

芪水煎对糖尿病肾病小鼠肝、肾组织细胞外基质调节因子表达的影响

刘晔 车念聪 杜宇琼 王金光 李文新

【摘要】 目的 基于肝肾同源理论,观察糖尿病肾病(kk-ay)小鼠后期谷丙转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、谷草转氨酶含量(aspartate transaminase,AST)变化以及芪水煎对肝、肾基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9,MMP-9)及基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1,TIMP-1)表达的影响。**方法** 采用kk-ay小鼠高糖高脂饮食4周建立糖尿病肾病模型后,随机分为模型组、黄芪水组、通心络组,设立C57BL/6J小鼠作为对照组。予芪水煎及通心络干预12周后,监测各组小鼠血ALT、AST,采用Western Blot、Realtime-PCR检测肝、肾组织MMP-9和TIMP-1蛋白含量及mRNA表达水平。**结果** 与模型组比较,芪水煎组AST显著降低($P<0.01$)、ALT呈下降趋势($P>0.05$),肝MMP-9蛋白及mRNA表达显著升高($P<0.01$),TIMP-1蛋白显著降低($P<0.01$),mRNA表达降低($P<0.05$),肾MMP-9蛋白及mRNA表达升高($P<0.05$),TIMP-1蛋白及mRNA表达降低($P<0.05$)。**结论** kk-ay小鼠后期会出现肝损伤,芪水煎对kk-ay小鼠肝、肾损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 黄芪; 水红花子; 肝肾同源; 肝损伤; 肾基质金属蛋白酶-9; 基质金属蛋白酶组织抑制因子-1

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.10.003

Effects of Qishui decoction on the expression of extracellular matrix regulatory factors in liver and kidney of diabetic nephropathy mice LIU Ye, CHE Niancong, DU Yuqiong, et al. the Capital Medical University, traditional Chinese medicine, Beijing 100069, China

Corresponding author: Che Niancong, E-mail: cnc088@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the content changes of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) of diabetic nephropathy (kk-ay) mice in later stage, and to investigate the influence of Qishui decoction on the expression of MMP-9, TIMP-1 in the hepatic and nephritic tissues based on the theory of "homogeny of liver and kidney". **Methods** The diabetic nephropathy model was established by kk-ay mice with high glucose and high fat diet for 4 weeks. The mice were randomly divided into model group, Qishui group and Tongxinluo group, and C57BL/6J mice were used as control group. After 12 weeks of drug intervention, the level of ALT and AST was detected, and the protein and mRNA expressions of MMP-9 and TIMP-1 in liver and kidney were detected by Western Blot and realtime-PCR. **Results** Compared with the model group, the level of AST in Qishui group was significantly decreased ($P<0.01$), while the level of ALT was decreased ($P>0.05$). The protein and mRNA expression of MMP-9 in liver was significantly increased ($P<0.01$), while the protein expression of TIMP-1 was significantly decreased ($P<0.01$), and mRNA was decreased ($P<0.05$). The protein and mRNA

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2012CB518602)

作者单位:100069 北京,首都医科大学中医药学院中医临床基础学系[刘晔(硕士研究生)、车念聪、杜宇琼、王金光(硕士研究生)、李文新(硕士研究生)]

作者简介:刘晔(1992-),女,2015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:liuye7562@163.com

通信作者:车念聪(1957-),博士,教授,博士生导师,主任医师。研究方向:中医肝病。E-mail:cnc088@sohu.com

expression of MMP-9 in kidney was increased ($P < 0.05$), while the protein and mRNA expression of TIMP-1 was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** kk-ay mice have liver injury in the later stage of diabetic nephropathy, and Qishui decoction has protective effects on liver and kidney injury in kk-ay mice.

