

针刺联合糖克煎剂对糖尿病肾病大鼠 TGF- β 1/CTGF/MMP-9 的影响

李春雨, 郭海洋, 崔晶晶, 付晓

(锦州医科大学附属第一医院, 辽宁省锦州市 121000)

[关键词] 糖尿病肾病; 糖克煎剂; 针刺治疗; TGF- β 1; CTGF

[摘要] **目的** 探讨针刺联合糖克煎剂对糖尿病肾病大鼠肾组织转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和结缔组织生长因子 (CTGF) 的影响。**方法** 选取 54 只 SPF 级 SD 雄性大鼠, 从中随机选出 8 只为正常对照组, 余下大鼠进行糖尿病肾病 (DN) 模型复制, 即一次性大鼠尾静脉注射现配链脲佐菌素, 随机将成模后大鼠分为模型组、厄贝沙坦组、糖克煎剂组 (中药组)、针刺组和针刺联合糖克煎剂组 (针药联合组)。观察大鼠一般情况, 测定体质量、血糖、肾质量/体质量、24 h 尿蛋白、尿素氮 (BUN)、血肌酐 (SCr)、甘油三酯 (TG) 和总胆固醇 (TC); HE 染色、Masson 染色和糖原染色 (PAS), 观察肾组织形态学的改变; Western blot 分别检测肾脏组织中 TGF- β 1、MMP-9、胶原蛋白 I (Collagen I)、CTGF 和 TIMP-1 的蛋白表达水平。**结果** 与模型组相比, 针药联合组、糖克煎剂组和厄贝沙坦组体质量、肾质量/体质量比、24 h 尿蛋白、BUN、SCr、TG、TC 明显改善, 针药结合效果更显著, 针刺组轻微改善。TGF- β 1 及 CTGF 蛋白表达水平降低明显, 通过调整 MMP-9 的蛋白表达下调 TIMP-1 的表达, 加快 Collafen I 水解。针药联合组肾脏表达 TGF- β 1、CTGF、TIMP-1 较糖克煎剂组或厄贝沙坦组下降明显, MMP-9 表达增多。针药联合组比糖克煎剂组、厄贝沙坦组疗效更为显著。**结论** 针刺联合糖克煎剂相对于糖克煎剂组治疗效果明显, 能有效调控 TGF- β 1、MMP-9 和 CTGF 的表达从而减轻肾小球硬化, 降低蛋白尿排量, 使肾功能得到保护, 糖尿病肾病的进展被延缓。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of acupuncture combined with Tangke apozem on TGF- β 1/CTGF/MMP-9 in rats with diabetic nephropathy

LI Chunyu, GUO Haiyang, CUI Jingjing, FU Xiao

(The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

[KEY WORDS] diabetic nephropathy; Tangke apozem; acupuncture treatment; TGF- β 1; CTGF

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of acupuncture combined with Tangke apozem on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and connective tissue growth factor (CTGF) in diabetic nephropathy rats. **Methods** 54 SPF SD male rats were selected, and 8 of them were randomly selected as control group. The remaining rats were subjected to diabetic nephropathy (DN) model replication, one-time rat tail vein injection of streptozotocin. Rats were randomly divided into model group, irbesartan group, acupuncture combined with Tangke apozem group (acupuncture combined with traditional Chinese medicine group), Tangke apozem treatment group (Chinese medicine group) and acupuncture group. Observe the general condition of the rats, and measure body weight, blood sugar, kidney weight/body weight, 24-hour urine protein, blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), triglyceride (TG) and total cholesterol (TC); HE staining, Masson staining and glycogen staining (PAS) were used to observe changes in renal tissue morphology; The protein expression levels of TGF- β 1, MMP-9, collagen I, CTGF, and TIMP-1 in kidney tissues were detected by Western blot method. **Results** Compared with the model group, the weight, kidney

[收稿日期] 2019-01-10

[修回日期] 2019-02-20

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(2013022014)

[作者简介] 李春雨, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治糖尿病及其慢性并发症的临床与研究, E-mail 为 1543201554@qq.com。通信作者付晓, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中医药防治糖尿病及其慢性并发症的临床与研究, E-mail 为 174002561@qq.com。

weight/body weight ratio, 24 h urine protein, BUN, SCr, TG, TC of the acupuncture combined with traditional Chinese medicine group, Chinese medicine group and irbesartan group were significantly improved, and the combination of needle and medicine was more remarkable. The acupuncture group slightly improved. The expression levels of TGF- β 1 and CTGF protein were significantly decreased. The expression of TIMP-1 was down-regulated by adjusting the protein expression of MMP-9, and the hydrolysis of Collafen I was accelerated. The expression of TGF- β 1, CTGF and TIMP-1 in the acupuncture combined with traditional Chinese medicine group was significantly lower than that in the traditional Chinese medicine or irbesartan group, and the expression of MMP-9 was increased. The acupuncture combined with traditional Chinese medicine group was more effective than the Chinese medicine group and the Western medicine group. **Conclusions** Acupuncture combined with Tangke apozem has obvious therapeutic effect compared with traditional Chinese medicine group. It can effectively regulate the expression of TGF- β 1, MMP-9 and CTGF, reduce glomerular sclerosis, reduce proteinuria and prevent renal function, and protect DN lesions. The progress has been delayed.

