

基于网络药理学与实验验证探讨二至丸调控 PI3K/Akt/PFKFB3 通路改善肾纤维化作用

汪 娴¹, 朱彤彤¹, 张泽鹏², 金同庆^{2*}

1. 昆山市中西医结合医院, 江苏 苏州 215300

2. 昆山市中医医院, 江苏 苏州 215300

摘要: **目的** 通过网络药理学、分子动力学模拟及动物实验, 探讨二至丸通过抑制异常糖酵解改善肾纤维化的作用机制。**方法** 从 TCMSP、ETCM、BATMAN-TCM 数据库获得二至丸的活性成分并预测作用靶点; 结合 GeneCards、DisGeNET、DrugBank 数据库获取肾纤维化交集靶点。构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络筛选核心靶标, 并进行基因本体 (GO) 与京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。利用 AutoDock Vina 和 Gromacs 2022 软件对核心成分与靶标进行分子对接及分子动力学模拟。建立腺嘌呤诱导的大鼠肾纤维化模型, 予以二至丸 (1.5、3.0 g/kg) 及氯沙坦干预。检测大鼠肾功能指标 [血清肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、24 h 尿蛋白]; 采用 HE、Masson 染色及免疫组化评估肾组织损伤与纤维化指标 [α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、波形蛋白 (Vimentin)]; 采用 Western blotting 检测肾组织磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 磷酸化及糖酵解关键酶 [6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3 (PFKFB3)、己糖激酶 2 (HK2)、葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、丙酮酸激酶 M2 型 (PKM2)] 蛋白表达。**结果** 网络药理学筛选获得 16 个活性成分, 与肾纤维化交集靶点 297 个。PPI 网络识别出木犀草素、山柰酚等核心成分, 以及 Akt1、PFKFB3、低氧诱导因子-1A (HIF-1A) 等核心靶点。KEGG 分析显示二至丸主要通过调控 PI3K/Akt 信号通路发挥作用。分子对接及动力学模拟结果显示, 木犀草素与糖酵解关键酶 PFKFB3 结合能最低且在 100 ns 模拟中结合构象极其稳定。动物实验表明, 二至丸能显著降低模型大鼠 Scr、BUN、24h UP 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 改善肾小管扩张及间质胶原沉积, α -SMA、Vimentin 表达显著下调 ($P < 0.01$)。Western blotting 结果显示, 二至丸组大鼠肾组织中 p-PI3K、p-Akt、PFKFB3、HK2、GLUT1、PKM2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 二至丸改善肾纤维化的作用与 PI3K/Akt/PFKFB3 通路调控异常糖酵解代谢重编程有关。

关键词: 二至丸; 肾纤维化; 网络药理学; 分子对接; 分子动力学模拟; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B; 6 磷酸果糖 2 激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3; 糖酵解

中图分类号: R285.5; R287.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2026)09-2521-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.09.006

Effects of Erzhi Pills on renal fibrosis via the PI3K/Akt/PFKFB3 pathway based on network pharmacology and experimental validation

WANG Xian¹, ZHU Tongtong¹, ZHANG Zepeng², JIN Tongqing²

1. Kunshan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Suzhou 215300, China

2. Kunshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 215300, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Erzhi Pills in ameliorating renal fibrosis by inhibiting abnormal glycolysis, using network pharmacology, molecular dynamics simulations, and animal experiments. **Methods** Active ingredients of Erzhi Pills were obtained from TCMSP, ETCM and BATMAN-TCM databases, and targets were predicted. Renal fibrosis-related targets were acquired from GeneCards, DisGeNET, and DrugBank databases to identify intersecting targets. A PPI network was constructed to screen core targets, followed by GO and KEGG pathway enrichment analyses. Molecular docking and molecular dynamics simulations of core components and targets were performed using AutoDock Vina and Gromacs 2022 software. A rat model of renal fibrosis was established by adenine administration, and the rats were treated with Erzhi Pill (1.5, 3.0 g/kg) or losartan. Renal function parameters (Scr, BUN, and 24 h UP) were measured. Renal tissue injury and fibrosis (α -SMA and Vimentin) were assessed by HE staining, Masson

收稿日期: 2026-06-09

项目基金: 昆山市科技专项 (KS2350)

作者简介: 汪 娴, 主管中药师。E-mail: 763144133@qq.com

*通信作者: 金同庆, 副主任中药师。E-mail: 18936097025@163.com

staining, and immunohistochemistry. Protein expression of phosphorylated PI3K/Akt and key glycolytic enzymes (PFKFB3, HK2, GLUT1, and PKM2) in renal tissues was detected by Western blotting. **Results** Network pharmacology screening identified 16 active components, and they intersected with 297 target points related to renal fibrosis. PPI network identified core components including luteolin and kaempferol, as well as core targets including Akt1, PFKFB3, and HIF-1A. KEGG analysis revealed that Erzhi Pills primarily exerts its effects through regulating the PI3K/Akt signaling pathway. Molecular docking and dynamics simulations demonstrated that luteolin exhibited the lowest binding energy with the key glycolytic enzyme PFKFB3, and maintained an extremely stable binding conformation during 100 ns simulation. Animal experiments showed that Erzhi Pills significantly reduced Scr, BUN, and 24 h UP levels ($P < 0.05, 0.01$), ameliorated tubular dilation and interstitial collagen deposition, and markedly downregulated the overexpression of α -SMA and Vimentin ($P < 0.01$). Western blotting results revealed that Erzhi Pills significantly decreased the protein expression of p-PI3K, p-Akt, PFKFB3, HK2, GLUT1, and PKM2 ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The ameliorative effect of Erzhi Pills on renal fibrosis is associated with the regulation of aberrant glycolytic metabolic reprogramming via the PI3K/Akt/PFKFB3 pathway. **Key words:** Erzhi Pills; renal fibrosis; network pharmacology; molecular docking; molecular dynamics simulation; PI3K/Akt; PFKFB3; glycolysis

肾纤维化是各类慢性进行性肾脏病进展至终末期肾衰竭的共同途径与核心病理特征^[1]。近年研究表明,代谢重编程在肾纤维化的发生发展中扮演着关键角色。在纤维化病理微环境中,受损肾脏细胞的能量代谢会从氧化磷酸化显著向有氧糖酵解发生重构。这种异常活跃的糖酵解不仅为细胞增殖提供了充沛的能量,还加速了细胞外基质(ECM)的大量合成^[2]。在此过程中,6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3 (PFKFB3) 作为调控糖酵解通路的至关重要的限速酶,其高表达直接推动了肾脏细胞的代谢重构^[3]。因此,抑制 PFKFB3 介导的异常糖酵解对改善肾纤维化具有积极的治疗价值。

