◇ 基础研究 ◇

http://www.cjcpt.com
2026 Sep; 31(9): 1182-1192

# 薯蓣皂苷通过抑制 Akt/GSK-3β 信号通路减轻 UUO 诱导肾纤维化的机制研究

高骏伟[1]，马贵婕[2]，林晓蒙[1]，邓颖萍[1]，尹程倩[3]，
吴宸广[3]，刘　鹏[4]，钟光辉[1]

[1]浙江中医药大学附属宁波市中医院，宁波 315010，浙江；
[2]十堰市中西医结合医院，十堰 442000，湖北；
[3]黑龙江省中医药科学院，哈尔滨 150000，黑龙江；
[4]中国中医科学院西苑医院，北京 100091

**摘要**　**目的**：探讨薯蓣皂苷（dioscin，Dis）对单侧输尿管梗阻（unilateral ureteral occlusion，UUO）诱导的肾纤维化及转化生长因子-β1（transforming growth factor-beta 1，TGF-β1）诱导的人肾小管上皮（human renal tubular epithelial cells，HK-2）细胞上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）样表型改变的影响及机制。**方法**：将 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为假手术、UUO、UUO+Dis（50 mg/kg、100 mg/kg）组。术后干预 7 d，取肾组织进行苏木精-伊红和 Masson 染色观察肾组织病理学改变；免疫组化、蛋白质印迹法（Western blot）和实时荧光定量 PCR（real time PCR，RT-PCR）检测蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）/糖原合成酶激酶 3β（glycogen synthase kinase 3β，GSK-3β）通路及 EMT 相关分子表达。体外实验以 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞 EMT 样表型改变，给予 Dis 或/和 Akt 激动剂 SC79 干预 24 h，通过 Western blot、免疫荧光和 RT-PCR 检测上述指标。**结果**：Dis 显著改善 UUO 模型小鼠肾脏病理损伤和胶原沉积，能抑制 UUO 模型小鼠肾脏中 Akt/GSK-3β 磷酸化（$P<0.05$），降低纤维连接蛋白、α-平滑肌肌动蛋白（alpha smooth muscle actin，α-SMA）、波形蛋白（Vimentin）表达（$P<0.05$），上调 E-钙黏蛋白表达（$P<0.05$）。体外实验中，Dis 抑制 TGF-β1 诱导的 Akt/GSK-3β 磷酸化（$P<0.01$），逆转 α-SMA 及 Vimentin 表达升高（$P<0.01$）。此外，SC79 可激活该通路并加剧 TGF-β1 诱导的 EMT 样表型改变（$P<0.05$），而 Dis 能逆转 SC79 的上述作用（$P<0.01$）。**结论**：Dis 可能通过抑制 Akt/GSK-3β 信号通路过度激活，减轻 UUO 模型肾纤维化及 TGF-β1 诱导的 EMT 样表型改变。

**关键词**　肾纤维化；UUO 模型小鼠；薯蓣皂苷；Akt/GSK-3β 通路；SC79

**中图分类号**：R965.2；R285.5
**文献标志码**：A
**文 章 编 号**：1009-2501(2026)09-1182-11
doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2026.09.004

慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）在全球范围内的患病率高达 10% ~ 15%[1]，其进展至终末期常伴随肾纤维化，表现为细胞外基质（extracellular matrix，ECM）过度沉积与正常肾实质结构的破坏[2-3]。目前临床尚缺乏有效延缓或逆转肾纤维化的手段，因此阐明其机制并探寻有效干预策略具有重要意义。

2026-01-16 收稿　2026-04-03 修回
宁波市中医肾病临床医学研究中心（2023L001）；浙江省自然科学基金联合项目（LHDMY24H270001，LBY24H290002）；浙江省中医药重点学科建设项目（2024-XK-63）；宁波市中医肾病临床医学研究中心（2024L001）；宁波市重点研发计划暨“揭榜挂帅”项目（2023Z165）；浙江省中医药科技计划项目（2026ZL0117，2024ZL142）；宁波市科技计划项目（2023Z165，2024J259）
高骏伟，男，博士，住院医师，研究方向：中医药防治慢性肾脏病的基础及临床研究。
E-mail: gaojwdr@163.com
马贵婕，共同第一作者，女，硕士，住院医师，研究方向：中医药防治慢性肾脏病的基础及临床研究。
E-mail: maguijie@163.com
钟光辉，通信作者，男，主任医师，硕士生导师，研究方向：中医药防治慢性肾脏病的基础及临床研究。
E-mail: zgh20040712@126.com

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肾纤维化发生的关键环节,该过程中肾小管上皮细胞失去极性及细胞间连接,获得迁移、侵袭及分泌 ECM 的能力,并伴随 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达下降和 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、波形蛋白(Vimentin)表达上调[4]。转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)是诱导 EMT 的重要因子[5],其下游的蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)信号通路在 EMT 调控中发挥重要作用[6]。然而,近年来谱系示踪研究提示,在肾纤维化中肾小管上皮细胞可能主要表现为表型改变,而非经典的完全转分化[7]。薯蓣皂苷(dioscin, Dis)是一种天然甾体皂苷,广泛存在于薯蓣科植物如穿山龙和山药中,具有抗炎、抗氧化、免疫调节、降脂及抗纤维化等多种药理活性[8-10]。前期研究表明,Dis 在肺组织纤维化模型中可通过调控 TGF-β1/Smad 信号通路发挥保护作用[11],但其在肾纤维化特别是单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)模型中的作用及是否通过 Akt/GSK-3β 信号通路发挥作用尚不明确。因此,本研究旨在通过体内 UUO 小鼠模型与体外 TGF-β1 诱导的人肾小管上皮(human renal tubular epithelial cells, HK-2)细胞 EMT 样表型改变模型,探讨 Dis 对肾纤维化的改善作用及机制,为肾纤维化的药物治疗提供科学依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

1.1.1　*对象*　8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量 25 ~ 28 g,购自北京华阜康实验动物中心,动物合格证号:SCXK(京)2023-0004。动物饲养于(21±2)℃、相对湿度(60±5)%、12 h/12 h 明暗循环的环境中,自由饮食饮水。所有动物实验均经中日友好医院临床医学研究所伦理委员会批准。HK-2 细胞由香港中文大学医学院蓝辉耀教授惠赠。