2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2DM) 发生率逐渐年轻化, 目前临床最快速有效的方法以应用胰岛素和降糖药控制血糖为主。但对慢性并发症却事倍功半, 长期服用难免各种毒副作用及经济负担, 严重影响患者生活质量^[1]。T2DM 慢性并发症中糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 发生率居第二位, 是终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD) 的主要病因^[2-3]。糖尿病肾病病理特点主要是过多的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积聚^[4]。转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 为一种多潜能生长因子, 介入肾脏的纤维变性和免疫调节, 是细胞因子纽带中的主导因子^[5]。在 TGF- β 1 发挥生物学效应的下游因子中, 属分泌蛋白类, 大多由半胱氨酸构成的结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF), 在维持 ECM 的动态平衡中发挥了重要作用^[6]。研究证实促使组织发生持续纤维化反应离不开 TGF- β 1 和 CTGF 二者联结协调作用^[7]。众多研究也表明, 糖克煎剂很早就被人们应用于治疗糖尿病肾病, 对糖尿病肾病疗效显著且具有非常重要的预防作用^[8]。而将中药与针刺结合在一起用于糖尿病肾病的报道极少。针刺作为辅助疗法, 经济安全, 效果显著。故本研究在糖克煎剂治疗基础上配合针刺大鼠双侧肾俞、脾俞和“后三里”, 取其疏通经络、活血化瘀, 使气血流通, 阴阳调和。本研究旨在研究糖克煎剂结合针刺是否通过调节 TGF- β 1、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 和 CTGF 的表达治疗糖尿病肾病。

1 材料与方法

1.1 试验药物

糖克煎剂 (黄芪 30 g、茯苓 20 g、水蛭 10 g、酒黄精 30 g、川连 9 g、牛蒡子 15 g、泽兰 30 g、虎杖 15 g)

购于锦州医科大学附属第一医院药局北京康仁堂药业有限公司全成分配方颗粒, 用去离子水配制成 18 g/kg 浓度生药备用。厄贝沙坦片 (格平) 购自修正药业集团股份有限公司 (批号 1.70903, 产品序列号 095457), 用去离子水配置成 13.5×10^{-3} g/kg 备用。华佗牌针灸针 (0.35 mm \times 13 mm) 购于苏州医疗用品厂有限公司。

1.2 实验动物

6~7 周的 SPF 级 SD 雄性大鼠 54 只, 体质量 200~220 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司 [动物许可证号: SCXK:(京)2014-0004]。随机分笼, 每笼 4 只, 饲养于锦州医科大学生理教研室动物房, 动物房湿度 40%~50%, 室温 24 $^{\circ}$ C。

1.3 试剂

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 购自美国 Sigma; 一抗 (兔抗鼠) TGF- β 1 (WL01076a)、MMP-9 (WL02141/WL02141a)、TIMP-1 (WL02342)、Collagen I (WL0088)、CTGF (WL02602) 抗体、二抗 (羊抗兔) HRP 标记 IgG (WLA023a)、Masson 染色液 (WLA045a)、糖原染色液 (WL033a)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒及超敏 ECL 化学发光液 (WLA006a) 购于沈阳万类生物技术有限公司; RIPA 裂解液 (强) P0013B、PVDF 膜 (Millipore) 和 SDS-PAGE 凝胶配制备试剂盒 P0012A 购于碧云天生物技术有限公司。

1.4 仪器

美国 Bio-Rad 电泳仪; 超微量分光光度计, 美国 Thermo; 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan; 化学发光成像分析仪 ChemiDocTMXRS⁺, 美国 BIO-RAD。全自动生化分析仪 7600-110 (HITACHI)。

1.5 分组及处理方法

54 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周。正常对照组为随机选出 8 只 SD 大鼠, 余下 46 只大鼠为糖尿病模型组。造模方法: 高糖高脂饲料喂养 (饲料配方: 猪油 18%、蔗糖 20%、蛋黄 3%、基础饲料 59%) 配合

