

本文引用: 董佳凝, 卫燕东, 赵怡蕊, 侯岚炜, 张鑫. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨“黄芪-桃仁-苦参”角药配伍抗肾纤维化的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(1): 31-41.

## 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨“黄芪-桃仁-苦参” 角药配伍抗肾纤维化的作用机制

董佳凝<sup>1</sup>, 卫燕东<sup>2</sup>, 赵怡蕊<sup>1,2\*</sup>, 侯岚炜<sup>1</sup>, 张鑫<sup>1</sup>

1.山西中医药大学第三临床学院,山西 晋中 030619;2.山西省中西医结合医院肾病科一病区,山西 太原 030000

**[摘要]** **目的** 探讨黄芪-桃仁-苦参(HTK)角药配伍抗肾纤维化(RF)的作用机制。**方法** 利用 TC MSP 和 Swiss Target Prediction 数据库筛选药物的活性成分及作用靶点;使用 GeneCard、OMIM、TTD 数据库检索 RF 的相关靶点;对收集的靶点和疾病靶点取其交集获得潜在作用靶点;通过 STRING 数据库构建靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络、DAVID 分析平台进行 GO 和 KEGG 信号通路富集分析。将 32 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、达格列净组和 HTK 组,除空白对照组外,其他 3 组先采用腺嘌呤连续灌胃 28 d 诱导 RF 大鼠模型,造模成功后,达格列净组和 HTK 组持续药物灌胃治疗 8 周,模型组和空白对照组给予等体积生理盐水灌胃。检测大鼠血尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)水平;HE 染色、Masson 染色、免疫组化观察大鼠肾脏病理变化;Western blot 检测肾组织中磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路对 RF 的调控作用。**结果** 网络药理学结果显示,HTK 治疗 RF 有 256 个潜在作用靶点,肿瘤蛋白 p53(TP53)、热激蛋白 90 $\alpha$ (HSP90 $\alpha$ )、Akt1 等核心靶点较为关键;KEGG 预测 HTK 可能通过癌症通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、PI3K/Akt 信号通路等发挥抗 RF 作用。动物实验结果显示,与空白对照组相比,模型组大鼠肾组织出现明显胶原纤维沉积,BUN、Scr 水平增高( $P<0.01$ ),I 型胶原蛋白(COL-I)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达升高( $P<0.01$ ),PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达升高( $P<0.01$ );与模型组相比,达格列净组、HTK 组肾组织胶原纤维沉积有所改善,BUN、Scr 水平下降( $P<0.01$ ),COL-I、 $\alpha$ -SMA 表达降低( $P<0.01$ ),PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。**结论** HTK 配伍可以改善肾纤维化,其作用机制可能与调节 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达促进胶原纤维降解有关。

**[关键词]** 肾纤维化;黄芪;桃仁;苦参;PI3K/Akt 信号通路;网络药理学

**[中图分类号]**R285.5

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.01.005

## Mechanism of action of the Huangqi (Astragali Radix)-Taoren (Persicae Semen)-Kushen (Sophorae Flavescentis Radix) tri-herb combination against renal fibrosis based on the PI3K/Akt signaling pathway

DONG Jianing<sup>1</sup>, WEI Yandong<sup>2</sup>, ZHAO Yirui<sup>1,2\*</sup>, HOU Lanwei<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1</sup>

1. The Third Clinical College of Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China; 2. The First Ward of Department of Nephrology, Shanxi Provincial Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine Hospital, Taiyuan, Shanxi 030000, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the mechanism of action of the Huangqi (Astragali Radix)-Taoren (Persicae Semen)-Kushen (Sophorae Flavescentis Radix) (HTK) tri-herb combination against renal fibrosis (RF). **Methods** Active ingredients and targets of

**[收稿日期]**2025-10-08

**[基金项目]**山西省卫生健康委员会中医药科研项目(2025ZYB032);山西省中医药管理局科研项目(2024ZYC028);山西中医药大学科技创新能力培育计划“国家自然科学基金培育专项”(2024PY-NS-008)。

**[通信作者]**\* 赵怡蕊,女,硕士,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:Zyr1007@126.com。

drugs were screened using the TCMSP and SwissTargetPrediction databases; RF-related targets were retrieved from the GeneCards, OMIM, and TTD databases; the intersection of drug targets and disease targets was identified to obtain potential therapeutic targets; a protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING database, and the GO and KEGG pathway enrichment analyses were performed using the DAVID analysis platform. Thirty-two SD rats were randomly divided into blank control, model, dapagliflozin, and HTK groups. Except for the blank control group, the other three groups were first induced with an RF rat model via continuous gavage administration of adenine for 28 days. After successful modeling, the dapagliflozin and HTK groups received continuous drug gavage treatment for 8 weeks, while the blank control and model groups were administered an equal volume of normal saline via gavage. Blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) levels were measured. Renal pathological changes were observed using HE staining, Masson's trichrome staining, and immunohistochemistry (IHC). Western blot analysis was performed to detect the regulatory role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway in RF. **Results** Network pharmacology results indicated 256 potential targets for HTK in treating RF. Core targets such as tumor protein p53 (TP53), heat shock protein 90 alpha (HSP90AA1), and protein kinase B1 (Akt1) were identified as crucial. KEGG prediction indicated that HTK exerted anti-RF effects through pathways including pathways in cancer, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance, and the PI3K/Akt signaling pathway. Animal experiments revealed that compared with the blank control group, rats in the model group exhibited significant collagen fiber deposition in renal tissue, elevated BUN and Scr levels ( $P<0.01$ ), increased expression of collagen type I (COL-I) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) ( $P<0.01$ ), and up-regulated protein expression of PI3K, p-PI3K, Akt, and P-Akt ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the dapagliflozin and HTK groups showed ameliorated renal collagen fiber deposition, decreased BUN and Scr levels ( $P<0.01$ ), reduced COL-I and  $\alpha$ -SMA expression ( $P<0.01$ ), and down-regulated protein expression of PI3K, p-PI3K, Akt, and P-Akt ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** HTK combination therapy can ameliorate renal fibrosis, and its mechanism of action may be related to promoting collagen fiber degradation through regulating the expression of proteins associated with the PI3K/Akt signaling pathway.