二至丸作为滋补肝肾、化瘀通络经典名方,由女贞子与墨旱莲等量组成^[4]。现代药理学表明二至丸具有抗炎、调节糖脂代谢等作用^[4-5]。临床研究证实,二至丸及其加减方能有效降低蛋白尿、改善肾小管间质损伤并延缓肾脏纤维化进程^[6-8]。因此本研究首先采用网络药理学与分子对接技术系统筛选二至丸抗肾纤维化的潜在活性成分与靶标,预测结果提示磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt) 信号通路及糖酵解关键酶 PFKFB3 可能是其发挥肾脏保护作用的重要环节。为验证这一理论预测,本研究建立腺嘌呤诱导的肾纤维化大鼠模型,从体内水平确证二至丸调控 PI3K/Akt 通路及 PFKFB3 靶点进而抑制异常糖酵解的抗纤维化效用,深入阐明二至丸防治肾纤维化的分子药理学内涵,为其临床精准应用提供坚实的科学依据。

1 网络药理学分析

1.1 二至丸活性成分筛选与肾纤维化靶点预测

检索 TCMSP、ETCM、BATMAN-TCM 中药数

据库,完整收录女贞子、墨旱莲全部天然产物;以口服生物利用度(OB) > 30%和类药性(DL) ≥ 0.18 为条件筛选活性成分。随后将成分导入 SwissTargetPrediction 数据库(probability > 0) 预测活性成分作用靶点。经 UniProt 校准基因名称、限定人源后,剔除重复无效靶点,获得二至丸成分相关靶标。同时,以“renal fibrosis”为关键词,在 GeneCards、DisGeNET、DrugBank 数据库获取疾病靶点。将成分靶点与疾病靶点取交集并绘制韦恩图,即得二至丸干预肾纤维化的潜在共有靶点。

1.2 “成分-靶点”网络构建与核心靶点的筛选

将上述获取的共有靶点导入 STRING 数据库进行蛋白质相互作用(PPI)分析,以评估靶标蛋白间的互作关系。随后,将所得的 PPI 网络数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件中进行网络可视化处理及拓扑学属性分析,构建“成分-核心靶点”作用网络,并筛选出在网络中发挥关键枢纽作用的核心靶点。

1.3 基因本体(GO)与京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析

将共有靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。应用 R Studio 软件对富集结果进行数据可视化处理,分别绘制 GO 功能富集条形图和 KEGG 通路富集气泡图。

1.4 分子对接

从 PubChem 和 PDB 数据库分别获取核心成分及靶蛋白的三维结构。利用 PyMOL 去除受体水分子与原配体,经 AutoDockTools 加氢和电荷平衡后,采用 AutoDock Vina 进行分子对接。最后使用 PLIP、PyMOL 对接复合物的相互作用模式(如氢键、疏水作用)进行分析与可视化展示。

1.5 分子动力学模拟

采用 Gromacs 2022, 受体与配体分别以 amber14sb 和 CGenff 力场描述, 置于 TIP3P 水盒中并添加离子中和。经最速下降与共轭梯度能量最小化后, 于 310 K、NPT 系综下运行 100 ns 模拟。模拟完成后, 调用 Gromacs 内置工具计算均方根偏差 (RMSD)、均方根涨落 (RMSF)、氢键数、回转半径 (R_g) 及溶剂可及表面积 (SASA); 并利用 G_mmpbsa 插件计算 MM-PBSA 结合自由能。

2 实验研究方法

2.1 材料与动物

2.1.1 试剂 二至丸 (雷允上药业集团有限公司, 规格 25 g/瓶, 批号 WB34014B); 双缩脲法蛋白含量检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 BC3180); 氯沙坦钾片 (杭州默沙东制药有限公司, 规格 50 mg/片, 批号 H20000371); α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab7817); 波形蛋白 (Vimentin)、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、PFKFB3、己糖激酶 2 (HK2)、葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、丙酮酸激酶 M2 型 (PKM2)、 β -肌动蛋白 (β -actin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 10366-1-AP、60225-1-Ig、30092-1-AP、66444-1-Ig、10176-2-AP、13763-1-AP、22029-1-AP、21829-1-AP、15822-1-AP、66009-1-Ig、60004-1-Ig)。

2.1.2 仪器 万分之一电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); 台式高速离心机 (长沙湘仪仪器有限公司); 自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特公司); Eclipse E100 光学显微镜 (日本尼康公司)。

2.1.3 动物 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠购自上海吉辉实验动物饲养有限公司 [许可证号 SCXK (沪) 2022-0009]。饲养温度 20~25 °C, 相对湿度为 (50±10) %, 12 h 交替光照, 自由饮水、饮食。所有实验操作均通过浙江慧通测评技术有限公司实验动物中心实验动物伦理委员会批准 (HTDW-202502007), 并按相关要求严格执行。

2.2 方法

2.2.1 分组与给药 大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为对照组、模型组、二至丸 (1.5、3.0 g/kg) 组^[9]、氯沙坦 (20 mg/kg) 组^[10], 每组 6 只。除对照组外, 其余各组每日 ig 腺嘌呤 150 mg/kg 诱导肾纤维化模型, 连续 21 d^[11]。造模 21 d 后, 随机取 2 只备用大鼠进行造模评价: 血清肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)

水平较对照组显著升高, 肾组织苏木精-伊红 (HE) 染色可见肾小管扩张及少量间质炎性细胞浸润, Masson 染色可见间质区早期胶原沉积, 提示肾纤维化模型建立成功。确认造模成功后, 各给药组按设定剂量连续 ig 给药 14 d。实验结束后, 颈椎脱臼法处死大鼠, 收集肾组织及相关标本待测。

2.2.2 生化指标检测及肾组织病理学检查 记录大鼠终末体质量及肾质量, 计算肾脏指数。收集大鼠处死前 24 h 尿液, 记录 24 h 总尿量。采用双缩脲法检测尿蛋白浓度, 结合尿量计算 24 h 尿蛋白总排泄量。利用全自动生化分析仪检测血清 BUN 和 Scr 水平。取肾组织经 4% 多聚甲醛固定、EDTA 脱钙及石蜡包埋后, 切成 5 μ m 薄片。常规脱蜡复水后, 经 HE 与 Masson 染色, 显微镜下观察肾组织病理改变与胶原沉积情况。

2.2.3 肾间质纤维化标志物检测 取 4 μ m 肾组织石蜡切片, 灭活内源性过氧化物酶后, 分别加入 Vimentin、 α -SMA 一抗, 于 4 °C 孵育 12 h。洗涤后加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h。经 DAB 显色及苏木素复染核后, 利用光学显微镜采集图像, 并应用 Image-Pro-Plus 软件进行半定量分析。