自由饮 5% 葡萄糖水 4 周。造模期间除正常对照组自由饮水外,其余各组大鼠自由饮 5% 葡萄糖水,造模成功后期都自由饮水,大鼠提前禁食 12 h 后,一次性尾静脉注射新鲜链脲佐菌素(4 ℃, 0.1 mol/L, pH4.5 无菌柠檬酸缓冲液) 30 mg/kg(正常对照组注射等量柠檬酸缓冲液), 72 h 后大鼠尾静脉采血,若糖尿病模型造模成功则检测大鼠血糖 ≥ 16.7 mmol/L,剔除未成模大鼠 1 只。糖尿病大鼠成模 2 周后,收集模型组大鼠 24 h 尿液,行 24 h 尿蛋白测定,若大鼠 24 h 尿蛋白定量 ≥ 30 mg,则糖尿病肾病造模成功,剔除 2 只未成模大鼠。糖尿病肾病造模成功后按照血糖随机分为 5 组即模型组($n=9$)、厄贝沙坦组($n=8$)、针刺联合糖克煎剂组(针药联合组)($n=9$)、糖克煎剂组(中药组)($n=9$)、针刺组($n=8$),正常对照组及模型组给予生理盐水 10 mL/kg 灌胃,连续灌胃 5 周。糖克煎剂组和针药联合组按 18 g/kg 剂量立即给药,厄贝沙坦组按 13.5 mg/kg 剂量立即给药,连续给药 5 周,针药联合组和针刺组从灌胃起行每日一次 30 min 针刺治疗,为便于针刺操作,自制大鼠固定鼠衣便于动物固定,依据中国针灸学会实验针灸研究会制定的“实验动物针灸穴位图谱”取双侧足三里(后三里)、脾俞和肾俞穴^[9]。选用华佗牌一次性 0.35 mm \times 13 mm 毫针刺刺双侧穴位,刺入深度约 4 mm,强度以大鼠耐受为度,每 10 min 行针一次,行平补平泻手法。每针刺治疗 10 天停针 1 天,针刺治疗在每日上午中药灌胃后进行。灌胃治疗过程中模型组和针药联合组各死亡 1 只。正常对照组($n=8$)、模型组($n=8$)、厄贝沙坦组($n=8$)、针药联合组($n=8$)、糖克煎剂组($n=9$)和针刺组($n=8$)在治疗后统一麻醉取材处死。

1.6 大鼠样本采集及指标检测

分别于初始给药及末次给药前 2 天,收集各组大鼠 24 h 全部尿液,经 3 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液经锦州医科大学附属第一医院检验中心测定大鼠 24 h 尿蛋白;开始给药前、给药后每一周和末次给药后取大鼠尾静脉血(鱼跃全自动血糖仪 580 型)检测血糖;末次给药后 20% 乌拉坦按 0.5 mL/100 g 体质量麻醉,解剖,颈动脉采血后离心,留血清经全自动生化分析仪检测。取双侧肾脏,4 ℃ 生理盐水冲洗残血,去外膜,再冲洗,滤纸吸干后,双肾称重,右肾立即放入 -80 ℃ 冰箱冷冻待用于相关实验。左肾于 10% 福尔马林中固定,待做病理形态学观察。

1.7 HE 染色

肾组织经 10% 福尔马林固定大于 72 h 后,石蜡包埋、修块后切成厚 5 μ m 组织片,捞片后,65 ℃ 烘

烤 2 h;将切片依次放入二甲苯 I、II 及无水乙醇 I、II 中各 10 min;再分别于梯度乙醇及双蒸水中,每次 5 min;苏木精染色 5 min;返蓝、分色后伊红染色 5 s;脱水封片后,光镜观察大鼠肾组织病理改变情况。

1.8 糖原染色

切片同上常规脱蜡至水;高碘酸溶液 10 min,蒸馏水充分水洗 5 min,擦干多余水份;Schiff 试剂浸染 8 min,自来水水洗 3 次,每次 1 min;苏木精染色 2 min,自来水返蓝 10 min;再由 95%、100% 乙醇脱水,透明,封片。光学显微镜下观察染色结果。

1.9 Masson 染色

切片同上常规脱蜡至水,核染液染色 2 min;蒸馏水洗 2 min;1% 盐酸乙醇分化 1 s,自来水返蓝 10 min;浆染液染色 50 s;蒸馏水洗 3 次,每次 2 min;分色液分色 2 min;复染液染色 5 min;蒸馏水洗 2 min;脱水透明,封片。镜下观察染色结果,用软件 Image J 分析计算肾胶原容积分数(CVF)。