[**Keywords**] renal fibrosis; Huangqi (Astragali Radix); Taoren (Persicae Semen); Kushen (Sophorae Flavescentis Radix); PI3K/Akt signaling pathway; network pharmacology

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是全球死亡率最高的疾病之一,在世界范围内的患病率将近 10%<sup>[1]</sup>。肾纤维化(renal fibrosis, RF)是 CKD 逐步发展至终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)共同的病理表现,其形成机制较为复杂,普遍认为是以肾脏基本结构及功能逐渐丧失,成纤维细胞、肌成纤维细胞增殖及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积过多为特征,导致组织正常结构被破坏并出现瘢痕化,而纤维化则是持续瘢痕化的最终形态,最终将导致的衰竭<sup>[2]</sup>。尽管有高患病率、高发病率及高死亡率的特点,但是目前尚无彻底阻止或逆转 RF 进展的特效药物<sup>[3]</sup>。故延缓或者改善 RF 对于防止 CKD 患者快速进入 ESRD 有着积极意义。

中医药在改善和治疗 RF 方面已显示出明确的疗效<sup>[4]</sup>。黄芪、桃仁、苦参属于山西道地药材<sup>[5]</sup>,三者均有保护肾功能、延缓肾脏疾病进一步发展的作用。角药是在中医基础理论的指导下,根据中药的性味、归经特性,将三味中药进行有机结合的一种配伍形

式,具有“三足鼎立、互成犄角”的结构特点,通过协同增效与拮抗制约,实现增效减毒的目的<sup>[6-8]</sup>。角药的灵活运用在临床处方配伍上有着重要作用。然而,目前将这三味中药作为“角药”应用于 RF 治疗的研究仍较为有限。本课题组基于对 CKD 的中医学认识,结合国医大师张大宁教授“肾虚血瘀论”及“补肾活血法”理论,同时融合课题组赵怡蕊教授的多年临床经验,提出使用山西道地药材“黄芪-桃仁-苦参”(以下简称 HTK)角药配伍治疗 RF。本研究利用网络药理学分析进行预测,通过动物实验对预测结果进行验证,以系统探讨 HTK 角药配伍抗 RF 的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验药物

黄芪(批号:230817)、桃仁(批号:240501)、苦参(批号:240614),均购自山西振东道地药材开发有限公司。参考赵怡蕊教授临床常用配伍比例黄芪 30 g、

桃仁 10 g、苦参 10 g,即按 3:1:1 的比例称取。制备时,将药材加入 8 倍体积纯水浸泡 1 h 后进行首次煎煮,持续煎煮 1 h 后用纱布过滤并收集药液,相同药渣再次加入 6 倍体积纯水重复煎煮 1 h,过滤后合并两次药液,将所收集的药液浓缩至生药浓度为 1 g/mL,冷却后分装,置于 4 °C 冰箱中保存备用,使用前根据实验所需浓度进行稀释。

## 1.2 实验动物

选取 6~8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 32 只,体重(200±20) g,由鑫百诺生物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号 SYXK2024-0003(北京华阜康生物科技股份有限公司),普通饲料喂养,自由饮水,隔日更换垫料。在山西中医药大学动物房内合笼适应性饲养一周后开始实验。本实验方案已通过山西省中西医结合医院医学伦理委员会伦理审批(ZXYLLSC-2025-099)。

## 1.3 药品及主要试剂

腺嘌呤(货号:A8330-25g)购自北京索莱宝科技有限公司;PI3K 抗体(货号:20584-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;p-PI3K 抗体(货号:BS-6417R)购自北京博奥森生物技术有限公司;GAPDH 抗体(货号:GB15004)、Akt 抗体(货号:GB15689)、p-Akt(货号:GB15002)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(货号:GB23303)购自武汉赛维尔生物技术有限公司;达格列净片(批准文号:国药准字 HJ2017119,规格:10 mg/片,阿斯利康制药有限公司)。

## 1.4 主要仪器

Chemray 240 型全自动生化分析仪购自深圳雷杜生命科技股份有限公司;KZ-III-FP 型低温研磨仪、SLX-1024F 型高速低温离心机、SCG-W3000 型化学发光仪均购自武汉赛维尔生物科技公司;DC-1006 型低温恒温槽购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

# 2 方法

## 2.1 HTK 药物活性成分及靶点的获取

首先利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP,<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>),以“黄芪”“桃仁”“苦参”为检索词检索并收集三味中药的活性成分,设定口服生物利用度(oral bioavailability,

OB) ≥ 30%,药物相似性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 作为过滤条件进行靶点筛选,以此建立药物活性成分列表。再通过有机小分子生物活性数据库(PubChem,<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取以上 3 种药物活性成分的 SMILES 号,将其输入小分子药物靶点预测在线平台(SwissTargetPrediction)数据库中预测潜在靶点,整合三味药物的成分,除去缺少 PubChem ID 号以及缺少靶点蛋白预测信息的成分,最后得到的为 HTK 的有效药物活性成分。

## 2.2 疾病靶点的获取

以“Renal Fibrosis”为检索词,分别在人类基因的综合数据库(GeneCards,<https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM,<https://www.omim.org/>)、药物靶标数据库(TTD,Therapeutic Target Database,<https://db.idrblab.net/ttd/>)中检索 RF 的相关靶点,对收集到的结果进行整合并去除重复项,最终获得 RF 的疾病相关靶点集合。

## 2.3 交集靶点筛选

将 HTK 相关活性成分靶点和 RF 疾病靶点经去重处理后,导入 Venny 2.1.0 在线平台(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)绘制韦恩图,两者的交集靶点即为 HTK 治疗 RF 的潜在作用靶点。

## 2.4 “药物-活性成分-靶点”网络构建

将全部交集靶点导入 Cytoscape 3.10.2 软件,构建出“药物-活性成分-靶点”相关互作网络。借助 CytoNCA 插件计算节点度值(Degree)等进行拓扑分析。该网络中,节点表示药物、活性成分与靶点,边表示节点与节点之间的相互作用关系,节点的度值反映其连接边的数目,靶点的度值越高,则说明该靶点在该网络中的重要性越突出。

## 2.5 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)核心靶点的构建与筛选

将交集靶点导入 PPI 网络平台(String,<https://cn.string-db.org/>)数据库中,构建 PPI 网络,物种设置为“Homo sapiens”(智人),最低交互作用置信度设置为 0.700(中置信度),将生成的 TVS 格式文件导入 Cytoscape 软件,借助 CytoNCA 插件对其进行拓扑分析。最终选择排名前 30 的靶点作为核心靶点进行可视化展示。

## 2.6 GO 功能、KEGG 富集分析

在 DAVID (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>)

数据库中输入筛选后的交集靶点,进行 GO 和 KEGG 富集分析,选择“functional annotation”,限定靶基因为“Homo sapiens”,将结果按照 *P* 值从小到大排序,进行 GO 分析,在生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cell component, CC)、分子功能(molecular function, MF)3 个类别中筛选排名前 10 位的条目,KEGG 分析排名前 20 位的条目通过微信在线平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)绘图实现可视化展示。

### 2.7 动物模型的制备及分组干预

将大鼠适应性喂养 1 周,随机选 8 只为空白对照组,其余组大鼠通过 200 mg/kg 剂量的腺嘌呤造模,在 100 mL 生理盐水中加入 2.5 g 腺嘌呤,制成浓度为 2.5%的腺嘌呤悬浮液,灌胃给药,剂量为 200 mg/kg (即 0.8 mL/100 g)连续 28 d 灌胃法造模处理。对造模后大鼠进行检测,肾脏外观呈现明显灰白色,Scr、BUN 结果相较于空白对照组均有所升高,HE 和 Masson 病理染色结果显示肾组织存在结构异常和胶原纤维沉积,提示 RF 模型构建成功。将造模成功后的大鼠随机分为模型组、达格列净组、黄芪-桃仁-苦参(HTK)组。

