

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research楮实子调控 PI3K/Akt 通路对治疗糖尿病
肾病的作用研究Research of fructus broussonetiae regulating PI3K/Akt pathway in treatment of
diabetic kidney disease郭锡春^{1a}, 袁梦梦^{1a}, 刘文山^{1a},
丁传华^{1a}, 韩秀媛^{1b}(1. 山东第二医科大学 附属医院 a. 药学部/
神经与肿瘤药物研发全国重点实验室; b. 感染
管理办公室, 山东 潍坊 261041)GUO Xi - chun^{1a},
YUAN Meng - meng^{1a},
LIU Wen - shan^{1a},
DING Chuan - hua^{1a},
HAN Xiu - yuan^{1b}(1. a. Department of Pharmacy/State Key
Laboratory of Neurology and Oncology
Drug Development; b. Department of
Infection Management, Affiliated Hospital
of Shandong Second Medical University,
Weifang 261041, Shandong Province,
China)基金项目: 神经与肿瘤药物研发全国重点实验室
开放课题基金资助项目 (SKLSIM -
F-2024113); 潍坊市卫生健康委员会
科研项目 (WFWSJK - 2025 - 056)作者简介: 郭锡春 (1988 -), 男, 主管药师,
主要从事医院药学和临床药学方面
的工作

通信作者: 韩秀媛, 副主任药师

Tel: (0536) 3081222

E - mail: hxy21001@163. com

摘要:目的 探讨楮实子调控磷脂酰肌醇 3 - 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 通路对糖尿病肾病 (DKD) 的作用机制。方法 用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、人类基因数据库 (GeneCards)、在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM) 及治疗靶点数据库 (TTD) 筛选活性成分与靶点。通过构建蛋白质互作 (PPI) 网络及拓扑分析, 利用基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 进行富集分析, 结合分子对接和分子动力学模拟 (MD) 验证核心成分与靶点的相互作用。将小鼠 MPC5 细胞分为对照组 (正常培养), 模型组 (30 mmol · L⁻¹ 葡萄糖处理 48 h), 甘露醇组 (在对照组基础上, 44.5 mmol · L⁻¹ 甘露醇处理 48 h), 实验组 (在模型组基础上, 2.5、5.0、15.0、30.0、45.0 μmol · L⁻¹ 木犀草素分别处理 24 h), 阳性药物组 (在模型组基础上, 100 μmol · L⁻¹ 卡托普利处理 24 h)。用细胞计数 (CCK - 8) 法检测细胞存活率, 用流式细胞术检测细胞凋亡, 用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法测定炎症因子白介素 - 1β (IL - 1β)、IL - 6、肿瘤坏死因子 (TNF - α) 的水平, 用蛋白质印迹法检测 B 细胞淋巴瘤 - 2 基因 (Bcl - 2)、Bcl - 2 相关 X 蛋白 (Bax)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3 (Caspase - 3)、热休克蛋白 90 - α (HSP90AA1)、磷酸化蛋白激酶 B (p - Akt) 与 Akt 蛋白表达水平。结果 共获得楮实子与 DKD 的交集靶点 42 个, 筛选出蛋白激酶 B1 (Akt1)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、肿瘤蛋白 53 (TP53)、HSP90AA1 等 13 个核心靶点。GO/KEGG 富集分析显示, 其作用机制主要涉及 PI3K/Akt 信号通路调控及氧化应激、细胞凋亡等生物过程。分子对接与 MD 证实, HSP90AA1 与木犀草素形成的复合物结构最稳定 (结合自由能 - 34.08 kcal · mol⁻¹), 故选定木犀草素开展后续细胞实验验证。CCK - 8 显示, 当浓度达到 30.0 μmol · L⁻¹ 时木犀草素作用进入平台期, 此浓度用于后续实验。对照组、模型组、甘露醇组、实验组 (30.0 μmol · L⁻¹) 和阳性药物组的细胞总凋亡率分别为 (6.23 ± 0.40)%、(35.47 ± 3.08)%、(6.42 ± 0.52)%、(11.20 ± 1.46)% 和 (10.78 ± 1.06)%; 对照组、模型组和实验组 (30.0 μmol · L⁻¹) 细胞的 IL - 6 分泌水平为 (29.52 ± 2.21)、(91.12 ± 6.14) 和 (36.48 ± 3.65) pg · mL⁻¹, IL - 1β 分泌水平为 (12.68 ± 1.17)、(47.42 ± 3.49) 和 (18.08 ± 1.42) pg · mL⁻¹, TNF - α 分泌水平为 (23.15 ± 1.81)、(79.35 ± 7.01) 和 (29.62 ± 2.17) pg · mL⁻¹; Bcl - 2 蛋白相对表达水平为 1.02 ± 0.11、0.45 ± 0.04 和 0.92 ± 0.07, Bax 蛋白相对表达水平为 1.01 ± 0.09、2.18 ± 0.17 和 1.12 ± 0.11, Caspase - 3 蛋白相对表达水平为 1.03 ± 0.08、2.32 ± 0.17 和 1.31 ± 0.14; HSP90AA1 蛋白相对表达水平为 1.00 ± 0.07、1.96 ± 0.12 和 1.08 ± 0.10, p - Akt/Akt 为 1.00 ± 0.07、2.25 ± 0.07 和 1.11 ± 0.06。模型组的上述指标与对照组相比, 实验组与模型组相比, 在统计学上差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。结论 楮实子的活性成分木犀草素可能通过下调 HSP90AA1 表达, 抑制 PI3K/Akt 信号通路的过度激活, 同时减轻炎症反应, 从而达到治疗糖尿病肾病的目的。