1.10 Western blot 检测相关蛋白表达

取 -80 ℃ 冻存的大鼠肾皮质组织约 200 mg,剪碎(需在冰浴或 4 ℃ 下),加入 1 mL RIPA 裂解液蛋白匀浆缓冲液,用前 2~3 min 加入 1% PMSF 混匀,冰上剪碎操作,并在高通量组织研磨仪(需在 4 ℃ 下)充分匀浆,12 000 r/min、4 ℃ 下离心 30 min 后取上清,提取大鼠肾蛋白。BCA 法进行蛋白含量测定,制样成浓度为 4 g/L,灌 10% 分离胶,5% 浓缩胶(小分子 12% 分离胶,5% 浓缩胶),上样 10 μ L,进行 SDS-PAGE 电泳。浓缩胶电压 80 V,分离胶电压 120 V,湿法将蛋白质转移 PVDF 膜上,恒压电泳 60 V,室温 120 min。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗膜,加入稀释兔抗鼠 TGF- β 1(1:750)、CTGF(1:800)、MMP-9(1:500)、TIMP-1(1:1200)、Collagen I(1:750)、 β -actin(1:1000)一抗,4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗(1:5000),摇床上室温杂交 2 h, TBST 洗膜,滴加新鲜配置显色液,上机显影,结果由 Image J 软件分析。

1.11 统计学处理方法

应用软件 IBM Statistics SPSS 20.0 分析处理数据,实验所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较多组间差异,以总体差异显著,则 LSD 法两两组间比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠生化指标比较

糖尿病肾病大鼠成模后,大鼠毛色暗淡、精神

相对于正常对照组萎靡,多饮、多食、多尿症状较正常对照组明显加重。各组大鼠经相应治疗 35 天后,与模型组相比,糖克煎剂组、针药联合组和厄贝沙坦组肾质量/体质量、24 h 尿蛋白、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血肌酐(serum creatinine, SCr)均显著改善,血糖值显著降低,以针药联合组效果更显著(表 1 和表 2)。

2.2 各组肾脏病理变化

电镜下观察肾脏 HE 及糖原染色,对比正常对照组大鼠肾完整组织结构,肾小球较薄的基底膜,染色示模型组肾小球体积普遍增大,糖原阳性积聚增多,基底膜增厚,系膜基质增多明显,增厚的肾小球致密斑,呈现肾间质和肾小管纤维化。治疗 5 周后,厄贝沙坦组、针药联合组、糖克煎剂组和针刺组大鼠对比模型组肾小球基底膜、糖原积聚、系膜基质、肾组织纤维化改善显著,对比各治疗组间,针药

联合组最为明显(图 1 和图 2)。大鼠肾组织 Masson 染色示,与正常对照组比较,模型组肾组织细胞间胶原纤维阳性积聚过多,给药组肾组织胶原纤维表达减少,针药联合组表达减少最明显(图 3 和表 3)。

表 1. 大鼠一般情况比较

Table 1. Comparison of general conditions of rats

分 组	<i>n</i>	体质量(g)	肾质量/ 体质量 ($\times 10^{-3}$)	血糖 (mmol/L)
正常对照组	8	483.66 \pm 10.73	6.4 \pm 0.13	6.5 \pm 0.6
模型组	8	299.73 \pm 20.09 ^a	14.34 \pm 1.62 ^a	29.7 \pm 2.9 ^a
厄贝沙坦组	8	356.67 \pm 4.89 ^b	10.23 \pm 0.82 ^b	24.3 \pm 1.9 ^b
糖克煎剂组	9	372.32 \pm 8.64 ^{bc}	9.23 \pm 0.33 ^{bc}	21.8 \pm 0.7 ^{bc}
针刺组	8	341.85 \pm 18.54 ^{bd}	10.73 \pm 0.43 ^{bd}	23.7 \pm 1.1 ^{bd}
针药联合组	8	388.67 \pm 5.89 ^{bcd}	8.18 \pm 0.59 ^{bcd}	19.5 \pm 0.5 ^{bcd}

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, 与厄贝沙坦组比较; d 为 $P < 0.05$, 与糖克煎剂组比较。

表 2. 各组大鼠生物化学指标比较

Table 2. Comparison of biochemical indicators in each group

分 组	<i>n</i>	24 h 尿蛋白($\times 10^{-3}$ g)	BUN(mmol/L)	SCr(mmol/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)
正常对照组	8	12.19 \pm 3.86	5.0 \pm 0.6	45.4 \pm 7.1	0.39 \pm 0.16	1.49 \pm 0.20
模型组	8	99.28 \pm 5.98 ^a	17.2 \pm 1.2 ^a	103.0 \pm 5.8 ^a	3.09 \pm 0.41 ^a	4.77 \pm 0.32 ^a
厄贝沙坦组	8	78.08 \pm 2.60 ^b	13.0 \pm 1.3 ^b	78.1 \pm 3.9 ^b	2.33 \pm 0.25 ^b	3.83 \pm 0.11 ^b
糖克煎剂组	9	72.35 \pm 4.64 ^{bc}	11.4 \pm 0.6 ^{bc}	72.5 \pm 2.3 ^{bc}	1.89 \pm 0.28 ^{bc}	3.56 \pm 0.14 ^{bc}
针刺组	8	80.13 \pm 3.26 ^{bd}	14.2 \pm 2.5 ^{bd}	93.6 \pm 3.0 ^{bd}	2.43 \pm 0.38 ^{bd}	4.07 \pm 0.16 ^{bd}
针药联合组	8	61.67 \pm 4.29 ^{bcd}	9.8 \pm 0.9 ^{bcd}	67.3 \pm 1.5 ^{bcd}	1.34 \pm 0.49 ^{bcd}	3.20 \pm 0.12 ^{bcd}