1.1.2　*实验药物*　薯蓣皂苷(CAS: 19057-60-4,纯度>98.0%,货号 S-048)购自成都赫贝科技有限公司。

1.1.3　*器材*　Milli-Q Integral 5 超纯水机(德国 Merck Millipore 公司);电子分析天平(德国 Sartorius 公司);高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司);石蜡切片机和冰冻切片机(日本 Sakura 公司);全自动生化分析仪(美国雅培公司);iBright CL1000 凝胶成像系统(美国 Thermo Fisher 公司);细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);多功能酶标仪(美国 Biotek 公司);EPS-300 型电泳(上海天能科技有限公司);BX53 荧光显微镜、CKX41 倒置显微镜和 DP70 图像采集系统(日本 OLYMPUS 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.1.4　*试剂*　10% 中性福尔马林溶液、4% 多聚甲醛(北京化学试剂公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、中性树胶封片剂、吐温 20、苏木紫染料、DAPI 溶液、10×TBST 缓冲液、Alexa Fluor 594 标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG(北京索莱宝科技有限公司);OCT 包埋剂(日本 Sakura 公司);HE 染液套装、Masson 染液套装(武汉谷歌生物科技有限公司);胎牛血清(澳大利亚 CellMax 公司);Gibco DMEM/F12 培养基、PBS 溶液、胰蛋白酶、双抗(美国 Thermo Fisher 公司);CCK-8 试剂盒、细胞 RNA 提取试剂盒、RevertAid First Strand cDNA 合成试剂盒、SYBR Green supermix、M5 超敏免疫组化试剂盒、5%BSA 封闭液、凝胶试剂盒、10×蛋白电泳缓冲液、ECL 化学发光试剂盒、蛋白预染 Marker(中国北京聚合美生物科技有限公司);PVDF 膜(德国 Merck Millipore 公司);20×转膜缓冲液(苏州新赛美生物科技有限公司);TGF-β1(100-21, 美国 PeproTech 公司);SC79(S7863, 美国 Selleck 公司);TGF-β1; Akt、p-Akt、GSK-3β、p-GSK-3β、α-SMA 抗体(46910T, 4060T, 12456T, 9323T, 19245S, 美国 Cell Signaling Technology 公司);Fibronectin、Vimentin、E-钙黏蛋白抗体(ab2413, ab92547, ab76055, 美国 abcam 公司);HRP 标记山羊抗兔二抗(BA1054, 美国 Boster 公司);HRP 标记抗小鼠二抗(德国 Merck Millipore 公司)。

1.1.5　*试剂配置*　Dis 溶解于 0.1 % DMSO 冻存备用;尿酸溶于 PBS 溶液中(NaOH 助溶),−20℃ 保存备用。

### 1.2　方法

1.2.1　*动物造模及给药方案*　将小鼠随机分为 4 组(每组 *n*=8):(1)假手术组(Sham);(2)UUO 模型组;(3)UUO+Dis 低剂量组(50 mg/kg);(4)UUO+

Dis 高剂量组(100 mg/kg)。UUO 模型构建参照前期研究[12]。所有小鼠经戊巴比妥钠麻醉后,分离左侧输尿管,用 4-0 丝线双重结扎并离断。假手术组仅分离输尿管,不予结扎。术后,Dis 干预组小鼠每日腹腔注射相应剂量 Dis(溶于 0.9% NaCl 溶液),连续 7 d;假手术组和 UUO 模型组则注射等体积溶剂。术后第 7 天,麻醉下收集双侧肾脏组织,部分置于液氮中速冻,部分用 4% 多聚甲醛固定,用于后续分析。

1.2.2 *组织病理学分析* 肾组织经固定、石蜡包埋后,制成 3 ~ 5 μm 切片,进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色和 Masson 染色,具体步骤参照文献[13],在光学显微镜(Olympus BX53)下观察肾组织病理学改变及胶原沉积。肾小管损伤程度采用半定量评分系统进行评估,对 HE 染色肾皮质切片进行双盲评分,基于以下病理参数:肾小管扩张、刷状缘脱落、肾小管萎缩及间质炎性细胞浸润。每项参数按 0-4 分计分:0 分(正常)、1 分(<25% 受累)、2 分(25% ~ 50%)、3 分(50% ~ 75%)、4 分(>75%),最终损伤评分为各参数总和。采用 Image J 软件对 Masson 染色图像进行胶原面积百分比定量分析。每张切片随机选取 5 个不重叠的高倍视野(×400),通过色彩阈值分离蓝色胶原纤维,计算胶原阳性面积占肾皮质总面积的百分比。

1.2.3 *免疫组织化学* 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,用蒸馏水清洗。在室温下用 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶。清洗后,将切片置于柠檬酸钠缓冲液(10 mmol/L, pH 6.0)中,微波处理 10 min 以进行抗原修复。待切片冷却后,在室温下用 5% 山羊血清封闭。接着,将切片分别与稀释后的 FN 抗体(1:50)及 α-SMA 抗体(1:50)孵育 2 h,再与二抗孵育 1 h。之后,将切片与链霉亲和素-POD 工作液在室温下孵育 30 min。最后,用 DAB 显色,苏木精轻度复染,再经过脱水、透明处理后封片。

1.2.4 *细胞模型及干预方案* HK-2 细胞采用含 10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM/F-12 培养基,于 37℃、5% $CO_2$ 培养箱中培养。细胞达 80% 融合后,分别以 TGF-β1(2 ng/mL)、不同浓度 Dis 和/或 SC79(10 μmol/L)处理 24 h,收集细胞进行蛋白及 RNA 提取。

1.2.5 *细胞活力检测* 将对数生长期的 HK-2 细胞以 $1\times10^4$ 个/孔的密度接种于 96 孔板,培养过夜后,分别加入不同浓度 Dis(0, 5, 10, 20, 40, 80 μmol/L)干预 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(OD 值)。每组实验重复 8 次。

1.2.6 *蛋白质印迹法(Western blot)* 提取肾组织或细胞总蛋白,BCA 法测定浓度。取等量蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后,转至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入相应一抗(Akt、p-Akt、GSK-3β、p-GSK-3β、α-SMA、Vimentin、E-cadherin,稀释比例均为 1:1 000)4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后,加入 HRP 标记的二抗(1:10 000)室温孵育 1 h。ECL 化学发光液显影,使用 iBright CL1000 成像系统采集图像,Image J 软件进行灰度值分析。

1.2.7 *免疫荧光染色* 将 HK-2 细胞接种于放置盖玻片的 24 孔板中,经不同处理后,用 4% 多聚甲醛固定,5% BSA 封闭。分别滴加抗 E-cadherin、p-Akt 或 Vimentin 一抗(1:100),4℃ 孵育过夜。次日,避光条件下滴加相应荧光二抗,室温孵育 2 h。DAPI 染细胞核后封片,于荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.8 *实时荧光定量 PCR(RT-PCR)* 提取肾组织及细胞中 RNA,使用 RevertAid First Strand cDNA 合成试剂盒将肾组织及细胞 RNA 逆转录为 cDNA,采用实时荧光定量 PCR 仪检测 Fibronectin、α-SMA、Vimentin、E-cadherin、β-actin 的 mRNA 表达。引物序列见 Tab.1。

1.2.9 *数据统计学处理* 数据均来源于至少重复 3 次的独立实验,采用 GraphPad Prism 9.0 软件统计分析数据,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较行单因素方差分析(One-way ANOVA),$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Dis 改善 UUO 小鼠肾组织病理损伤与胶原沉积** 通过 HE 和 Masson 染色评估肾组织病理改变。如 Fig.1 所示,假手术(Sham)组肾小球和肾小管结构正常,间质未见明显胶原沉积。UUO 模型组肾组织中呈现显著的肾小管扩张、萎缩伴刷状缘脱落、间质炎性细胞浸润及大量蓝色胶