2.2.4 Western blotting 检测相关蛋白表达 提取肾组织总蛋白, 蛋白煮沸变性后经 10% SDS-PAGE 电泳分离并转至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶封闭后, 分别加入 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、PFKFB3、HK2、GLUT1、PKM2、 β -actin、GAPDH 一抗 (稀释度 1:1000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜后, 于室温下与相应二抗 (1:1000) 孵育 1 h, ECL 化学发光试剂盒显影, 凝胶成像系统扫描和分析条带。

2.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 软件对数据进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验或单因素方差分析进行差异比较。

3 基于网络药理学的二至丸抗肾纤维化核心靶点与通路预测

3.1 活性成分与疾病交集靶点的获取

依据 OB、DL 值对 TCMSP、ETCM、BATMAN-TCM 数据库中二至丸的主要成分进行筛选, 得到活性成分 16 个, 见表 1。通过 SwissTargetPrediction 数据库预测各成分作用靶点共 307 个。检索 Gene Cards、DisGeNET、DrugBank 数据库, 共获得肾纤维化相关靶点 18 629 个。将两者取交集, 得到二至丸治疗肾纤维化的潜在共有靶点 297 个, 见图 1。

表 1 二至丸中主要活性成分

Table 1 Major active ingredients in Erzhi Pills

编号	活性成分	OB/%	DL	来源
C1	丁香树脂醇双葡萄糖苷	83.12	0.80	女贞子
C2	槲皮素	46.43	0.28	女贞子、墨旱莲
C3	olitoriside	65.45	0.23	女贞子
C4	木犀草素	36.16	0.25	女贞子、墨旱莲
C5	lucidusculine	30.11	0.75	女贞子
C6	lucidumoside D	48.87	0.71	女贞子
C7	山柰酚	41.88	0.24	女贞子
C8	圣草酚	71.79	0.24	女贞子
C9	β-谷甾醇	36.91	0.75	女贞子
C10	去甲蟛蜞菊内酯	72.13	0.43	墨旱莲
C11	漆黄素	69.94	0.21	墨旱莲
C12	3'-O-methylorobol	57.41	0.27	墨旱莲
C13	蟛蜞菊内酯	49.60	0.48	墨旱莲
C14	蒙花苷	39.84	0.71	墨旱莲
C15	红车轴草素	39.06	0.28	墨旱莲
C16	刺槐黄素	34.97	0.24	墨旱莲

二至丸



肾纤维化

图 1 二至丸与肾纤维化交集靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of intersection targets between Erzhi Pills and renal fibrosis

3.2 PPI 网络分析

将上述交集靶点导入 String 数据库构建 PPI 网络 (图 2A)。通过 MCODE 插件构建的核心蛋白的网络图 (图 2B)。该 PPI 网络特征路径长度 (平均最短距离) 为 2.333, 网络内靶点之间信号传递高效。构建“二至丸 - 化学成分 - 肾纤维化靶点”网络 (图 2C), 根据度 (degree) 值前 7 位筛选出山柰

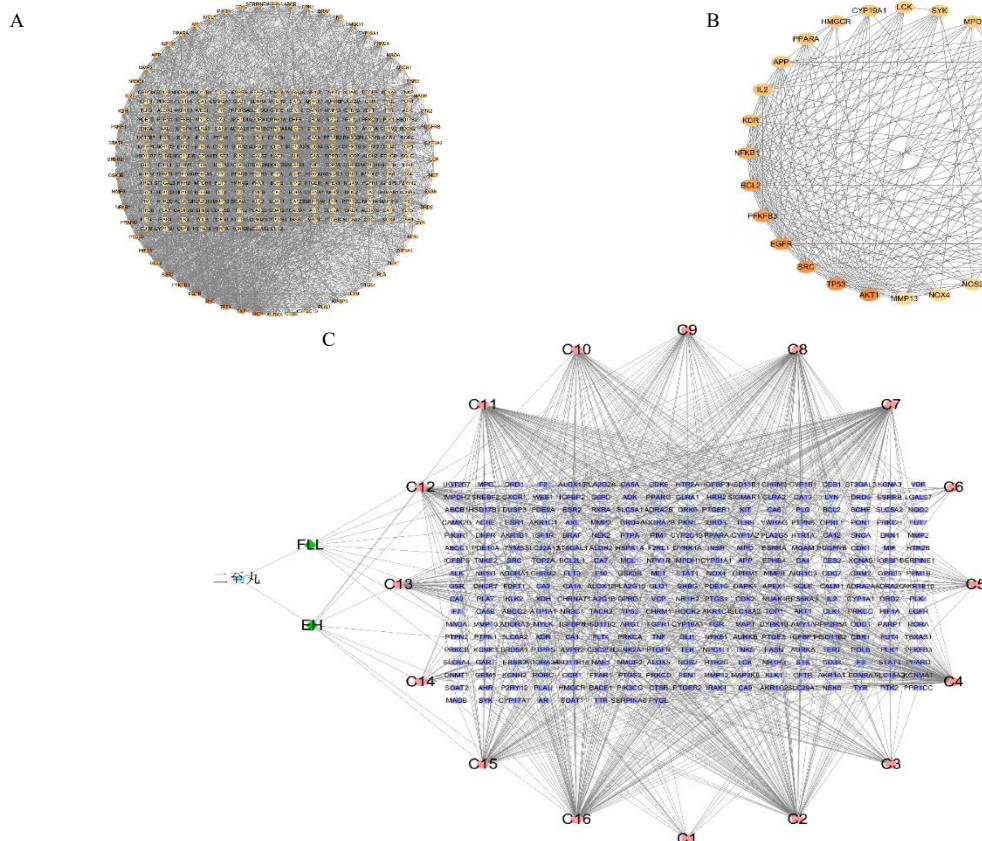


图 2 二至丸与肾纤维化交集靶点的 PPI 网络 (A)、核心蛋白网络图 (B)、“二至丸 - 化学成分 - 肾纤维化靶点”网络 (C)

Fig. 2 PPI network of intersection targets between Erzhi Pills and renal fibrosis (A), core protein network diagram (B), “Erzhi Pills - chemical components - target for renal fibrosis network” (C)

酚、木犀草素、刺槐黄素、槲皮素、漆黄素、圣草酚、红车轴草素为核心活性成分, 见表 2。

采用 Cytoscape cytoHubba 插件, 基于 degree 值、最大团中心性 (MCC)、邻域组件中心性

(MNC)、边缘渗透组件 (EPC) 共 4 种局部拓扑算法, 取各算法排名前 10 位靶点的交集, 取交集得到 7 个候选核心靶点, 分别为 Akt1、PFKFB3、缺氧诱导因子-1α (HIF-1A)、肿瘤坏死因子 (TNF)、肿瘤

表 2 二至丸中主要活性成分的 degree 值
Table 2 Degree values of the major active ingredients in Erzhi Pills