关键词: 楮实子; 木犀草素; 糖尿病肾病; 实验验证**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.11.008

中图分类号:R969 文献标志码:A
文章编号:1001-6821(2026)11-1545-07

Abstract: Objective To explore the mechanisms of action of fructus broussonetiae regulating phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) in diabetic kidney disease (DKD). **Methods** The traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP), the human gene database (GeneCards), online mendelian inheritance in man (OMIM) and therapeutic target database (TTD) were used to screen the active ingredients and targets. The protein-protein interaction (PPI) network and topology analysis were constructed and enriched using gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG), and molecular docking and molecular dynamics (MD) simulations were used to verify the interactions between the core ingredients and targets. Mouse podocyte cells 5 were divided into control group (without any treatment), model group (treated with 30 mmol · L⁻¹ glucose for 48 h), mannitol group (treated with 44.5 mmol · L⁻¹ mannitol for 48 h on the basis of the control group), experimental group (treated with 2.5, 5.0, 15.0, 30.0 and 45.0 μmol · L⁻¹ luteolin for 24 h, on the basis of the model group) and positive drug group (treated with 100 μmol · L⁻¹ captopril for 24 h on the basis of the model group). Cell viability were detected by cell counting kit-8 (CCK-8), apoptosis were detected by flow cytometry, levels of inflammatory factors interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and tumour necrosis factor (TNF-α) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and B-cell lymphoma-2 gene (Bcl-2), Bcl-2-related X protein (Bax), cysteine aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3), heat shock protein 90-α (HSP90AA1), phosphorylated protein kinase B (p-Akt) and Akt protein expression levels were detected by Western blot. **Results** A total of 42 intersection targets of fructus broussonetiae and DKD were identified, and 13 core targets were screened out, including protein kinase B1 (Akt1), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), tumour protein 53 (TP53) and HSP90AA1, etc. The GO/KEGG enrichment analysis showed that the mechanism of action was involved in the regulation of PI3K/Akt signalling pathway as well as the oxidative stress, apoptosis, etc. The molecular docking and kinetic simulations confirmed that HSP90AA1 formed the most stable complex with luteolin (binding free energy -34.08 kcal · mol⁻¹), therefore, luteolin were selected for subsequent cellular experiments. CCK-8 showed that the effect of luteolin entered into a plateau phase when the concentration reached 30.0 μmol · L⁻¹, and this concentration was used for the subsequent experiments. The total apoptosis rates of the control group, model group, mannitol group, experimental group (30.0 μmol · L⁻¹) and positive drug group were (6.23 ± 0.40)%, (35.47 ± 3.08)%, (6.42 ± 0.52)%, (11.20 ± 1.46)% and (10.78 ± 1.06)%, respectively; the IL-6 levels of the cells in the control, model and experimental groups (30.0 μmol · L⁻¹) were (29.52 ± 2.21), (91.12 ± 6.14) and (36.48 ± 3.65) pg · mL⁻¹, respectively; IL-1β levels were (12.68 ± 1.17), (47.42 ± 3.49) and (18.08 ± 1.42) pg · mL⁻¹, respectively; and TNF-α levels were (23.15 ± 1.81), (79.35 ± 7.01) and (29.62 ± 2.17) pg · mL⁻¹, respectively; the relative expression levels of Bcl-2 protein were 1.02 ± 0.11, 0.45 ± 0.04 and 0.92 ± 0.07, respectively; the relative expression levels of Bax protein were 1.01 ± 0.09, 2.18 ± 0.17 and 1.12 ± 0.11, respectively; the relative expression levels of Caspase-3 protein relative expression levels were 1.03 ± 0.08, 2.32 ± 0.17 and 1.31 ± 0.14, respectively. The relative expression levels of HSP90AA1 protein were 1.00 ± 0.07, 1.96 ± 0.12 and 1.08 ± 0.10, respectively; the relative expression levels of p-Akt/Akt were 1.00 ± 0.07, 2.25 ± 0.07 and 1.11 ± 0.06, respectively. The above indexes in the model group were statistically significant when compared with those in the control group, and when compared with those in the experimental and model groups (*P* < 0.001). **Conclusion** The active component luteolin of fructus broussonetiae may reduce the expression of HSP90AA1, inhibit the activation of PI3K/Akt signaling pathway, and reduce the inflammatory response, thus achieving the purpose of treating DKD.

