

- [7] 王济维,杜宁,符诗聪,等.手法治疗实验性膝骨性关节炎研究[J].上海第二医科大学学报,1996,16(6):417-419.
- [8] 唐旭昇,杜宁,张昊,等.手法治疗大鼠实验性膝骨性关节炎扫描电镜研究[J].中医正骨,2001,13(1):3-4.
- [9] 韩崑,熊昌源.“三联疗法”对兔膝关节骨关节炎氧自由基代谢的影响[J].湖北中医杂志,2006,28(3):9-10.
- [10] 王春林,赵永康,赵志勇,等.拔伸松动法治疗膝关节骨性关节炎的临床观察[J].按摩与康复医学,2011,5(2):23-25.
- [11] 王春林,向勇,田启东,等.拔伸松动法治疗兔膝骨性关节炎的实验研究[J].云南中医中药杂志,2010,31(9):14-16.
- (收稿日期:2013-08-02)
(本文编辑:黄凡)

加味消渴康对糖尿病肾病大鼠肝组织细胞外基质相关调节因子表达的影响

李光超 车念聪 耿建国 王志强 郭新新 赵晖 白辰

【摘要】 目的 基于中医“肝肾同源”理论,观察加味消渴康对糖尿病肾病大鼠肝组织转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), Smad-4 蛋白 (drosophila mothers against decapentaplegic protein-4), 基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 和金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1) 表达的影响。**方法** 采用单侧肾切除加链脲佐菌素诱导的糖尿病肾病模型,将造模成功后的 50 只糖尿病肾病大鼠随机分为模型组、西药组和中药小、中、大剂量组,每组 10 只,另选取 10 只正常大鼠作为正常对照。其中西药组予氯沙坦 (5.2 mg/kg·d) 灌胃,中药组予加味消渴康灌胃 (小、中、大剂量分别为 13.125 g/kg·d, 26.25 g/kg·d 和 52.5 g/kg·d), 正常组及模型组每日灌服 2 ml 蒸馏水,共灌胃 12 周。各组大鼠于第 12 周末处死取出肝脏,运用 ELisa 法观察大鼠肝组织 TGF- $\beta 1$ 、Smad-4、MMP-9 和 TIMP-1 的表达。**结果** 与正常组相比,各组大鼠肝中 TGF- $\beta 1$ 、Smad-4 和 TIMP-1 表达明显升高,而 MMP-9 的表达明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中药治疗后,各组大鼠 TGF- $\beta 1$ 、Smad-4 的表达与模型组相比明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 TIMP-1 和 MMP-9 的表达则分别具有降低和升高的趋势。**结论** 加味消渴康对 DN 大鼠的肝损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 肝肾同源; 糖尿病肾病; 肝损伤; 转化生长因子 $\beta 1$; 基质金属蛋白酶 9; 金属蛋白酶组织抑制剂-1

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.02.003

The effects of JiaweiXiaokekang on the expressions of factors regulating the hepatic extracellular matrix in DN rats Li Guang-chao, CHE Nian-cong, GENG Jian-guo, et al. College of traditional Chinese medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: CHE Nian-cong, E-mail: cnc088@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of JiaweiXiaokekang on the expression of TGF- $\beta 1$, Smad-4, MMP-9 and TIMP-1 in the hepatic tissues of diabetic nephropathy (DN) rats based on the "

基金项目:首都中医药与护理研究专项(12ZHY02)

作者单位:100069 首都医科大学中医药学院[李光超(硕士研究生)、车念聪、耿建国、郭新新、赵晖、白辰(硕士研究生)];北京市平谷区中医医院(王志强)

