

# 基于支链氨基酸代谢探讨益糖康对 db/db 小鼠肾损伤的影响

孙立亚，李嘉鑫，孙贵炎，王庆峰，王轲儿，杨宇峰<sup>\*</sup>，石岩<sup>\*</sup>  
(辽宁中医药大学，辽宁沈阳 110847)

**摘要：**目的 观察益糖康对 db/db 小鼠支链氨基酸代谢及肾损伤的影响。方法 8 周龄 db/db 小鼠随机分为模型组、益糖康组 (30 g/kg) 和 BT2 组 (20 mg/kg)，另设同周龄 db/m 小鼠作为正常组，各组给予相应药物或生理盐水灌胃 5 周后，检测小鼠体质量、空腹血糖 (FBG)、尿微量白蛋白 (mALB)；苏木素-伊红 (HE) 染色、马松 (Masson) 染色、过碘酸-雪夫 (PAS) 染色、过碘酸-六胺银 (PASM) 染色、透射电镜观察小鼠肾组织病理变化及超微结构；超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS/MS) 法检测小鼠肾组织支链氨基酸水平；蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肾组织内皮细胞标志物血小板内皮细胞黏附分子 1 (CD31)、内皮素 1 (ET-1) 表达，以及支链氨基酸分解代谢酶 BCKDK、PP2Cm、DBT 蛋白表达。结果 与正常组比较，模型组小鼠体质量、FBG、mALB、内皮细胞损伤标志物 ET-1 表达升高 ( $P < 0.01$ )，内皮细胞间连接蛋白 CD31 表达降低 ( $P < 0.01$ )；肾组织结构发生损伤，肾小球基底膜增厚，内皮细胞融合、增生、肿胀，内皮细胞膜的连续性中断，系膜区扩大，系膜基质增多，线粒体结构损伤；肾组织亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile)、缬氨酸 (Val) 水平升高 ( $P < 0.01$ )；BCKDK 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ )，PP2Cm、DBT 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较，益糖康组和 BT2 组小鼠体质量、FBG、mALB、ET-1 降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，CD31 升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；肾小球内皮细胞损伤减轻，肾组织形态得到一定改善；Leu、Ile、Val 水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；BCKDK 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )，PP2Cm、DBT 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论** 益糖康可能通过调节支链氨基酸代谢，缓解肾小球内皮细胞损伤，从而达到防治糖尿病肾损伤的效果。

**关键词：**益糖康；糖尿病；肾损伤；支链氨基酸；肾小球内皮细胞

中图分类号：R285.5 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2026)01-0065-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.01.010

## Effects of Yitangkang on renal injury in db/db mice based on branched-chain amino acid metabolism

SUN Li-ya, LI Jia-xin, SUN Gui-yan, WANG Qing-feng, WANG Ke-er, YANG Yu-feng<sup>\*</sup>, SHI Yan<sup>\*</sup>

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To observe the effect of Yitangkang on branched-chain amino acid metabolism and renal injury in db/db mice. **METHODS** Eight-week-old db/db mice were randomly divided into model group, Yitangkang group (30 g/kg) and BT2 group (20 mg/kg), and db/m mice of the same week age were set as normal group. After 5 weeks of gavage with corresponding drugs or normal saline, the body weight, fasting blood glucose (FBG) and urine microalbumin (mALB) of the mice were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson staining, periodic acid-Schiff (PAS) staining, periodic-acid silver methenamine (PASM) staining, and transmission electron microscopy were used to observe the pathological changes and ultrastructure of renal tissues. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to detect the levels of

收稿日期：2025-03-17

基金项目：国家中医药管理局青年岐黄学者项目（国中医药人教函〔2022〕256号）；辽宁省应用基础研究计划项目（2025JH2/101330106）；辽宁省教育厅高校基本科研项目（JYTZD2023197）；辽宁省科技计划联合计划自然科学基金·博士科研启动项目（2024-BSLH-152）

