

基于肾脏代谢组学探讨知母皂苷治疗糖尿病肾病大鼠的作用机制

陈禹竹¹, 吴丹丹², 徐博学¹, 李 猛^{2*}

1. 黑龙江省传染病防治院, 黑龙江 哈尔滨 150599

2. 黑龙江中医药大学附属第四医院, 黑龙江 哈尔滨 150018

摘要: **目的** 通过肾脏代谢组学技术, 揭示知母皂苷治疗糖尿病肾病的潜在作用机制。 **方法** SD 雄性大鼠 40 只, 随机分为对照组、模型组、二甲双胍(阳性药, 65 mg·kg⁻¹)组、知母皂苷(30 mg·kg⁻¹)组, 每组 8 只。除对照组外, 各组大鼠喂养高脂饲料, 连续 28 d, ip 链脲佐菌素(STZ) 40 mg·kg⁻¹ 用于制备 2 型糖尿病(T2DM)大鼠模型。于造模成功后, 给药组 ig 给予知母皂苷或二甲双胍, 对照组和模型组大鼠每天 ig 蒸馏水, 连续给药 8 周。给药结束后, 称大鼠体质量, 使用血糖仪进行尾静脉血糖检测; 生化仪测定血清三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平; 苏木精-伊红(HE)染色观察肾组织病理变化; 采用超高效液相色谱串联飞行时间质谱分析技术(UPLC-Q-TOF-MS)对对照组、模型组、知母皂苷组大鼠肾脏代谢组学进行分析, 采用主成分分析法探寻潜在的关键性生物标志物, 联合人类代谢组学数据库(HMDB)和京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)找出对应的相关性代谢通路。 **结果** 与模型组比较, 二甲双胍、知母皂苷组大鼠体质量、血糖水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 血清 Scr、BUN、TC、TG 水平均显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 肾小管扩张、间质纤维化、血管淤血等情况均有改善。糖尿病肾病模型大鼠肾脏样本中发现 21 个潜在生物标志物, 涉及 18 条相关代谢通路, 其中甘油磷脂代谢、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成、亚油酸代谢为主要的代谢途径。 **结论** 知母皂苷可能通过调节甘油磷脂代谢、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成、亚油酸代谢治疗糖尿病肾病。

关键词: 糖尿病肾病; 肾脏代谢组学; 生物标志物; 知母皂苷; 甘油磷脂代谢; 苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成; 亚油酸代谢

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)11-3088-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.11.004

Investigation of mechanism of action of *Anemarrhena* saponin in preventing diabetic nephropathy in rats based on renal metabolomics

CHEN Yuzhu¹, WU Dandan², XU Boxue¹, LI Meng²

1. Heilongjiang Provincial Hospital of Infectious Disease Prevention and Control, Harbin 150599, China

2. The Fourth Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150018, China

Abstract: Objective To reveal the potential mechanism of action of *Anemarrhena* saponin in the treatment of diabetic nephropathy through renal metabolomics technology. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into the control group, model group, metformin (positive drug, 65 mg·kg⁻¹) group, and *Anemarrhena* saponin (30 mg·kg⁻¹) group, with 8 rats in each group. Except for the control group, all groups were fed a high-fat diet for 28 consecutive days and ip injected with streptozotocin (STZ) at 40 mg·kg⁻¹ to establish a type 2 diabetic (T2DM) rat model. After successful modeling, the drug groups were ig administered *Anemarrhena* saponin or metformin, while the control group was ig administered distilled water daily for 8 consecutive weeks. After the administration period, the body weight of the rats was measured, and blood glucose levels were detected by a blood glucose meter through the tail vein. Serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), serum creatinine (Scr), and blood urea nitrogen (BUN) levels were determined by a biochemical analyzer. Renal tissue pathological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was used to analyze the renal metabolomics of the control group, model group, and *Anemarrhena* saponin group. Principal component analysis was used to explore potential key

收稿日期: 2025-05-08

基金项目: 2024 年度黑龙江省卫生健康委科技计划资助项目(2024131050500)

作者简介: 陈禹竹, 从事中药药性及药效物质基础研究。E-mail: 1546084321@qq.com

*通信作者: 李 猛, 研究方向为中药学。E-mail: 282246311@qq.com

biomarkers, and the Human Metabolome Database (HMDB) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) were used to identify the corresponding metabolic pathways. **Results** Compared with the model group, the body weight and blood glucose levels of the metformin and *Anemarrhena* saponin groups were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), and the levels of serum Scr, BUN, TC, and TG were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). The conditions of renal tubular dilation, interstitial fibrosis, and vascular congestion were improved. Twenty-one potential biomarkers were identified in the renal samples of diabetic nephropathy model rats, involving 18 related metabolic pathways, among which glycerophospholipid metabolism, phenylalanine/tyrosine/ tryptophan biosynthesis, and linoleic acid metabolism were the main metabolic pathways. **Conclusion** *Anemarrhena* saponin may treat diabetic nephropathy by regulating glycerophospholipid metabolism, phenylalanine/tyrosine/tryptophan biosynthesis, and linoleic acid metabolism.