作者简介:李光超(1986-),2011 级在读硕士研究生。研究方向:中医肝病的证治规律研究。E-mail:li252530538@163.com

通讯作者:车念聪(1957-),本科,教授。研究方向:中医肝病的证治规律研究。E-mail:cnc088@sohu.com

theory of homogeny of liver and kidney". **Methods** The rat model was established by uninephrectomy and injection of streptozotocin. 50 models were divided into 5 groups: model group, western medicine group and Chinese herb medicine groups including low-dose, medial-dose and high-dose group. There were 10 models in each group. Besides, another 10 normal rats were chosen as the normal group. Western medicine group was given losartan (5.2 mg/kg · d) by intragastric administration; Chinese herb medicine groups were given JiaweiXiaokekang (low-dose group: 13.125 g/kg · d, medial-dose group: 26.25 g/kg · d and high-dose group: 52.5 g/kg · d) by intragastric administration; The normal group and model group were fed with 2 ml distilled water daily. After 12 weeks, sacrificed all the rats and removed their hepars and then observed the expressions of TGF- β 1, Smad-4, MMP-9 and TIMP-1 by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group, the expression of TGF- β 1, Smad-4 and TIMP-1 in other groups significantly increased, while the expression of MMP-9 significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After the treatment, compared with the model group, the expression of TGF- β 1 and Smad-4 in other groups significantly decreased. While there was a decreased or increased trend on the expression of TIMP-1 and MMP-9 respectively. **Conclusion** JiaweiXiaokekang had a certain protective effect on the hepatic injury of DN rats.

【Key words】 Homogeny of liver and kidney; Diabetic nephropathy; Hepatic injury; Transforming growth factor- β 1; Matrix metalloproteinase-9; Tissue inhibitor of metalloproteinases-1

中医理论认为肝与肾的关系密切,即“肝肾同源”。“肝肾同源”是指肝肾虽然有不同的结构和功能,但其起源相同,生理病理密切相关,常采用“肝肾同治”的治疗法则^[1]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见的并发症,其主要病因是糖尿病所致的肾小球微血管病变引起的蛋白排泄和滤过异常,其特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肾小球基底膜的积聚,导致肾小球硬化。在疾病发生发展的过程中,由转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)及其 Smad 蛋白(drosophila mothers against decapentaplegic protein)所组成的 TGF- β /Smad 通路对 ECM 的合成起到了重要的作用,与 DN 的发生发展关系密切。与此同时,在肝损伤发生时,该通路也可以发生相应的改变。研究发现, TGF- β 1 可以通过 TGF- β /Smad 通路激活肝星状细胞,进而使肝中 ECM 合成增加,导致肝纤维化的发生^[2]。基质金属蛋白酶/金属蛋白酶组织抑制剂(matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinases, MMPs / TIMPs)在脏器纤维化的发生发展中起着重要的作用,其中 MMP-9 和 TIMP-1 则尤为重要。MMP-9 主要参与 ECM 的降解,调节生理和病理状态下 ECM 的合成和代谢平衡。而 TIMP-1 作为其抑制剂可以与 MMP-9 特异性结合,进而阻断 MMP-9 的活性。研究显示,在糖尿病肾病中, MMP-9 蛋白及基因表达明显降低, TIMP-1 蛋白及基因表达明显升高^[3]。而在肝脏中,各种原因导致的肝损伤,尤其是肝纤维化,也会发生 MMP-9/TIMP-1 的调节失衡。研究发现,在免疫

性肝纤维化大鼠中,会出现 MMP-9/TIMP-1 的比例失衡^[4]。基于此,本实验在中医“肝肾同源”理论的指导下,通过观察加味消渴康对糖尿病肾病大鼠肝组织 TGF- β 1, Smad-4, MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响,探讨其对 DN 大鼠肝脏的保护作用,为中医的“肝肾同源”理论提供实验依据。