作者简介：孙立亚，女，博士在读，从事内分泌疾病的中医基础、临床研究。E-mail：952762386@qq.com

\*通信作者：杨宇峰，男，教授，硕士生导师，从事中西医结合防治糖尿病及其代谢综合征研究。E-mail：Yangyufeng5698@163.com

石岩，男，教授，博士生导师，从事中医药防治糖尿病及其代谢综合征研究。E-mail：shi\_yan0705@163.com

branched-chain amino acids in renal tissues. Western blot was used to detect the expressions of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31) and endothelin 1 (ET-1) and branched-chain amino acid catabolic enzymes BCKDK, PP2Cm and DBT proteins in renal tissue. **RESULTS** Compared with the normal group, the body weight, FBG, mALB, and endothelial cell damage marker ET-1 expression in the db/db group were increased ( $P < 0.01$ ), and the expression of endothelial intercellular connexin CD31 was decreased ( $P < 0.01$ ); the renal tissue structure was damaged, the glomerular basement membrane was thickened, the endothelial cells were fused, proliferated, and swollen, the continuity of the endothelial cell membrane was interrupted, the mesangial area was expanded, the mesangial matrix was increased, the mitochondrial structure was damaged; and the levels of leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val) in renal tissue were increased ( $P < 0.01$ ); the protein expression of BCKDK was increased ( $P < 0.01$ ), while the protein expressions of PP2Cm and DBT were decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the body weight, FBG, mALB and ET-1 in Yitangkang group and BT2 group decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while CD31 increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the damage of glomerular endothelial cells was alleviated and the morphology of renal tissue was improved to some extent; the levels of Leu, Ile and Val decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the protein expression of BCKDK decreased ( $P < 0.05$ ), while the protein expressions of PP2Cm and DBT increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** Yitangkang may alleviate the injury of glomerular endothelial cells by regulating the metabolism of branched-chain amino acids, thus achieving the effect of preventing and treating diabetic renal injury.

**KEY WORDS:** Yitangkang; diabetes; renal injury; branched-chain amino acids; glomerular endothelial cells

糖尿病是一种由于胰岛素分泌不足、胰岛素敏感性降低而导致机体高血糖的慢性代谢性疾病，糖尿病肾病是其主要并发症，表现为高血压、蛋白尿和肾功能进行性下降，已成为全球慢性甚至终末期肾病的主要原因，发病率在未来 20 年预计将增加近 50%，10 年累积死亡率高达 31.1%<sup>[1]</sup>。糖脂代谢紊乱是 2 型糖尿病出现肾脏并发症的原因，但糖尿病即使接受降糖降脂治疗，仍残留较高的肾脏并发症风险，说明单纯调控糖脂代谢在指导糖尿病肾病防治方面仍有局限性。支链氨基酸 (branched-chain amino acids, BCAAs) 是以支链侧链结构为特征的氨基酸，包括亮氨酸 (leucine, Leu)、异亮氨酸 (isoleucine, Ile) 和缬氨酸 (valine, Val)，是肠道菌群分解代谢产物，不仅是人体的重要能量来源，还作为调节葡萄糖、脂质、蛋白质代谢的信号分子来发挥作用，其分解代谢失调会引起多种代谢疾病的发生发展<sup>[2]</sup>。最新研究表明，BCAAs 可作为早期检测糖尿病肾病的生物标志物<sup>[3-5]</sup>，它会损害血管内皮<sup>[6]</sup>。国家岐黄学者石岩教授主张糖尿病从脾论治，带领团队创新性提出脾运转平衡理论，基于此创立的中药复方益糖康（国家专利 ZL201410287755.4）具有运脾化浊功效。课题组前期研究发现，糖尿病小鼠体内 BCAAs 水平升高，而益糖康可调节肠道菌群和 BCAAs 代谢来修复小肠屏障损伤，并通过调控

BCAAs 代谢来改善骨骼肌胰岛素抵抗，进而减轻糖尿病<sup>[7-11]</sup>。本研究在前期报道基础上，继续探讨益糖康对 db/db 小鼠肾损伤的影响，旨在丰富脾运转平衡理论的科学内涵，为该方防治糖尿病肾损伤提供新的靶点，从而进一步指导临床。

## 1 材料

**1.1 动物** 30 只 8 周龄雄性 db/db 小鼠，体质量 35~40 g；10 只 8 周龄雄性 db/m 小鼠，体质量 20~25 g，均购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0008]，饲养于辽宁中医药大学动物室，室温 (22±2)℃，相对湿度 40%~70%，12 h/12 h 昼夜交替，自由饮水摄食，小鼠垫料及维持饲料均购自沈阳茂华生物科技有限公司，已辐照消毒。动物相关操作均经辽宁中医药大学动物伦理委员会批准（伦理审查批号 21000042023198）。

**1.2 试剂与药物** 益糖康包含黄芪（批号 21090158）、红参（批号 21100366）、黄精（批号 20070143）等中药，严格按临床原方比例组方而成，由四川新绿色药业科技发展有限公司生产，购自辽宁中医药大学附属医院，使用时称量相应药物溶于蒸馏水，水浴加热至完全溶解，4 ℃保存。阳性对照药 α-酮酸脱氢酶激酶 (BCKDK) 的变构抑制剂 BT2 (500 mg/瓶，货号 HY-114855)，购自美国 MedChemExpress 公司。尿微量白蛋白 (mALB)

试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,货号E038-1-1);ECL发光液试剂盒(大连美伦生物技术有限公司,货号MA0186-1);5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、免冰浴快速转膜缓冲液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G2075-10ML、G2028-15);β-肌动蛋白(β-actin)、CD31、ET-1、BCKDK、PP2Cm、DBT抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号20536-1-AP、28083-1-AP、12191-1-AP、15718-1-AP、14573-1-AP、12451-1-AP)。

1.3 仪器 血糖仪、试纸(武汉恒康医疗器械有限公司);MK3酶标仪、ST16R高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);KL-T1全自动组织脱水机(湖北康龙电子科技有限责任公司);EG1150H石蜡包埋机(德国 Leica 公司);ECLIPSETS100倒置显微镜(日本 Nikon 公司);Power Pac<sup>TM</sup> Basic电泳仪、1658001垂直电泳槽、170-3932转移电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);5200全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