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, 与厄贝沙坦组比较; d 为 $P < 0.05$, 与糖克煎剂组比较。

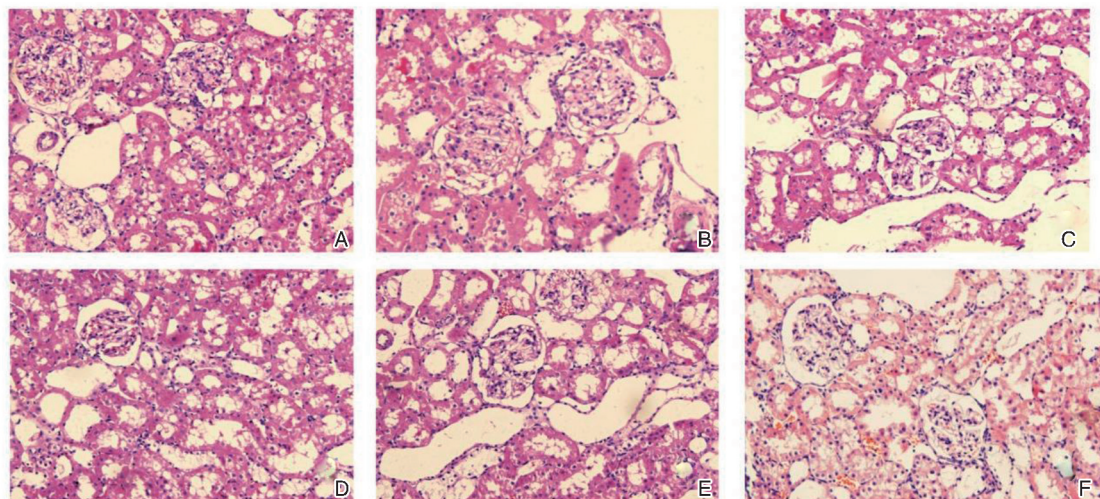


图 1. HE 染色观察糖尿病肾病大鼠肾脏组织形态(200 \times) A 为正常对照组, B 为模型组, C 为厄贝沙坦组, D 为针药联合组, E 为糖克煎剂组, F 为针刺组。

Figure 1. HE staining was used to observe kidney tissue morphology in rats with diabetic nephropathy (200 \times)