Key words: diabetic nephropathy; renal metabolomics; biomarkers; *Anemarrhena* saponin; glycerophospholipid metabolism; phenylalanine/tyrosine/tryptophan biosynthesis; linoleic acid metabolism

糖尿病肾病 (DN) 是 2 型糖尿病最常见的并发症, 也是全球终末期肾病的主要病因, 与高发病率 and 死亡率有关^[1-3], 其发病机制涉及糖脂代谢紊乱、氧化应激、炎症反应及肾脏纤维化等多重途径^[4-5]。当前临床治疗一直依赖于降血糖药物和血管紧张素抑制剂, 但长期使用存在肾毒性等不良反应^[6]。因此, 探寻安全有效的新型治疗策略具有迫切的临床需求。

代谢组学作为解析生物样本中小分子代谢物动态变化的前沿技术, 近年来在筛选生物标志物以及阐明疾病发展的潜在机制方面引起了关注^[7-8], 被越来越多地用于诊断疾病、探究疾病发生机制、寻找新的治疗靶点、个性化药物治疗等方面^[9-10]。

知母皂苷作为知母的主要活性成分, 既往研究表明其具有降血糖、抗炎、抗氧化、抗纤维化等活性^[10-15]。Yuan 等^[14]和张体华等^[15]的研究分别从硫氧还蛋白相互作用蛋白 (TXNIP)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)/核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路和抑制肾脏纤维化角度揭示了其部分作用机制。然而, DN 作为一种复杂的代谢性疾病, 其发生发展与代谢网络的整体失衡密切相关。目前从单一靶点或通路研究知母皂苷的作用, 难以全面阐释其治疗 DN 的整体效应和多靶点调控特性。

本研究采用肾脏组织代谢组学技术, 旨在系统性揭示知母皂苷干预 DN 模型大鼠后肾脏内源性代谢物的整体变化图谱, 筛选关键差异代谢物及受扰动的代谢通路, 从代谢网络调控层面深入探讨其治疗 DN 的潜在作用机制, 为全面阐明知母皂苷的药效物质基础和作用原理提供新证据, 为 DN 的治疗开拓新的思路 and 方向。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

知母皂苷 (普研生物科技有限公司, 批号

QT210615, 质量分数 >98%); 链脲佐菌素 (STZ, 北京博奥拓达科技有限公司, 生产批号 s6050); 二甲双胍 (北京圣永制药有限公司, 生产批号 2220109); 高脂饲料 (小泰有泰生物科技有限公司, 生产批号 202305001, 饲料配方: 基础饲料 + 10% 猪油 + 20% 蔗糖 + 2.5% 胆固醇 + 1% 胆酸钠); 三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 试剂盒, 深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.2 仪器

超高效液相色谱串联飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS)、QI3.0 软件 (美国 Waters 公司); 电子天平 (中国天马股份有限公司); 电子计量秤 (梅特勒-托利多公司); 低温医疗冷冻冰箱 (中国海尔有限公司); TDZ5-WS 离心机 (湘仪集团); ZMN-7803 全自动组织包埋机、ZMN-6802 病理组织漂烘仪 (华利电子有限公司); R139 轮转切片机、EMAC20 全自动染色机、CV5030 全自动封片机、ASP6025S 全自动脱水机 (徠卡显微系统); Chemray360 全自动生化分析仪 (雷度米特医疗有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。大鼠饲养环境温度控制于 (23 ± 3) °C, 湿度控制于 40%~70%, 12 h/12 h 光/暗周期交替, 每笼 8 只。本实验获得黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准, 伦理审查批准号 2022062023。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

SD 大鼠随机分为对照组、模型组、二甲双胍 (阳性药, $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组、知母皂苷 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[12, 15] 组。除对照组外, 各组大鼠喂养高脂饲料, 连续

28 d, ip STZ 40 mg·kg⁻¹ 用于制备 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠模型, 注射后 72 h, 空腹血糖高于 11.1 mmol·L⁻¹ 视为造模成功。于造模成功后, 给药组 ig 给予知母皂苷或二甲双胍, 对照组和模型组大鼠每天 ig 蒸馏水, 连续给药 8 周。

2.2 大鼠体质量及血糖的检测

给药结束后, 称大鼠体质量, 使用血糖仪进行尾静脉血糖检测。

2.3 大鼠血清生化指标的检测

末次给药后 24 h, ip 戊巴比妥钠麻醉后, 大鼠腹主动脉采血, 3 500 r·min⁻¹ 常温离心 10 min, 取血清 50 μL, 用生化仪测定血清 TG、TC、Scr、BUN 水平。

2.4 苏木素-伊红 (HE) 染色法检测肾组织病理学变化

末次给药后 24 h, ip 戊巴比妥钠麻醉后, 剥离大鼠肾脏, 肾组织经 10% 多聚甲醛固定后常规石蜡包埋、切片 (4 μm), 进行 HE 染色, 光学显微镜下观察肾组织病理变化。

2.5 代谢组学检测及分析

2.5.1 样本收集与制备 末次给药后 24 h, ip 戊巴比妥钠麻醉后, 剥离大鼠肾脏, 9 倍体积甲醇冰上研磨, 于 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取匀浆上清液储存在新离心管中, 重复上述操作, 取 2 μL 上清液进行肾脏代谢组学分析。

2.5.2 UPLC-MS 分析条件 色谱条件: 采用 BEH C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm i.d. Waters Corp, Milford, USA), 流动相 A 为乙腈 (含 0.05% 甲酸), 流动相 B 为水 (含 0.05% 甲酸), 梯度洗脱程序为 0~8 min, 98%→60% B; 8~10 min, 60%→2% B; 10~13 min, 2%→0 B; 13~14 min, 0→98% B; 14~17 min, 98% B; 体积流量为 0.40 mL·min⁻¹, 进样量为 2 μL, 柱温为 40 °C, 样品仓温度 5 °C。