2.1 分组及给药 30只db/db小鼠按随机数字表法分为模型组、益糖康组和BT2组,每组10只,另选db/m小鼠10只作为正常组,适应性喂养1周后灌胃给药。结合前期研究<sup>[7]</sup>及小鼠与成人(70 kg)用药量换算(系数9.1),益糖康颗粒给药剂量为30 g/kg,将其溶于蒸馏水制成3 g/L药液。BT2给药剂量为20 mg/kg,取适量,依次加入10%二甲基亚砜(DMSO)、40%聚乙二醇(PEG300)、5%聚山梨醇酯80(Tween 80)和45%0.9%氯化钠溶液(NS),制成8.42 mmol/L澄清溶液,现用现配<sup>[7,12]</sup>,正常组和模型组灌胃给予蒸馏水,各组剂量均为0.1 mL/10 g,共5周,每周称定1次体质量,按其变化调整给药剂量。

2.2 样本采集 小鼠放入代谢笼中,接取24 h尿液,记录总尿量,4℃、1 800 r/min(离心半径10 cm)离心8 min,收集上清,用于mALB测定。取部分右肾组织,放入装有4%多聚甲醛的离心管中,用于苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色、过碘酸-雪夫(PAS)染色、过碘酸-六胺银(PASM)染色,另取部分放入电镜固定液中固定,用于透射电镜检测;其余-80℃保存,用于蛋白免疫印迹(Western blot)、超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测。

2.3 生化指标检测 各组小鼠最后1次灌胃给药

后禁食12 h,尾尖取血,检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)水平。严格按照试剂盒说明书,检测尿液mALB水平。

2.4 HE、Masson、PAS、PASM染色观察肾组织病理形态学变化 小鼠处死后分离肾组织,放入4%多聚甲醛中固定,进行常规石蜡包埋、切片、病理染色。HE染色:将脱水后的组织切片浸入苏木精染液中,酸性乙醇分化并通过自来水冲洗返蓝,再用伊红染色。Masson染色:严格按照说明书,切片分别用铁苏木精染核、酸性品红染胞质,再用磷钼酸分化,将胶原纤维染成蓝色。PAS染色:严格按照说明书,分别经碘酸、Schiff试剂及苏木精染核。PASM染色:将切片用过碘酸氧化后在甲胺银染液中反应,金氯和硫代硫酸钠处理以固定颜色,再用苏木精染核。上述染色完成后,切片进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,在光学显微镜下观察肾组织病理形态,并采集病理图像,ImageJ软件对Masson染色、PAS染色切片进行定量分析。

2.5 透射电镜观察肾小球内皮细胞损伤情况 将小鼠肾皮质切成约1 mm×1 mm×1 mm大小的组织块,预冷2.5%戊二醛固定,依次进行脱水、包埋和固化,连续切片,乙酸双氧铀和枸橼酸铅染色,在透射电子显微镜下观察肾组织超微结构变化并采集图像。

2.6 UPLC-MS/MS法检测小鼠肾组织支链氨基酸水平

2.6.1 肾组织样品制备 取解冻的样本50 mg左右,匀浆,加入1 000 μL 50%甲醇,振荡提取1 h,4℃、12 000 r/min离心10 min,取10 μL上清液,置于1.5 mL离心管中,加入10 μL超纯水、5 μL内标和40 μL异丙醇(含0.1%甲酸),涡旋振荡2 min,4℃、12 000 r/min离心10 min;另取10 μL,置于1.5 mL离心管中,加入70 μL硼酸缓冲盐、20 μL AccQ Tag衍生试剂,立即振摇10 s,1 min后过量衍生剂水解以结束反应,离心管在55℃下加热10 min,加入400 μL水稀释。

2.6.2 标准品制备 采用梯度稀释法,依次制成400、200、100、40、20、10、4、2、1 μmol/L氨基酸溶液,分别取20 μL,加5 μL内标和40 μL异丙醇(含0.1%甲酸),涡旋振荡2 min,4℃、12 000 r/min离心10 min,取10 μL上清液,置于1.5 mL离心管中,加入70 μL硼酸缓冲盐、20 μL AccQ Tag衍生试剂,立即振摇10 s,1 min后加入

过量衍生剂水解以结束衍生，55 °C 加热 10 min，加入 400 μL 水稀释，取 100 μL 上清液，转移至液相小瓶中，即得。

**2.6.3 色谱条件** Waters ACQUITY UPLC I-CLASS 超高效液相色谱仪，Waters UPLC HSS T3 色谱柱 (1.8 μm, 2.1 mm×150 mm)；流动相水 (0.1% 甲酸) (A) -乙腈 (B)，梯度洗脱 (0~0.5 min, 96% A; 0.5~2.5 min, 96%~90% A; 2.5~5 min, 90%~72% A; 5~6 min, 72%~5% A; 6~7 min, 5% A; 7~7.1 min, 5%~96% A; 7.1~9 min, 96% A)；体积流量 0.5 mL/min；柱温 50 °C；进样量 5.0 μL。