1 材料

SD 雄性大鼠 60 只,体重 160 ~ 180 g,鼠龄 2 ~ 3 月,购自首都医科大学实验动物科学部[动物的合格证号: SCXK(京)2006-0009]。加味消渴康由生黄芪 10 g、山茱萸 30 g、生薏苡仁 30 g、水蛭 6 g、葛根 30 g、丹参 10 g、决明子 10 g 组成,所需药材购自北京祥威药业公司;氯沙坦钾片(购自杭州默沙东制药有限公司,生产批号: 100438),链脲佐菌素(购自美国 Sigma 公司),大鼠 TGF β -1 ELISA 试剂盒(购自上海蓝基生物科技有限公司),大鼠 Smad-4 ELISA 试剂盒(购自上海蓝基生物科技有限公司),大鼠 MMP-9 ELISA 试剂盒(购自上海蓝基生物科技有限公司);大鼠 TIMP-1 ELISA 试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组

本实验采用单侧肾切除加腹腔注射链脲佐菌素的方法制作 DN 大鼠模型:将造模大鼠适应性饲养 1 周后,行右侧肾脏切除术。术后 2 周,禁食 12 小时,按 50 mg/kg 的剂量进行单次腹腔内注射链脲

佐菌素。72 小时后,尾静脉采血,用稳步血糖仪测定大鼠血糖,用尿糖试纸测大鼠随意尿糖,血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L,尿糖定性 $> + + +$,确定 DN 造模成功^[5]。将造模成功的 50 只大鼠随机分为模型组、氯沙坦组(5.2 mg/kg·d)、加味消渴康小剂量组(13.125 g/kg·d)、加味消渴康中剂量组(26.25 g/kg·d)、加味消渴康大剂量组(52.5 g/kg·d)灌胃,此外,另取 10 只大鼠作为正常对照组,每日 1 次,连续灌胃 12 周,正常组及模型组每日灌服 2 ml 蒸馏水。

2.2 标本采集和观察指标检测

各组大鼠于第 12 周末进行肝脏取材,每只取下 150~200 mg 肝组织,加入生理盐水,肝组织重量与生理盐水量比例为 1:7。在冰浴中制备匀浆后 4℃ 3000 r 离心 20 分钟,取上清液 0.1 ml,放入 4℃ 冰箱备用。取出大鼠 TGF- β 1, Smad-4, MMP-9 和 TIMP-1 Elisa 试剂盒,于室温(25~30℃)放置 30 分钟。取出酶标板,按照标准品的次序分别加入 50 μ l 的标准品溶液于空白微孔中。空白微孔中加入 50 μ l 的样品,空白对照加入 50 μ l 的蒸馏水。在各孔中加入 100 μ l 的酶标记溶液(不含空白对照孔)。将酶标板用封口胶密封后,37℃ 孵育反应 1 小时(在孵育箱中保持稳定的温度与湿度)。充分清洗酶标板 5 次,保持各孔有充足的水压(浓缩洗涤液以 1:100 的比例与蒸馏水稀释)。酶标板洗涤后用吸水纸彻底拍干。各孔加入显色剂 A、B 各 50 μ l 后 37℃ 避光反应 10~15 分钟。各孔加入 50 μ l 终止液,终止反应。

2.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 进行统计处理,各组计量数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析法考查显著性,组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 作为显著性差异, $P < 0.01$ 作为极显著性差异。

3 实验结果

各组大鼠肝组织 TGF- β 1 与 Smad-4 表达的测

定结果见表 1。

与正常组相比,各组大鼠 TGF- β 1, Smad-4 和 TIMP-1 的含量明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。而 MMP-9 的含量明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组相比,各治疗组 TGF- β 1 和 Smad-4 的含量明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。而 TIMP-1 的表达具有降低的趋势,MMP-9 的表达则具有升高的趋势,本实验并未发现两者具有统计学差异。

4 讨论

“肝肾同源”是中医的经典理论之一,它最早起源于《黄帝内经》。《素问·阴阳应象大论》云:“北方生寒,寒生水,水生咸,咸生肾,肾生骨髓,髓生肝。”本实验在基于该理论的前提下对 DN 大鼠肝脏进行了相关的研究。在此,笔者主要从以下四点进行分析。