**Tab.1　Primer sequences for real-time PCR**

| Species | Gene | Gene Primer sequence (5′-3′) | |
|---|---|---|---|
| Mouse | Fibronectin | F: AGGAACCGAGTACACCATCTA | R: GGGAAGCTCATCTGTCTTCTTC |
| | α-SMA | F: GTCCCAGACATCAGGGAGTAA | R: TCGGATACTTCAGCGTCAGGA |
| | Vimentin | F: CTGCTAACTACCAGGACACTA | R: CAGGTTCAGGGAAGAAAA |
| | E-cadherin | F: CAGTTCCGAGGTCTACACCTT | R: TGAATCGGGAGTCTTCCGAAAA |
| | β-actin | F: ACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAG | R: CATGAGGTAGTCTGTCAGGT |
| Human | Fibronectin | F: CCACAGTGGAGTATGTGGTTAG | R: CAGTCCTTTAGGGCGATCAAT |
| | α-SMA | F: CTATGAGGGCTATGCCTTG | R: GCTCAGCAGTAGTAACGAAGGA |
| | Vimentin | F: AGTCCACTGAGTACCGGAGAC | R: CATTTCACGCATCTGGCGTTC |
| | E-cadherin | F: CGAGAGCTACACGTTCACGG | R: GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG |
| | β-actin | F: AGGCATCCTCACCCTGAAGTA | R: CACACGCAGCTCATTGTAGA |

原纤维沉积。与 Sham 组相比，UUO 模型组肾小管损伤评分显著升高（$P$<0.01）；Dis（50 mg/kg 和 100 mg/kg）干预后，损伤评分明显下降（$P$<0.01）。Masson 染色定量分析显示，UUO 组胶原面积百分比显著增加（$P$<0.01）；Dis 低剂量和高剂量组较 UUO 组胶原面积百分比出现明显降低（$P$<0.01）。以上结果表明，Dis 能够减轻 UUO 诱导的肾组织损伤及纤维化。

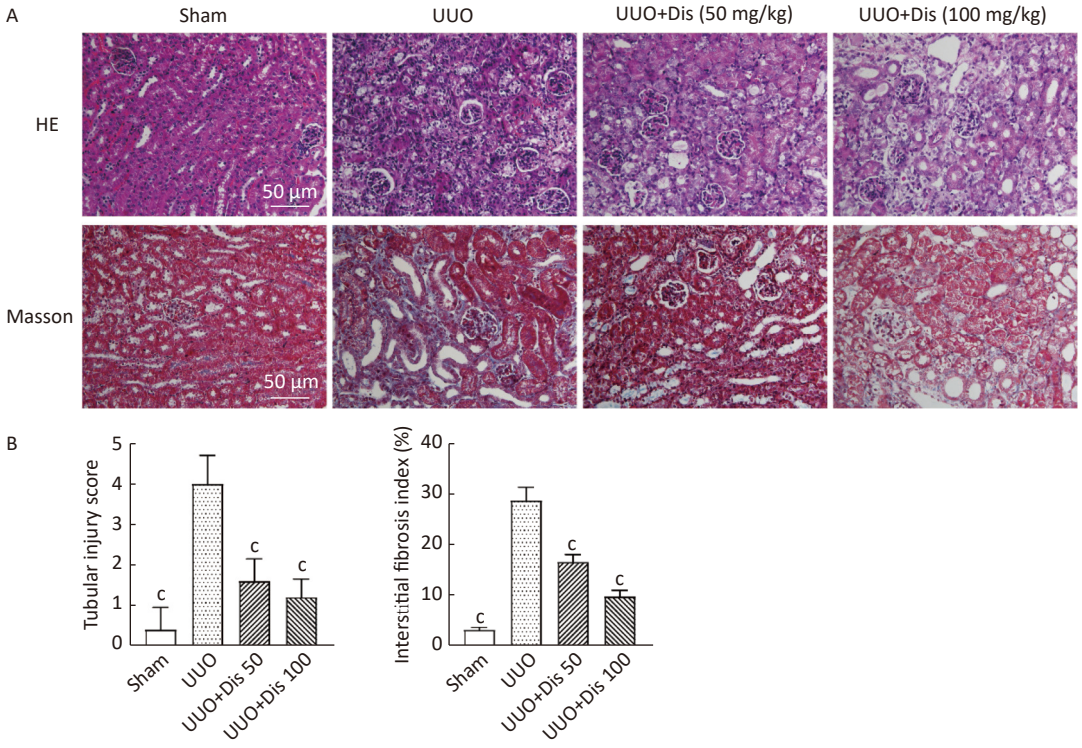



**Fig.1　Dioscin attenuates renal pathological changes and collagen deposition in UUO mice**

A: representative photomicrographs of HE staining of kidney tissues from each group on day 7 after UUO operation (bar=50 μm). Representative photomicrographs of Masson's trichrome staining of kidney tissues from each group (bar=50 μm). Blue areas indicate collagen deposition. B: Left: scoring of renal tubular damage assessed by loss of the brush border, tubular dilation, inflammatory cell infiltration degree according to random HE-stained kidney cortical region sections. Right: scoring of Masson's trichrome staining assessed by percentage of blue-stained collagen area in each selected random cortical region field ($\bar{x}\pm s$, $n$=5). $^{c}P$<0.01, compared with UUO group.

**2.2 Dis 抑制 UUO 小鼠肾组织 EMT 样表型改变及 ECM 沉积** 为探究 Dis 对肾纤维化过程中肾小管上皮细胞表型改变的影响，我们检测 EMT 标志物及 ECM 相关分子的表达。免疫组化结果显示(Fig.2A)，与 Sham 组相比，UUO 组肾间质 FN 和 α-SMA 表达显著增加；Dis 干预后，两者表达均被明显抑制。Western blot 结果进一步证实(Fig.2B-C)，UUO 组肾组织中 α-SMA、Vimentin 蛋白表达水平显著升高，而 E-cadherin 蛋白表达显著降低(均 $P<0.01$)。给予 Dis 干预后，以上蛋白表达的异常变化得到显著逆转，差异有统计学意义($P<0.05$)。RT-PCR 检测结果与蛋白表达水平一致(Fig.2D)，结果显示 UUO 组 FN、α-SMA 的 mRNA 表达明显上调，E-cadherin mRNA 表达明显下调($P<0.01$)；Dis 干预后能够一定程度恢复以上 mRNA 的表达水平($P<0.05$)。以上提示 UUO 手术成功诱导小鼠肾脏 EMT 样表型改变及 ECM 沉积，而 Dis 对此过程具有显著的抑制作用。