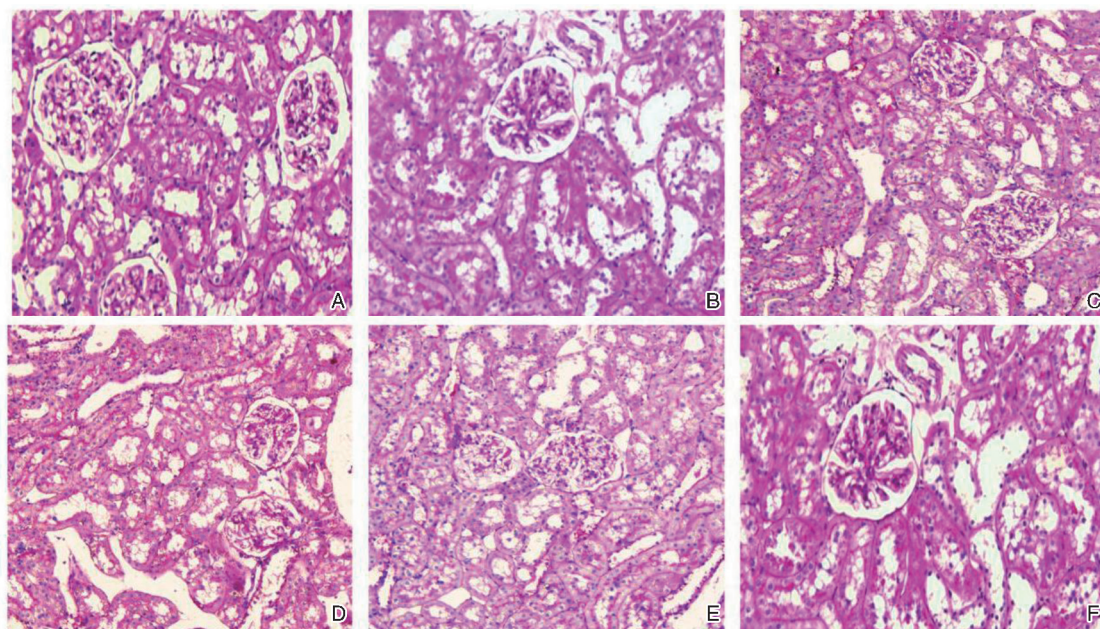


图2. 糖原染色观察糖尿病肾病大鼠肾脏组织形态(200×) A为正常对照组,B为模型组,C为厄贝沙坦组,D为针药联合组,E为糖克煎剂组,F为针刺组。

Figure 2. Chromatin staining was used to observe the morphology of kidney in rats with diabetic nephropathy (200×)

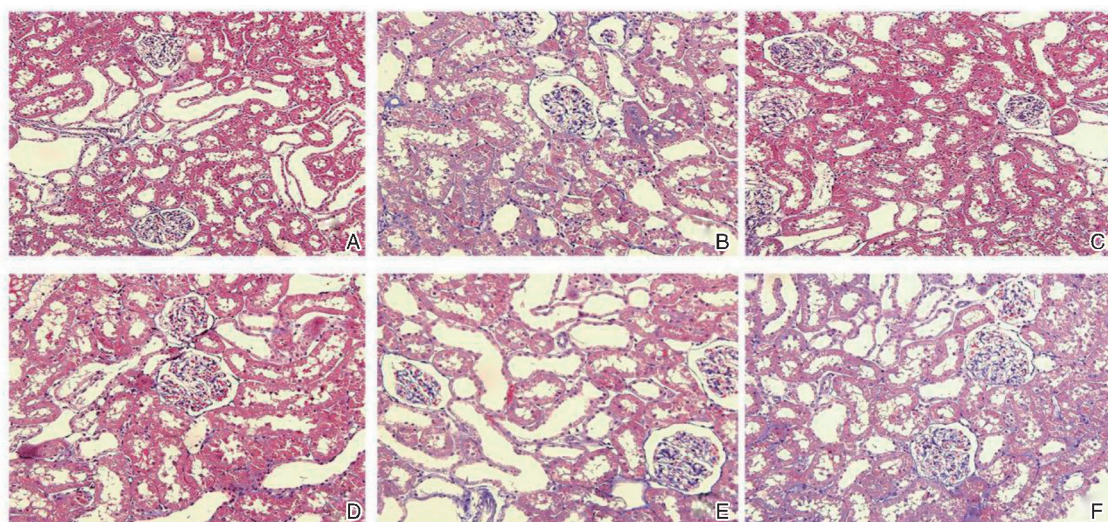


图3. Masson 染色观察糖尿病肾病大鼠肾脏组织形态(200×) A为正常对照组,B为模型组,C为厄贝沙坦组,D为针药联合组,E为糖克煎剂组,F为针刺组。

Figure 3. Masson staining was used to observe the kidney morphology of rats with diabetic nephropathy (200×)

表3. 各组胶原容积分数

Table 3. Collagen volume fraction in each group

分 组	n	胶原容积分数(%)
正常对照组	8	6.32±0.42
模型组	8	32.08±2.11 ^a
厄贝沙坦组	8	26.10±2.44 ^b
糖克煎剂组	9	22.90±1.65 ^{bc}
针刺组	8	27.89±0.90 ^{bd}
针药联合组	8	19.82±1.38 ^{bcd}

a为 $P<0.01$,与正常对照组比较;b为 $P<0.01$,与模型组比较;c为 $P<0.05$,与厄贝沙坦组比较;d为 $P<0.05$,与糖克煎剂组比较。

2.3 各组大鼠肾脏相关蛋白的表达结果

与正常对照组比较,模型组 Collagen I、TGF- β 1、CTGF、TIMP-1 蛋白的表达显著增加,MMP-9 表达下降。与模型组比较,厄贝沙坦组和糖克煎剂组 Collagen I、TGF- β 1、CTGF、TIMP-1 蛋白表达量降低;与糖克煎剂组比较,针药联合组 Collagen I、TGF- β 1、CTGF 蛋白表达水平降低明显($P<0.01$);厄贝沙坦与糖克煎剂均抑制 TIMP-1 蛋白表达。相比厄贝沙坦,糖克煎剂组达到类似结果,但针药联合组 TGF- β 1、CTGF 蛋白水平下调更加明显($P<$