【Key words】 Astragalus membranaceus; Fructus polygoni orientalis; Homogeny of liver and kidney; Hepatic injury; Matrix metalloproteinase-9; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1

糖尿病以代谢紊乱和高血糖为主要特征,由于长期存在的血糖代谢障碍,会导致多个脏腑器官受累。糖尿病常见并发症首先当属肾损伤,其危害性表现为发病率高,病情预后较差;此外,肝脏作为糖代谢的功能器官,长期的代谢异常亦会对肝脏造成损害,由于其代偿能力较强,肝损伤早期并不明显,但到后期肝损伤随着病情发展严重将无法逆转^[1]。反之,肝脏功能受损亦会糖、脂代谢紊乱,从而形成恶性循环^[2-3]。肝肾同属人体重要器官,病理上互相影响,发病机制复杂,病情发生发展过程中相互作用也不是简单的因果关系,相关性的具体机制目前尚不清楚^[4]。认识不足、手段有限使现代医学在治疗糖尿病肝肾并发症时并不理想。而中医基础理论早已揭示了肝肾之间物质基础和生理作用上密切相关,所以在整体观念指导下的“肝肾同源”和络病理论给复杂病情治疗提供新的思维。在糖尿病肝肾损伤中,都能观测到与基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinases, MMPs)和金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)的平衡改变密切相关。TIMP-1 升高则会抑制 MMP-9 活性,平衡打破,提示脏器受到损伤^[5]。基于此,本实验在上述中医理论的指导下,通过观察芪水煎对 kk-ay 小鼠肝肾 TIMP-1、MMP-9 治疗前后表达的影响,探讨芪水煎对肝损伤的作用,进而探讨肝肾同源性理论,从而指导临床。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 kk-ay 小鼠 24 只(生产许可号: SXCK 京 2015-0008), 8 周龄, 体重 20 ~ 30 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 饲养在首都医科大学实验动物科学部 SPF 级动物室。实验小鼠随机分为 3 组, 即模型组、通心络组、黄芪水红花子组, 每组 8 只; 设立 C57BL/6J 小鼠 8 只为空白对照组。

1.2 药物

芪水煎(临床常用成人剂量为黄芪 20 g、水红花子 5 g, 购于北京同仁堂), 按等效剂量换算, 小鼠水红花子生药量 0.75 g/(kg · d), 黄芪生药

3 g/(kg · d), 按照每 100 g 小鼠灌胃 2 mL 的体积配成相应浓度, 取黄芪和水红花子加相当于药材量 5 倍的冷水浸泡 1 ~ 2 小时, 煮沸 30 分钟, 过滤。药渣加 3 倍量水继续煎煮, 煮沸 20 分钟, 过滤, 合并 2 次滤液。冷却装入灭菌药瓶, 高温灭菌后, 置 4℃ 冰箱保存备用。通心络超微粉(主药为人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍等, 由河北以岭医药研究院有限公司提供)将通心络超微粉溶解, 按照每 100 g 小鼠灌胃 2 mL 的体积, 配成相应浓度, 冷却装入灭菌药瓶, 高温灭菌后, 置 4℃ 冰箱保存备用 0.9%, 氯化钠溶液购自北京市普京康利科技有限公司, 批号: 150526。

1.3 试剂

MMP-9 antibody (Abcam、Ab38898)、TIMP-1 antibody (Abcam、Ab38978)、Goat anti rabbit IgG、(H + L) HRP 二抗 (Jackson、111-035-003、B-Actin antibody (Abcam、Ab8227); RNA 抽提试剂盒、oligo-(dT)、Ribonuclease Inhibitor、M-MLV Reverse Transcriptase、M-MLV Reverse Transcriptase 均购于 Takara。

1.4 仪器和设备

摇床 (其林贝尔、TS-92)、电泳仪 (Bio-rad、165-8004)、旋涡混合器 (其林贝尔、QL-901)、Line-gene 荧光定量 PCR 检测系统 (杭州博日科技有限公司)、台式高速冷冻离心机 TGL-16 (湘仪离心机)、DYY-7C 型电泳仪 (北京六一仪器厂)。

1.5 动物模型制备及分组

本实验采用 8 周龄 2 型糖尿病 kk-ay 小鼠建立糖尿病肾病模型, 设立 C57BL/6J 小鼠 8 只为空白组, 空白组 C57BL/6J 小鼠予以普通饲料喂养、kk-ay 小鼠予以高脂饲料喂养 4 周。4 周后 kk-ay 小鼠随机分为 3 组, 即模型组、通心络组、黄芪水红花子组, 每组 8 只。在保持造模不变的情况下, 开始予药物治疗, 黄芪水红花子予芪水煎溶液 2 mL/100 g 灌胃, 通心络组予通心络溶液 2 mL/100 g 灌胃, 同时正常组及模型组予等量生理盐水灌胃。治疗 1 次/日, 共 11 周。每周一称量小鼠体重, 随体重变化更改造模及治疗剂量。