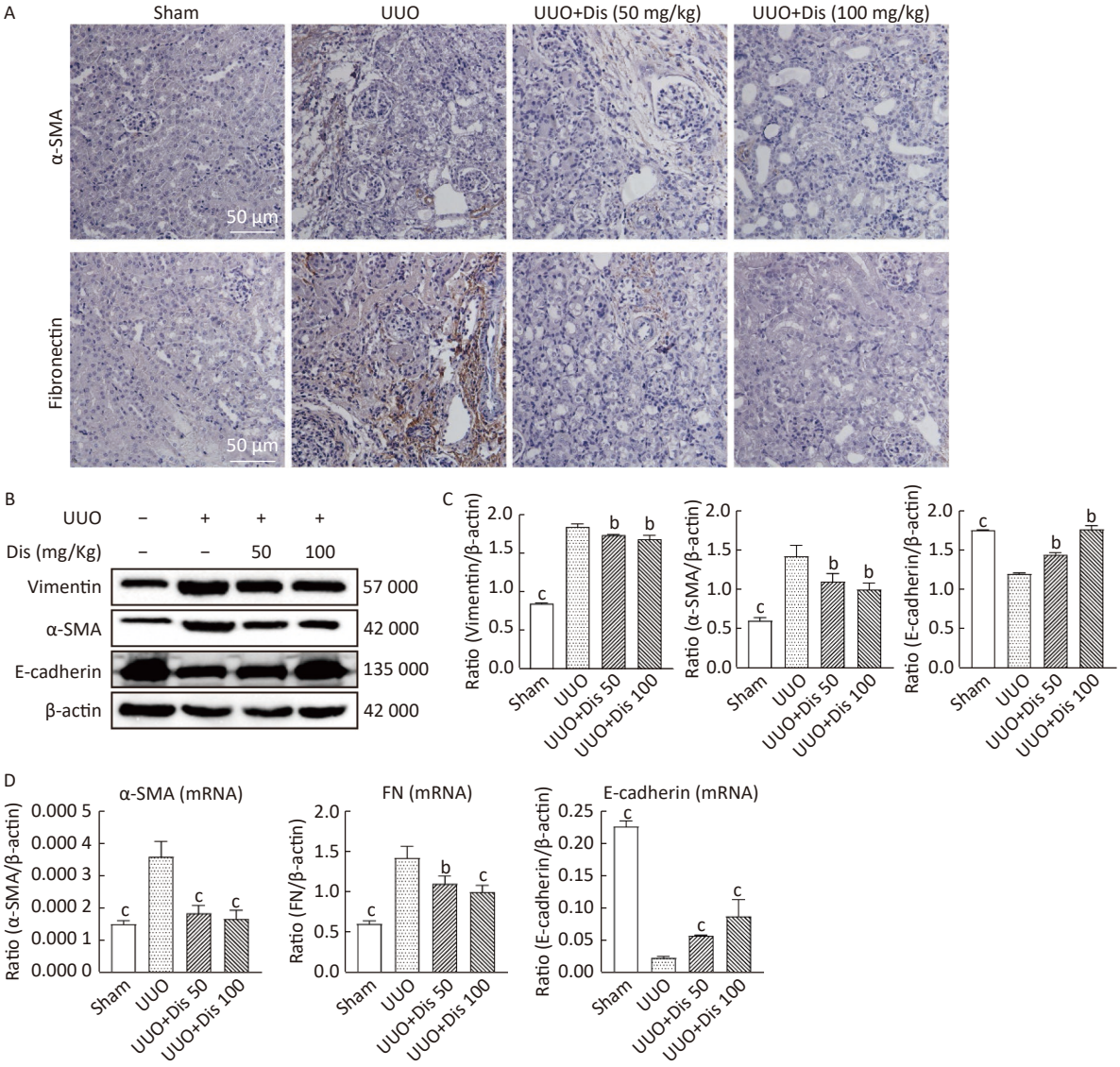



**Fig.2 Effect of Dioscin on the expression of EMT-related markers in kidneys of UUO mice**

A: representative images of immunohistochemical staining for α-SMA and FN in renal tissues (bar=50 μm). B: representative Western blot images showing the protein expression levels of α-SMA, Vimentin and E-cadherin in renal tissues. C: quantitative analysis of α-SMA, Vimentin and E-cadherin protein expression. D: mRNA relative expression levels of FN, α-SMA, and E-cadherin in renal tissues detected by RT-PCR ($\bar{x}\pm s$, $n=3$). $^{b}P<0.05$, $^{c}P<0.01$, compared with UUO group.

**2.3 Dis 抑制 UUO 小鼠肾组织 Akt/GSK-3β 信号通路激活** 为探讨 Dis 抗肾纤维化的作用机制，我们检测 Akt/GSK-3β 信号通路关键蛋白的表达。Western blot 结果显示(Fig.3A-B)，与 Sham 组相比，

UUO 组肾组织中 p-Akt、p-GSK-3β 蛋白水平及其相应的磷酸化比值(p-Akt/Akt, p-GSK-3β/GSK-3β)均显著升高($P$<0.01)。经 Dis 干预后，p-Akt 表达水平及 p-Akt/Akt 比值显著降低($P$<0.01)，并且 p-GSK-3β 的表达及其磷酸化比值也出现下降($P$<0.05)。这些结果表明，Dis 能够有效抑制 UUO 所诱导的肾脏 Akt/GSK-3β 信号通路的过度激活。

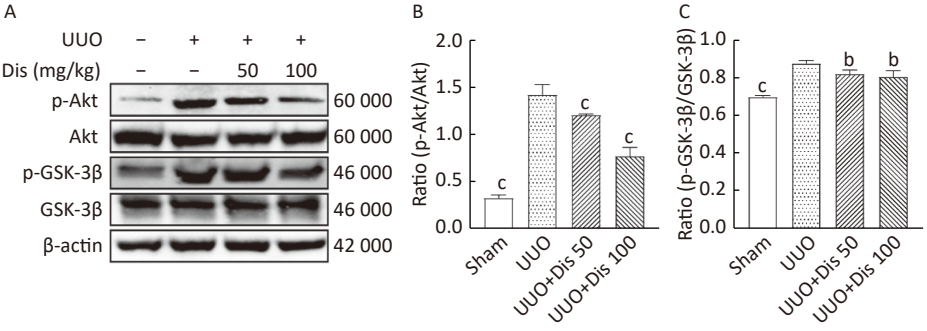



**Fig.3　Effect of Dioscin on the expression of Akt/GSK-3β pathway proteins in kidneys of UUO mice**

A: representative Western blot images showing the protein expression levels of Akt, p-Akt (Ser473), GSK-3β, and p-GSK-3β (Ser9) in renal tissues. B: quantitative analysis of p-Akt, Akt, p-GSK-3β and GSK-3β protein expression and the ratios of p-Akt/Akt and p-GSK-3β/GSK-3β ($\bar{x}\pm s$, $n$=3). $^bP$<0.05, $^cP$<0.01, compared with UUO group.