Key words: fructus broussonetiae; luteolin; diabetic kidney disease; experimental verification

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是糖尿病主要的微血管并发症,以白蛋白尿、持续性高血压及进行性肾功能减退为特征,显著增加心血管事件和终末期肾脏病风险^[1]。随着全球糖尿病患病率的上升,DKD 患者数量预计将大幅增加。DKD 发病机制复杂,涉及糖脂代谢紊乱、血流动力学改变、氧化应激与炎症反应等多通路交互作用^[2]。现行临床管理只能减缓疾病进展,减轻肾脏损害,但治疗效果有限^[3]。而中药多组分、多靶点特性可协同调控 DKD 相关信号通路,发挥整体治疗优势。楮实子 (fructus broussonetiae) 为桑科植物构树的干燥成熟果实,具有滋肾益阴、清肝明目及利水消肿等传统功效,其活性成分薯蓣皂苷、木犀草素等展现出抗氧化、免疫调节特性及多靶点效应^[4]。另有研究认为,楮实子是治疗肾病的常用药^[5],但其具体的药理作用靶点及作用机制仍需进一步研究。本研究拟整合网络药理学与分子对接技术,系统揭示楮实子治疗 DKD 的活性成分、作用靶点及潜在机制,以期为 DKD 的多靶点治疗新策略提供依据。

材料与方法

1 材料

细胞 小鼠永生生化足细胞 MPC5,购自湖北武汉普诺赛生命科技有限公司。

试剂 木犀草素,规格:每支 500 mg,纯度:≥98%,批号:L107329、葡萄糖,规格:每瓶 500 g,纯度:≥99%,批号:G107850、甘露醇,规格:每瓶 500 g,纯度:≥97%,批号:D657382、卡托普利,规格:每瓶 1 g,纯度:≥98%,批号:C129108,均由上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产;胰蛋白酶和磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS),均由上海源培生物科技股份有限公司生产;RPMI-1640 培养基、胰酶和胎牛血清,均由美国 Gibco 公司生产;放射免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解缓冲液,上海碧云天生物技术有限公司生产;兔抗 β -微管蛋白 (β -tubulin) 和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记二抗,均由美国 Cell Signaling Technology 公司生产;B 细胞淋巴瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2 gene, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-related X protein, Bax)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3 (cysteine aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、热休克蛋白 90- α (heat shock protein 90- α , HSP90AA1)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated

protein kinase B, p-Akt) 和 Akt 蛋白,均由美国 CST 公司生产;白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒,均由美国 R&D Systems 公司生产;细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒,日本 Dojindo 公司生产;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒,美国 BD Biosciences 公司生产;小鼠二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒和增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒,均由美国 Thermo Scientific 公司生产。

仪器 iMark 酶标仪和 221BR 蛋白湿转仪及电泳设备,均为美国 Bio-Rad 公司产品;FACSCanto II 流式细胞仪,美国 BD Biosciences 公司产品;5200CE 全自动化学发光图像分析系统,上海 Tanon 公司产品;DS-2S100 摇床,湖北武汉赛维尔生物科技有限公司产品。