1.6 样本采集及处理

治疗 11 周后,小鼠麻醉后,眼球取血,3500 r/min 离心 10 分钟,取上清分装。打开腹腔,分离肝脏、肾脏,观察形态,称重。取肝、肾组织,分装入冻存管,−80℃ 低温冰箱冷藏。

1.7 肝功监测

检测血清 ALT、AST 等肝功能指标。

1.8 Western Blot 法检测小鼠肝、肾组织中 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白含量

取肝、肾组织,BCA 法蛋白定量,在 10% SDS-PAGE 胶上电泳分离之后转印至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭振荡,一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 摇床洗膜 5 分钟×3 次,二抗孵育,TBST 摇床洗膜 5 分钟×3 次,ECL 试剂暗室内胶片曝光,扫描胶片,用图像分析软件分析目标条带。

1.9 Quantitative Real-time PCR 检测小鼠肝、肾组织 MMP-9 和 TIMP-1 的 mRNA 表达水平

取肝、肾组织,加入 1 mL 的 Trizol,抽取待测样品的 RNA 并进行质量检测,采用 oligo-(dT) 试剂盒,将样品 RNA 逆转录为 cDNA 并进行扩增,记录相应的 Ct 值。基因相应表达量采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。引物序列如下。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5' to 3')
MMP-9	上游: 5'-AGCCGACTTTTGTGCTCTTC-3'
	下游: 5'-ATGGCCTTTAGTGTCTGGCTG-3'
TIMP-1	上游: 5'-CAACTCGGACCTGGATGCTAA-3'
	下游: 5'-CTCTCACTGCGTTCTGG-3'
ACTIN	上游: 5'-CTGAGCTGCGTTTACACCCT-3'
	下游: 5'-CGCCTTCACCGTTCCAGTT-3'

1.10 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计处理,结果用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD法), $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为有显

著性差异。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 ALT、AST 检测结果对比

与正常组相比,模型组 ALT 升高($P<0.05$),AST 显著升高($P<0.01$);与模型组相比,芪水煎组 AST 显著降低($P<0.01$),ALT 呈下降趋势,没有统计意义;与模型组相比,通心络组 ALT、AST 显著升高($P<0.01$);与通心络组相比,芪水煎组 ALT、AST 显著降低($P<0.01$),见表 2。

表 2 小鼠 ALT、AST 比较($n=8, \bar{x}\pm s, U/L$)

组别	ALT	AST
正常组	10.80±1.57	23.50±2.38
模型组	37.37±1.62 ^a	46.50±1.37 ^b
芪水煎组	27.03±2.97 ^d	30.41±4.23 ^{cd}
通心络组	165.90±29.64 ^c	103.80±12.93 ^c

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

2.2 各组小鼠肝、肾 MMP-9、TIMP-1 mRNA 表达检测

与正常组相比,模型组肝、肾 MMP-9 表达显著降低($P<0.01$),TIMP-1 表达升高($P<0.05$);与模型组相比,芪水煎组肝 MMP-9 表达显著升高($P<0.01$),肾表达升高($P<0.05$),肝、肾 TIMP-1 表达降低($P<0.05$);与模型组相比,通心络组肝 MMP-9 表达显著升高($P<0.01$),肾表达升高($P<0.05$),肝、肾 TIMP-1 表达降低($P<0.05$);与通心络组相比,芪水煎组肝 TIMP-1 表达降低($P<0.05$),其他指标没有统计学意义。见表 3。