质谱条件: 二极管阵列检测器全波长扫描模式, 紫外检测器流出液不经分流直接导入质谱系统检测。电喷雾离子源 (ESI), 采用正、负离子模式进行检测。锁定质量浓度为 2.0 μg·L⁻¹, 体积流量为 40 μL·min⁻¹。脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气流量 750.0 L·h⁻¹, 离子源温度 110 °C, 锥孔气流量 20 L·h⁻¹, 毛细管电压正离子 1 300.0 V, 负离子 1 500.0 V; 样品锥孔电压正离子 60.0 V, 负离子 70.0 V; 应用 LockSprayTM 校正系统进行亮

氨酸脑啡肽在线质量校正, 数据采集范围 *m/z* 100~1 500。

2.5.3 潜在生物标志物分析 利用 QI 软件, 通过对大鼠尿液样本数据进行无监督主成分分析 (PCA) 以及监督正交偏最小二乘识别分析 (OPLS-DA) 筛选潜在的生物标志物, 以变量投影重要性 (VIP) > 1 作为投射筛选条件, 找出贡献值较大的生物标志物, 同时联合人类代谢组学数据库 (HMDB) 和京都基因与基因组百科全书数据库 (KEGG) 进行相关代谢通路分析。

2.6 数据处理

数据均采用 SPSS 26.0 软件进行分析, 实验数据统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间水平比较, 数据符合正态分布且方差齐采用 LSD 法检验, 若不齐则采用 Tamhane's *T*₂ 检验; 不符合正态分布则采用非参数检验。

3 结果

3.1 知母皂苷对 DN 大鼠体质量及血糖的影响

结果如表 1 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠体质量明显降低 ($P < 0.01$), 血糖明显升高 ($P < 0.01$); 相较于模型组, 二甲双胍组及知母皂苷组大鼠体质量显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 血糖显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

表 1 知母皂苷对 DN 模型大鼠体质量及血糖的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effects of *Anemarrhena saponin* on body weight and blood glucose in DN model rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g	血糖/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	440.16 ± 35.96	4.00 ± 0.38
模型	—	238.33 ± 42.89 ^{##}	21.44 ± 6.73 ^{##}
二甲双胍	65	313.17 ± 45.15 [*]	10.37 ± 6.35 ^{**}
知母皂苷	160	344.50 ± 85.14 ^{**}	9.15 ± 1.89 ^{**}

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.

3.2 知母皂苷对 DN 大鼠血清生化指标的影响

结果如表 2 所示, 与对照组相比, 模型组 Scr、BUN、TC、TG 均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 知母皂苷组 Scr、BUN、TC、TG 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.3 知母皂苷对 DN 大鼠肾组织病理学损伤的影响

结果见图 1, 对照组大鼠肾脏皮质中肾小球分布均匀, 肾小管上皮细胞圆润、饱满, 间质无明显增生, 未见明显的炎症改变; 模型组大鼠肾脏组织

表 2 知母皂苷对 DN 模型大鼠血清 Scr、BUN、TC、TG 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of *Anemarrhena* saponin on Scr, BUN, TC, and TG contents in DN model rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	25.25±2.15	6.26±1.26	1.13±0.60	0.48±0.11
模型	—	40.11±3.92 ^{##}	12.57±6.06 [#]	2.75±1.25 ^{##}	2.65±1.06 ^{##}
二甲双胍	65	29.26±2.06 ^{**}	9.67±5.03	2.07±1.03	1.72±0.60 [*]
知母皂苷	160	27.05±1.76 ^{**}	7.34±2.25 [*]	1.57±0.75 [*]	1.53±0.47 ^{**}

与对照组比较: [#] $P<0.01$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ 。

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group.

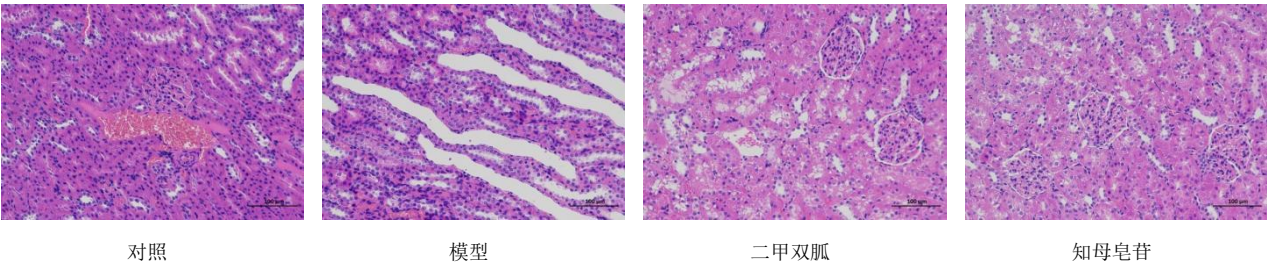


图 1 各组大鼠肾脏病理学损伤程度 (×200)

Fig. 1 Degree of renal pathologic damage in rats in each group (×200)

出现肾小球肥大, 肾小管上皮细胞气球样变性, 以及间质纤维化, 并多见血管淤血、扩张; 与模型组对比, 给药组肾小管扩张、间质纤维化、血管淤血等情况均有改善。

3.4 知母皂苷对 DN 大鼠肾脏样本代谢轮廓的影响

如图 2 所示, 采用 PCA 衡量不同组的聚类情况, 对照组、模型组、知母皂苷组在 PCA 评分图

中明显分开, 显示大鼠代谢水平发生显著改变; 与模型组相比, 知母皂苷组处于对照组与模型组中间, 趋向于对照组, 提示知母皂苷干预后 DN 大鼠的部分代谢物水平被逆转并回调趋于对照组水平。观察对照组和模型组 S-plot 图可知, 大多数代谢产物离子在 origin 周围聚集, 偏离原点的离子占少数, 这些偏离原点的离子说明两组之间存在差异。见图 3。