2 实验方法

2.1 楮实子抗 DKD 活性成分的筛选及核心靶点预测

基于中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP),以口服生物利用度 ≥30% 和类药性 ≥0.18 为标准筛选楮实子活性成分^[6],并预测其对应靶点。同时,检索人类基因数据库 (the human gene database, GeneCards)、在线人类孟德尔遗传数据库 (online mendelian inheritance in man, OMIM) 及治疗靶点数据库 (therapeutic target database, TTD) 数据库获取 DKD 相关疾病靶点,将药物靶点与疾病靶点取交集以确定潜在作用靶点。随后,将交集靶点导入分子功能注释系统数据库 (search tool for the retrieval of interacting genes/proteins, STRING) 构建蛋白质互作网络 (protein-protein interaction networks, PPI),基于拓扑学参数筛选核心靶点^[7]。在此基础上,利用 R 语言对核心靶点分别进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析,以明确其生物学功能及信号通路。最后,选取节点度值排名靠前的核心靶点与活性成分进行分子对接验证,并对结合能最优的复合物进行 100 ns 分子动力学模拟 (molecular dynamics, MD),

通过计算均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 及结合自由能评估其结合稳定性^[8]。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养^[9]

MPC5 细胞用含 10% 胎牛血清、 $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 的 RPMI-1640 培养基, 置于 33°C 、5% CO_2 的培养箱中进行增殖培养。当细胞融合度达 80% ~ 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。为诱导 MPC5 细胞分化为成熟的足细胞, 将细胞接种于培养板后, 更换为不含 IFN- γ 的完全培养基, 并将培养温度切换至 37°C 持续培养, 直至细胞形态由上皮样变为具有突起的成熟足细胞形态。

2.2.2 细胞分组与处理方法^[10]

将处于对数生长期的 MPC5 细胞分为对照组 (MPC5 细胞全程于 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖条件下正常培养 48 h), 模型组 (全程于 $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖条件下培养 48 h), 甘露醇组 (在对照组基础上, 全程于含 $44.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇的培养基中培养 48 h), 实验组 (先予 $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖处理 24 h 建立损伤模型, 随后更换含 2.5、5.0、15.0、30.0、45.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 木犀草素的 $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基继续干预 24 h), 阳性药物组 (先予 $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖处理 24 h, 随后更换含 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡托普利的 $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基继续干预 24 h)。后续实验操作中, 均设置 6 个复孔。

2.2.3 CCK-8 法检测 MPC5 细胞活力^[9]

取对数生长期待检测的 MPC5 细胞, 以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板内, 置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中连续培养 24 h, 使细胞贴壁。作用 24 h 后, 每孔加入 CCK-8 10 μL 溶液, 37°C 避光孵育 2 h, 于 450 nm 波长下检测光密度值, 计算细胞活力, 筛选木犀草素合适的作用浓度。

2.2.4 流式细胞术检测 MPC5 细胞凋亡情况^[9]

根据 CCK-8 检测结果重新进行分组, 将处于对数生长期的 MPC5 细胞分为对照组, 模型组, 甘露醇组, 实验组 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和阳性药物组。分别干预处理 24 h。用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化收集各组细胞, PBS 洗涤后, 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 分析各组细胞凋亡水平, 计算总凋亡率。

2.2.5 ELISA 法检测 MPC5 细胞炎症因子水平^[10]

根据 CCK-8 检测结果和细胞凋亡情况重新进行分组, 将处于对数生长期的 MPC5 细胞分为对照组, 模型组和实验组 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 后续均按此分

组进行实验。分别干预处理 24 h。收集细胞培养上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 分别检测 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 浓度。

2.2.6 蛋白质印迹法检测 MPC5 细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 通路相关蛋白表达水平^[11]

收集“2.2.5”项中各组处理后的 MPC5 细胞, 加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 提取总蛋白质。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 后转至聚偏氟乙烯膜。使用 5% 脱脂奶粉室温封闭非特异性结合位点 2 h, 分别加入 Bcl-2、Bax、Caspase-3 及特异性一抗 (稀释比例参照说明书), 4°C 摇床孵育过夜。次日经含吐温-20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h。最后使用 ECL 超敏发光液显影, 利用 Image J 软件分析各条带灰度值, 以 β -tubulin 为内参进行归一化定量分析。

3 统计学处理

用 SPSS 27.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异比较先行单因素方差分析 (ANOVA), 若方差齐则用最小显著性差异法 (LSD) 进行事后两两比较, 若方差不齐则选用 Tamhane's T^2 检验。

