丙烯酰胺
AKT	Protein Kinase B	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	AKT 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1
AP	Ammonium persulphate	过硫酸铵
BUN	Blood urea nitrogen	血尿素氮
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BC	Betweenness centrality	中介中心性
CASP3	Caspase 3	半胱天冬酶-3
CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1	血小板-内皮细胞黏附分子
CC	Closeness centrality	接近中心性
CCK8	Cell counting kit-8	细胞活力检测试剂盒
ddH ₂ O	double distilled water	双蒸水
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
EGFR	Epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木素-伊红染色
KIM-1	Kidney injury molecule-1	肾损伤分子-1
nm	Nanometer	纳米
OOC	Organ-on-a-chip	器官芯片
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PAS	Periodic acid-Schiff stain	过碘酸-希夫染色
PPI	Protein-Protein Interaction	蛋白质-蛋白质相互作用
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
p-AKT	Phosphorylated Protein Kinase B	磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
RMSD	Root mean square deviation	均方根偏差
RMSF	Root mean square fluctuation	均方根涨落

续中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
FFL	Free energy landscape	自由能形貌图
FITC-BSA	Fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin	荧光素异硫氰酸酯结合白蛋白
Rg	Radius of gyration	回旋半径
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SASA	Solvent accessible surface area	溶剂可及表面积
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	SRC 原癌基因非受体酪氨酸激酶
SCr	Serum creatinine	血肌酐
TiO ₂ NPs	Titanium dioxide nanoparticles	纳米二氧化钛
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling	末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记法
TBST	Tris buffered saline with tween	三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水
TEM	Transmission electron microscope	透射电子显微镜
TEMED	Tetramethyl ethylene diamine	四甲基乙二胺
TP53	Tumor protein p53	肿瘤蛋白 P53
UPLC-Q-TOF-MS/MS	Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight Tandem Mass Spectrometry	超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用技术
UA	Uric acid	尿酸
WT1	Wilms tumor gene 1	肾母细胞瘤基因 1
WB	Western Blot	免疫印迹实验

1 前言

作为 21 世纪材料科学革命的核心,纳米材料是指至少在一维空间尺度上介于 1-100 纳米 (Nanometer, nm) 之间的物质单元或由其构成的材料。在该介观尺度下,受量子效应和尺寸效应等影响,纳米材料在电子信息技术、能源环境、生物医学和环境治理等领域应用颇多。具体而言,在电子领域,碳纳米管和硅纳米线可用于半导体与芯片技术;在能源领域,纳米结构催化剂和电极材料显著提升了燃料电池、锂电池的效率和太阳能电池的光电转换率;在医疗领域,脂质体、介孔二氧化硅纳米粒等作为载体,可实现药物的靶向输送、控制释放,提高疗效并降低全身毒性;在环境污染治理领域,纳米材料凭借其高效的吸附与催化降解能力,成为净化水体与空气污染物的明星材料^[1,2]。

在众多纳米材料中,纳米二氧化钛 (Titanium dioxide nanoparticles, TiO₂ NPs) 是指尺寸在 1-100 nm 范围内的二氧化钛 (Titanium dioxide, TiO₂) 颗粒,已成为目前全球范围内销量最高、应用最广的纳米材料之一。据统计,全球每年约生产 60000 吨 TiO₂ NPs,且产量在逐年增加^[3]。TiO₂ NPs 具有良好的稳定性、光催化性及抗菌性^[4,5],使其广泛应用于食品、防晒、涂料、油漆、抗菌材料及水处理等方面^[4-9]。TiO₂ 早已作为食品添加剂被应用,食品级 TiO₂ 又称食品添加剂 E171,在 900 多种食品中广泛用作增白剂^[10],美国食品药品监督管理局规定其最大允许添加量为食品重量的 1%。事实上,E171 所含纳米级颗粒占比高达 36-40%^[7],有研究在食品中检测到 E171 浓度为 0.02-9.0 mg/g 产品^[11],成人每日经膳食摄入的 TiO₂ NPs 为 1-2 mg/kg BW,儿童则高达为 5 mg/kg BW^[12]。此外,TiO₂ NPs 还被广泛地应用于化妆品、抗菌药物以及牙膏等可与人体直接接触的商品中,因此人体实际暴露与摄入剂量可能更高。