活性成分	degree 值	活性成分	degree 值
山柰酚	99	去甲蟛蜞菊内酯	51
木犀草素	99	蟛蜞菊内酯	45
刺槐黄素	99	β -谷甾醇	44
槲皮素	99	olitoriside	34
漆黄素	93	lucidusculine	29
圣草酚	78	蒙花苷	21
红车轴草素	61	丁香树脂醇双葡萄糖苷	15
3'-O-methylorobol	58	lucidumoside D	11

蛋白 p53 (TP53)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2), 各靶点 degree 值、紧密度中心性、中介中心性及节点平均最短路径见表 3。7 个候选核心靶点 degree 值均高于 90, 紧密度中心性处于 0.570~0.624, 节点平均最短路径均小于 1.76, 提示上述候选靶点不仅局部蛋白互作密集, 在整个 PPI 网络中亦具备高效的全局信号传导能力, 最终确认为核心靶点。

表 3 核心靶点的拓扑学参数
Table 3 Topological parameters of core hub targets

靶点	degree 值	紧密度中心性	中介中心性	节点平均最短路径
Akt1	128	0.624	0.065	1.603
TNF	125	0.620	0.069	1.613
TP53	121	0.608	0.055	1.644
SRC	113	0.601	0.103	1.664
PFKFB3	104	0.590	0.033	1.695
HIF-1A	91	0.570	0.022	1.753
PTGS2	90	0.574	0.041	1.743

3.3 GO 功能注释与 KEGG 通路富集分析

对交集靶点进行富集分析, 共获得 GO 条目 820 项, 其中生物过程 (BP) 548 条, 细胞成分 (CC) 85 条, 分子功能 (MF) 187 条, 见图 3。将 BP、CC、MF 的前 10 位进行可视化, 发现二至丸的 BP 主要集中于肝配蛋白受体信号通路、肽基酪氨酸磷酸化、PI3K/PKB 信号转导等; CC 主要集中于受体复合物、含蛋白质的复合物、线粒体; MF 主要集中于酶结合、蛋白酪氨酸激酶活性、组蛋白 H2AX

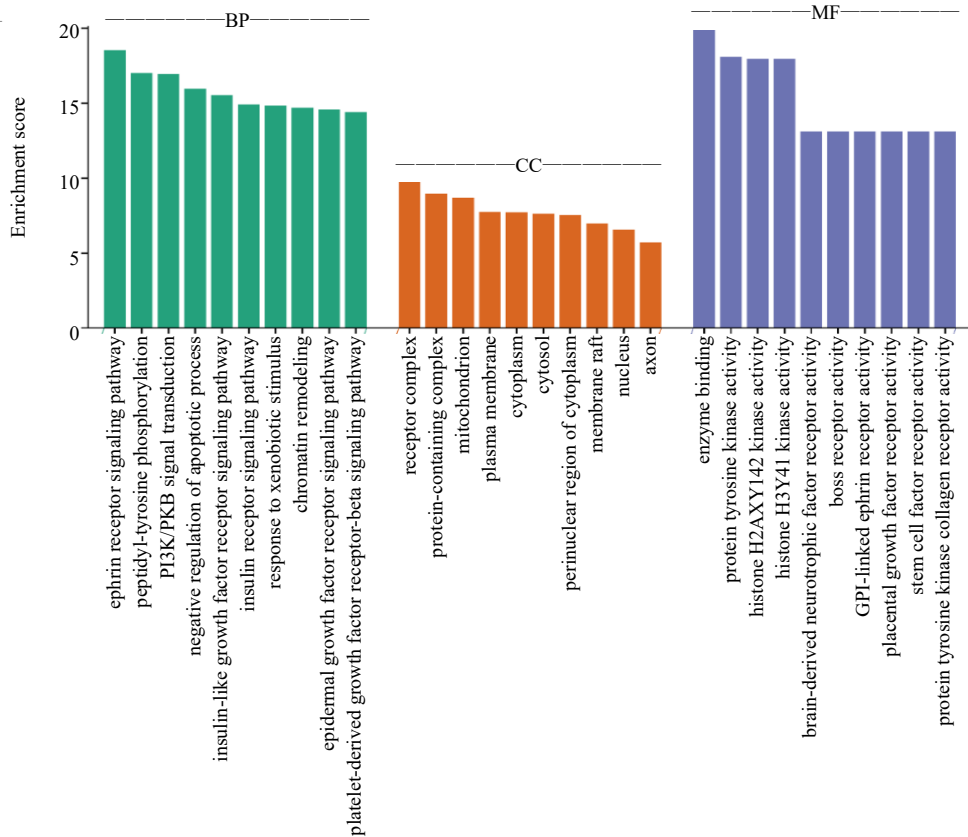


图 3 GO 功能富集分析
Fig. 3 GO functional enrichment analysis

Y142 激酶活性。KEGG 结果共富集到 156 条信号通路, 气泡图可视化前 20 位结果发现除了参与多种癌症途径外, 高度富集于 EGFR 酪氨酸激酶抑制

剂耐药、PI3K/Akt 等信号通路, 见图 4。

3.4 分子对接分析

结合肾纤维化相关研究背景, 优先选择与肾间

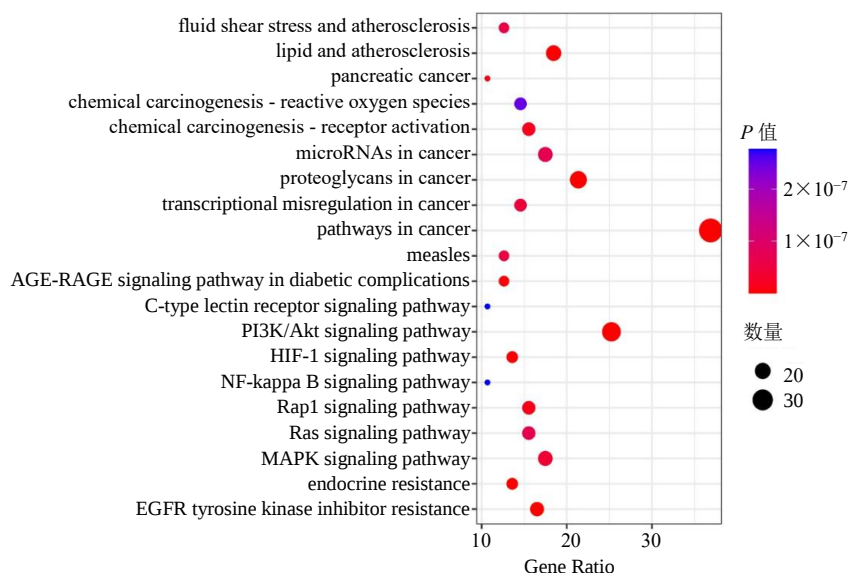


图 4 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis

质纤维化、缺氧糖代谢重编程密切相关,且拓扑属性优良的 Akt1、PFKFB3、HIF-1A,同时选取核心活性成分中 degree 值排名前 3 位的山柰酚、木犀草素、刺槐黄素开展分子对接分析,结合能如表 4 所示。各配体-受体复合物对接结合能 ≤ -5.0 kcal/mol (1 cal=4.2 J),提示活性成分与对应靶蛋白之间存在较强的潜在结合亲和力。对接相互作用模式可视化见图 5。其中核心成分与 Akt1、PFKFB3 的结合