结 果

1 楮实子活性成分与 DKD 关键靶点的关联性及通路富集分析

本研究从楮实子中筛选出符合标准的活性成分 13 个, 与 DKD 相关疾病靶点映射后获得潜在作用靶点 42 个, 体现了其“多成分-多靶点”的调控特征。PPI 网络拓扑分析确定蛋白激酶 B1 (protein kinase B1, Akt1)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、肿瘤蛋白 53 (tumour protein 53, TP53)、热休克蛋白 90- α (heat shock protein 90- α , HSP90AA1) 等 13 个基因为关键枢纽靶点。GO 分析显示, 这些靶点主要富集于细胞凋亡、炎症反应及氧化应激等生物过程, KEGG 分析则揭示, PI3K/Akt 信号通路为最主要的富集通路。分子对接显示, 所有关键靶点与成分结合能均小于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$; 进一步的 MD 证实, HSP90AA1 与木犀草素形成的复合物结构最为稳定 (RMSD 稳定在 $0.25 \sim$

0.4 nm, 结合自由能达 $-34.08 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)。综合上述预测与验证,本研究选定木犀草素作为研究对象,并聚焦 PI3K/Akt 信号通路进行后续细胞实验验证。

2 木犀草素对高糖诱导的 MPC5 细胞活力的影响

模型组与对照组相比,实验组 (5.0 、 15.0 、 30.0 、 $45.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与模型组相比,在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$);甘露醇组与对照组相比, $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组与模型组相比, $45.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组与 $30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组相比,在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。说明浓度达到 $30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时木犀草素作用进入平台期,因而选择 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的木犀草素进行后续实验,见表 1。

3 木犀草素对高糖诱导的 MPC5 细胞凋亡的影响

对照组、模型组、甘露醇组、实验组和阳性药物组的细胞总凋亡率分别为 $(6.23 \pm 0.40)\%$ 、 $(35.47 \pm 3.08)\%$ 、 $(6.42 \pm 0.52)\%$ 、 $(11.20 \pm 1.46)\%$ 和 $(10.78 \pm 1.06)\%$ 。模型组与对照组相比,实验组、阳

性药物组分别与模型组相比,在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$);甘露醇组与对照组相比,在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 1。

4 木犀草素对高糖诱导的 MPC5 细胞中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 炎症因子释放的影响

与对照组相比,模型组细胞中的 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著升高 (均 $P < 0.001$);与模型组相比,实验组细胞中的 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著降低 (均 $P < 0.001$),见表 2。

5 木犀草素对高糖诱导的 MPC5 细胞中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组细胞中 Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$);Bcl-2 蛋白相对表达水平显著降低 ($P < 0.001$);与模型组相比,实验组 MPC5 细胞中 Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.001$);Bcl-2 蛋白相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$),见表 3 和图 2。

6 木犀草素对高糖诱导的 MPC5 细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

模型组与对照组相比,实验组与模型组相比, HSP90AA1、p-Akt 和 p-Akt/Akt 相对表达水平,在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$);Akt

表 1 木犀草素对 MPC5 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of luteolin on MPC5 cells viability ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Cells Viability (%)
Control	6	100.0 $\pm$ 3.14
Model	6	45.21 $\pm$ 4.60 ***
Mannitol	6	98.03 $\pm$ 5.02
Experimental - 2.5	6	46.65 $\pm$ 4.78
Experimental - 5.0	6	60.22 $\pm$ 6.02 $\Delta\Delta\Delta$
Experimental - 15.0	6	74.75 $\pm$ 5.93 $\Delta\Delta\Delta$
Experimental - 30.0	6	87.59 $\pm$ 6.90 $\Delta\Delta\Delta$
Experimental - 45.0	6	88.07 $\pm$ 7.91 $\Delta\Delta\Delta$
Positive drug	6	88.89 $\pm$ 5.79 $\Delta\Delta\Delta$

Control group: MPC5 cells were cultured for 48 h under the condition of $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose; Model group: Treated with $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose for 48 h; Mannitol group: Treated with $44.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol for 48 h on the basis of the control group; Experimental group: Treated with $2.5, 5.0, 15.0, 30.0, 45.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ luteolin for 24 h on the basis of the model group; Positive drug group: Treated with $100.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ captopril for 24 h; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

表 2 木犀草素对 MPC5 细胞中白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF- α) 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of luteolin on the expression levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor (TNF- α) in MPC5 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	IL-6 (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	IL-1 β (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	TNF- α (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)
Control	6	29.52 $\pm$ 2.21	12.68 $\pm$ 1.17	23.15 $\pm$ 1.81
Model	6	91.12 $\pm$ 6.14 ***	47.42 $\pm$ 3.49 ***	79.35 $\pm$ 7.01 ***
Experimental - 30.0	6	36.48 $\pm$ 3.65 $\Delta\Delta\Delta$	18.08 $\pm$ 1.42 $\Delta\Delta\Delta$	29.62 $\pm$ 2.17 $\Delta\Delta\Delta$