2.3 各组小鼠肝、肾 MMP-9、TIMP-1 的蛋白表达检测

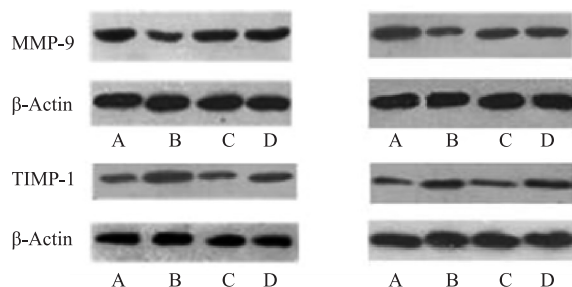
与正常组相比,模型组肝、肾 MMP-9 蛋白表达显著降低($P<0.01$),肝、肾 TIMP-1 蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组相比,芪水煎组肝 MMP-9 蛋白表达显著升高($P<0.01$)、肾 MMP-9 蛋白表达升

表 3 小鼠肝、肾 MMP-9、TIMP-1 mRNA 比较($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	肝 MMP-9	肝 TIMP-1	肾 MMP-9	肾 TIMP-1
正常组	1.13±0.06	1.05±0.12	1.15±0.15	0.88±0.12
模型组	0.34±0.12 ^b	1.77±0.24 ^a	0.16±0.07 ^b	1.98±0.30 ^a
芪水煎组	0.86±0.04 ^d	1.44±0.23 ^{ce}	0.44±0.04 ^c	0.99±0.05 ^c
通心络组	0.97±0.03 ^d	1.29±0.19 ^c	0.42±0.04 ^c	1.05±0.16 ^c

注:与正常组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组相比,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与通心络组相比,^e $P<0.05$ 。

高($P<0.05$),肝 TIMP-1 蛋白显著降低($P<0.01$),肾表达降低($P<0.05$);与模型组相比,通心络组肝 MMP-9 蛋白表达显著升高($P<0.01$),肾 MMP-9 蛋白表达升高($P<0.05$),肝、肾 TIMP-1 蛋白显著降低($P<0.01$);与通心络组相比,芪水煎组肝 TIMP-1 蛋白表达降低($P<0.05$)。见图 1。



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 芪水煎组; D: 通心络组

图 1 小鼠肝、肾 MMP-9、TIMP-1 蛋白表达水平

3 讨论

《素问·阴阳应象大论》曰“肾生骨髓,髓生肝”,明代李中梓《医宗必读》提出“乙癸同源,肝肾同源”理论,肝肾同居下焦,精血互生,母子相生^[6],中医理论揭示了肝肾在物质方面相生相养,生理功能上相互为用,互相调节制约的密切关系。正因如此,肝肾两脏母子相生,精血相互转化中一环出现问题,必然在病理上渐渐展现出肝肾同病的趋势。在糖尿病发生发展慢性病程中,日久侵袭肾络,导致肾络瘀滞,中医认为肝肾之气互通、精血互化,故肾络病变必然会导致肝的疏泄和藏血等功能受损,终致肝血行不畅从而发生肝络瘀阻^[7]。实验中糖尿病肾病模型小鼠 AST、ALT 升高,证明糖尿病肾病后期存在肝损伤,佐证了“肝肾同源”理论。

其次,糖尿病肝肾合病病理上关系复杂,两者可互为因果,治疗起来颇为棘手。临床用药亦需要兼顾疾病与防止肝肾功能损害。根据本课题组前期实验研究,临床常用成人剂量黄芪 20 g、水红花子 5 g 效果最优,故本实验选用黄芪和水红花子 4:1 的配比组成的芪水煎进行治疗,黄芪、水红花子是名老中医关幼波临床治疗肝病方子中常用的中草药,后经钱英教授总结出来的药对,实验发现黄芪可以缓解水钠潴留,临床上多用于治疗糖尿病^[8],黄芪多糖可有效保护糖尿病大鼠肝功,缓解肝细胞的损伤^[9],水红花子可以改善大鼠血清肝纤维指标^[10],依据络病理论,糖尿病肝损伤的基本病机为