4.1 肝与肾在生理上关系密切

肝属东方甲乙木,主疏泄,调畅气机,调节气血津液的代谢,疏泄情志,肝藏血,以生发为特性。肾属北方壬癸水,主闭藏,主水,通过蒸腾气化调节人体水液的代谢,肾藏精,主生长发育和生殖。肝肾在生理方面密切相关,首先,在五行之中,水生木,木为水之子,故肝肾为子母关系,其气相通,肝木得到肾水的滋养才能得以维持正常的生理功能。其次,肝藏血,肾藏精,而精血同源,故肝中之血与肾中之精可以相互化生,肝血可以下达于肾以滋养肾精,使肾精化而有源;同样肝血也有赖于肾精的滋生。与此同时,肾藏精,主骨生髓,骨中精髓与血液也可相互化生^[6],此外,肝与肾在经脉上的循行上密切相关,足厥阴肝经与足少阴肾经都循行于身体内侧,并交会于“三阴交”,同时也通过奇经八脉而相互关联,经气互通。若肝肾的经气不利,势必会导致肝肾的相关功能紊乱。因此,肝肾在生理上相互依存,关系密切。

表 1 各组大鼠肝组织 TGF- β 1, Smad-4 的比较($\bar{x} \pm s$)($n = 10$)

组别	TGF- β 1 (pg/ml)	Smad-4 (pg/ml)	MMP-9 (pg/ml)	TIMP-1 (pg/ml)
正常组	55.54 \pm 11.97	0.72 \pm 0.09	3.24 \pm 0.77	0.26 \pm 0.07
模型组	112.69 \pm 28.56 ^a	2.24 \pm 0.32 ^a	0.81 \pm 0.20 ^a	0.66 \pm 0.20 ^a
西药组	70.47 \pm 8.17 ^c	1.18 \pm 0.34 ^{a^c}	1.44 \pm 0.52 ^a	0.47 \pm 0.24
中药小剂量组	62.13 \pm 10.02 ^c	1.36 \pm 0.17 ^{a^c}	1.09 \pm 0.41 ^a	0.60 \pm 0.18 ^b
中药中剂量组	85.80 \pm 28.85 ^{b^d}	0.92 \pm 0.21 ^c	1.33 \pm 0.52 ^a	0.56 \pm 0.17 ^b
中药大剂量组	69.60 \pm 7.41 ^c	0.93 \pm 0.24 ^c	1.42 \pm 0.59 ^a	0.51 \pm 0.21

注:与正常组相比^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$ 与模型组相比^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$ 。

4.2 肝与肾在病理上相互影响

肝与肾不仅在生理上关系密切,通过实验研究发现,其在病理上也相互影响。本实验以糖尿病肾病大鼠为模型,试图探讨在大鼠肾脏发生损伤时的肝损伤情况。实验结果显示,模型组大鼠肝脏中的 TGF- β 1, Smad-4 和 TIMP-1 的表达与正常组相比具有显著性的升高, MMP-9 的表达则具有显著性的降低。此结果说明,从该指标的层面上来看, DN 大鼠的确存在肝损伤。而在针对 DN 大鼠进行治疗后,肝中 TGF- β 1 与 Smad-4 的表达明显下调,且 TIMP-1 和 MMP-9 也不同程度的降低和升高的趋势。这说明在针对 DN 大鼠肾脏治疗的同时,肝损伤也得到了一定的修复,即两脏“一荣俱荣,一损俱损”,这与中医的“肝肾同源”理论相符。中医理论认为,若肾水亏竭不能涵养肝木;或肝阳过亢,劫耗肾阴;或肾精亏耗,肝血不足,最终都可以导致肝肾双方阴血的不足,会因为“母病及子”或“子盗母气”而引发肝肾阴虚,肝阳上亢,肾精亏虚等病理表现。基于此,笔者推断 TGF- β 1/Smad 通路及 TIMP-1/ MMP-9 对 ECM 代谢调节的紊乱可能也是上述中医理论在微观层面的体现之一,同时,该实验也说明了肝与肾在病理上的可以相互影响。