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

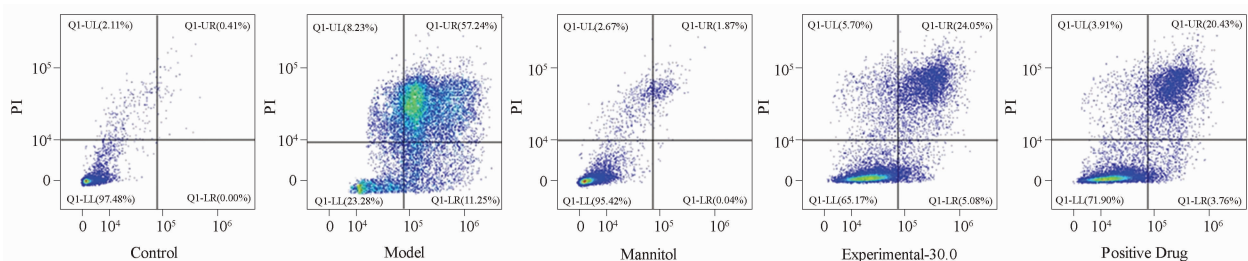


图 1 木犀草素对 MPC5 细胞凋亡的影响

Figure 1 Effects of luteolin on apoptosis in MPC5 cells

相对表达水平在统计学上差异无统计学意义($P>0.05$),见表4和图3。

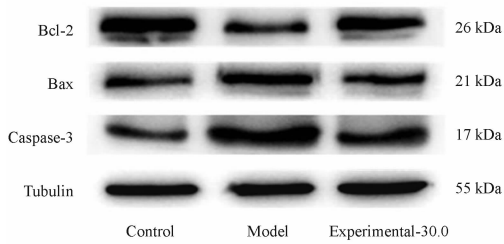


图2 蛋白质印迹法检测各组 MPC5 细胞中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达水平

Figure 2 Detection of the relative expression levels of Bcl-2, Bax and Caspase-3 proteins in MPC5 cells of each group by Western blot assay

表4 MPC5 细胞中磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路相关蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the relative expression levels of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway-related proteins in MPC5 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	HSP90AA1	p-Akt	Akt	p-Akt/Akt
Control	6	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.07
Model	6	1.96 ± 0.12 ***	2.20 ± 0.11 ***	0.98 ± 0.07	2.25 ± 0.07 ***
Experimental-30.0	6	1.08 ± 0.10 $\Delta\Delta\Delta$	1.09 ± 0.09 $\Delta\Delta\Delta$	0.99 ± 0.09	1.11 ± 0.06 $\Delta\Delta\Delta$

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

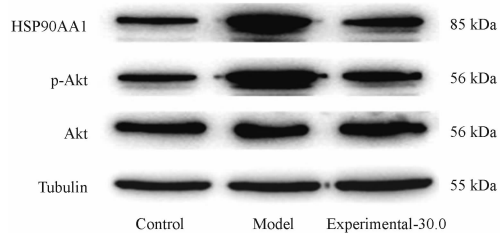


图3 蛋白质印迹法检测各组 MPC5 细胞中 PI3K/Akt 通路相关蛋白相对表达水平

Figure 3 Detection of the relative expression levels of PI3K/Akt pathway in MPC5 cells of each group by Western blot assay

讨 论

DKD 作为糖尿病主要微血管并发症,以持续性蛋白尿及肾功能进行性减退为特征,其病理机制涉及多信号通路交互失衡^[10]。现代医学虽可通过控糖、降压等方法延缓 DKD 的进展,但长期用药存在药物不良反应且难以逆转肾脏损伤^[12]。因此,从天然药物中挖掘多靶点、低毒性的新型治疗药物,具有重要的临床转化价值。楮实子作为桑科构树的果实,传统医学认为其可“补肾利水”。现代药理学证据表明,楮实子虽证实其具有抗炎、抗氧化应激及改善微循环等多种生物活性,但其发挥药效的物质基础及分子调控网络仍有待深入解析。