表 4 分子对接结合能

Table 4 Molecular docking binding energies

成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)		
	Akt1	PFKFB3	HIF-1A
刺槐黄素	-8.1	-7.6	-5.0
山柰酚	-8.0	-8.3	-4.9
木犀草素	-8.2	-8.5	-5.1

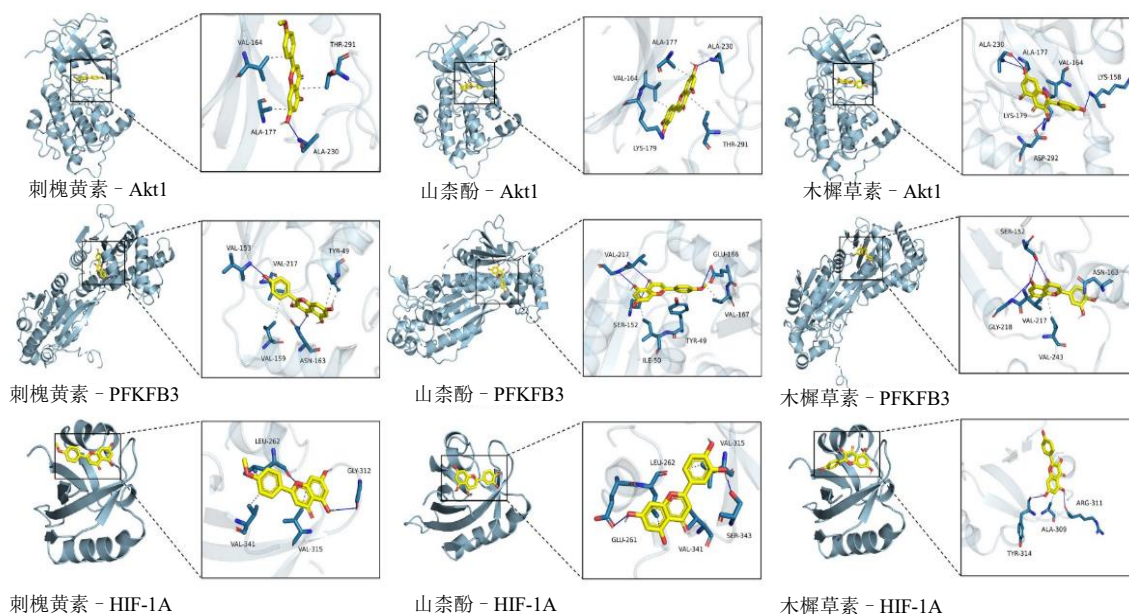


图 5 分子对接结果

Fig. 5 Molecular docking results

能数值更低, 预示二者相互作用潜力更优。

3.5 分子动力学模拟分析

分子对接结果表明, 木犀草素 - PFKFB3 结合能最低, 亲和力最优。为进一步评价该复合物生理条件下的结合稳定性, 开展 100 ns 分子动力学模拟, 见图 6。结果显示, 体系在 98 ns 后达到平衡, RMSD

稳定在 5.4 Å (1 Å=0.1 nm) 左右; Rg、SASA 波动极小; 氢键数量维持在 4 个左右; RMSF 显示氨基酸残基柔性较低 (<2.1 Å)。MM/PBSA 计算结合自由能为-17.17 kcal/mol。关键氨基酸贡献的分析显示, TYR49 和 VAL243 等残基对结合有较高的贡献, 表明它们可能在催化过程中发挥重要作用。以