**2.6.4 质谱条件** Waters XEVO TQ-S Micro 串联四级杆质谱系统；正离子扫描；离子源电压 1.5 kV；锥孔电压 20 V；去溶剂气温度 600 °C，体积流量 1 000 L/h；锥孔气体积流量 10 L/h。

**2.6.5 靶向数据处理** 采用 MassLynx 定量软件计算峰面积，保留时间允许误差 15 s，通过标准曲线法进行定量分析。

**2.7 Western blot 法检测内皮细胞标志物 CD31、ET-1 及支链氨基酸分解代谢酶表达** 小鼠肾组织称定质量后置于离心管中，加入蛋白提取液，研磨后冰上静置 0.5 h 至充分裂解，4 °C、12 000×g 离心 10 min，取上清，即为提取蛋白，BCA 法测定浓度，95 °C 加热变性 5 min，取适量上样、电泳、转膜，快速封闭液封闭 20 min，加入兔来源 β-actin、CD31、ET、BCKDK、PP2Cm、DBT 抗体，4 °C 孵育过夜，洗膜后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗，室温孵育 1 h，TBST 洗膜后 ECL 曝光、显影，采用 ImageJ 软件测定灰度值。

**2.8 统计学分析** 通过 SPSS 27.0 软件进行处理，计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，满足正态分布、方差齐时组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法，方差不齐时采用 Dunnett T3 检验；不满足正态分布时组间比较采用非参数检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 益糖康对 db/db 小鼠一般状况及体质量的影响** 正常组小鼠活动自由，饮水摄食正常；与正常组比较，模型组小鼠多饮、多食、多尿，体质量增加 ( $P < 0.01$ )，出现弓腰塌背、懒动、反应迟钝、活动量下降，腹股沟和腋下脂肪堆积等表现，在后续饲养过程中稳定性良好；给药 5 周后，益糖康组

和 BT2 组小鼠症状有所改善，体质量降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，见表 1。

表 1 各组小鼠体质量比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

Tab. 1 Comparison of body weight of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

组别	体质量/g
正常组	23.85±0.96
模型组	59.69±2.63 **
益糖康组	56.70±1.48 #
BT2 组	54.51±4.04 ##

注：与正常组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

**3.2 益糖康对 db/db 小鼠 FBG、mALB 水平的影响** 给药 5 周后，与正常组比较，模型组小鼠 FBG、mALB 水平升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，益糖康组和 BT2 组小鼠 FBG、mALB 水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，见表 2。

表 2 各组小鼠 FBG、mALB 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

Tab. 2 Comparison of FBG and mALB levels in mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

组别	FBG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	mALB/(mg·L <sup>-1</sup> )
正常组	7.80±3.64	13.05±3.12
模型组	24.56±5.05 **	48.79±3.36 **
益糖康组	18.63±3.47 #	34.13±2.99 ##
BT2 组	19.29±6.55 #	37.00±5.17 ##

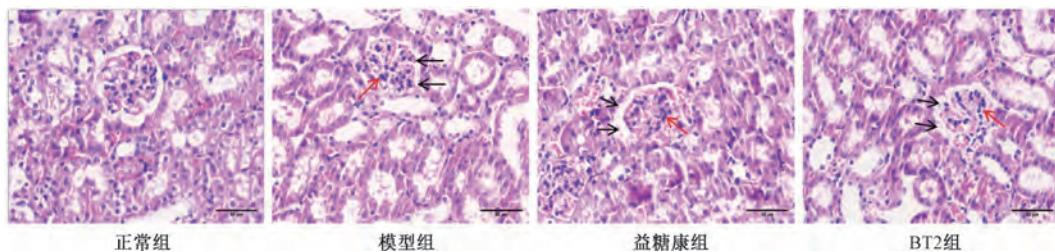
注：与正常组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

**3.3 益糖康对 db/db 小鼠肾组织病理形态的影响**

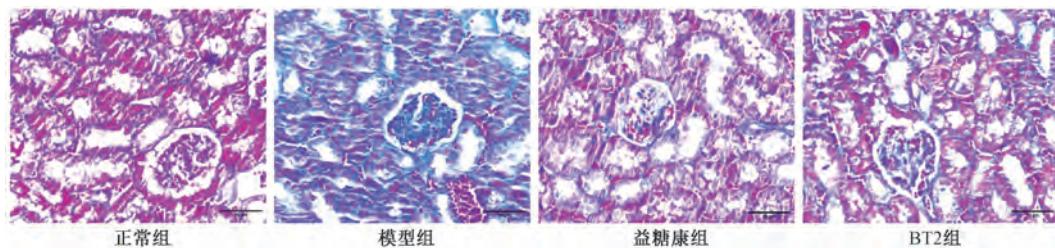
**3.3.1 HE 染色** 如图 1 所示，正常组小鼠肾组织结构正常，毛细血管管腔通畅，未见炎症细胞浸润，系膜外基质正常，系膜区未见扩张；与正常组比较，模型组小鼠肾组织结构紊乱，肾小球内皮细胞和系膜细胞数量明显减少，炎症细胞和系膜外基质增多，毛细血管壁增厚，系膜区扩张明显；与模型组比较，益糖康组和 BT2 组小鼠肾组织结构形态改善。