灌胃剂量根据人和动物(大鼠)体表面积换算等效剂量法<sup>[11]</sup>,按照 60 kg 成人进行给药剂量换算,HTK 组根据赵怡蕊教授常用临床用量,给予中药水煎液灌胃 5.25 g/kg,达格列净组给予达格列净灌胃 1 mg/kg,空白对照组及模型组给予生理盐水,连续 8 周,根据体质量变化调整灌胃剂量。最后一次灌胃后 12 h 禁食不禁水,麻醉后取腹主动脉血,处死大鼠取肾组织。肾组织先去除周围结缔组织,用生理盐水进行冲洗,吸干水分后使用电子天平称定肾脏质量用来计算肾脏系数。左肾用 4%多聚甲醛溶液固定,右肾用液氮速冻后于-80 °C 冰箱储存。

### 2.8 肾功能检测

取大鼠腹主动脉血,先室温静置 2 h 后,4 °C、3 500 r/min 离心 10 min,离心半径 8.5 cm,取上层血清,分装置于-80 °C 保存用于后续检测。应用全自动生化仪检测大鼠血肌酐(serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平。

### 2.9 肾组织病理学观察

将大鼠左侧肾脏用 4%多聚甲醛溶液固定 24 h 以上,经过石蜡包埋、切片等步骤后,分别进行 HE

及 Masson 染色,封片后在光学显微镜下观察肾脏组织病理学改变并进行拍照。采用 ImageJ 1.54 软件对图像进行分析。

### 2.10 免疫组化染色法

将肾组织石蜡切片进行脱蜡至水、抗原修复、PBS 冲洗封闭操作,然后加入一抗( $\alpha$ -SMA、Collagen I,稀释比例为 1:200),4 °C 孵育过夜,次日加入二抗,室温孵育、显色后在显微镜下观察。

### 2.11 Western blot 检测

取冻存的肾组织,剪碎后加入含蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀分析缓冲液,充分匀浆后置于冰上低温裂解,在 4 °C 条件下,12 000 r/min 离心 15 min,离心半径 8.5 cm,离心收集上清液,采用 BCA 蛋白定量统一样本浓度,用 10% PAGE 凝胶,制胶后加入蛋白样品,经电泳、转膜、封闭后,加入配制好的一抗 PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、Akt(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)和 GAPDH(1:10 000),4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,HRP 标记二抗(1:5 000),室温孵育 1 h。再次洗膜后,ECL 进行显影,使用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值。

### 2.12 统计学分析

数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 22.0 软件对数据分析处理,GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计作图。若符合正态分布且方差齐时,多组间比较应用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较使用 LSD-*t* 检验;若不符合正态分布,采用非参数检验;以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 网络药理学结果

3.1.1 HTK 药物活性成分及靶点 在 TCMSP 和 PubChem 数据库中共获得黄芪 20 个活性成分、桃仁 23 个活性成分、苦参 44 个活性成分,将 HTK 活性成分靶点通过 SwissTargetPrediction 筛选,去重后共得到有效靶点 740 个。

3.1.2 疾病靶点 将 GeneCards、OMIM、TTD 数据库获取的 RF 相关靶点整合去除重复项,其中 GeneCards 数据库结果根据 Relevance score 取其中位数,选取  $\geq 5.89$  的靶点,最后共获得 2 485 个相关靶点。

3.1.3 药物-疾病共同靶点 通过 Venny 2.1.0 平台映射取药物与疾病交集靶点,得出共同靶点 256 个。详见图 1。

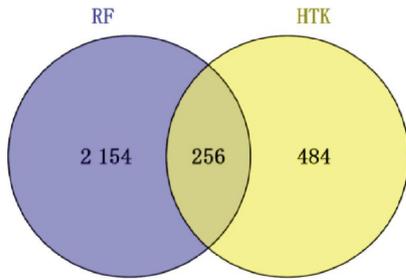


图1 HTK与RF交集靶点韦恩图

Fig.1 Venn diagram of intersecting targets between TTK and renal fibrosis

3.1.4 药物-活性成分-疾病交集靶点网络构建及核心成分筛选 将HTK治疗RF的潜在作用靶点输入Cytoscape 3.10.2软件,构建“药物-活性成分-疾病交集靶点”网络图。借助CytoNCA插件计算出该网络共有343个节点、2302条边。根据拓扑参数中的Degree值分析,排名前5的活性成分分别为槲皮素、熊竹素、异鼠李素、黄芪紫檀烷苷、木犀草素,推测上述活性成分可能是HTK治疗过程中发挥作用的关键成分。详见图2。

3.1.5 有效成分-靶点-疾病靶点的PPI 将上述256个交集靶点输入STRING数据库构建PPI网络,通过Cytoscape 3.10.2软件内置插件对PPI网络数

据进行分析。根据以下阈值筛选核心靶点:Betweenness(中介中心性) $>540.1$ 、Closeness(接近中心性) $>0.001$ 、Degree(点度中心性) $>13.6$ 。其中,根据Degree值选择排名前10的靶点作为关键核心靶点,分别为肿瘤蛋白p53(tumor protein P53, TP53)、Src蛋白(Src protein, SRC)、信号转导及转录活化因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、联蛋白 $\beta 1$ (axin1/beta-catenin, CTNNB1)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、热激蛋白90 $\alpha$ (heat shock protein 90- $\alpha$ , HSP90 $\alpha$ )、Akt激酶1(Akt kinase-1, Akt1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumour necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、B细胞淋巴瘤-2基因(B cell lymphoma 2 gene, BCL2)、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )。详见图3、表1。

3.1.6 GO功能与KEGG通路富集分析 通过DAVID数据库对256个交集靶点进行GO功能分析与KEGG通路富集分析。GO富集结果显示,BP共获得884个,主要包括EGFR信号通路、胰岛素样生长因子受体信号通路、PI3K/Akt信号通路转导的正向调