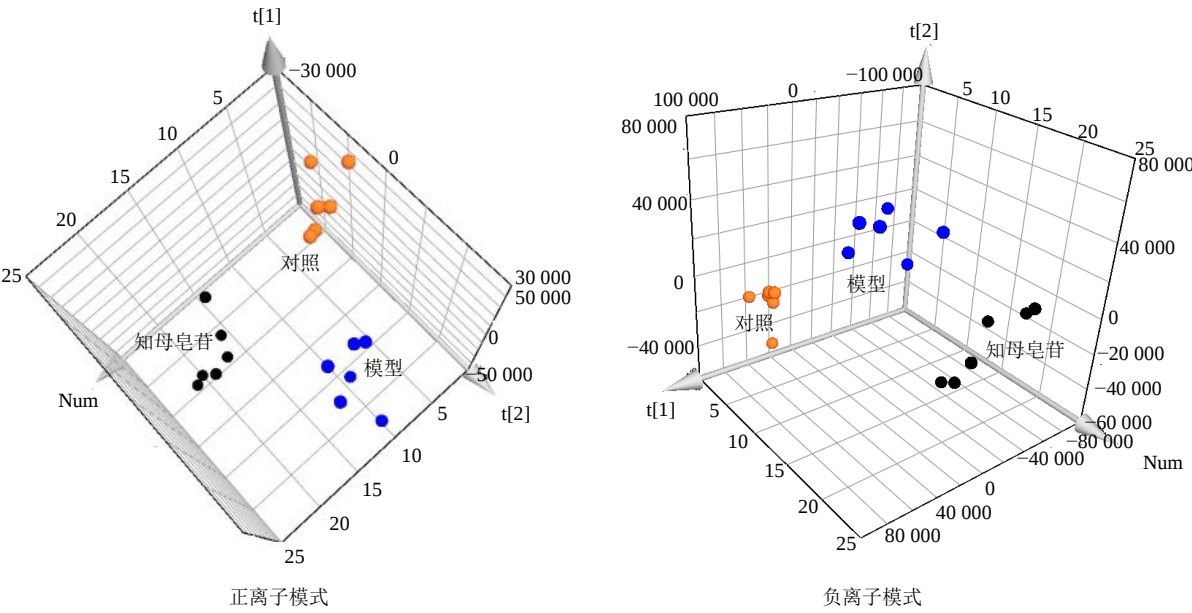


图 2 知母皂苷对 DN 的 3D-PCA 分析图

Fig. 2 3D-PCA analysis of DN by *Anemarrhena* saponin

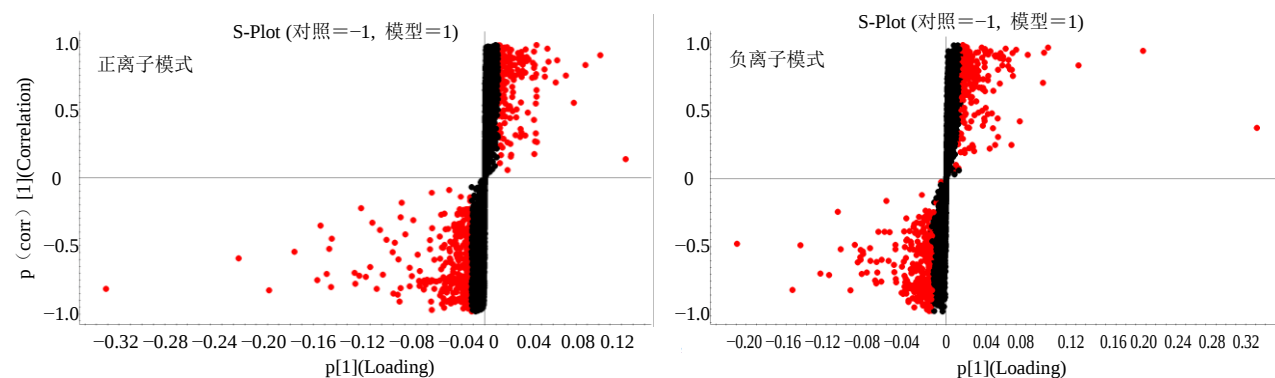


图 3 知母皂苷对 DN 的 S-Plot 分析图

Fig. 3 S-Plot analysis of DN by *Anemarrhena saponin*

3.5 知母皂苷对 DN 模型大鼠肾脏代谢内源性潜在生物标志物的影响

通过对大鼠肾脏样本代谢产物变化的预测,寻找符合 VIP>1, fold change>1.2 或<0.8 及 q -value>0.5 的代谢产物,对照组与模型组经比较发现 39 个差异代谢产物;给药知母皂苷干预后,可对

上述差异代谢产物中的 21 个具有回调的作用,此即为共同潜在生物标志物;经过离子强度的比较分析,与对照组相比,模型组 10 个生物标志物显著性上调,11 个生物标志物显著性下调;给药干预后,与模型组相比,知母皂苷组 11 个生物标志物显著性下调,10 个生物标志物显著性上调,见表 3。

表 3 知母皂苷对 DN 模型大鼠肾脏样本中共同潜在生物标志物的影响

Table 3 Effects of *Anemarrhena saponin* on common potential biomarkers in kidney samples from DN model rats