**2.4　Akt 磷酸化激动剂 SC79 加剧 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞 EMT**　为在细胞水平验证 Akt/GSK-3β 通路的功能，我们使用 Akt 磷酸化激动剂 SC79(10 μmol/L)进行研究。Western blot 结果显示(Fig.4A-D)，与对照组相比，TGF-β1 刺激可显著提高 HK-2 细胞中 α-SMA、Vimentin 蛋白表达($P$<0.05)及 p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β 比值($P$<0.05)；SC79 处理进一步加剧了 TGF-β1 诱导的上述蛋白表达及通路磷酸化水平的升高($P$<0.05)。RT-PCR 结果显示(Fig.4E)，SC79 能协同 TGF-β1，促进 α-SMA 和 Vimentin 的 mRNA 表达，同时抑制 E-cadherin 的 mRNA 表达($P$<0.05)。以上表明增强 Akt 磷酸化可加剧 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞 EMT 样表型改变。

**2.5　Dis 抑制 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞 EMT 样表型改变及 Akt/GSK-3β 通路过度激活**　首先通过 CCK-8 实验筛选 Dis 对 HK-2 细胞的安全浓度。结果显示(Fig.5A)，低于 20 μmol/L 的 Dis 对细胞活力无显著影响，而超过 40 μmol/L 则表现出显著的细胞增殖抑制作用($P$<0.01)。因此，后续实验选用 3、6、12 μmol/L 三个浓度干预细胞。Western blot 结果显示(Fig.5B-D)，TGF-β1 刺激可显著上调 HK-2 细胞 α-SMA、Vimentin 的蛋白及 mRNA 表达($P$<0.05)；不同浓度 Dis 处理可剂量依赖性地逆转这些变化($P$<0.05)。同时，免疫荧光染色显示(Fig.5E)，Dis 能抑制 TGF-β1 引起的 E-cadherin 表达下调和 Vimentin 表达上调。机制上，Western blot 结果显示(Fig.5F-G)，TGF-β1 刺激显著提高 HK-2 细胞中 Akt 和 GSK-3β 磷酸化水平($P$<0.01)；而 Dis 干预能以剂量依赖方式抑制对 Akt 和 GSK-3β 的磷酸化激活过程($P$<0.05)。

**2.6　Dis 可抑制 SC79 对 Akt/GSK-3β 通路的过度激活及 EMT 样表型改变的促进作用**　为明确 Dis 可通过 Akt/GSK-3β 通路发挥抗肾纤维化作用。Western blot 结果显示(Fig.6A-D)，在 TGF-β1 刺激 HK-2 细胞中，SC79 可增强 Akt、GSK-3β 磷酸化水平($P$<0.01)，激活 Akt/GSK-3β 信号通路，从而导致 α-SMA 和 Vimentin 蛋白表达升高($P$<0.05)；而同时加入 Dis 干预后，Dis 能够显著拮抗 SC79 引起的上述效应($P$<0.01)。以上表明 Dis 通过抑制 Akt/GSK-3β 信号通路来发挥其抗 EMT 及肾脏纤维化作用。

## 3　讨论

在 CKD 向终末期进展的过程中，肾纤维化的发生涉及多条信号通路的复杂交互[14]。Akt/GSK-3β 通路在多种组织纤维化中被证实具有关键调控作用[6,15-16]。在肾脏中，该通路不仅参与 TGF-β1 诱导的 EMT 样表型改变，还调控炎症反应、细胞凋亡等多个纤维化相关过程[15]。然而，目前针对该通路的特异性抑制剂仍较为有限，尤其是来源于天然产物的化合物值得进一步探索。本研究

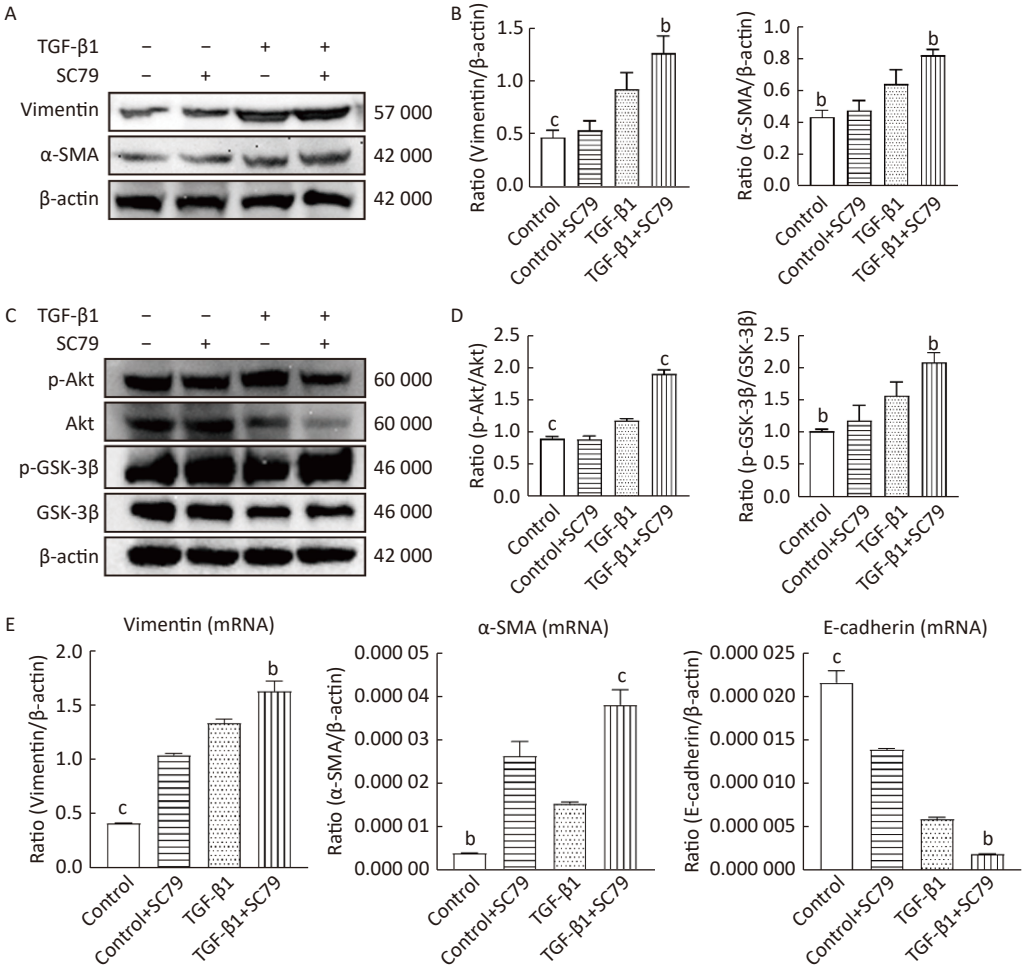



**Fig.4 The Akt phosphorylation agonist SC79 aggravates TGF-β1-induced EMT-like phenotypic changes in HK-2 cells**

A: representative Western blot images showing the protein expression levels of α-SMA and Vimentin in HK-2 cells from each group. B: quantitative analysis of α-SMA and Vimentin protein expression. C: representative Western blot images showing the protein expression levels of Akt, p-Akt, GSK-3β, and p-GSK-3β. D: quantitative analysis of p-Akt, Akt, p-GSK-3β and GSK-3β protein expression and the ratios of p-Akt/Akt and p-GSK-3β/GSK-3β. E: mRNA relative expression levels of α-SMA, Vimentin, and E-cadherin detected by RT-PCR ($\bar{x}\pm s$, $n$=3). $^{b}P$<0.05, $^{c}P$<0.01, compared with the TGF-β1 group.