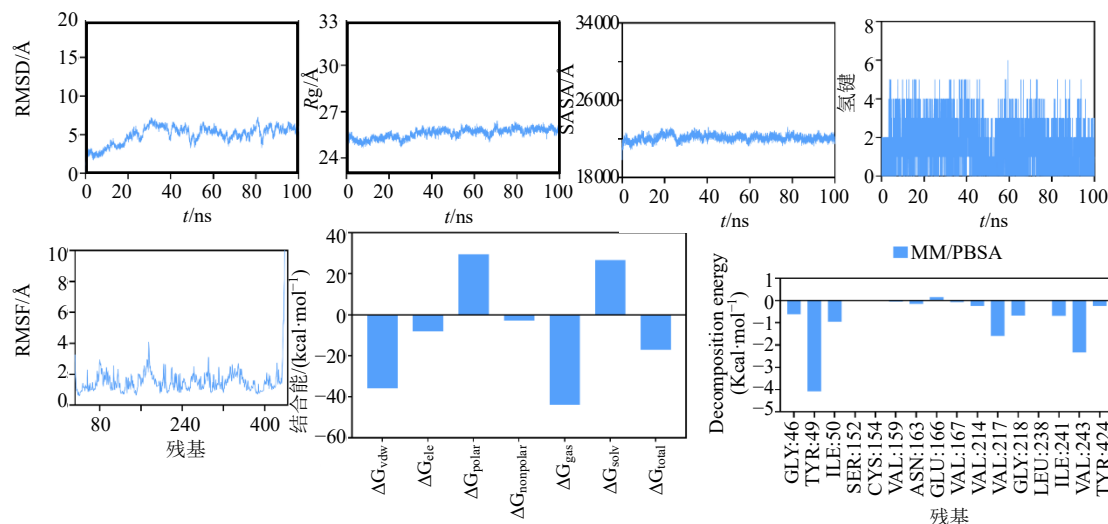


图 6 分子动力学模拟结果

Fig. 6 Molecular dynamics simulation results

上这些这结果表明该复合物结合极其稳定。

4 二至丸对肾纤维化大鼠肾功能及病理损伤的影响

4.1 对模型大鼠肾脏系数与肾功能的影响

与模型组相比, 二至丸组大鼠肾脏系数、BUN、Scr、24 h 尿蛋白排泄量均显著降低 ($P<0.05, 0.01$), 见图 7。

4.2 对模型大鼠肾组织病理形态及胶原沉积的影响

HE 染色显示, 模型组大鼠肾小管呈囊性扩张, 上皮细胞排列紊乱, 间质伴有大量炎症细胞浸润; Masson 染色显示肾间质有大面积蓝色的胶原纤维

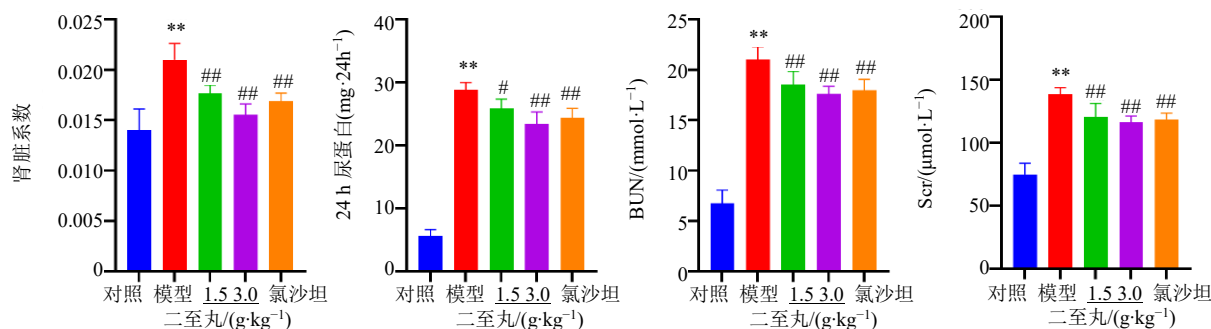
增生。二至丸组大鼠肾脏病理损伤减轻, 肾小管形态部分恢复, 间质内蓝色胶原纤维沉积面积大幅缩减, 见图 8。

4.3 对肾间质纤维化表型标志物表达的抑制作用

免疫组化结果显示, 与模型组相比, 二至丸组大鼠肾组织中的间质活化及纤维化标志物 Vimentin、 α -SMA 的表达显著异常降低 ($P<0.01$), 见图 9。

4.4 二至丸通过 PI3K/Akt/PFKFB3 通路介导糖酵解抗肾纤维化的作用

4.4.1 二至丸对肾组织 PI3K/AKT 通路的抑制作



与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group.

图 7 二至丸对肾脏系数、肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Effect of Erzhi Pills on renal coefficient and renal function ($\bar{x} \pm s, n=6$)

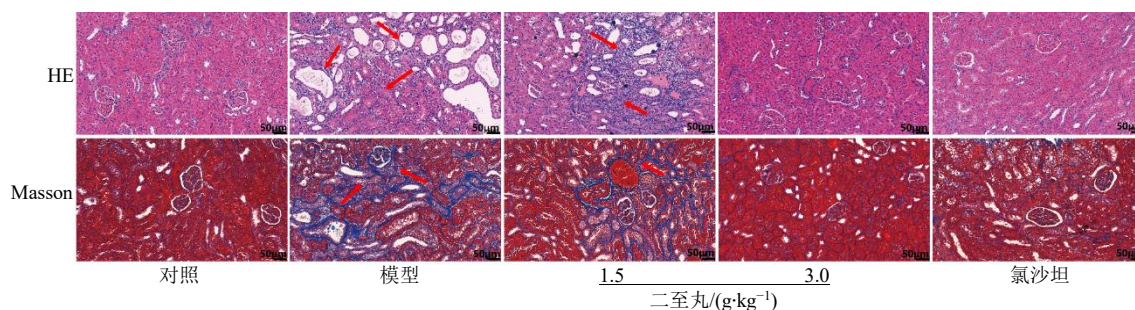
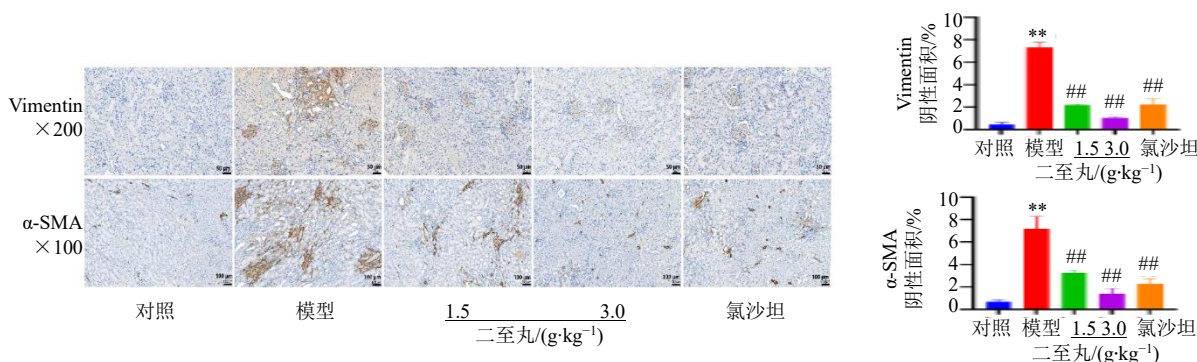


图 8 二至丸对肾组织病理形态及胶原沉积的影响 (×200, 标尺=50 μm)

Fig. 8 Effect of Erzhi Pills on renal histopathology and collagen deposition (×200, scale bar = 50 μm)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 9 二至丸对肾间质纤维化表型标志物 Vimentin、α-SMA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Effect of Erzhi Pills on the renal interstitial fibrosis markers expression of Vimentin and α-SMA ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

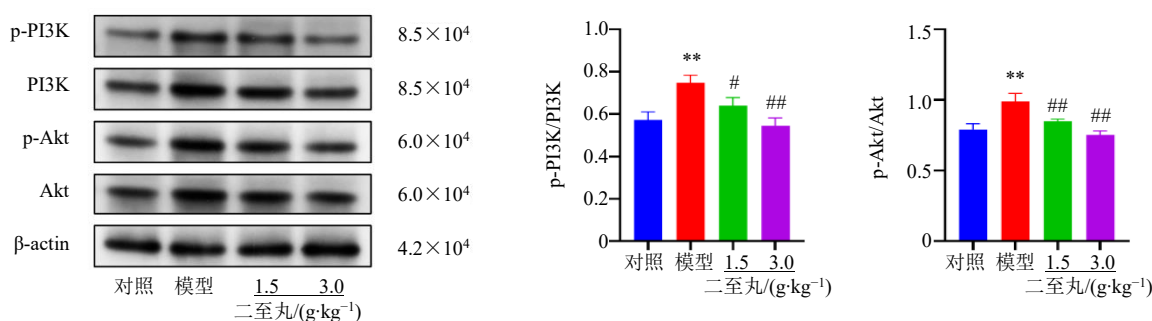
用基于网络药理学预测,采用 Western blotting 检测大鼠肾组织中 PI3K/Akt 通路的活化状态。结果显示,与模型组相比,二至丸组 p-PI3K、p-Akt 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),见图 10。