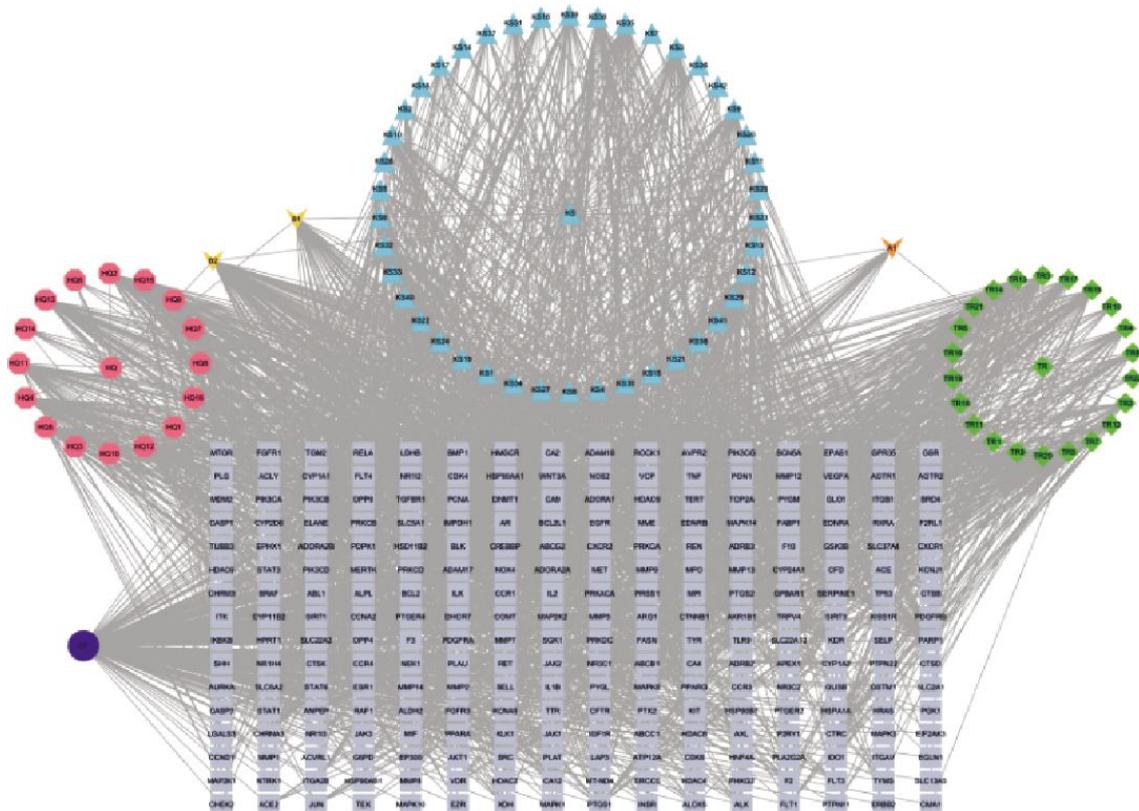


图2 药物-活性成分-疾病交集靶点网络图

Fig.2 Network diagram of drug-active ingredient-disease intersection target

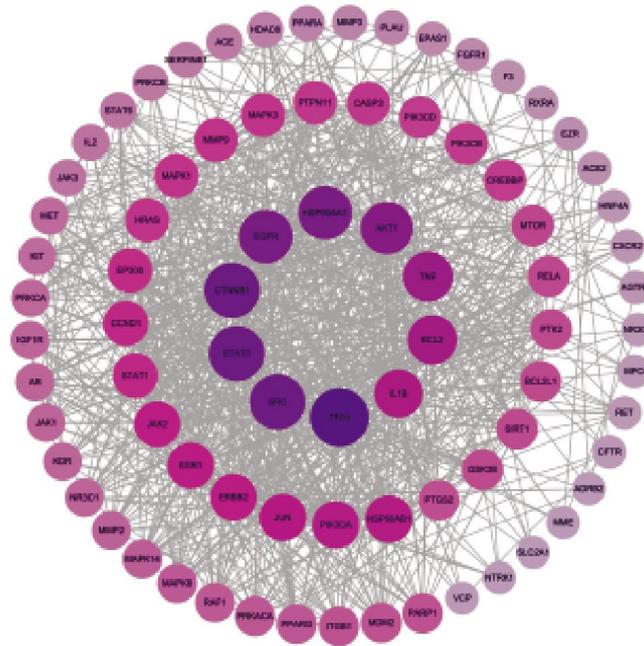


图 3 PPI 网络图

Fig.3 PPI network graph

表 1 排名前 10 的核心靶点拓扑参数分析

Table 1 Topological parameter analysis of top 10 core targets

NO.	靶点名称	Betweenness	Closeness	Degree
1	TP53	5 263.189	0.538	80
2	STAT3	2 638.044	0.528	71
3	CTNNB1	3 687.785	0.528	71
4	SRC	4 850.132	0.528	71
5	EGFR	2 874.897	0.524	66
6	HSP90AA1	3 608.797	0.521	66
7	Akt1	1 811.299	0.513	62
8	TNF	4 641.780	0.508	56
9	BCL2	1 872.808	0.506	54
10	IL-1 $\beta$	3 593.124	0.497	51

控;CC 共获得 106 个,主要包括受体复合物、细胞质膜、细胞外泌体;MF 共获得 147 个,主要包括组蛋白 H3Y41 激酶活性、组蛋白 H2AXY142 激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性;KEGG 通路共 178 个,主要包括癌症通路、前列腺癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、癌细胞中的糖多蛋白、PI3K/Akt 信号通路、内分泌抵抗等。结果显示,HTK 可能是通过上述信号通道发挥抗 RF 作用的。详见图 4。

### 3.2 动物实验结果

#### 3.2.1 HTK 对 RF 大鼠肾脏系数的影响 与空白对

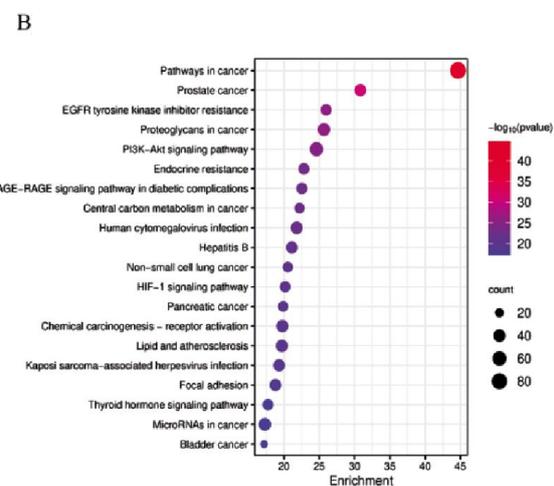
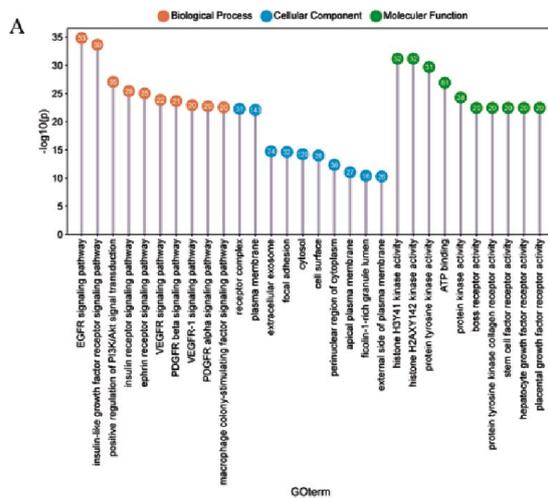


图 4 GO 功能与 KEGG 通路富集分析图

Fig.4 Diagram of GO function and KEGG pathway enrichment analysis

注:A.GO 富集分析图;B.KEGG 通路气泡图。

对照组相比,模型组大鼠的体质量降低( $P<0.05$ ),肾脏质量和肾脏系数升高( $P<0.01$ );与模型组相比,达格列净组和HTK组肾脏质量和肾脏系数降低( $P<0.01$ )。详见图5。