**3.3.2 Masson 染色** 如图 2、表 3 所示，正常组小鼠肾组织未见明显纤维化；与正常组比较，模型组小鼠肾小球基底膜及间质可见蓝色胶原纤维沉积增加 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，益糖康组和 BT2 组小鼠肾小球基底膜及间质蓝色胶原纤维沉积减少 ( $P < 0.01$ )。

**3.3.3 PAS 染色** 如图 3、表 4 所示，正常组小鼠肾小球未见明显糖原沉积；与正常组比较，模型组小鼠肾小球基底膜增厚，系膜基质增多伴有系膜扩张，糖原沉积区域增加 ( $P < 0.01$ )；与模型组比



注：黑色箭头为基底膜均质性增厚，红色箭头为肾小球系膜基质增多。

图1 各组小鼠肾组织HE染色( $\times 400$ )Fig. 1 HE staining of renal tissue of mice in each group ( $\times 400$ )图2 各组小鼠肾组织Masson染色( $\times 400$ )Fig. 2 Masson staining of renal tissue of mice in each group ( $\times 400$ )表3 各组小鼠肾组织纤维化面积比较( $\bar{x} \pm s$ , n=3)Tab. 3 Comparison of renal fibrosis area of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

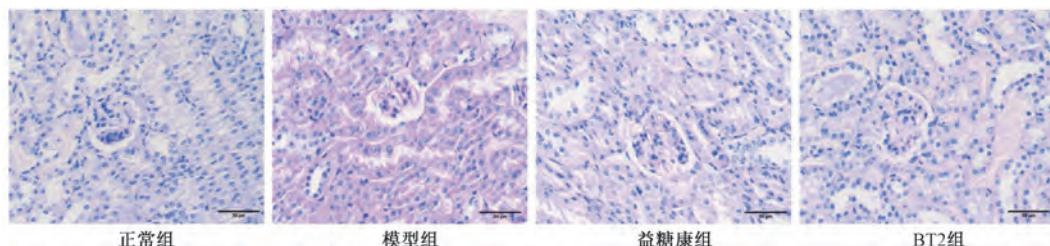
组别	肾脏纤维化面积/%
正常组	5.28±0.34
模型组	34.21±1.54 **
益糖康组	8.43±0.95 ##
BT2组	9.59±0.87 ##

注：与正常组比较，\*\* P&lt;0.01；与模型组比较，## P&lt;0.01。

较，益糖康组和BT2组小鼠肾组织糖原沉积区域减少( $P<0.01$ )，肾小球病变改善。

3.3.4 PASM染色 如图4所示，正常组小鼠肾小球未见明显异常；与正常组比较，模型组小鼠肾小球基底膜增厚；与模型组比较，益糖康组和BT2组小鼠肾小球病变改善。

3.3.5 透射电镜 如图5所示，正常组小鼠肾小球内皮细胞形态正常，毛细血管基底膜结构清晰、

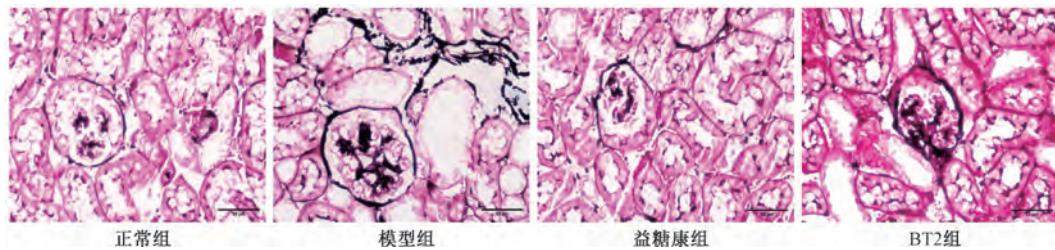
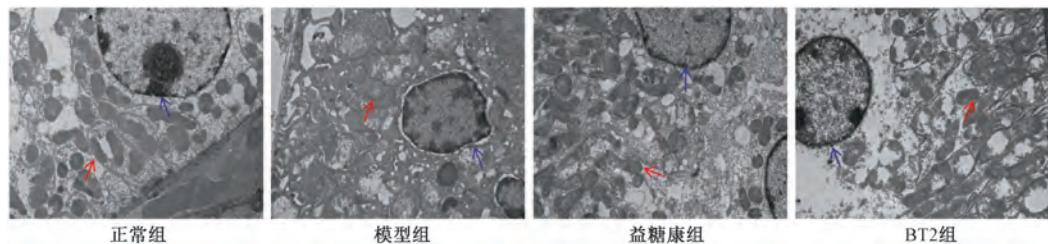
图3 各组小鼠肾组织PAS染色( $\times 400$ )Fig. 3 PAS staining of renal tissue of mice in each group ( $\times 400$ )表4 各组小鼠肾脏糖原沉积面积比较( $\bar{x} \pm s$ , n=3)Tab. 4 Comparison of glycogen deposition area in kidney of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	肾脏糖原沉积面积/%
正常组	4.34±0.71
模型组	19.44±2.01 **
益糖康组	6.38±0.87 ##
BT2组	8.54±1.29 ##