表3 MPC5 细胞中 B 细胞淋巴瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶3(Caspase-3)蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the relative expression levels of B-cell lymphoma-2 gene (Bcl-2), Bcl-2-related X protein (Bax), cysteine aspartate-specific proteinase-3 (Caspase-3) in MPC5 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Bcl-2	Bax	Caspase-3
Control	6	1.02 ± 0.11	1.01 ± 0.09	1.03 ± 0.08
Model	6	0.45 ± 0.04 ***	2.18 ± 0.17 ***	2.32 ± 0.17 ***
Experimental-30.0	6	0.92 ± 0.07 $\Delta\Delta\Delta$	1.12 ± 0.11 $\Delta\Delta\Delta$	1.31 ± 0.14 $\Delta\Delta\Delta$

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

本研究基于网络药理学锁定楮实子治疗 DKD 的关键活性成分,主要是薯蓣皂苷元与木犀草素。文献证实,薯蓣皂苷元可改善糖尿病模型肾功能^[13-14],木犀草素则通过抗炎、抗氧化及改善胰岛素抵抗等发挥肾保护作用^[15-16]。拓扑分析与分子对接显示,2者可稳定结合 Akt1、HSP90AA1 等核心靶点。KEGG 分析提示,PI3K/Akt 为关键通路,该通路通过调控 Akt1 介导的自噬、凋亡及纤维化进程参与 DKD 进展^[17-19]。MD 进一步验证,HSP90AA1-木犀草素复合物结合自由能最优($-34.08 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$),为后续的实验验证提供了精准导向。为进一步验证网络药理学的预测并阐明相关作用机制,本研究采用高糖($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖)诱导的 MPC5 细胞损伤模型进行体外实验。CCK-8 显示,高糖环境显著抑制了足细胞的活力,而不同浓度的木犀草素干预能够有效逆转这一趋势。特别值得一提的是,本研究设置了甘露醇高渗对照组,其与正常对照组在统计学上差异无统计学意义,进而排除了高渗环境对实验结果的干扰,证实了高糖对足细胞的损伤具有特异性^[9]。在此基础上,流式细胞术检测发现,木犀草素能将高糖诱导的细胞总凋亡率从 35.47% 大幅降至 11.20%,发挥了较强的抗凋亡作用。

在分子层面,本研究印证了网络药理学的预测。

炎症微环境是驱动 DKD 进展的核心因素,本研究发现木犀草素能显著抑制高糖环境下 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等促炎因子的释放。这与其靶向结合 PTGS2 (即环氧合酶 2) 等炎症关键节点的预测高度一致,揭示了其通过抑制炎症级联反应减轻肾脏损伤的途径^[20]。蛋白质印迹法进一步证实,木犀草素可下调 HSP90AA1 表达并特异性抑制 Akt 异常磷酸化,而不影响总 Akt 水平^[21],这表明,其可能通过下调 HSP90AA1,破坏了维持 Akt 稳定性的微环境,从而实现对 PI3K/Akt 通路过度激活的负向调控^[22]。此外,细胞凋亡相关蛋白的检测结果也进一步揭示了下游的肾脏保护机制。木犀草素能显著逆转高糖环境下 Bax/Bcl-2 比例的失调,并抑制 Caspase-3 的异常活化。结果表明,木犀草素通过阻断 PI3K/Akt 通路的过度激活,进而抑制了其下游的线粒体凋亡途径,最终实现了保护足细胞的目的^[23]。同时,下游 Bcl-2/Bax 及 Caspase-3 的变化,也间接支持了木犀草素可能通过调控肿瘤抑制蛋白 p53 来发挥抗细胞凋亡的作用^[24-25]。

本研究提示:木犀草素可能通过靶向调控 HSP90AA1/Akt 信号轴,抑制 PI3K/Akt 通路的过度激活,从而发挥抗炎与抗足细胞凋亡的双重肾脏保护作用,为阐释楮实子“补肾利水”的功效提供了现代分子生物学依据。但本研究局限于单一成分,后续将开展多成分协同作用及体内药效学验证,以全面揭示楮实子防治 DKD 的科学内涵。

参考文献:

- [1] GADDY A, ELRGAL M, MADARIAGA H, *et al.* Diabetic kidney disease[J]. *Dis Mon*, 2025, 71(4):101848.
- [2] TUTTLE K R, AGARWAL R, ALPERS C E, *et al.* Molecular mechanisms and therapeutic targets for diabetic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2022, 102(2):248—260.
- [3] SELBY N M, TAAL M W. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22(1):3—15.
- [4] 张兴,陆钰婷,杨玉兰,等. 楮实子功用的古文献研究[J]. *亚太传统医药*, 2019, 15(8):171—173.
- [5] 张晶,李冰冰,黄敏仪,等. 基于网络效应的薯蓣皂苷类成分调控糖代谢作用机制研究[J]. *世界中医药*, 2021, 16(2):197—205.
- [6] 马小丽,武朝阳,韩丽丽,等. 基于网络药理学及分子对接探讨八味柴芍合剂治疗胃食管反流病的潜在作用机制[J]. *中国临床药理学杂志*, 2025, 41(15):2195—2200.
- [7] 叶穗雯,毕晓莹,吕晓枝,等. 基于网络药理学及分子对接探讨中药治疗乳腺癌化疗后周围神经病变的研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2025, 41(12):1658—1663.
- [8] 陈小晴,黄杨玲,李姗姗,等. 基于网络药理学、分子动力学模拟和体外实验验证探讨骨方颗粒治疗骨质疏松症作用机制[J]. *中国中医药信息杂志*, 2025, 32(03):42—50.
- [9] 李冰心,许军英,张雅茹,等. 基于内质网应激 PERK-CHOP 信号通路探讨冬虫夏草对高糖诱导的足细胞凋亡的影响[J]. *中医药导报*, 2025, 31(5):8—12.
- [10] 郭楠楠,韩洁,安江科,等. 木犀草素调控 AMPK/SIRT1 通路对高糖诱导的肾小球系膜细胞自噬和凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(21):5334—5339.
- [11] 李霜青,刘艳,周韩菁. 雌马酚通过 CCDC92 调控 AMPK/mTOR 通路对糖尿病肾病足细胞损伤的作用及机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2026, 42(1):47—52.
- [12] 靳丁霞,王志刚. 中医药治疗糖尿病肾病的作用机制研究进展[J]. *实用中医内科杂志*, 2024, 38(11):130—133.
- [13] GAN Q, WANG J, HU J, *et al.* The role of diosgenin in diabetes and diabetic complications[J/OL]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2020, 198:105575. 2019-12-30 [2026-03-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31899316/>.
- [14] KANCHAN D M, SOMANI G S, PESHATTIWAR V V, *et al.* Renoprotective effect of diosgenin in streptozotocin induced diabetic rats[J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(2):370—377.
- [15] 林烨,柳丽,孙静,等. 木犀草素防治糖尿病的作用机制研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(7):112—118.
- [16] 张翠,王国光,朱海龙,等. 木犀草素对 STZ 诱导的糖尿病肾脏的保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(12):2405—2409.
- [17] 刘伟,朴元林. 中药对糖尿病肾病 PI3K/Akt 信号通路影响的研究进展[J]. *北京中医药*, 2022, 41(08):935—938.
- [18] CHEN S, LI B, CHEN L, *et al.* Uncovering the mechanism of resveratrol in the treatment of diabetic kidney disease based on network pharmacology, molecular docking, and experimental validation[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1):380.
- [19] 张雅琴,李小宁,吴萍萍,等. 苦瓜皂苷对糖尿病肾病 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *江苏医药*, 2015, 41(07):750—753.
- [20] GUAN Y, DAVIS L, BREYER M D, *et al.* Cyclooxygenase-2 contributes to diabetic nephropathy through glomerular EP4 receptor[J/OL]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2022, 159:106621. 2022-02-04 [2026-03-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35131551/>.
- [21] ZHENG M, JIA Z, WANG P, *et al.* Bioinformatics analysis and experimental validation reveal that heat HSP90AA1 enhances intestinal ischemia reperfusion induced necroptosis by inducing phosphorylated MLKL[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1):38698—38698.
- [22] 胡婷婷. 黄芪多糖对山羊肌内前体脂肪细胞增殖分化的调控作用[D]. 四川成都:西南民族大学, 2024.
- [23] 肖佳佳,曹正柳,周敏,等. 中药单体通过 STAT3 信号通路调控糖尿病肾病足细胞损伤的研究进展[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2025, 65(5):100—106.
- [24] YAN Z, ZHANG L, KANG Y, *et al.* Integrating serum pharmacochimistry and network pharmacology to explore potential compounds and mechanisms of *Alpinia oxyphylla* fructus in the treatment of cellular senescence in diabetic kidney disease[J/OL]. *Front Med (Lausanne)*, 2024, 11:1424644. 2024-07-03 [2026-03-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39021818/>.
- [25] 伍浩,兰琪,薛进宜,等. 心肌细胞程序性死亡对心肌梗死影响的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(23):5874—5879.

(本文编辑:王珊 收稿日期 2026-04-16)