3.2.2 HTK对RF大鼠血BUN、Scr水平的影响 与空白对照组相比,模型组BUN、Scr水平升高( $P<0.01$ );与模型组相比,达格列净组和HTK组BUN、Scr均下降( $P<0.01$ )。详见表2。

表2 HTK对RF大鼠血BUN、Scr水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Effects of HTK on Serum BUN and Scr levels in RF Rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	BUN/(mmol/L)	Scr/( $\mu$ mol/L)
空白对照组	4.63 $\pm$ 0.54	45.85 $\pm$ 2.04
模型组	43.92 $\pm$ 5.9**	169.36 $\pm$ 17.42**
达格列净组	23.06 $\pm$ 5.33 <sup>#</sup>	80.63 $\pm$ 16.95 <sup>#</sup>
HTK组	23.65 $\pm$ 4.82 <sup>#</sup>	84.86 $\pm$ 10.96 <sup>#</sup>

注:与空白对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.01$ 。

3.2.3 HTK对RF大鼠肾组织外观及病理学的影响

与空白对照组相比,模型组大鼠肾脏呈大白肾外观,整体呈灰白色,表面可见大量白色颗粒分布,质

地坚实,肾脏表面包膜与肾组织结合不紧密,易剥落;与模型组相比,达格列净组与HTK组大鼠肾脏表面的白色颗粒覆盖面积减少。详见图6。

HE染色显示,与空白对照组相比,模型组大鼠肾小球体积扩张,肾小管萎缩,肾小管上皮细胞出现空泡变性坏死,细胞核位置异常,肾小管间质中有大量炎症细胞浸润并有淡红色淀粉样物质沉积;与模型组比较,各给药组大鼠的肾损伤在不同程度上均改善,空泡现象稍减轻,肾间质纤维化以及炎症细胞的浸润有所减少。

Masson染色显示,与空白对照组比较,模型组肾组织中的蓝色胶原纤维沉积明显,系膜区、管腔结构扩大;与模型组比较,各给药组胶原纤维沉积均减少。详见图7。

3.2.4 免疫组化染色法观察肾组织Collagen I、 $\alpha$ -SMA的表达 与空白对照组相比,模型组、达格列净组和HTK组大鼠COL-I、 $\alpha$ -SMA水平升高( $P<0.01$ );与模型组相比,达格列净组和HTK组上述指标降低( $P<0.01$ )。详见图8、表3。

3.2.5 HTK对RF大鼠模型肾组织PI3K/Akt通路的影响 KEGG通路富集分析显示,PI3K/Akt信号

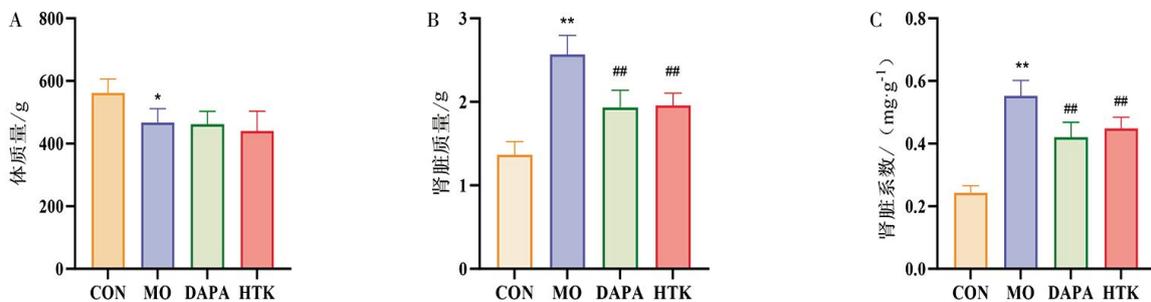


图5 HTK对RF大鼠体质量(A)、肾脏质量(B)和肾脏系数(C)的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Fig.5 Effects of HTK body weight (A), kidney weight (B), and kidney index (C) ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

注:CON.空白对照组;MO.模型组;DAPA.达格列净组;HTK.HTK组。与空白对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.01$ 。

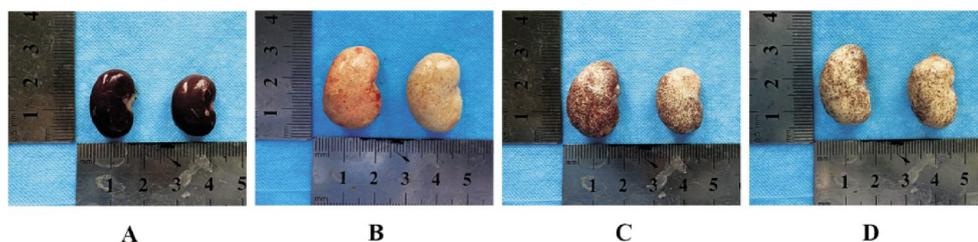


图6 HTK对RF大鼠肾脏外观的影响

Fig.6 Effects of HTK on the renal appearance in RF rats

注:A.空白对照组;B.模型组;C.达格列净组;D.HTK组。

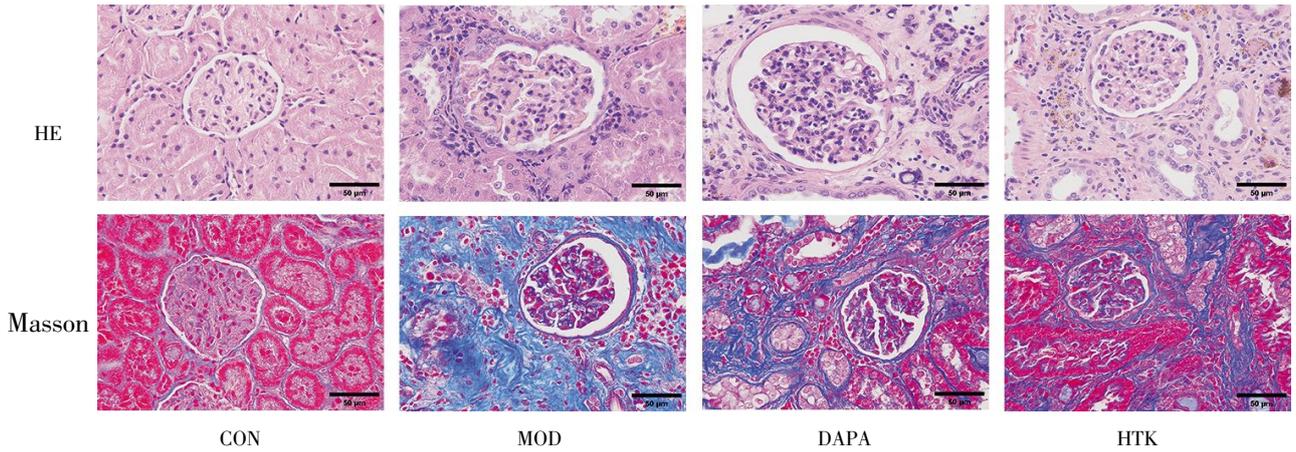


图 7 HTK 对 RF 大鼠肾组织病理学影响(×400, 标尺=50 μm)