注：与正常组比较，\*\* P&lt;0.01；与模型组比较，## P&lt;0.01。

完整、均匀，无增厚，管腔大小和内容物未见明显异常，线粒体结构正常；与正常组比较，模型组小鼠肾小球内皮细胞融合、增生肿胀，向管腔内突出，系膜区扩大，系膜基质增多，内皮细胞窗孔结构消失，膜连续性中断，线粒体结构严重受损；与模型组比较，益糖康组和BT2组小鼠肾小球上述损伤有所减轻。

3.4 益糖康对db/db小鼠肾组织BCAAs水平的影响

图4 各组小鼠肾组织PASM染色( $\times 400$ )Fig. 4 PASM staining of renal tissue of mice in each group ( $\times 400$ )

注：红色箭头代表线粒体，蓝色箭头代表细胞核。

图5 各组小鼠肾组织超微结构( $\times 5000$ )Fig. 5 Ultrastructures of renal tissue of mice in each group ( $\times 5000$ )

与正常组比较，模型组小鼠肾组织 Leu、Ile、Val 水平升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，益糖康组和 BT2 组小鼠肾组织 Leu、Ile、Val 水平降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，见表 5。

表5 各组小鼠肾组织 Leu、Ile、Val 水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )Tab. 5 Comparison of Leu, Ile and Val levels in renal tissue of mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	Leu/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Ile/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Val/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
正常组	318.28±62.01	157.96±36.68	237.94±39.54
模型组	521.59±72.38 **	239.15±32.61 **	379.24±47.37 **
益糖康组	338.01±94.05 ##	151.88±43.51 ##	246.83±58.52 ##
BT2 组	363.73±43.40 #	164.60±19.95 #	268.27±35.77 #

注：与正常组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较，#  $P<0.05$ ，##  $P<0.01$ 。

3.5 益糖康对 db/db 小鼠肾组织 CD31、ET-1 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠肾组织 CD31 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ )，ET-1 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，益糖康组和 BT2 组小鼠肾组织 CD31 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，ET-1 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )，见图 6、表 6。

3.6 益糖康对 db/db 小鼠肾组织 BCAAs 分解代谢关键蛋白 BCKDK、PP2Cm、DBT 表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠肾组织 BCKDK 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ )，PP2Cm、DBT 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，益糖康组和 BT2 组小鼠肾

组织 BCKDK 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )，PP2Cm、DBT 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，见图 7、表 7。

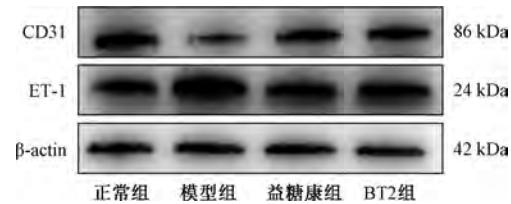


图6 各组小鼠肾组织 CD31、ET-1 蛋白条带

Fig. 6 Protein bands of CD31 and ET-1 in renal tissue of mice in each group

表6 各组小鼠肾组织 CD31、ET-1 蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )Tab. 6 Comparison of protein expressions of CD31 and ET-1 in renal tissue of mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	CD31/β-actin	ET-1/β-actin
正常组	0.87±0.08	0.73±0.10
模型组	0.47±0.08 **	1.13±0.14 **
益糖康组	0.68±0.10 #	0.89±0.07 #
BT2 组	0.68±0.05 ##	0.92±0.05 #

注：与正常组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较，#  $P<0.05$ ，##  $P<0.01$ 。

#### 4 讨论

脾运转平衡理论强调“脾”是人体精微运化的关键枢纽；“转”是指脾将胃所腐熟的饮食物转化为水谷精微并进行吸收，转化成精、气、血、

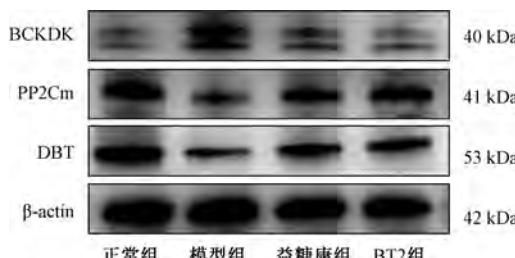


图7 各组小鼠肾组织 BCKDK、PP2Cm、DBT 蛋白条带

Fig. 7 Protein bands of BCKDK, PP2Cm and DBT in renal tissue of mice in each group

表7 各组小鼠肾组织 BCKDK、PP2Cm、DBT 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Tab. 7 Comparison of protein expressions of BCKDK, PP2Cm and DBT in renal tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	BCKDK/β-actin	PP2Cm/β-actin	DBT/β-actin
正常组	0.44±0.04	0.77±0.12	0.84±0.07
模型组	0.75±0.08 **	0.43±0.07 **	0.45±0.08 **
益糖康组	0.57±0.07 #	0.62±0.02 #	0.63±0.07 ##
BT2 组	0.53±0.13 #	0.69±0.08 ##	0.61±0.02 #