4.4.2 二至丸对 PFKFB3 及糖酵解关键代谢酶的调控作用 结合前期分子对接结果,本研究进一步检测了二至丸对糖酵解关键酶 PFKFB3 及其下游糖酵

解代谢酶蛋白表达的干预作用。与模型组相比,二至丸组大鼠肾组织中 PFKFB3 及其下游蛋白 HK2、PKM2、GLUT1 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$),见图 11。

5 讨论

肾纤维化是慢性进行性肾脏病的核心病理改变,也是多数慢性进行性肾病晚期的典型表现,其

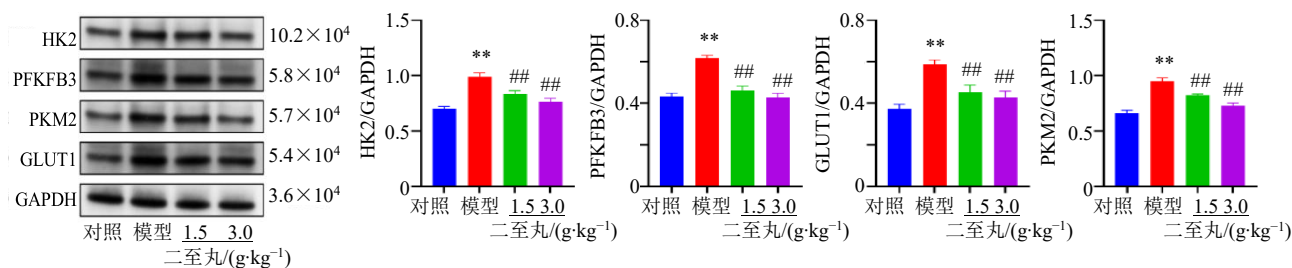


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 10 二至丸对肾纤维化大鼠的肾组织 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 Effect of Erzhi Pills on the expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt proteins in renal tissues of rats with renal fibrosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 11 二至丸对肾纤维化大鼠的肾组织 PFKFB3 及糖酵解关键代谢酶 HK2、PKM2、GLUT1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 11 Effect of Erzhi Pills on the expression of PFKFB3, HK2, PKM2 and GLUT1 in renal tissue of rats with renal fibrosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

特点为细胞外基质在肾脏内过度沉积, 导致器官结构破坏、功能减退, 最终进展为肾衰竭^[12]。中医认为慢性肾脏疾病病机多属“肝肾阴虚、浊瘀阻络”, 治宜“滋补肝肾、化瘀通络”。

二至丸作为平补肝肾的经典名方, 在妇科、肾脏及肝脏疾病中具有深厚的临床应用基础^[4]。然而, 既往现代药理研究多聚焦于二至丸的保肝、抗骨质疏松及抗衰老作用, 其对肾脏的保护作用及微观分子机制尚缺乏系统阐释^[13-15]。本研究通过网络药理学系统揭示了二至丸干预肾纤维化的潜在物质基础与靶点网络。筛选出核心活性成分主要为山柰酚、木犀草素、刺槐黄素等黄酮类化合物。木犀草素兼具显著抗氧化与抗细胞凋亡作用^[16]; 山柰酚可通过减轻氧化应激及抑制核因子- κ B (NF- κ B) 炎症通路改善肾损伤^[17-19]; 刺槐黄素则能有效抑制肾脏血管紧张素系统, 发挥肾脏保护作用^[20]。此外, PPI 网络分析筛选出 Akt1、TP53、PFKFB3、HIF-1A 等核心靶点, 广泛参与细胞能量代谢、炎症免疫响应及氧化应激等生物学过程。这印证了二至丸“多成分-多靶点-多途径”抗肾纤维化的系统调控特征。区别于常规仅停留在靶点预测的网络药理学研究, 本研究进一步引入了 100 ns 的分子动力学模拟技术, 在动态生理环境下验证了核心成分木犀草素与糖酵解关键酶 PFKFB3 结合的极高热力学稳定性, 这为后续的实体机制验证提供了更为精准的靶向依据。

PI3K/Akt 信号通路在调控转录、翻译、增殖、生长及生存等基础细胞功能中居于核心地位, 与慢性进行性肾脏病的病理过程密切相关。抑制该通路可有效改善肾损伤, 因其参与调节炎症、氧化应激、细胞凋亡、上皮-间质转化 (EMT) 及自噬等关键

病理环节^[21]。研究表明, 持续性慢性肾脏炎症可激活 PI3K/Akt 通路, 促进 NF- κ B 核转位, 进而释放更多炎症因子, 形成炎症-纤维化的恶性循环^[22]。此外, PI3K/Akt 通路的激活可下调 PTEN 和 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达, 同时上调 α -SMA 和纤维蛋白的表达, 驱动肾小管上皮细胞发生 EMT, 从而促进肾纤维化^[23]。在多种慢性进行性肾脏病模型中, 抑制 PI3K/Akt 可有效减少肾小管上皮细胞凋亡, 进而改善纤维化^[21]。本实验中, 二至丸能显著抑制模型大鼠肾组织中 p-PI3K、p-Akt 的蛋白表达, 并有效下调纤维化标志物 α -SMA, 提示二至丸的抗纤维化作用与抑制 PI3K/Akt 信号通路的异常活化高度相关。

在探讨深层机制方面, 本研究突破了单一经典激酶通路的局限, 将视角延伸至“细胞代谢重编程”领域。肾脏作为高代谢器官, 在病理状态下成纤维细胞代谢会从氧化磷酸化向有氧糖酵解 (Warburg 效应) 转变, 这是推动纤维化进程的重要特征^[2]。而抑制肾成纤维细胞的有氧糖酵解可显著减轻肾纤维化。本研究检测了 PFKFB3 糖酵解信号下游蛋白。HK2 和 PKM2 同为糖酵解关键限速酶, 被视为细胞代谢与能量的重要调控因子^[24-25]。PKM2 可促进下游乳酸脱氢酶 A (LDHA) 及 GLUT1 的转录^[26], 并通过调节代谢重编程、足细胞损伤、成纤维细胞活化与增殖、巨噬细胞极化及 T 细胞调控等过程, 参与肾脏疾病的发生发展及治疗^[24-25]。本研究证实, 二至丸在体内能显著下调肾组织中 PFKFB3、GLUT1、HK2、PKM2 的异常高表达, 提示二至丸具有改善病理状态下糖酵解相关限速酶异常表达的潜力。值得注意的是, PI3K/Akt 信号通路已被确认可通过调控糖酵解途径而在慢性进行