0.01,图4和表4)。

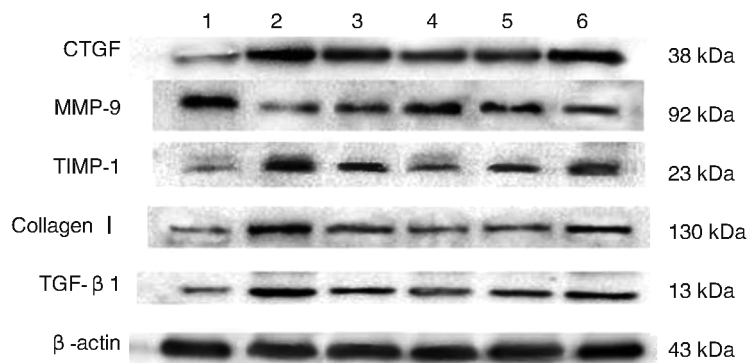


图4. Western blot 检测各组大鼠 CTGF、MMP-9、TIMP-1、TGF-β1 和 Collagen I 表达 1 为正常对照组,2 为模型组,3 为厄贝沙坦组,4 为针药联合组,5 为糖克煎剂组,6 为针刺组。

Figure 4. Western blot analysis of CTGF, MMP-9, TIMP-1, TGF-β1 and collagen I expression in each group

表4. 各组大鼠肾脏组织相关蛋白比较

Table 4. Comparison of kidney tissue related proteins in each group of rats

分 组	n	Collagen I	TGF-β1	CTGF	TIMP-1	MMP-9
正常对照组	8	0.28±0.04	0.39±0.03	0.18±0.03	0.22±0.03	0.90±0.06
模型组	8	1.05±0.03 ^a	1.06±0.01 ^a	1.37±0.17 ^a	0.98±0.06 ^a	0.26±0.05 ^a
厄贝沙坦组	8	0.70±0.06 ^b	0.83±0.04 ^b	0.79±0.03 ^b	0.76±0.08 ^b	0.44±0.02 ^b
糖克煎剂组	9	0.55±0.02 ^{bc}	0.75±0.05 ^{bc}	0.63±0.04 ^{bc}	0.64±0.07 ^{bc}	0.62±0.02 ^{bc}
针刺组	8	0.71±0.08 ^{bd}	0.85±0.04 ^{bd}	0.83±0.09 ^{bd}	0.78±0.03 ^{bd}	0.33±0.05 ^{bd}
针药联合组	8	0.45±0.06 ^{bed}	0.62±0.05 ^{bed}	0.45±0.02 ^{bed}	0.46±0.04 ^{bed}	0.79±0.02 ^{bed}

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, 与厄贝沙坦组比较; d 为 $P < 0.05$, 与糖克煎剂组比较。

3 讨 论

糖尿病肾病为糖尿病最主要致残、致死的微血管并发症之一。在我国,糖尿病肾病约占终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)患者原发病因的 16.4%^[10]。常规治疗通过控制血糖及血压,减少蛋白尿为主来改善糖尿病肾病病情。血管紧张素 II 受体拮抗剂(ARB)类抗高血压药物厄贝沙坦具有明显的降尿蛋白、降压及延缓肾脏病变进展的作用,被批准用于治疗高血压伴有 2 型糖尿病肾病^[11]。全氏等^[12]认为糖尿病肾病的基本病机为瘀、虚、浊,而瘀是核心病机,虚为基本条件,浊是最终结局。糖尿病肾病早期以络瘀为主,络滞、虚证或不明显,故化瘀通络为主,使旧血得去,新血得生,络脉通畅。糖克煎剂中茯苓、黄精、黄芪合用益气行水,使脾健则可利水;黄连和牛蒡子合用解毒降糖降脂,作为治疗“消渴病”的常用药对,被广泛应用于临床;久病多瘀,气虚血行不畅,水蛭能活血

祛瘀,通腑泄浊,推陈致新;虎杖和泽兰又可活血降浊不伤阴。

《针灸逢源·卷五·证治参详·三消》“三消证。三焦受病也… …下消属肾,烦躁引饮,面黑耳焦,溺如膏,名曰肾消,亦曰内消。是皆心胃之火上炎,真阴不足也。承浆、金津、玉液、肾俞。”肾俞穴为肾脏之气汇注之处,与肾相应,为肾之背俞穴,属足太阳膀胱经,是治疗肾疾的重要腧穴。足三里以调和肠胃、理气化痰为主,现代医学研究证实足三里有双向性良性调节垂体-肾上腺皮质系统的作用,且能调节内分泌系统^[13]。脾俞,为脾之背俞穴,属于足太阳膀胱经,可调理脾气,可消滞通络。

在针药干预治疗后血糖值、肾质量/体质量、24 h 尿蛋白、TG、BUN、SCr 和 TC 均较模型组显著改善($P < 0.01$);与糖克煎剂组和针刺组比较,针药联合组大鼠血清中 TG、BUN、SCr 和 TC 改善最为明显。