注：与正常组比较，\*\* P<0.01；与模型组比较，# P<0.05，## P<0.01。

津液等精微物质；“输”是指脾将所转化的精微物质运输至全身，以营养五脏六腑、四肢百骸，使其发挥正常功能。若脾运转平衡，脾气健运，散精如常，精微物质生化充足，输达全身脏腑，则人体阴阳气血调和；若脾运转失衡，精不正化而为浊瘀，则是消渴病发生的核心病机。脾失健运，脾不散精，精不正化，聚为血浊，血浊附着脉管，阻塞脉道，血瘀气壅，妨碍水泄，津聚成痰，痰、瘀与血浊相互胶结，使脾运转受困，日久化热，损及脉道，发为血管并发症。根据上述理论创立的中药复方益糖康中红参、黄芪益气养阴，白术、茯苓健脾补中，黄精、枸杞子补肾固精，丹参、三七凉血活血而不伤血，黄连、黄柏等清热解毒燥湿，诸药合用，具有益气健脾、运脾化浊之功。课题组前期研究证实，益糖康可通过调控铁死亡等多种途径防治糖尿病肾损伤<sup>[13-16]</sup>。

在糖尿病微血管系统中，微血管内皮细胞被认为是高血糖损伤的主要靶点，细胞内高糖可通过多种病理生理过程对血管内皮造成损害，导致内皮细胞功能紊乱<sup>[17]</sup>，故内皮功能障碍是糖尿病肾病的关键特征<sup>[18]</sup>。mALB 作为糖尿病肾病早期临床表现，其水平升高提示肾脏血管发生病变<sup>[19]</sup>。CD31

作为血管内皮细胞的重要标志物，其表达的变化可反映后者状态和功能。在 db/db 小鼠中，由于高糖等刺激因素的作用，导致肾脏内皮细胞功能障碍和凋亡增加，进一步影响 CD31 表达和分布，使得其在肾组织中的水平降低<sup>[20]</sup>。ET-1 是血管内皮分泌的活性物质，内皮细胞损伤时释放增加，具有强烈的缩血管效应而加重内皮损伤<sup>[21]</sup>。本研究结果显示，益糖康组 CD31 表达升高，ET-1 表达降低，病理染色和透射电镜显示肾小球内皮细胞形态改善，表明它具有防治糖尿病肾损伤的功效。

BCAAs 可通过一系列代谢途径生成代谢产物，进入三羧酸循环，参与机体能量代谢过程。BT2 是支链 α-酮酸脱氢酶激酶 (BCKDK) 的变构抑制剂，可增强 BCAAs 氧化，降低血浆 BCAAs，同时 BCKDK 磷酸化 BCKDE1α 亚基并抑制 BCKD，而蛋白磷酸酶 2Cm (PP2Cm) 使 BCKDE1α 亚基去磷酸化并激活 BCKD<sup>[22-23]</sup>。研究发现，糖尿病肾病小鼠 BCAAs 水平上调<sup>[24]</sup>，高血清 BCAAs 水平与肾小球滤过率降低和肾功能下降相关<sup>[4]</sup>，可加剧肾功能不全和肾纤维化<sup>[25]</sup>；BCAAs 还对血管内皮存在有害影响，其水平升高时可通过激活 mTORC1 通路诱导内皮细胞炎症和氧化应激，从而导致血管过度收缩<sup>[26]</sup>；补充或长期暴露于高水平的 BCAAs 可导致动脉粥样硬化和其他心血管并发症<sup>[27]</sup>。最新研究显示，BCAAs 稳态破坏时可通过增强炎症和纤维化的上皮-间质转化来促进糖尿病肾病的进展<sup>[28]</sup>。本研究发现，益糖康干预后小鼠肾组织 Leu、Ile、Val 水平及分解代谢关键酶 BCKDK 降低，PP2Cm、DBT 升高，说明它可通过调节 BCAAs 水平及分解代谢酶表达来维持 BCAAs 代谢稳态，发挥保护糖尿病肾小球内皮细胞的作用。

综上所述，益糖康能改善 BCAAs 代谢紊乱，从而发挥防治糖尿病肾损伤的作用。本研究结果进一步丰富了“脾运转平衡”理论的现代生物学内涵及益糖康防治糖尿病肾损伤的作用机制。后续可利用生物信息学、多组学联合分析及分子对接技术对益糖康靶向调控 BCAAs 防治糖尿病肾病开展进一步研究，为本病开辟新的治疗途径。

#### 参考文献：

- [1] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2020, 395(10225): 709-733.
- [2] Zhang Y, Luo K, Peters B A, et al. Sugar-sweetened beverage