Fig.7 Pathological effects of HTK on renal tissue in RF rats (×400, scale bar = 50 μm)

注: CON.空白对照组; MOD.模型组; DAPA.达格列净组; HTK.HTK 组。

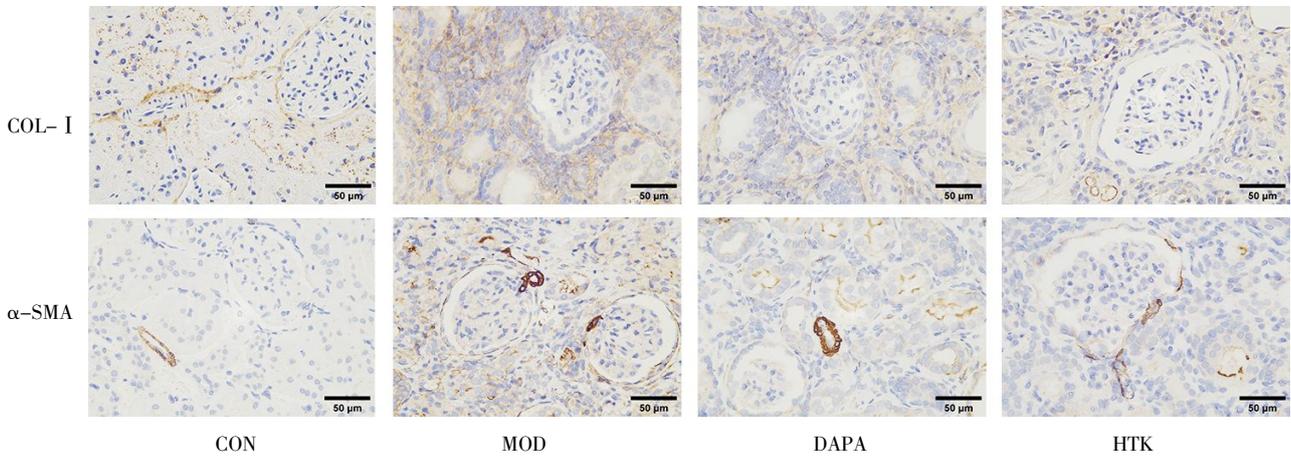


图 8 各组大鼠肾组织 COL-I、α-SMA 免疫组化(×400, 标尺=50 μm) ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig.8 Immunohistochemical staining for COL-I and α-SMA in renal tissue of rats in different groups (×400, scale bar = 50 μm) ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

注: CON.空白对照组; MOD.模型组; DAPA.达格列净组; HTK.HTK 组。

表 3 各组大鼠肾脏免疫组织化学染色 COL-I、α-SMA 表达(Area, %) ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Immunohistochemical staining for COL-I and α-SMA expression in renal tissues of rats in different groups (Area, %) ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	COL-I	α-SMA
空白对照组	2.86±0.52	0.60±0.14
模型组	33.06±3.80**	4.07±0.56**
达格列净组	18.88±1.42***	2.02±0.53***
HTK 组	18.72±2.72***	1.84±0.24***

注: 与空白对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比较, \*\*\* $P < 0.01$ 。

通路可能是参与 HTK 抗 RF 的关键通路, 基于此, 采用 Western blot 评估 HTK 的干预对 PI3K/Akt 信号通路的影响。结果表明, 与空白对照组相比, 模型组、达格列净组和 HTK 组 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 的

蛋白表达均上升( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 达格列净组与 HTK 组 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白的表达均下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。详见图 9、表 4。

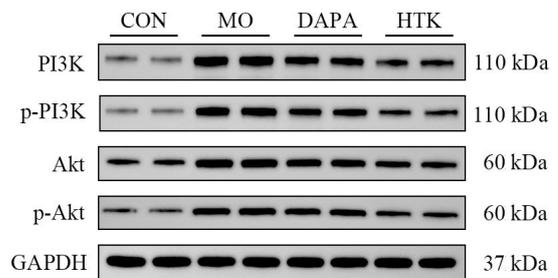


图 9 HTK 对 RF 大鼠肾组织中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达的影响

Fig.9 Effects of HTK on the protein expression of PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt in renal tissue of RF rats

注: CON.空白对照组; MO.模型组; DAPA.达格列净组; HTK.HTK 组。

表4 HTK对RF大鼠肾组织中PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=4$ )Table 4 Effects of HTK on the protein expression of PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt in renal tissue of RF rats ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	PI3K/GAPDH	p-PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH
空白对照组	0.56±0.01	0.51±0.02	0.64±0.04	0.51±0.04
模型组	0.97±0.04**	0.97±0.03**	0.90±0.04**	0.74±0.04**
达格列净组	0.84±0.04***	0.85±0.04***	0.80±0.03**	0.67±0.03**
HTK组	0.73±0.06***	0.72±0.03***	0.76±0.04***	0.64±0.02***

注:与空白对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.01$ 。

## 4 讨论

RF的发生涉及多种途径,RF普遍被认为是几乎所有CKD发展的共同病理途径。肾组织损伤发生纤维化的过程实质是正常伤口愈合进程中的病理延伸。但随着CKD的进展导致纤维化基质的沉积逐渐失去控制,ECM、肌成纤维细胞在肾小管间质中大量积聚,组织局部血液供应减少、肾脏自我修复能力降低,最终导致肾脏结构的破坏甚至肾衰竭<sup>[12-13]</sup>。

钠-葡萄糖协同转运蛋白2抑制剂(SGLT2i)达格列净是一种口服降糖药,通过抑制近端肾小管中SGLT2的表达,减少葡萄糖的重吸收,从而减轻炎症和RF标志物的产生<sup>[14]</sup>。近年非糖尿病CKD的研究结果证明,达格列净可以改善非糖尿病患者心血管和肾脏疾病的预后<sup>[15]</sup>,通过减少炎症浸润、改善肾小管扩张起到抗纤维化作用<sup>[16-17]</sup>。

中医古籍中并未有“慢性肾脏病”或“肾纤维化”病名的记载,但据其临床表现可归于“肾劳”“水肿”“肾络癥瘕”等范畴<sup>[18]</sup>。CKD病程长,肾病日久致脏腑亏虚,耗损阳气累及脾肾,脾阳不足,运化失司,肾阳不振,气化不行,气机运行不畅导致水湿、痰浊、瘀血及浊毒等逐渐蓄积壅塞三焦,进而瘀阻于肾络,最终导致肾功能减退<sup>[19-21]</sup>。肾阳虚是本病根本,肾虚血瘀、浊毒内蕴是基本病机<sup>[22-23]</sup>。基于张大宁教授治疗CKD“补肾、活血、通腑排毒”的理论<sup>[24]</sup>,本课题组将黄芪、桃仁和苦参三味“晋药”相组合。黄芪味甘,性微温,具有健脾益卫、利尿托毒等功效,其中富含黄芪皂苷、槲皮素等多种活性成分,有抗炎、心肾保护等方面的作用<sup>[25]</sup>;桃仁味苦、甘,性平,具有破血逐瘀消癥、润肠止咳的功效,苦杏仁苷为其主要的有效成分,有一定的毒性,具有抗炎、心肾保护等多种药理作用<sup>[26-28]</sup>;苦参味苦、性寒,具有清热燥湿、利尿的功