在 UUO 诱导的肾纤维化模型中评价了 Dis 的保护作用，并揭示其作用机制与抑制 Akt/GSK-3β 信号通路密切相关。

本研究结果表明 Dis 能够显著抑制肾脏上皮细胞的 α-SMA、Vimentin 表达升高以及 E-cadherin 表达下降。值得注意的是，近年谱系示踪研究表明，在 UUO 肾纤维化模型中，肾小管上皮细胞并非直接转分化为肌成纤维细胞，而更倾向于发生部分性 EMT 表型改变[7]。具体而言，Lovisa 等研究显示受损肾小管上皮细胞在保留如 E-cadherin 等上皮标志物的同时获得 vimentin、α-SMA 表达的间质特征，但仍定位于肾小管基底膜内，未完全脱离上皮结构[17]。这些处于部分性 EMT 状态的细胞通过旁分泌机制释放促纤维化因子，激活间质驻留成纤维细胞，驱动细胞外基质沉积[18]。因此，本研究中观察到的 α-SMA、Vimentin 表达升高及 E-cadherin 下降，应理解为肾小管上皮细胞发生了 EMT 样表型改变，并伴随促纤维化旁分泌效应。Dis 对此过程的抑制可能通过减轻上皮细胞损伤及其促纤维化旁分泌效应实现。与某些天然产物通过抑制纤维化核心环节 EMT 来发挥抗肿瘤的作用机制相似[19]，Dis 可能通过调节相关转录因子或微环境中的细胞因子，阻遏 EMT 以减少胶原沉积和组织纤维化[20]。本研究进一步发现，Dis 在肾纤维化模型中表现出剂量依赖性地抑制 EMT 样表型改变的能力，且高剂量组效果更为显著，提示抑制 EMT 可能是其抗多器官纤维化作用的共同环节。为进一步明确 Dis 的

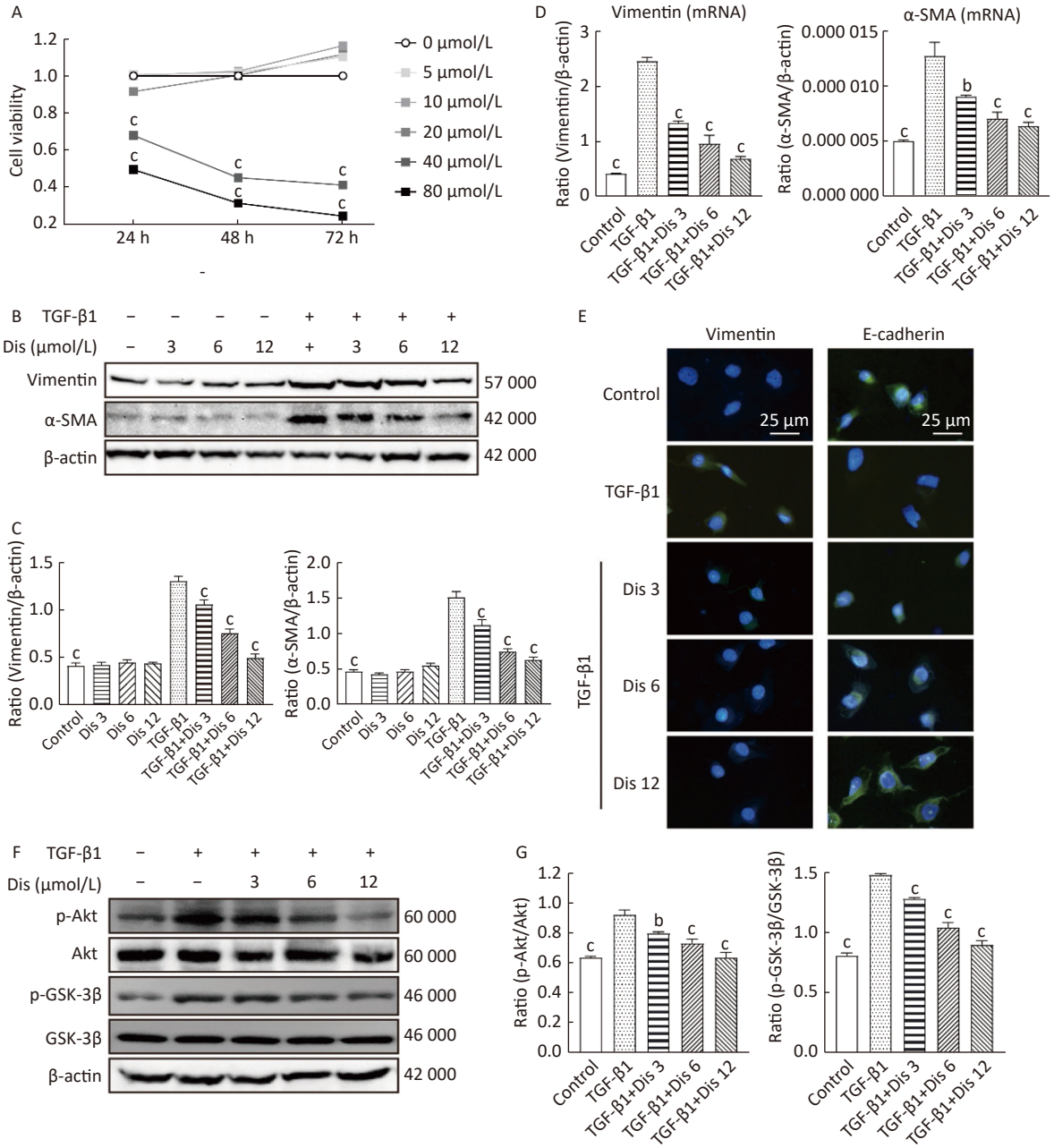



**Fig.5　Dis inhibits TGF-β1-induced EMT-like phenotypic changes and Akt/GSK-3β pathway activation in HK-2 cells**

A: cell viability of HK-2 cells treated with different concentrations of Dis for 24, 48, and 72 h, assessed by CCK-8 assay ($\bar{x}\pm s$, $n$=8). $^{c}P$<0.01, compared with the 0 μmol/L group. B: representative Western blot images showing the protein expression levels of α-SMA and Vimentin in HK-2 cells from different treatment groups. C: quantitative analysis of α-SMA and Vimentin protein expression. D: mRNA relative expression levels of α-SMA and Vimentin detected by RT-PCR. E: immunofluorescence staining for Vimentin (green) and E-cadherin (green). Scale bar=25 μm. F: representative Western blot images showing the protein expression levels of Akt, p-Akt, GSK-3β, and p-GSK-3β. G: quantitative analysis of the ratios of p-Akt/Akt and p-GSK-3β/GSK-3β ($\bar{x}\pm s$, $n$=3). $^{b}P$<0.05, $^{c}P$<0.01, compared with the TGF-β1 group.