随着 TiO₂ NPs 应用的普及,其潜在的生物安全性问题逐渐浮出水面。2010 年,国际癌症研究机构将 TiO₂ 归为 2B 类致癌物 (可能对人类致癌)。2021 年,欧盟委员会进一步将其列为 2 类吸入性致癌物。欧洲食品安全局评估认为食品添加剂 E171 安全性存疑,无法排除其遗传毒性风险,因此欧盟委员会于 2022 年 6 月起禁止其在食品中使用,而中国、美国、英国等国家目前尚未调整 E171 的使用限制。此外有研究表明,TiO₂ NPs 可通过呼吸道、消化道等多种途径进入血液循环,并穿透生物屏障,在多种器官中蓄积,从而引起肾脏、肝脏、心脏、神经和生殖毒性^[13-19]。特别值得关注的是 TiO₂ NPs 的肾毒性,已在多项动物研究中得到证实,暴露于 TiO₂ NPs 会引起肾功能降低、肾小球萎缩、肾小管炎症细胞浸润、充血、肾小管细胞变性、坏死、间质水肿、纤维化和肾小管凋亡等^[20-22]。

研究证实, TiO_2 NPs 的肾毒性机制主要涉及氧化应激、炎症激活和细胞凋亡^[15, 21-23]。 TiO_2 NPs 直接造成损伤并激活炎症信号。炎症反应被激活后, 炎症细胞本身会产生更多活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 加剧氧化应激; 同时, 炎症因子可进一步损害线粒体功能, 促进凋亡。细胞凋亡会释放更多的细胞内“危险信号”, 进一步激活炎症小体和招募炎症细胞, 从而持续驱动氧化应激和炎症。信号通路涉及 ROS 相关的缺氧诱导因子-1 α /转化生长因子- β (Hypoxia-inducible factor-1 α /transforming growth factor- β , HIF-1 α /TGF- β) 信号通路、核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1, Nrf2/HO-1) 通路以及丝裂原活化蛋白激酶/核因子 E2 相关因子 2/Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (MAPK/Nrf2/Keap1) 信号通路等^[24-26]。Huang 等人的研究表明, TiO_2 NPs 暴露可能通过 ROS 激活 HIF-1 α /TGF- β 通路导致小鼠肾纤维化^[26]。 TiO_2 NPs 还可以通过抑制 Nrf2/HO-1 通路来增加肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和核因子 κ B (Nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 蛋白水平, 导致大鼠肾脏损伤^[24]。此外, TiO_2 NPs 可以通过 MAPK/NRF2/Keap1 途径诱导尼罗罗非鱼的毒性^[25]。鉴于这些风险, 迫切需要寻找 TiO_2 NPs 诱导肾损伤的有效干预对策。近几十年来, 中药因其精确的疗效、相对较低的毒性和成本效益而引起了全球的关注。

肉苁蓉为列当科多年生草本植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y.C.Ma 或管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质茎^[27], 是一种被称为“沙漠人参”的传统中药, 几个世纪以来在亚洲被广泛用于治疗与肾脏相关的疾病, 包括肾虚和慢性肾病。现已有研究表明, 我国肉苁蓉植物有 4 种 1 变种: 荒漠肉苁蓉、管花肉苁蓉、盐生肉苁蓉及其变种白花盐苁蓉、沙苁蓉, 主要分布于新疆、内蒙古、宁夏、甘肃等沙漠地区^[27, 28]。肉苁蓉含有苯乙醇苷类、环烯醚萜类、木质素类、多糖类等多种主要活性成分, 还含有单萜类、有机酸、核苷及含氮有机物和无机微量元素等成分^[27, 29, 30]。

现代药理学研究表明, 肉苁蓉具有多靶点生物活性, 包括抗炎^[29]、抗氧化^[29]、抗肿瘤^[31]、抗凋亡和肾损伤保护^[32, 33]。肉苁蓉可以抑制促炎细胞因子释放并抑制 NF- κ B 信号通路, 该通路在炎症中起着关键作用。肉苁蓉富含抗氧化剂, 可以中和自由基并减轻氧化应激^[29, 30]。苁归益肾方可抑制糖尿病肾病大鼠炎症反应, 改善血管内皮功能, 降低尿蛋白^[34]。肉苁蓉总苷通过提高机体氧化应激水平、调节免疫能力、改善机体代谢方式和调理肠道微生物平衡以发挥抗肝癌的作用^[31]。