性肾脏病中发挥重要作用。PI3K/Akt 信号转导通过磷酸化多种营养转运蛋白(如 GLUT1)和代谢酶(如 HK2、PFKFB3/4、PKM2)并调节相关分子网络,促进有氧糖酵解^[27]。在转化生长因子- β (TGF- β) 诱导的肾纤维化模型中, PI3K、Akt、mTOR 的磷酸化水平升高,进而促进 HK2 表达,并通过增强糖酵解影响纤维化进程^[28]。在脂多糖刺激的小鼠子宫收缩模型中,炎症通过 PI3K/Akt 信号增强 PFKFB3 表达,促进细胞糖酵解,从而驱动子宫平滑肌收缩^[29]。因此,二至丸可能通过抑制 PI3K/Akt 信号上游,进而调控 PFKFB3 介导的糖酵解代谢酶群,发挥减轻肾纤维化的作用。

综上,本研究揭示了二至丸可能通过靶向调控 PI3K/Akt 信号通路,进而改善 PFKFB3 相关的糖酵解代谢酶异常表达,最终有效减轻肾脏损伤并延缓纤维化进程。本研究为二至丸调控能量代谢的药理学内涵提供了线索,为其临床精准用药提供了参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邵丽鹏. 肾纤维化发病机制和治疗研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2024, 37(13): 2196-2198.
- [2] Ding H, Jiang L, Xu J, *et al.* Inhibiting aerobic glycolysis suppresses renal interstitial fibroblast activation and renal fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(3): F561-F575.
- [3] Wang Y T, Li H Y, Jiang S M, *et al.* The glycolytic enzyme PFKFB3 drives kidney fibrosis through promoting histone lactylation-mediated NF- κ B family activation [J]. *Kidney Int*, 2024, 106(2): 226-240.
- [4] 李彦赞, 孙传腾, 贺凌飞, 等. 二至丸药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(9): 1922-1928.
- [5] 韩龙, 谭登, 万仕炜, 等. 二至丸对绝经后骨质疏松模型大鼠脂肪组织糖代谢影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(5): 419-423.
- [6] 衣芳亮. 黄芪二至丸加减治疗气阴两虚型慢性肾小球肾炎的疗效研究 [J]. 中国医药指南, 2022, 20(1): 137-140.
- [7] 李春雨. 浅谈二至丸在肾病综合征治疗中的应用 [J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(11): 146-147.
- [8] 吕冬宁. 二至丸在肾脏疾病中的应用举隅 [J]. 江苏中医药, 2006(9): 52-53.
- [9] Zhang Z P, Dai Y J, Xu D D, *et al.* Elucidating the therapeutic mechanisms of Erzhi Pills against adenine-induced chronic kidney disease: A multi-omics study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2026, 272: 117374.
- [10] Liu B R, Chen G W, Mo H Y, *et al.* Bupi Yishen formula improves chronic kidney disease by restoring renal energy metabolism and mitochondrial oxidative phosphorylation [J]. *Phytomedicine*, 2025, 145: 157055.
- [11] Hu J J, Pang X Y, Liang X, *et al.* Raspberry ameliorates renal fibrosis in rats with chronic kidney disease via the PI3K/Akt pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 140: 156589.
- [12] Yan H, Xu J X, Xu Z F, *et al.* Defining therapeutic targets for renal fibrosis: Exploiting the biology of pathogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112115.
- [13] Huang S J, Mu F, Li F, *et al.* A network-based approach to explore the mechanism and bioactive compounds of Erzhi Pill against metabolic dysfunction-associated fatty liver disease [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 7867245.
- [14] Shang G X, Zhou X Q, Yin J, *et al.* Multi-omics analysis of kidney, bone and bone marrow explored potential mechanisms of Erzhi Wan against osteoporosis with kidney-Yin deficiency [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 246: 116211.
- [15] Feng L, Gao M T, Zhai Y Y, *et al.* A novel strategy based on targeted cellular metabolomics for quantitatively evaluating anti-aging effect and screening effective extracts of Erzhi Wan [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, 1178: 122857.
- [16] Chen L Y, Cheng H L, Liao C K, *et al.* Luteolin improves nephropathy in hyperglycemic rats through anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms [J]. *J Funct Foods*, 2023, 102: 105461.
- [17] Fernández-Del-Río L, Nag A, Gutiérrez Casado E, *et al.* Kaempferol increases levels of coenzyme Q in kidney cells and serves as a biosynthetic ring precursor [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 110: 176-187.
- [18] Park M J, Lee E K, Heo H S, *et al.* The anti-inflammatory effect of kaempferol in aged kidney tissues: The involvement of nuclear factor- κ B via nuclear factor-inducing kinase/I κ B kinase and mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *J Med Food*, 2009, 12(2): 351-358.
- [19] Alshehri A S, El-Kott A F, El-Kenawy A E, *et al.* The ameliorative effect of kaempferol against CdCl₂-mediated renal damage entails activation of Nrf2 and inhibition of NF- κ B [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(38): 57591-57602.
- [20] Lv Z Y, Wang W C. Acacetin improves renovascular hypertension via inhibition of the renin-angiotensin pathway in experimental rats [J]. *Int J Pharmacol*, 2021, 17(8): 596-605.
- [21] Wang H S, Gao L J, Zhao C C, *et al.* The role of PI3K/Akt

- signaling pathway in chronic kidney disease [J]. *Int Urol Nephrol*, 2024, 56(8): 2623-2633.
- [22] Ma Z C, Liu Y D, Li C C, *et al.* Repurposing a clinically approved prescription *Colquhounia root tablet* to treat diabetic kidney disease via suppressing PI3K/AKT/NF- κ B activation [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 2.
- [23] Hu T T, Chen F, Chen D, *et al.* DNMT3a negatively regulates PTEN to activate the PI3K/AKT pathway to aggravate renal fibrosis [J]. *Cell Signal*, 2022, 96: 110352.
- [24] Li L, Zhang X, Lin Y, *et al.* Let-7b-5p inhibits breast cancer cell growth and metastasis via repression of hexokinase 2-mediated aerobic glycolysis [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 114.
- [25] Chen D Q, Han J, Liu H, *et al.* Targeting pyruvate kinase M2 for the treatment of kidney disease [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1376252.
- [26] Chen Y L, Bai X Y, Chen J W, *et al.* Pyruvate kinase M2 regulates kidney fibrosis through pericyte glycolysis during the progression from acute kidney injury to chronic kidney disease [J]. *Cell Prolif*, 2024, 57(2): e13548.
- [27] Fontana F, Giannitti G, Marchesi S, *et al.* The PI3K/Akt pathway and glucose metabolism: A dangerous liaison in cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(8): 3113-3125.
- [28] Chen L M, Li X F, Deng Y Y, *et al.* The PI3K-Akt-mTOR pathway mediates renal pericyte-myofibroblast transition by enhancing glycolysis through HKII [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 323.
- [29] He J, Li X, Yu H H, *et al.* Inflammation-induced PFKFB3-mediated glycolysis promoting myometrium contraction through the PI3K-Akt-mTOR pathway in preterm birth mice [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2025, 328(3): C895-c907.

[责任编辑 高源]