效,生物碱类是其最主要的活性成分,在治疗肾脏炎症及纤维化方面都具有良好的活性<sup>[29-30]</sup>。HTK的配伍中使用大量黄芪,取益气温阳、健脾补肾之效,因其为补气诸药之最,能补益一身之阳,又具有生津补血的作用,符合“阴中求阳”之意;桃仁的应用重在活血消癥、兼以补肾;苦参清利湿热、分消湿瘀浊毒,使恢复水道的正常运行。三药配伍,补肾益气、升阳健脾以治本,利尿祛湿、化瘀解毒以治标,以求达到扶正祛邪、调和阴阳、恢复肾脏功能的目的。

本研究首先采用网络药理学的方法,预测HTK角药配伍改善RF的潜在作用靶点以及信号通路。网络结果显示,核心活性成分槲皮素、熊竹素、异鼠李素、黄芪紫檀烷苷、木犀草素与TP53、SRC、STAT3、CTNNB1、EGFR、HSP90 $\alpha$ 、Akt1等核心靶点关联度较高。SRC的磷酸化会促进PI3K/Akt信号途径的传导<sup>[31]</sup>;EGFR是一种受体酪氨酸激酶,存在于多种肾脏细胞类型中,当EGFR被激活时,将通过下游通路PI3K/Akt进一步转导促进RF的发展<sup>[32]</sup>;STAT3是一种转录因子,有抗纤维化的作用,抑制STAT3可以降低PI3K/Akt的表达<sup>[33]</sup>。GO功能富集结果表明,HTK治疗RF主要与EGFR信号通路、胰岛素样生长因子受体信号通路及PI3K/Akt信号通路转导的正向调控密切相关。KEGG富集结果也表明,靶点主要富集在癌症、PI3K/Akt等信号通路。结合以上结果,可以推测HTK中的活性成分可能是通过抑制PI3K/Akt通路而发挥抗RF的作用。

PI3K/Akt信号通路参与调控多种生理过程,在肾脏疾病中,该通路可以通过调节炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍等环节,对肾脏功能具有改善作用<sup>[34-36]</sup>。PI3K是一种胞内脂质激酶,可分为三类,其中最被广泛研究的是I类PI3K,由p110催化亚基和p85调节亚基两种亚基所构成的异源二聚体<sup>[37]</sup>,通过激活下游的酪氨酸激酶发挥其作用,调节亚基

p85 能够与含有相应结合位点的靶蛋白发生相互作用,传递各种细胞信号<sup>[38]</sup>。当细胞受到外部刺激,PI3K 接收到上游信号,催化亚基 p110 将磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸二钠转催化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,进而促使 Akt 从细胞质转移到内膜激活和磷酸化<sup>[39]</sup>。作为 PI3K 的下游靶标,Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,有 Akt1、Akt2 和 Akt3 三种亚型,可以响应 PI3K 的信号而被激活,其中 Akt1 是表达最为广泛的亚型<sup>[40]</sup>。研究发现,PI3K/Akt 信号通路与 RF 的形成密切相关<sup>[41-42]</sup>,Akt 可以介导肾细胞线粒体自噬和 EMT,是改善 RF 的关键靶点<sup>[43]</sup>。抑制该信号通路的激活可下调纤维化相关蛋白的表达,并抑制 EMT 进程,从而发挥抗 RF 的作用<sup>[44-45]</sup>。

本研究通过动物实验探讨 HTK 是否可以通过 PI3K/Akt 信号通路延缓 RF。采用腺嘌呤灌胃法诱导 RF 大鼠模型,并予以达格列净及 HTK 中药煎液灌胃进行干预,观察 HTK 对 RF 的改善作用。生化结果表明,大鼠血清中 BUN 和 Scr 水平在 HTK 治疗后显著降低;HE、Masson、免疫组化染色结果显示,HTK 能够有效改善大鼠的 RF 发展,并且 HTK 能显著抑制 PI3K、Akt 以及其磷酸化的蛋白表达,从而抑制 PI3K/Akt 信号通路。由此,HTK 可能通过对 PI3K/Akt 信号通路的抑制发挥对 RF 的改善作用。

综上所述,本研究基于网络药理学对 HTK 角药配伍治疗 RF 的作用机制进行预测,通过动物实验验证了 HTK 改善大鼠 RF 的机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路相关,为角药配伍治疗 RF 提供了理论依据。尽管本研究主要集中在 PI3K/Akt 信号通路,但是网络药理学结果也揭示了 HTK 配伍干预 RF 是一个多靶点、多途径的复杂过程,PI3K/Akt 信号通路是一个重要的信号枢纽,和其他靶点一起形成一个相互串扰而复杂的交叉网络,协同调控疾病的进程。但是本研究也存在若干限制,并未进一步说明 HTK 通过 PI3K/Akt 信号通路调控 RF 的具体过程,也缺少对其他关键靶点的验证。后续本课题组拟进一步进行体外实验,探讨 HTK 作用于 RF 过程的详细机制,促进“晋药”基础研究向临床转化。

## 参考文献

- [1] BELLO A K, OKPECHI I G, LEVIN, ADEERAYE, et al. An update on the global disparities in kidney disease burden and care across world countries and regions[J]. *Lancet Global Health*, 2024, 12(3): e382-e395.
- [2] YAMASHITA N, KRAMANN R. Mechanisms of kidney fibrosis and routes towards therapy[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2024, 35(1): 31-48.
- [3] RUIZ-ORTEGA M, RAYEGO-MATEOS S, LAMAS S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2020, 16(5): 269-288.
- [4] XU H, WU T, HUANG L. Therapeutic and delivery strategies of phytoconstituents for renal fibrosis[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 177: 113911.
- [5] 秦雪梅, 李爱平, 李科, 等. 山西黄芪产业发展思考[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(24): 4670-4674.
- [6] 宋春生, 陈志威, 赵家有. “三足鼎立”角药临床研究概述[J]. *北京中医药*, 2017, 36(3): 282-284.
- [7] 李剑颖. 《伤寒杂病论》中“角药”应用分析[J]. *中医临床研究*, 2012, 4(4): 32-33.
- [8] 赵嘉敏, 许桐, 王宁, 等. 基于术数“三”探讨角药的配伍规律[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(9): 5448-5450.
- [9] LI Y, CHEN S, YANG Q, et al. The ANGPTL4-HIF-1 $\alpha$  loop: a critical regulator of renal interstitial fibrosis[J]. *Journal of translational medicine*, 2024, 22(1): 649.
- [10] 秦鹏, 厉珊. 积雪草苷调节 Hippo-YAP 信号通路对慢性肾衰竭大鼠肾纤维化的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2025, 41(9): 2172-2178.
- [11] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010(5): 52-53.
- [12] LONG Y, NIU Y D, LIANG K N, et al. Mechanical communication in fibrosis progression[J]. *Trends in Cell Biology*, 2022, 32(1): 70-90.
- [13] HUMPHREYS B D. Mechanisms of renal fibrosis[J]. *Annual Review of Physiology*, 2018, 80: 309-326.
- [14] DEL VECCHIO L, BERETTA A, JOVANE C, et al. A role for SGLT-2 inhibitors in treating non-diabetic chronic kidney disease[J]. *Drugs*, 2021, 81(13): 1491-1511.
- [15] WHEELER D C, STEFANSSON B V, BATIUSHIN M, et al. The dapagliflozin and prevention of adverse outcomes in chronic kidney disease (DAPA-CKD) trial: Baseline characteristics[J]. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 2020, 35(10): 1700-1711.
- [16] CASTOLDI G, CARLETTI R, IPPOLITO S, et al. Renal anti-fibrotic effect of sodium glucose cotransporter 2 inhibition in angiotensin II-dependent hypertension[J]. *American Journal of Nephrology*, 2020, 51(2): 119-129.
- [17] JAIKUMKAO K, PONGCHAIDECHA A, CHUEAKULA N, et al. Dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor, slows the progression of renal complications through the suppression of renal inflammation, endoplasmic reticulum stress and apoptosis