气虚血瘀,中医理论认为气虚则血行无力,血行缓慢滞而为瘀,故瘀阻脉络,故用益气活血通络的黄芪,解毒通络的水红花子,两者配伍益气活血通络。

糖尿病肾病主要的病理特征是肾小球及肾间质的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积,导致肾小球硬化及肾间质纤维化,因此改善糖尿病肾病可以从 ECM 降解系统着手^[11],高糖状态下, TIMP-1 表达增加, MMPs/TIMPs 失衡,大鼠肝纤维化程度加重^[12]。MMPs/TIMPs 是参与 ECM 降解过程的重要酶系, MMPs 及其组织抑制剂在细胞外基质的合成、降解及组织重塑过程中起决定性调节作用。MMPs 属于降解酶系,其中 MMP-9 是降解 IV 型胶原的最主要成分。TIMPs 是 MMPs 的天然抑制剂,目前对 TIMP-1 的研究较为深入,在细胞因子的诱导下产生,与激活后的 MMP-9 以 1:1 的方式形成复合体,从而抑制 MMP-9 的活性,阻断其对 ECM 的降解,引起 ECM 沉积,使纤维化加重^[13]。本研究结果显示,经芪水煎治疗后小鼠肝、肾组织 TIMP-1 降低,减轻 TIMP-1 对 MMP-9 的抑制作用, MMP-9/TIMP-1 失衡有所改善,促进细胞外基质的降解,减少细胞外基质的合成,改善肝、肾纤维化,提示芪水煎能够抑制 kk-ay 小鼠肝、肾组织纤维化,延缓病程。

实验研究表明, kk-ay 小鼠后期存在肝损伤,为肝肾同源理论提供实验依据。芪水煎通过调控 ECM 降解酶系 MMP-9/TIMP-1 蛋白及 mRNA 表达,减少肝、肾组织 ECM 沉积,保护肝肾功,具有减少用药造成的肝肾损伤的优势。此外,作为诱发肝肾损伤的危险因素高血糖,芪水煎对血糖代谢作用有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] 高磊,邹志强,孙荣玲,等. 糖尿病在肝损伤患者中的危险性分析[J]. 中国医药导报, 2012, 9(30): 30-32.
- [2] 韩文兵. 基于“肝肾同源”理论探讨柴黄益肾颗粒防治糖尿病肝肾并发症的机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [3] Lakshmanan AP, Thandavarayan RA, Watanabe K, et al. Modulation of AT-1R/MAPK cascade by an olmesartan treatment attenuates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 348(1): 104-11.
- [4] 谢瑞奎, 班博. 非酒精性脂肪性肝病与 2 型糖尿病及糖尿病肾病关系的研究进展[J]. 医学综述, 2015, (1): 107-108.
- [5] 李风华. 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠的治疗作用及其对细胞因子 p38、CTGF、TIMP-1 及 MMP-9 表达的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [6] 罗俊华, 巴元明. “肝肾同源”理论的研究进展[J]. 云南中

- 医学院学报,2013,36(1): 91-93.
- [7] 李光超,车念聪,耿建国,等. 基于“肝肾同源”探讨 DN 大鼠肝中 TGF- β 1、Smad-4、 α -SMA 和 PDGF 在中药治疗前后的变化[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,(4): 459-461.
- [8] 穆鑫,袁霞,康白,等. 糖尿病大鼠肾脏水通道蛋白-2mRNA 的表达及黄芪的调节作用[J]. 中国药理学通报,2010,26(9):1176-1179.
- [9] 王晓琳,翁孝刚,王宪华,等. 黄芪多糖预防 2 型糖尿病大鼠肝损伤的实验研究[J]. 现代生物医学进展,2016,16(10): 1846-1849.
- [10] 杜宇琼,赵晖,张秋云,等. 水红花子对免疫肝纤维化大鼠肝功能及血清肝纤维化标志物的影响[J]. 中国中医急症,2011,(9): 1433-1434.
- [11] 邹大威,高彦彬,刘迎新,等. 糖肾宁对自发性 2 型糖尿病 kk-ay 小鼠肾组织 MMP-9、TIMP-1 表达的影响[J]. 环球中医药,2015,8(11):1324-1328.
- [12] 陈枫,杨爱萍,李燕,等. 糖尿病对大鼠肝纤维化组织 TIMP-1/MMP-1 表达的影响[J]. 重庆医学,2013,42(9): 964-967.
- [13] 余毅,李增棋,陈昆,等. 乌司他丁对心脏联合瓣膜置换术患者 S100 β 蛋白及早期认知功能障碍的影响[J]. 中国现代医生,2015,(14): 74-77.

(收稿日期: 2017-03-10)

(本文编辑: 王馨瑶)