针对其抗凋亡和肾保护功能, Bai 等人的研究表明, 肉苁蓉可以通过减少炎症、氧化应激和细胞凋亡来减轻庆大霉素诱导的大鼠肾功能障碍和结构损伤^[32]。肉苁蓉的正丁醇萃取物影响阿霉素损伤后的人胚肾上皮细胞凋亡, 随着肉苁蓉的正丁醇萃取物浓度增加, 细胞凋亡明显减少; 肉苁蓉煎剂和肉苁蓉的正丁醇萃取物均对腺嘌呤造大鼠慢性肾衰竭的动物模型有明显的缓解作用, 血清生化指标、血常规指标等均有明显改善^[35]。另外, 肉苁蓉苯乙醇苷类化合物主要通过调节转录活化蛋白 1、肿瘤蛋白 P53 (Tumor protein

p53, TP53) 和环磷酸鸟苷-磷酸腺苷合酶/干扰素基因刺激蛋白 (Cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes, cGAS-STING) 信号通路, 减少氧化应激、细胞凋亡和炎症, 同时恢复正常的细胞周期进程, 从而对肾衰老发挥保护作用^[33]。然而, 肉苁蓉水提物对 TiO₂ NPs 所致肾毒性的保护作用及其潜在机制尚不明确。

近年来, 网络药理学、分子对接和分子动力学模拟等计算方法在阐明药物作用机制方面得到广泛应用。网络药理学可以用于预测中药靶点和确定中药的活性成分, 利用现有数据库研究中药调控的多个靶点及信号通路, 从而预测其治疗疾病的作用机制^[36, 37]。分子对接是一种将配体放置到其受体结合位点的计算方法, 分析受体和配体的特征及相互作用, 预测中药活性成分与特定疾病靶标蛋白之间的三维结合模式、亲和力及关键相互作用^[37]。分子动力学模拟在原子水平模拟蛋白质-配体复合物在生理环境下的动态行为, 可考察结合位点的构象变化、结合稳定性、关键残基的相互作用演变以及自由能变化等重要信息^[37]。因此, 网络药理学、分子对接和分子动力学模拟可为筛选肉苁蓉中防治肾毒性的潜在有效成分和作用机制提供基础。

动物模型为药物研发和毒理学研究提供了科学支撑, 不仅能揭示体内复杂的生理反应, 还能对环境毒物暴露后的药物筛选提供关键依据。然而, 与具备完整组织结构的动物模型相比, 传统 2D 细胞模型因缺乏微环境及细胞间空间构型, 难以系统反映体内多细胞相互作用的组织器官功能特点。在此背景下, 器官芯片 (Organ-on-a-chip, OOC) 的出现, 构建了一种组织与器官水平的新型体外研究模型, 为毒理学研究和药物筛选提供了全新解决方案, 使毒理机制解析与安全性评价能够在更接近人体真实生理微环境的体系中进行。OOC 是一种结合仿生生物学和微加工技术的微生理系统, 可以在微流控芯片上模拟人体器官。OOC 利用三维细胞培养和微流控技术构建微尺度人体组织和器官, 有助于解决细胞培养、动物模型与临床试验之间在药物安全性和有效性方面的差异, 从而加速新药研发^[38]。微流控系统是指能对微小体积流体进行操控的技术。这些系统通常由尺寸在数十至数百微米之间的通道构成, 可使流体在层流条件下流动, 并提供了一种在空间和时间上精准调控浓度的独特手段, 具有高灵敏度、高分辨率及更短分析时间等优点, 其样本与试剂消耗量极小, 从而降低了分析成本与设备体积。作为基于微流控平台发展而来的技术, OOC 已成为疾病模型构建与药物研发领域的重要工具^[39]。通过在动态微型装置中培养细胞, OOC 能更精准地模拟人类及其他哺乳动物器官的结构与生理复杂性^[38, 40]。例如, 杨圣通过急性、亚急性和亚慢性小鼠呼吸暴露模型以及 OOC 平台, 多个维度系统性地明确纳米塑料的肺损伤作用^[41]。

肾脏作为人体核心排泄器官, 肾单位的数量高达约一百万。每个肾单位均由一系列精密协作的微结构构成, 包括肾小球、近端肾小管、髓袢、远端肾小管以及集合管。这些结构共同通过肾小球滤过、肾小管重吸收和肾小管分泌三大核心步骤, 协同完成代谢废物的清除与内环境稳态的维持。肾 OOC 能够复现人体的器官功能, 包括功能性肾小