作用机制，本研究利用 Akt 磷酸化激动剂 SC79 证实，激活 Akt/GSK-3β 通路可加剧 TGF-β1 诱导的 EMT 样表型改变，而 Dis 能有效逆转该效应，证实 Akt/GSK-3β 通路是 Dis 抗肾纤维化的关键作用靶点。GSK-3β Ser9 磷酸化作为其抑制性修饰，通过稳定 β-catenin 蛋白促进其核内积累并激活下游靶基因[21-22]。既往研究证实 Akt/GSK-3β 通路在细胞增殖、凋亡及 EMT 中发挥重要作用，且在肾纤维化过程中被激活[15]。Lee 等在肾小管细胞中证实 PI3K/Akt 通过磷酸化 GSK-3β 稳定 Snail 和 β-

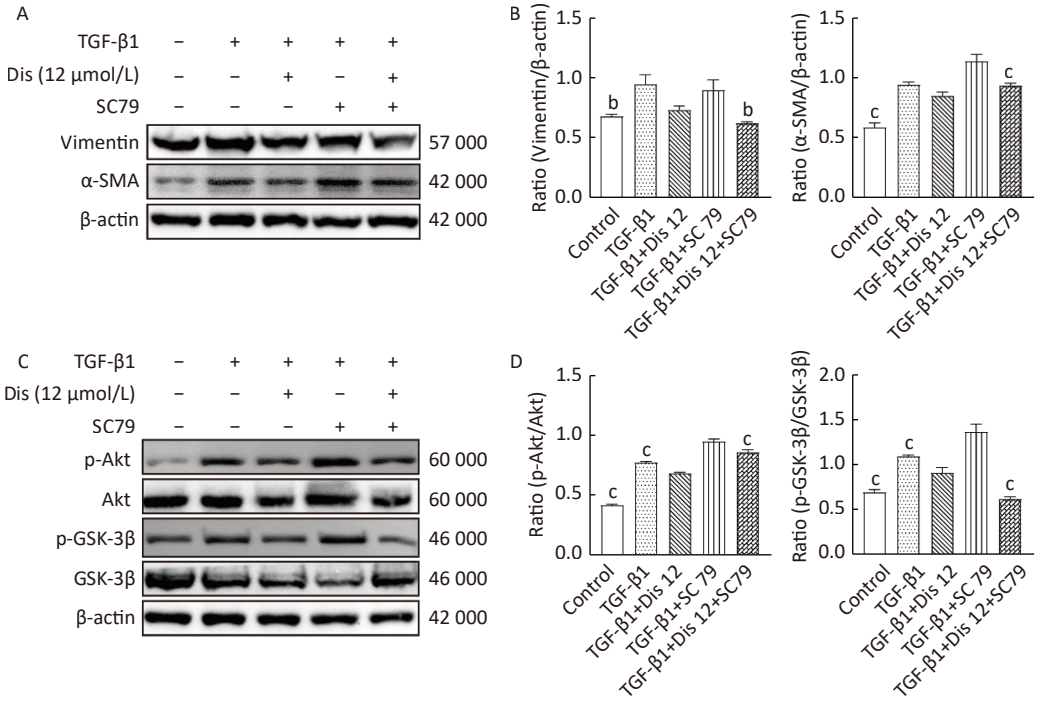



**Fig.6 Dis counteracted the effects of SC79 on Akt/GSK-3β pathway activation and EMT marker expression in HK-2 cells**
A: representative Western blot images showing the protein expression levels of α-SMA and Vimentin. B: quantitative analysis of α-SMA and Vimentin protein expression. C: representative Western blot images showing the protein expression levels of Akt, p-Akt, GSK-3β, and p-GSK-3β. D: representative Western blot images showing the protein expression levels of Akt, p-Akt, GSK-3β, and p-GSK-3β ($\bar{x}\pm s$, $n$=3). $^{b}P$<0.05, $^{c}P$<0.01, compared with the TGF-β1+SC79 group.

catenin, 促进 EMT 和肾纤维化[23]。此外, 有研究表明 GSK-3β/β-catenin/Snail1 是 TGF-β1 诱导肾纤维化的核心信号通路[24]。本研究观察到 Dis 可抑制 p-GSK-3β(Ser9)水平, 推测其可恢复 GSK-3β 活性, 促进 β-catenin 降解并抑制 Snail 介导的 E-cadherin 转录抑制。前期研究表明 Dis 可通过恢复 GSK-3β 活性、阻断 β-catenin 介导的转录, 从而抑制肺腺癌的增殖、侵袭及 EMT [25]。本研究则为 Dis 作为靶向 Akt/GSK-3β 通路的潜在抗肾纤维化药物提供了分子药理学证据。

然而, 本研究仍存在一定局限性。首先, 动物实验采用 UUO 急性梗阻模型, 由于对侧肾脏代偿, 血清学肾功能指标难以准确反映损伤程度, 且该模型未能涵盖糖尿病肾病、慢性肾小球肾炎等更贴近临床病程的慢性纤维化模型。其次, 尽管体内外实验均提示 Dis 通过抑制 Akt/GSK-3β 通路发挥作用, 但未检测 β-catenin、Snail 等下游转录因子以及 Dis 是否直接靶向 Akt 或通过其他受体影响该通路, 均有待深入研究。此外, 从临床转化角度而言, 近年来中药复方联合西药治疗慢性肾脏病取得显著进展, 如尿毒清颗粒联合非布司他可显著改善高尿酸血症肾损害患者肾功能[26], 提示 Dis 等中药活性成分具有临床需求背景。然而, Dis 作为甾体皂苷类化合物, 具有分子极性较大、膜渗透性受限等理化特征, 口服生物利用度较低, 且长期用药的安全性数据尚待积累; 未来需结合纳米制剂、靶向递送技术等新型给药系统以改善 Dis 的成药性, 并在糖尿病肾病等慢性模型中验证其疗效。基于此, Dis 可能更适合作为中药复方的组成部分, 通过多组分协同发挥肾保护作用。

综上所述, 本研究证实 Dis 能够显著减轻 UUO 诱导的肾纤维化及 TGF-β1 诱导的肾小管上皮细胞 EMT 样表型改变, 其保护作用可能与抑制 Akt/GSK-3β 信号通路的过度激活密切相关。以上发现不仅拓展对 Dis 药理作用的认识, 也为开发以其为基础的抗肾纤维化药物提供了重要的临床前依据。

## 参考文献

[1] Law JP, Pickup L, Pavlovic D, et al. Hypertension and cardiomyopathy associated with chronic kidney disease: epidemiology, pathogenesis and treatment considerations [J]. J Hum Hypertens, 2023, 37(1): 1-19.

[2] Yan H, Xu J, Xu Z, et al. Defining therapeutic targets for renal fibrosis: exploiting the biology of pathogenesis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 143: 112115.

[3] Zhang D, Zhang YH, Liu B, et al. Role of peroxisomes in the pathogenesis and therapy of renal fibrosis [J]. Metabolism, 2025, 166: 156173.

[4] Hsieh YH, Tsai JP, Ting YH, et al. Rosmarinic acid ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the phosphorylated-AKT mediated epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo [J]. Food Funct, 2022, 13(8): 4641-4652.

[5] Lu S, Chen X, Chen Y, et al. Downregulation of PDZK1 by TGF-β1 promotes renal fibrosis via inducing epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells [J]. Biochem Pharmacol, 2024, 220: 116015.