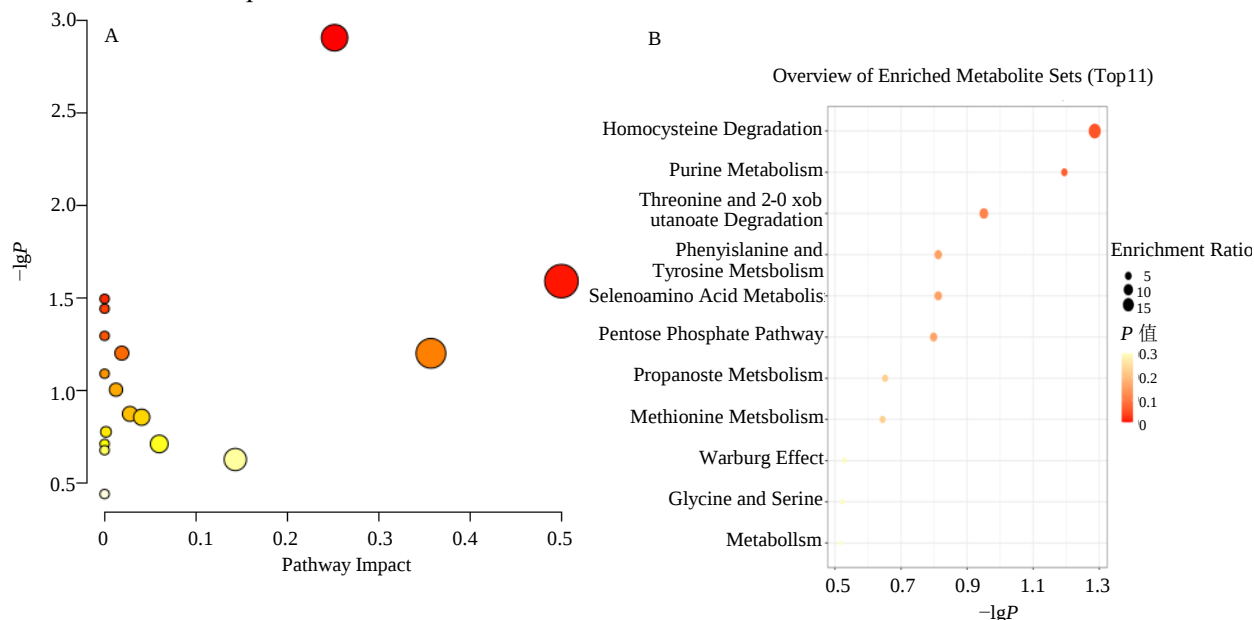
序号	t_R	m/z	离子模式	分子式	HMDB号	潜在生物标志物	中文名称	对照vs模型	模型vs知母皂苷
1	8.745 6	520.508 1	+	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃	0000790	<i>N</i> -palmitoylsphingosine	<i>N</i> -棕榈酰鞘氨醇	↓#	↑*
2	3.605 4	544.339 6	+	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	0010396	lysoPC[20 : 4(8Z, 11Z, 14Z, 17Z)]	溶血磷脂酰胆碱	↑##	↓*
3	0.846 7	137.029 8	+	C ₅ H ₄ N ₄ O	0000157	hypoxanthine	次黄嘌呤	↑#	↓*
4	0.404 1	291.057 2	+	C ₇ H ₁₅ O ₁₀ P	0001068	<i>D</i> -sedoheptulose 7-phosphate	<i>D</i> -癸庚酮糖 7-磷酸	↑#	↓*
5	0.925 2	120.064 8	+	C ₄ H ₆ O ₃	0000005	2-ketobutyric acid	2-酮丁酸	↑#	↓*
6	2.242 9	466.311 4	+	C ₂₂ H ₄₄ NO ₇ P	0010380	lysoPC[14 : 1(9Z)]	溶血磷脂酰胆碱	↑##	↓**
7	0.996 6	176.058 3	+	C ₆ H ₆ O ₅	0060348	2-maleylacetate	马来乙酸	↓#	↑*
8	1.102 0	190.074 2	+	C ₆ H ₈ N ₂ O ₄	0001212	hydantoin-5-propionic acid	乙内酰脲-5-丙酸	↓#	↑*
9	8.538 6	608.470 2	+	C ₃₂ H ₆₆ NO ₇ P	0010405	lysoPC(24 : 0)	溶血磷脂酰胆碱	↓##	↑**
10	6.828 1	993.707 6	+	C ₂₄ H ₅₁ NO ₇ P	0062541	1-palmitoylglycerophosphocholine	1-棕榈酰甘油磷酸胆碱	↓#	↑*
11	8.967 1	754.556 0	+	C ₄₂ H ₇₆ NO ₈ P	0008426	PC[20 : 4(5Z,8Z,11Z,14Z)/14 : 0]	磷脂酰胆碱	↓##	↑**
12	8.374 8	671.465 7	-	C ₃₇ H ₆₉ O ₈ P	0007860	PA[16 : 0/18:2(9Z,12Z)]	磷脂酸	↓#	↑*
13	0.846 8	267.072 9	-	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	0000195	inosine	肌苷	↑#	↓*
14	4.475 2	552.365 0	-	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	0013122	lysoPC(P-18 : 0/0 : 0)	溶血磷脂酰胆碱	↓##	↑**
15	2.585 8	453.285 8	-	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	0000917	ursocholic acid	熊胆酸	↑#	↓*
16	1.173 6	178.050 2	-	C ₉ H ₉ NO ₃	0000992	3-succinoylpyridine	3-琥珀酰基吡啶	↑#	↓*
17	3.476 9	500.278 7	-	C ₃₂ H ₃₉ NO ₄	0005030	fexofenadine	非索非那定	↓	↑
18	4.268 0	466.297 4	-	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	0015057	buprenorphine	丁丙诺啡	↑	↓
19	1.230 8	322.949 4	-	C ₈ H ₁₁ Cl ₃ O ₇	0042049	trichloroethanol glucuronide	三氯乙醇葡萄糖苷酸	↓#	↑*
20	1.011 1	203.081 9	-	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	0000929	<i>L</i> -tryptophan	<i>L</i> -色氨酸	↓##	↑**
21	0.918 2	164.070 9	-	C ₉ H ₁₁ NO ₂	0000159	<i>L</i> -phenylalanine	<i>L</i> -苯丙氨酸	↑##	↓**