4.3 加味消渴康对 DN 大鼠肝脏具有保护作用

本实验通过选取糖尿病肾病大鼠肝脏内 TGF β 1, Smad-4, MMP-9 和 TIMP-1 进行研究,治疗方药采用了耿建国教授治疗糖尿病肾病的验方加味消渴康。该方由黄芪、山茱萸、生薏苡仁、葛根、决明子、丹参、水蛭组成,全方具有健脾益肾,祛瘀化浊的功效^[7]。治疗 12 周后,各治疗组与模型组相比, TGF- β 1, Smad-4 和 TIMP-1 水平均有不同程度降低, MMP-9 有一定的升高趋势,且 TGF- β 1, MMP-9, TIMP-1 的变化趋势与其在肾脏中的水平变化趋势一致^[8-9]。说明加味消渴康针对 DN 大鼠肝中 TGF β 1 和 Smad-4 水平升高的结果,起到了正向调节作用,其通过降低肝中 TGF- β 1 和 Smad-4 的表达,起到保护肝损伤的作用。由此可知,加味消渴康在针对 DN 大鼠肾脏治疗的同时,肝损伤也得到了一定的修复,此结果也为中医的“肝肾同源”理论相符提供了一定的实验依据。

5 展望

研究发现,在糖尿病肾病大鼠中,肝脏也存在损伤,且针对大鼠的糖尿病肾病进行治疗后,肝损伤有所减轻,这是“肝肾同源”理论在病理和治疗上的具体体现。而中医对糖尿病肾病的治法颇多,因此在下一步的研究中,可以根据不同的辨证要点,选用不同种类治法的方剂进行探讨,从而可以更有有效的指导临床实践。

“肝肾同源”的内容非常广泛,笔者目前仅在肾损伤的同时探索肝脏的损伤情况。今后可以通过建立肝损伤的模型来探讨肾脏的相关状态,或者根据“肾主骨,生髓,通于脑”的理论来研究脑的状态。通过对各个不同的角度的探讨,“肝肾同源”理论的实验依据将会日趋完善。

综上所述,“肝肾同源”不仅有理论推断,也有实验依据,本实验证明,两脏可“同病”,亦可“同治”,而有关病理切片等形态学的观察及其它指标的检测则有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 李瀚旻. “肝肾同源”的理论探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(7): 5-9.
- [2] LIANG Tie-jun, YUAN Jun-hua, TAN Yan-rong, et al. Effect of ursodeoxycholic acid on TGF beta1/Smad signaling pathway in rat hepatic stellate cells [J]. Chinese Medical Journal, 2009, 122 (10): 1209-1213.
- [3] 邹大威, 高彦彬, 王金羊, 等. 通心络对自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠肾功能及肾组织 MMP-9、TIMP-1 表达的影响[J]. 世界中医药, 2013, 8(7): 782-786.
- [4] 郝瑞春, 门九章, 李霞, 等. 雄芍汤对免疫性肝纤维化大鼠 MMP-9 和 TIMP-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (16): 219-221.
- [5] 高苹, 贾汝汉. 2 型糖尿病肾病大鼠模型的建立[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(6): 316.
- [6] 施维. “肝肾同源”刍议[J]. 陕西中医, 2006, 27(5): 575-577.
- [7] 张铨, 李凤婷, 李梦, 等. 加味消渴康对糖尿病肾病大鼠纤维粘连蛋白、层粘连蛋白和 IV 型胶原表达的影响[J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(4): 498-502.
- [8] 张铨, 李梦, 李凤婷, 等. 加味消渴康对糖尿病肾病大鼠丝裂原活化蛋白激酶 P38 及转化生长因子- β 1 表达的影响[J]. 中医学报, 2012, 27(12): 1064-1066.
- [9] 张铨, 李梦, 李凤婷, 等. 加味消渴康对糖尿病肾病大鼠 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(5): 412-413.

(收稿日期: 2013-12-03)

(本文编辑: 董历华)