[6] Seo JH, Lee HJ, Sim DY, et al. Honokiol inhibits epithelial-mesenchymal transition and hepatic fibrosis via activation of Ecadherin/GSK3β/JNK and inhibition of AKT/ERK/p38/β-catenin/TMPRSS4 signaling axis [J]. Phytother Res, 2023, 37(9): 4092-4101.

[7] He S, Xia T, Guo Z, et al. Tracing the origin of myofibroblasts in kidney fibrosis [J]. Nat Commun, 2025, 17(1): 653.

[8] Li Y, Gao M, Yin LH, et al. Dioscin ameliorates methotrexate-induced liver and kidney damages via adjusting miRNA-145-5p-mediated oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 169: 99-109.

[9] Zhang W, Lin L, Zhang Y, et al. Dioscin potentiates the antitumor effect of suicide gene therapy in melanoma by gap junction intercellular communication-mediated antigen cross-presentation [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 150: 112973.

[10] Wang Y, Yu D, Zhu S, et al. The genus Dioscorea L. (Dioscoreaceae), a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicity [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 329: 118069.

[11] Dinesh Babu V, Suresh Kumar A, Sudhandiran G. Diosgenin inhibits TGF-β1/Smad signaling and regulates epithelial mesenchymal transition in experimental pulmonary fibrosis [J]. Drug Chem Toxicol, 2022, 45(3): 1264-1275.

[12] Hosseinian S, Rad AK, Bideskan AE, et al. Thymoquinone ameliorates renal damage in unilateral ureteral obstruction in rats [J]. Pharmacological Rep, 2017, 69(4): 648-657.

[13] Yin L, Li H, Liu Z, et al. PARK7 protects against chronic kidney injury and renal fibrosis by inducing SOD2 to reduce oxidative stress [J]. Front Immunol, 2021, 12: 690697.

[14] 钟小冬, 杨军平. 肾间质纤维化的关键信号通路和血清学指标研究进展 [J]. 光明中医, 2023, 38(22): 4490-4492.

[15] Sun AB, Li FH, Zhu L, et al. TRPC6 knockout alleviates renal fibrosis through PI3K/AKT/GSK3B pathway [J]. Curr Med Sci, 2024, 44(3): 589-602.

[16] Bao S, Chen T, Chen J, et al. Multi-omics analysis reveals the mechanism of action of ophiopogonin D against pulmonary fibrosis [J]. Phytomedicine, 2023, 121: 155078.

[17] Lovisa S, Lebleu VS, Tampe B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis [J]. Nat Med, 2015, 21(9): 998-1009.

[18] Minamida A, Nakata T, Kurose R, et al. Injured tubule derived CCN1 exacerbates renal congestion-mediated acute kidney injury and fibrosis [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 20840.

[19] Chen SL, Hu SW, Lin YY, et al. Boehmeria nivea extract (BNE-RRC) reverses epithelial-mesenchymal transition and inhibits anchorage-independent growth in tumor cells [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(17): 9572.

[20] Chiang CH, Lan TY, Hsieh JH, et al. Diosgenin reduces acute kidney injury and ameliorates the progression to chronic kidney disease by modifying the NOX4/p65 signaling pathways [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(31): 17444-17454.

[21] Alhaj Sulaiman A, Katanaev VL. Beyond antioxidants: how redox pathways shape cellular signaling and disease outcomes [J]. Antioxidants, 2025, 14(9): 1142.

[22] Hong CE, Le D, Lee M, et al. Pro-apoptotic and anti-EMT activity of wild ginseng adventitious root extract in MDA-MB-231 TNBC cells: association with GSK-3β/β-catenin signaling [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2026, 19(2): 86.

[23] Lee YJ, Han HJ. Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3β, Snail1, and β-catenin in renal proximal tubule cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(5): F1263-F1275.

[24] Kanlaya R, Peerapen P, Nilnumkhum A, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and fibrotic changes of renal

cells via GSK-3β/β-catenin/Snail1 and Nrf2 pathways [J]. J Nutr Biochem, 2020, 76: 108266.

[25] Mao W, Yin H, Chen W, et al. Network pharmacology and experimental evidence reveal dioscin suppresses proliferation, invasion, and EMT via AKT/GSK3b/mTOR signaling in lung adenocarcinoma [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 2135-2147.

[26] 李娟, 杨林. 尿毒清颗粒联合非布司他治疗高尿酸血症肾损害患者研究 [J]. 实用医学杂志, 2024, 40(10): 1418-1422.

# Dioscin attenuates UUO-induced renal fibrosis by inhibiting the Akt/GSK-3β signaling pathway

GAO Junwei[1], MA Guijie[2], LIN Xiaomeng[1], DENG Yingping[1], YIN Chengqian[3], WU Chenguang[3], LIU Peng[4], ZHONG Guanghui[1]

*[1] Ningbo Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Ningbo 315010, Zhejiang, China; [2] Shiyan Hospital of integrated Traditional and Western Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China; [3] Heilongjiang Academy of Chinese Medicine Sciences, Harbin 150000, Heilongjiang, China; [4] Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China*

**ABSTRACT** **AIM**: To investigate the effect of dioscin (Dis) on unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced renal fibrosis and on transforming growth factor-β1 (TGF-β1)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like phenotypic changes in human renal tubular epithelial (HK-2) cells, as well as its underlying mechanism. **METHODS**: Male C57BL/6J mice were randomly divided into sham-operated, UUO, UUO+Dis (50 mg/kg), and UUO+Dis (100 mg/kg) groups. After 7 days of intervention, kidney tissues were collected for hematoxylin-eosin and Masson's trichrome staining to observe histopathological changes. Immunohistochemistry, Western blot, and real-time PCR (RT-PCR) were used to detect the expression of protein kinase B (Akt)/glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β) pathway and EMT-related molecules. HK-2 cells were induced with TGF-β1 to establish an EMT-like phenotypic changes model and treated with Dis and/or the Akt agonist SC79 for 24 h. Western blot, immunofluorescence, and RT-PCR were performed to evaluate the above indicators. **RESULTS**: Dis significantly ameliorated renal pathological injury and collagen deposition in UUO mice. It inhibited the phosphorylation of Akt and GSK-3β in UUO kidneys ($P<0.05$), downregulated the expression of fibronectin, α-smooth muscle actin (α-SMA), and Vimentin ($P<0.05$), and upregulated E-cadherin expression ($P<0.05$). In HK-2 cells, Dis suppressed TGF-β1-induced phosphorylation of Akt/GSK-3β ($P<0.01$) and reversed the upregulation of α-SMA and Vimentin ($P<0.01$). Furthermore, SC79 activated this pathway and aggravated TGF-β1-induced EMT-like phenotypic changes ($P<0.05$), whereas Dis reversed these effects of SC79 ($P<0.01$). **CONCLUSION**: Dis may alleviate UUO-induced renal fibrosis and TGF-β1-induced EMT-like phenotypic changes by inhibiting the overactivation of the Akt/GSK-3β signaling pathway.

**KEYWORDS** renal fibrosis; UUO mice; dioscin (Dis); Akt/GSK-3β pathway; SC79