ECM 的主要水解酶是 MMP-9^[14],在自然界中 TIMP-1 是一种抑制 MMP-9 的特异性因子,TIMP-1

和 MMP-9 可优先合体,形成 TIMP-1-MMP-9 复合物,阻断底物与 MMP-9 的结合和水解,影响 ECM 降解过程^[15-16]。而 TGF- β 1 可刺激系膜 ECM 蛋白的生成,抑制 MMP-9 活性,抑制蛋白降解,增加其抑制剂 TIMP-1 的活性,从而促进 ECM 沉积,影响糖尿病肾病的发生发展^[17-18]。本研究发现,针刺结合中药复方糖克煎剂比糖克煎剂组和针刺组 TGF- β 1、TIMP-1 和 CTGF 表达减少,MMP-9 表达增多,说明针药结合法可显著降低肾组织中 TGF- β 1 和 CTGF 的表达,抑制 TIMP-1 表达,减少 MMP-9 和 TIMP-1 的结合加强 MMP-9 水解 Collagen I,减少 ECM 沉积,减轻肾脏纤维化。据此,高糖高脂饮食配合 STZ 诱发的大鼠糖尿病肾病模型发生进行性 ECM 积累,导致大鼠肾组织的纤维化,针刺结合糖克煎剂加强对大鼠肾组织 TGF- β 1/CTGF/MMP-9 的调控来降低肾脏纤维化程度,可逆转 MMP-9 表达,进而保护肾脏功能,改善糖尿病肾病病理特质,其疗效优于单纯中药或针刺。

综合以上所述,针刺联合糖克煎剂通过抑制 TGF- β 1/TIMP-1/MMP-9 的恶性循环起到调控 TGF- β 1/CTGF 信号通路的作用,ECM 沉积进而减轻,系膜扩张得到抑制,延缓基底膜的增厚,肾脏纤维化进程可进一步控制,达到保护肾脏的作用。

[参考文献]

- [1] 李娟. 我国糖尿病疾病负担和应对策略研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制, 2013, 21(5): 623-625.
- [2] Kotlarsky P, Arkady Bolotin, Dorfman K, et al. Link between retinopathy and nephropathy caused by complications of diabetes mellitus type 2[J]. Int Ophthalmol, 2015, 35(1): 59-66.
- [3] Tziomalos K, Athyros VG. Diabetic nephropathy: new risk factors and improvements in diagnosis[J]. Rev Diabet Stud, 2015, 12(1-2): 110-118.
- [4] 王秋月. MMPs/TIMPs、TGF- β -1、细胞外基质与糖尿病肾病[J]. 国外医学(内分泌学分册), 2003, 23(3): 201-203.
- [5] 房辉, 徐刚, 于德民, 等. TGF- β -1 和 ECM 与糖尿病

肾病关系的实验研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2000, 8(4): 36-39.

- [6] Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package[J]. J Endocrinol, 2003, 178(2): 169-175.
- [7] Leask A. Targeting the TGF β , endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma[J]. Cell Signal, 2008, 20(8): 1409-1414.
- [8] 付晓, 李敬林. 益气解毒活络中药复方对糖尿病大鼠肾脏病理组织结构的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(1): 47-49.
- [9] 徐东升, 赵硕, 崔晶晶, 等. 绘制实验大鼠腧穴图谱的新尝试[J]. 针刺研究, 2019, 44(01): 62-65, 79.
- [10] Liu ZH. Nephrology in China [J]. Nat Rev Nephrol, 2013, 9(9): 523-528.
- [11] 刘梅颜. 中国增加厄贝沙坦治疗合并高血压的 2 型糖尿病肾病的适应症[J]. 中国医药导刊, 2007, 9(3): 241.
- [12] 仝小林, 周强, 赵林华, 等. 糖尿病肾病的中医辨治经验[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 144-146.
- [13] 孙志, 马丽, 韩海荣, 等. 针刺提高 2 型糖尿病模型大鼠胰岛 β 细胞胰岛素的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(28): 5227-5231.
- [14] Toblli JE, Ferrini MG, Cao G, et al. Antifibrotic effects of pioglitazone on the kidney in a rat model of type 2 diabetes mellitus [J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(8): 2384-2391.
- [15] 杨波, 盛辉, 苑春莉. MMP-9 及其抑制剂 TIMP-1 在非小细胞肺癌中的表达及其与病理特征的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(9): 1166-1167.
- [16] Li Y, Yang J, Dai C, et al. Role of integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis [J]. J Clin Invest, 2003, 112(4): 503-516.
- [17] Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology [J]. Genes Dev, 2000, 14(17): 2123-2133.
- [18] 董健平, 陈香美, 师锁柱, 等. 金属蛋白酶组织抑制剂 1 在大鼠肾小管间质损害中的表达及其意义[J]. 中华肾脏病杂志, 2002, 18(4): 41-45.

(此文编辑 许雪梅)