- intake, gut microbiota, circulating metabolites, and diabetes risk in Hispanic Community Health Study/Study of Latinos[J]. *Cell Metab*, 2025, 37(3): 578-591.
- [ 3 ] Saleem T, Dahpy M, Ezzat G, et al. The profile of plasma free amino acids in type 2 diabetes mellitus with insulin resistance: association with microalbuminuria and macroalbuminuria[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 188(3): 854-867.
- [ 4 ] Liu M, Yang Y, Liu Y, et al. Serum branched chain amino acids: an effective indicator of diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1269633.
- [ 5 ] Wang J, Zhou C, Zhang Q, et al. Metabolomic profiling of amino acids study reveals a distinct diagnostic model for diabetic kidney disease[J]. *Amino Acids*, 2023, 55(11): 1563-1572.
- [ 6 ] Zhenyukh O, Civantos E, Ruiz-Ortega M, et al. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 104: 165-177.
- [ 7 ] 李嘉鑫, 王庆峰, 安继仁, 等. 从“脾与小肠相通”探讨益糖康调控 db/db 小鼠支链氨基酸代谢修复小肠黏膜屏障损伤的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(5): 2516-2521.
- [ 8 ] 韩雪莹, 单国顺, 杨宇峰, 等. 益糖康对 2 型糖尿病模型大鼠糖脂代谢和肠道菌群的影响[J]. 中医杂志, 2022, 63(1): 64-71.
- [ 9 ] 韩雪莹, 单国顺, 窦德强, 等. 基于肠道产丁酸菌代谢探讨益糖康防治 2 型糖尿病的作用机制[J]. 中华中医药学刊, 2023, 42(3): 46-51.
- [ 10 ] 田禄宇, 杨宇峰, 石岩. 基于“从脾论治”探讨中药复方益糖康调节肠道菌群防治 2 型糖尿病研究思路[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(3): 183-187.
- [ 11 ] 张瀚文, 石岩, 任艳玲, 等. 基于“气血冲和”理论研究益糖康方调控支链氨基酸代谢改善骨骼肌胰岛素抵抗的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(19): 236-247.
- [ 12 ] Liu S, Li L, Lou P, et al. Elevated branched-chain  $\alpha$ -keto acids exacerbate macrophage oxidative stress and chronic inflammatory damage in type 2 diabetes mellitus[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 175: 141-154.
- [ 13 ] 郭隽馥, 李乡南, 杨宇峰, 等. 基于 NFAT5 介导的 EMT 研究益糖康改善高血糖对肾脏早期损伤的作用机制[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(1): 35-40; 265.
- [ 14 ] 李艳春. 中药复方益糖康调控 SLC7A11/GPX4 介导的铁死亡防治糖尿病肾脏损伤的机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2022.
- [ 15 ] 孟桐宇, 杨宇峰, 任艳玲, 等. 益糖康抑制坏死性凋亡及 EMT 减轻糖尿病肾病肾损伤的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(9): 2151-2155.
- [ 16 ] 王生化, 何信用, 郑思成, 等. 益糖康调控 JAK2/STAT3 信号通路抑制炎症预防糖尿病肾病的研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(12): 145-149; 291.
- [ 17 ] Yang J, Liu Z. Mechanistic pathogenesis of endothelial dysfunction in diabetic nephropathy and retinopathy[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 816400.
- [ 18 ] Shen J, San W, Zheng Y, et al. Different types of cell death in diabetic endothelial dysfunction[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115802.
- [ 19 ] Thipsawat S. Early detection of diabetic nephropathy in patient with type 2 diabetes mellitus: a review of the literature[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2021, 18(6): 1476901544.
- [ 20 ] 何凯颖. ALOX15 通过内质网应激介导糖尿病肾病内皮细胞凋亡与脂质沉积的机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2024.
- [ 21 ] 刘均广, 李猛, 陈笑寒, 等. 基于 DAG/PKC 信号通路探讨盐酸青藤碱对 db/db 小鼠肾脏血流动力学及微循环障碍的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2025, 41(1): 72-89.
- [ 22 ] Zhang Y, Zhan L, Zhang L, et al. Branched-chain amino acids in liver diseases: complexity and controversy[J]. *Nutrients*, 2024, 16(12): 1875.
- [ 23 ] Kaspy M S, Hannaian S J, Bell Z W, et al. The effects of branched-chain amino acids on muscle protein synthesis, muscle protein breakdown and associated molecular signalling responses in humans: an update[J]. *Nutr Res Rev*, 2024, 37(2): 273-286.
- [ 24 ] Rong G, Weng W, Huang J, et al. Artemether alleviates diabetic kidney disease by modulating amino acid metabolism[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 7339611.
- [ 25 ] Pillai S M, Herzog B, Seebek P, et al. Differential impact of dietary branched chain and aromatic amino acids on chronic kidney disease progression in rats[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1460.
- [ 26 ] Zhenyukh O, González-Amor M, Rodrigues-Diez R R, et al. Branched-chain amino acids promote endothelial dysfunction through increased reactive oxygen species generation and inflammation[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(10): 4948-4962.
- [ 27 ] Fang Q, Liu N, Zheng B, et al. Roles of gut microbial metabolites in diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 636175.
- [ 28 ] Deng X, Tang C, Fang T, et al. Disruption of branched-chain amino acid homeostasis promotes the progression of DKD via enhancing inflammation and fibrosis-associated epithelial-mesenchymal transition[J]. *Metabolism*, 2025, 162: 156037.