- in prediabetic rats[J]. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 2018, 20(11): 2617-2626.
- [18] 李雪, 高菁, 郑时静, 等. 肾络癥瘕辨证方法及其临床应用[J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47(8): 1049-1054.
- [19] 王钢, 周恩超, 易岚, 等. 邹氏肾科治肾学术传承及经验概要[J]. *南京中医药大学学报*, 2024, 40(10): 1087-1096.
- [20] 曾静静, 杨冠琦, 吕静. “伏毒损络”论治慢性肾脏病研究进展[J]. *天津中医药大学学报*, 2025, 44(6): 571-576.
- [21] 李克勤, 邢建月, 孙宝林, 等. 刘光珍教授从“浊”论治慢性肾脏病思想刍议[J]. *世界中西医结合杂志*, 2025, 20(1): 103-106.
- [22] 张兴坤, 何学志, 苗鹏伟, 等. 国医大师张大宁温阳法论治慢性肾脏病思想管窥[J]. *中华中医药杂志*, 2025, 40(6): 2879-2882.
- [23] 王霄轩, 何桥, 孙文督, 等. 国医大师张大宁运用补肾活血法治疗慢性肾小管间质性肾炎经验[J]. *环球中医药*, 2025, 18(2): 262-265.
- [24] 田妮, 邓媛媛, 董少宁, 等. 基于补肾活血法探讨国医大师张大宁教授运用角药治疗慢性肾脏病的经验[J]. *中国当代医药*, 2024, 31(34): 69-73, 78.
- [25] ZHANG Y Y, CHEN Z J, CHEN L P, et al. Astragali Radix (Huangqi): A time-honored nourishing herbal medicine[J]. *Chinese Medicine*, 2024, 19(1): 119.
- [26] 李想, 刘庆, 高晨, 等. 苦杏仁苷对肾纤维化大鼠的保护作用及其机制[J]. *医药导报*, 2022, 41(9): 1282-1289.
- [27] HE X Y, WU L J, WANG W X, et al. Amygdalin—A pharmacological and toxicological review[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 254: 112717.
- [28] 张妍妍, 韦建华, 卢澄生, 等. 桃仁化学成分、药理作用及质量标志物的预测分析[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(1): 234-241.
- [29] 孙起超, 康云红, 徐静, 等. 苦参碱药理作用、毒性及临床应用研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2024, 31(11): 191-197.
- [30] 代云莉, 彭灿, 梁丹, 等. 氧化苦参碱减轻糖尿病肾病小鼠肾组织炎症及纤维化反应的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(6): 31-37.
- [31] 周曼, 吴军, 干定云, 等. HGF通过p-Src调控MAPK/PI3K/Akt信号通路介导HepG2细胞胰岛素抵抗的作用机制[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(15): 3782-3787.
- [32] CAO S R, PAN Y, TERKER A S, et al. Epidermal growth factor receptor activation is essential for kidney fibrosis development[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 7357.
- [33] LEE S H, KIM K H, LEE S M, et al. STAT3 blockade ameliorates LPS-induced kidney injury through macrophage-driven inflammation[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2024, 22(1): 476.
- [34] YAO L, LIANG X H, LIU Y M, et al. Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone ameliorates mitochondrial dysfunction via PI3K/Akt/ENOS signaling pathway in diabetic tubulopathy[J]. *Redox Biology*, 2023, 68: 102946.
- [35] LIU Y L, GONG S T, LI K J, et al. Coptisine protects against hyperuricemic nephropathy through alleviating inflammation, oxidative stress and mitochondrial apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 156: 113941.
- [36] WANG D Z, JIN M Y, ZHAO X Y, et al. FGF1ΔHBS ameliorates chronic kidney disease via PI3K/Akt mediated suppression of oxidative stress and inflammation[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(6): 464.
- [37] CANTLEY L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [38] WANG J C, HU K L, CAI X Y, et al. Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(1): 18-32.
- [39] YANG C Z, WANG S H, ZHANG R H, et al. Neuroprotective effect of astragalin via activating PI3K/Akt-mTOR-mediated autophagy on APP/PS1 mice[J]. *Cell Death Discovery*, 2023, 9(1): 15.
- [40] KIM D, CHUNG J. Akt: Versatile mediator of cell survival and beyond[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 35(1): 106-115.
- [41] WANG Z, JIAN G H, CHEN T, et al. The Qi-Bang-Yi-Shen formula ameliorates renal dysfunction and fibrosis in rats with diabetic kidney disease via regulating PI3K/Akt, ERK and PPAR $\gamma$  signaling pathways[J]. *European Journal of Histochemistry*, 2023, 67(1): 3648.
- [42] LI R, SHI C R, WEI C T, et al. Fufang Shenhua tablet inhibits renal fibrosis by inhibiting PI3K/Akt[J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154873.
- [43] WANG Y, PING Z L, GAO H X, et al. LYC inhibits the Akt signaling pathway to activate autophagy and ameliorate TGF $\beta$ -induced renal fibrosis[J]. *Autophagy*, 2024, 20(5): 1114-1133.
- [44] TUOHETI K, BAI X, YANG L, ET AL. Forsythiaside A suppresses renal fibrosis and partial epithelial-mesenchymal transition by targeting THBS1 through the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 129: 111650.
- [45] YANG F, LI T, ZHANG X, et al. Screening of active components in Astragalus mongholicus Bunge and Panax notoginseng formula for anti-fibrosis in CKD: nobil etin inhibits I $\alpha$ 1/PI3K/AKT signaling to improve renal fibrosis[J]. *Renal Failure*, 2024, 46(2): 2375033.

(本文编辑 苏维)