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

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

3.6 知母皂苷对 DN 模型大鼠肾脏样本中通路的影响

将大鼠肾脏样本中筛选出的潜在生物标志物进行富集分析,以临界值应大于 0.10 为条件筛选,结果显示共涉及 18 条代谢通路,其中 $P < 0.05$ 且 $\text{Impact} > 0$ 的关键代谢途径主要为甘油磷脂代谢 ($P = 0.001\,24$, $\text{Impact} = 0.252$)、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成 ($P = 0.025\,6$, $\text{Impact} = 0.5$)、亚油酸代谢 ($P = 0.031\,9$, $\text{Impact} = 0$)。知母皂苷干预后,与这些通路相关的代谢产物[如磷脂酰胆碱(PC)、溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)、磷脂酸(PA)、L-色氨酸]发生显著回调(表 3),提示知母皂苷通过调节这些关键代谢物的水平,调控相关代谢通路的稳态,进而发挥对 DN 的治疗作用,见图 4、表 4。



A-代谢物富集分析气泡图; B-代谢通路的分析图。

A-metabolite enrichment analysis bubble plot; B-analysis diagram of metabolic pathway.

图 4 知母皂苷对 DN 模型大鼠代谢通路影响的分析图

Fig. 4 Analysis of effects of *Anemarrhena saponin* on metabolic pathways in DN model rats

4 讨论

本研究应用肾脏代谢组学技术,在 DN 模型大鼠肾脏组织中鉴定出 21 个知母皂苷干预相关的潜在生物标志物,并富集到 18 条相关代谢通路。其中,甘油磷脂代谢、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成以及亚油酸代谢通路的扰动最为显著 ($P < 0.05$, $\text{Impact} > 0$),且干预后相关标志物水平显著回调,提示这 3 条通路可能是知母皂苷治疗 DN 的核心代谢调控靶点。

甘油磷脂(如 PC、LysoPC、PA)是细胞膜的主要结构成分,其代谢稳态对维持细胞膜流动性、信号转导(如炎症信号)和能量稳态至关重要^[16]。甘油磷脂代谢通过磷脂酶的水解联络体液代谢的相关信号通路,促进物质与能量代谢的正常运行,维持新陈代谢的平衡与稳态。磷脂酶的合成是影响甘油磷脂代谢产物的重要环节,其含量的减少会造成大量磷脂类代谢产物的堆积,导致相关代谢疾病

的发生^[17]。本研究在 DN 模型大鼠肾脏中观察到显著的甘油磷脂代谢失衡,具体表现为:多种 PC 显著上调,如 LysoPC[20 : 4(8Z, 11Z, 14Z, 17Z)]、LysoPC[14 : 1(9Z)],而多种 LysoPC 显著下调,如 PC[20 : 4 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)/14 : 0]、1-palmitoylglycero-phosphocholine、LysoPC (24 : 0)、LysoPC(P-18 : 0/0 : 0),同时 PA[16 : 0/18 : 2 (9Z, 12Z)]也显著下调。这与临床和实验研究报道的糖尿病患者/模型普遍存在的脂质代谢异常,特别是甘油磷脂代谢失衡相一致^[18]。PC/LysoPC 比值的异常升高与细胞膜流动性改变、胰岛素抵抗增强及炎症反应激活密切相关^[19-20]。LysoPCs 不仅是膜磷脂代谢产物,更是重要的生物活性脂质介质,具有调节炎症、细胞增殖和血管功能的作用。其水平降低可能削弱肾脏的保护性调节机制^[21]。此外,PA 作为信号脂质前体,其下调也可能影响下游信号通路的正常传导。知母皂苷干预后,显著回调了上述异常的 PC、

表 4 知母皂苷对 DN 模型大鼠代谢通路的影响

Table 4 Effects of *Anemarrhena* saponin on metabolic pathways in DN model rats

名称	化合物 总数	预期值 (Expected)	匹配个 数(Hits)	原始P值 (Raw P)	-lgP	Holm adjust	错误发现 率(FDR)	Impact
Glycerophospholipid metabolism (甘油磷脂代谢)	36	0.232 26	3	0.001 24	2.908 1	0.104	0.103 80	0.251 69
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成)	4	0.025 81	1	0.025 58	1.592 1	1	0.754 23	0.500 00
Linoleic acid metabolism(亚油酸代谢)	5	0.032 26	1	0.031 89	1.496 4	1	0.754 23	0
Aminoacyl-tRNA biosynthesis (氨酰-tRNA 生物 合成)	48	0.309 68	2	0.036 07	1.442 8	1	0.754 23	0
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis (缬氨 酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成)	8	0.051 61	1	0.050 57	1.296 1	1	0.754 23	0
Purine metabolism (嘌呤代谢)	65	0.419 35	2	0.062 72	1.202 6	1	0.754 23	0.018 85
Phenylalanine metabolism (苯丙氨酸代谢)	10	0.064 52	1	0.062 85	1.201 7	1	0.754 23	0.357 14
α -Linolenic acid metabolism (α -亚麻酸代谢)	13	0.083 87	1	0.081 00	1.091 5	1	0.850 52	0
Glycerolipid metabolism (甘油脂代谢)	16	0.103 23	1	0.098 83	1.005 1	1	0.922 46	0.012 46
Pentose phosphate pathway (磷酸戊糖途径)	22	0.141 94	1	0.133 57	0.874 3	1	1	0.027 75
Propanoate metabolism (丙酸代谢)	23	0.148 39	1	0.139 24	0.856 2	1	1	0.040 61
Phosphatidylinositol signaling system (磷脂酰肌醇 信号系统)	28	0.180 65	1	0.167 09	0.777 0	1	1	0.001 52
Glycine, serine and threonine metabolism (甘氨酸、 丝氨酸和苏氨酸代谢)	33	0.212 90	1	0.194 13	0.711 9	1	1	0
Cysteine and methionine metabolism (半胱氨酸和 蛋氨酸代谢)	33	0.212 90	1	0.194 13	0.711 9	1	1	0.059 83
Arachidonic acid metabolism (花生四烯酸代谢)	36	0.232 26	1	0.209 98	0.677 8	1	1	0
Tryptophan metabolism (色氨酸代谢)	41	0.264 52	1	0.235 76	0.627 5	1	1	0.143 05
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (细 胞色素P450对外源物的代谢)	68	0.438 71	1	0.362 35	0.440 9	1	1	0

LysoPC 及 PA 水平,表明其可能通过恢复肾脏甘油磷脂代谢平衡,保护肾细胞膜结构与功能,减轻脂毒性及相关的炎症反应,从而改善 DN 肾脏损伤。

芳香族氨基酸代谢通路在维持蛋白质合成、神经递质产生和能量代谢中起核心作用^[22]。本研究在 DN 模型大鼠肾脏中发现显著的芳香族氨基酸代谢紊乱,具体表现为: L-苯丙氨酸显著上调,而 L-色氨酸显著下调。这一现象在糖尿病及其并发症中已被广泛报道^[23-24]。苯丙氨酸蓄积可能通过多种途径加剧肾损伤,例如:竞争性抑制其他氨基酸转运,干扰蛋白质合成与修复;转化为苯乙胺等神经毒性物质;激活还原型辅酶 II (NADPH) 氧化酶产生活性氧 (ROS),直接损伤肾小管细胞等。色氨酸缺乏则限制了其作为必需氨基酸的生理功能,更重要的是,其作为犬尿氨酸途径的前体,其水平降低可能影响具有肾脏保护潜力的代谢物(如 NAD⁺前体)的生成,同时可能使代谢流向具有促炎/促氧化特

性的喹啉酸等产物倾斜,加剧肾脏炎症和氧化应激^[25]。此外,苯丙氨酸与酪氨酸代谢相互依赖(酪氨酸由苯丙氨酸羟化合成),其动力学紊乱在慢性肾脏病 (CKD) 早期即已发生改变,并与 DN 进展风险增加相关^[26-27]。知母皂苷干预后,有效回调了 L-苯丙氨酸的上调和 L-色氨酸的下调,提示其可能通过调节肾脏芳香族氨基酸代谢稳态,减轻苯丙氨酸累积导致的氧化损伤和毒性作用,并可能有利于恢复色氨酸代谢网络的平衡,间接发挥抗氧化、抗炎和保护血管内皮功能的作用,共同对抗 DN 进展。

亚油酸代谢异常与 DN 存在关联,虽然具体机制尚未完全明确,但已有研究表明其在疾病过程中发挥作用。有研究分析了 1 894 名成年人的医疗数据,发现高亚油酸水平与较低的炎症标志物和血糖调节指标有关。推测在 DN 中,亚油酸代谢可能通过影响炎症反应、血糖调节等过程参与疾病的发生

发展,知母皂苷可能通过调节亚油酸代谢通路中的相关生物标志物,对 DN 起到治疗作用,但具体机制还需进一步深入研究。

本研究采用肾脏代谢组学技术,揭示知母皂苷治疗 DN 的作用可能主要通过调节 *N*-palmitoylsphingosine、lysoPC[20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)]、LysoPC[14:1(9Z)]等 21 个代谢物水平进而调控甘油磷脂代谢、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成以及亚油酸代谢途径。推测知母皂苷有助于恢复肾脏的脂质代谢稳态、氨基酸平衡和炎症状态,从而减轻肾脏损伤,延缓 DN 进展。这为知母皂苷的“多成分-多靶点-多通路”整体调节作用提供了重要的代谢组学证据。然而本研究仍存在一定局限性:①仅采用单一剂量(30 mg·kg⁻¹)的知母皂苷干预,未探讨剂量-效应关系;②未分析知母皂苷具体是哪种单体皂苷(如知母皂苷 AIII、BII 等)在发挥主要作用;③未结合分子生物学实验(如 Western blotting)验证代谢通路关键酶的表达。未来研究可从以下方向深入:①开展多剂量梯度实验,优化知母皂苷给药方案;②分离鉴定知母皂苷中起主要作用的活性单体,并研究其构效关系;③结合转录组学和蛋白组学,解析代谢通路上下游调控机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Samsu N. Diabetic nephropathy: Challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 1497449.
- [2] Valencia W M, Florez H. How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control [J]. BMJ, 2017, 356: i6505.
- [3] Zhang L X, Long J Y, Jiang W S, et al. Trends in chronic kidney disease in China [J]. N Engl J Med, 2016, 375(9): 905-906.
- [4] Jin Q, Liu T T, Qiao Y, et al. Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: Role of polyphenols [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1185317.
- [5] Li J L, Li L X, Zhang Z, et al. Ferroptosis: An important player in the inflammatory response in diabetic nephropathy [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1294317.
- [6] 阮诺冰, 方朝晖. 中医药治疗糖尿病肾脏病研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2023, 35(7): 1438-1442.
- Ruan N B, Fang Z H. Research progress in Chinese medicine for the prevention and treatment of diabetic kidney disease [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2023, 35(7): 1438-1442.
- [7] Johnson C H, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(7): 451-459.
- [8] Bai L J, Wu C, Lei S H, et al. Potential anti-gout properties of Wuwei Shexiang Pills based on network pharmacology and pharmacological verification [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 305: 116147.
- [9] Xu X M, Fang C, Wang Y, et al. Integrating network pharmacology and metabolomics to elucidate the mechanism of action of Huang Qin Decoction for treatment of diabetic liver injury [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 899043.
- [10] 刘炳彤, 李良昌, 李光昭. 知母皂苷对肥大细胞活化的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1033-1035.
- Liu B T, Li L C, Li G Z. Effects of saponins from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge on mast cells activation [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2016, 27(5): 1033-1035.
- [11] Kang Y J, Chung H J, Nam J W, et al. Cytotoxic and antineoplastic activity of timosaponin A-III for human colon cancer cells [J]. J Nat Prod, 2011, 74(4): 701-706.
- [12] 刘卓, 金英, 刘婉珠, 等. 知母皂苷对脂多糖引起的大鼠学习记忆障碍和炎症反应的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(10): 1362-1366.
- Liu Z, Jin Y, Liu W Z, et al. Effects of SAaB on LPS-induced learning and memory disorders and inflammatory reaction in rat hippocampus [J]. Chin Pharmacol Bull, 2010, 26(10): 1362-1366.
- [13] Cong Y, Wang L M, Peng R J, et al. Timosaponin AIII induces antiplatelet and antithrombotic activity via Gq-mediated signaling by the thromboxane A2 receptor [J]. Sci Rep, 2016, 6: 38757.
- [14] Yuan Y L, Guo C R, Cui L L, et al. Timosaponin B-II ameliorates diabetic nephropathy via TXNIP, mTOR, and NF-κB signaling pathways in alloxan-induced mice [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 6247-6258.
- [15] 张体华, 刘鑫. 知母皂苷对糖尿病肾病大鼠的肾保护作用及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(10): 2439-2443.
- Zhang T H, Liu X. The renoprotective effect and mechanism of Zhimu saponin in diabetic nephropathy rats [J]. Chin J Gerontol, 2024, 44(10): 2439-2443.
- [16] 刘全亮, 张文浩, 杨娇. 知母皂苷激活 HIF-1α/VEGF 信号通路促进慢性脑低灌注大鼠血管生成 [J]. 解剖科学进展, 2025, 31(2): 225-228.
- Liu Q L, Zhang W H, Yang J. Anemarrhenasaponins

- activate the HIF-1 α /VEGF signaling pathway to promote angiogenesis in rats with chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Progr Anat Sci*, 2025, 31(2): 225-228.
- [17] Shen Y, Xie H K, Liu Z Y, et al. Characterization of glycerophospholipid molecular species in muscles from three species of cephalopods by direct infusion-tandem mass spectrometry [J]. *Chem Phys Lipids*, 2020, 226: 104848.
- [18] López-Hernández Y, Lara-Ramírez E E, Salgado-Bustamante M, et al. Glycerophospholipid metabolism alterations in patients with type 2 diabetes mellitus and tuberculosis comorbidity [J]. *Arch Med Res*, 2019, 50(2): 71-78.
- [19] Razquin C, Toledo E, Clish C B, et al. Plasma lipidomic profiling and risk of type 2 diabetes in the PREDIMED trial [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(12): 2617-2624.
- [20] Zhao X J, Fritsche J, Wang J S, et al. Metabonomic fingerprints of fasting plasma and spot urine reveal human pre-diabetic metabolic traits [J]. *Metabolomics*, 2010, 6(3): 362-374.
- [21] Tonks K T, Coster A C, Christopher M J, et al. Skeletal muscle and plasma lipidomic signatures of insulin resistance and overweight/obesity in humans [J]. *Obesity* (Silver Spring), 2016, 24(4): 908-916.
- [22] Lynch J H, Dudareva N. Aromatic amino acids: A complex network ripe for future exploration [J]. *Trends Plant Sci*, 2020, 25(7): 670-681.
- [23] Balint L, Socaciu C, Socaciu A I, et al. Metabolite profiling of the gut-renal-cerebral axis reveals a particular pattern in early diabetic kidney disease in T2DM patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6212.
- [24] Luo H H, Li J, Feng X F, et al. Plasma phenylalanine and tyrosine and their interactions with diabetic nephropathy for risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2020, 8(1): e000877.
- [25] Zakrocka I, Załuska W. Kynurenine pathway in kidney diseases [J]. *Pharmacol Rep*, 2022, 74(1): 27-39.
- [26] Lee H, Jang H B, Yoo M G, et al. Amino acid metabolites associated with chronic kidney disease: An eight-year follow-up Korean epidemiology study [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(7): 222.
- [27] Ibarra-González I, Cruz-Bautista I, Bello-Chavolla O Y, et al. Optimization of kidney dysfunction prediction in diabetic kidney disease using targeted metabolomics [J]. *Acta Diabetol*, 2018, 55(11): 1151-1161.

[责任编辑 兰新新]