

基于肠道菌群探讨气阴两虚证糖尿病肾脏疾病动物模型

陈鹏德¹,姚 蓝^{1*},郭 凤¹,韩 雪¹,张文祥¹,韩 荣^{2*}¹新疆医科大学中医学学院;²新疆医科大学教务科,乌鲁木齐 830054

摘要:建立气阴两虚证糖尿病肾脏疾病病证结合动物模型及评价指标。将30只Wistar大鼠按照体重随机分为正常组(10只)、模型组(20只)。模型组采用高糖高脂饲料喂养4周,腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)25 mg/kg诱导形成糖尿病大鼠。把成模大鼠按照24 h尿蛋白值分配到糖尿病肾脏疾病模型组(10只)、气阴两虚病证结合模型组(10只),气阴两虚病证结合模型组以附子、青皮、枳实按照5:6:6,13 g/kg灌胃诱导8周。对大鼠各项测量指标进行观测。发现与正常组和糖尿病肾脏疾病模型组比较,气阴两虚病证结合模型组大鼠粪便中有益菌:乳酸杆菌属、梭菌属、拟杆菌门、双歧杆菌属含量显著降低;致病菌:梭杆菌属、肠杆菌、毛螺菌科、粪肠球菌含量显著升高;气阴两虚病证结合模型组大鼠血清中免疫球蛋白G(IgG)(0.5 ± 0.1 g/L)、免疫球蛋白M(IgM)(14.2 ± 0.6 g/L)和肾脏组织中钠钾泵酶(Na^+/K^+ -ATP)(0.8 ± 0.3 U/mg)、钙镁泵酶(Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP)(2.0 ± 0.3 U/mg)显著低于正常组($P < 0.05$),环磷酸腺苷(cAMP)(0.9 ± 0.2 mmol/L)、环磷酸腺苷/环磷酸鸟苷(cGMP)(0.3 ± 0.1 mmol/L)显著高于正常组($P < 0.05$)。HE染色显示:与正常组和糖尿病肾脏疾病模型组比较,气阴两虚病证结合模型组大鼠出现明显肾脏和结肠损伤;肾脏和结肠组织的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)蛋白表达均显著升高,结肠中毒蕈碱型胆碱受体M3(M_3R)、5-羟色胺受体3A(5-HT_{3A})、闭合蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白(ZO-1)表达显著降低。实验结果表明通过高糖高脂喂养4周联合腹腔注射STZ 25 mg/kg、附子、青皮、枳实灌胃诱导大鼠8周,可部分形成气阴两虚证糖尿病肾脏疾病基本证候特征,用于评价气阴两虚证糖尿病肾脏疾病的建立。

关键词:糖尿病肾病;气阴两虚;病证结合;肠道菌群

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)12-2040-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.12.003

Study on the animal model of diabetic kidney disease with Qi-yin deficiency syndrome based on intestinal flora

CHEN Peng-de¹, YAO Lan^{1*}, GUO Feng¹, HAN Xue¹, ZHANG Wen-xiang¹, HAN Rong^{2*}¹College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University;²Department of Educational Affairs, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Abstract: To establish an animal model and evaluation index of Qi-yin deficiency syndrome of diabetic kidney disease. Thirty Wistar rats were randomly divided into normal group (10 rats) and model group (20 rats) according to body weight. The model group was fed high-carbohydrate and high-fat diet for four weeks, and the diabetic rats were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) 25 mg/kg. The model rats were assigned to diabetic kidney disease model group (10 rats) and Qi-yin deficiency syndrome combined model group (QYCM) (10 rats) according to the 24 h urinary protein value. The QYCM was administrated with Aconm Lateralis Radix Praeparata, Pericarpium Citri Peticulatae Viride and Fructus Aurantii Immaturus by gavage at 5:6:6, 13 g/kg for eight weeks. The measurement indexes of rats were observed. It was found that compared with normal group and diabetic kidney disease model group, the content of beneficial bacteria in fecal stool of rats in combination with QYCM: *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* and *Bifidobacterium* decreased significantly; Pathogenic bacteria: *Fusobacterium*, *Enterobacter*, *Trichospirillaceae*, *Enterococcus faecalis* increased significantly; Serum immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin M (IgM) and kidney tissue sodium potassium pump enzyme (Na^+/K^+ -ATP), calcium magnesium pump (Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP) in kidney tissue were significantly lower than those in normal group ($P < 0.05$). Cyclic adenosine

收稿日期:2023-05-26

接受日期:2023-09-04

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2018D01C176)

*通信作者 E-mail: yly11026@sina.com, 87503767@163.com

phosphate (cAMP) and cyclic adenosine phosphate/cyclic guanosine phosphate (cGMP) were significantly higher than those in normal group ($P < 0.05$). HE staining showed that compared with normal group and diabetic kidney disease model group, there were obvious kidney and colon injuries in QYCM. The expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in kidney and colon were significantly increased, while the expressions of muscarinic choline receptor M3 (M_3R), 5-hydroxytryptamine receptor 3A(5-HT_{3A}), occludin and tight junction protein (ZO-1) in colon were significantly decreased. The experimental results showed that the basic syndrome characteristics of diabetic kidney disease in Qi-yin deficiency syndrome could be partially formed by feeding rats with high sugar and high fat for four weeks combined with abdominal injection of STZ 25 mg/kg, Aconm Lateralis Radix Praeparata, Pericarpium Citri Peticulatae Viride and Fructus Aurantii Immaturus for eight weeks, which was used to evaluate the establishment of diabetic kidney disease in Qi-yin deficiency syndrome.

Key words: diabetic kidney disease; Qi-yin deficiency; combination of disease and syndrome; intestinal flora

目前多数学者认为糖尿病肾脏疾病 (diabetic kidney disease, DKD) 气阴两虚为 DKD 的基本病因病机,其病变是由消渴的阴虚燥热为基础演变而成,其中气阴两虚为最根本的条件,贯穿于 DKD 病程始终^[1]。本论文以气阴两虚证作为 DKD 基本病机,应用高脂饲料喂养及小剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 注射建立糖尿病肾脏疾病模型组大鼠模型基础上,采用青皮、枳实、附子灌胃的方法(青皮、枳实有疏肝破气之功,过用该药可使正气耗散;附子入肾经,大热,过用可耗伤肾阴)探讨 DN 气阴两虚证病证结合动物模型建立及考察指标^[2]。

临床研究表明,气阴两虚会导致 DN 患者机体免疫力衰退^[3],免疫球蛋白 G (human immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 M (human immunoglobulin M, IgM) 浓度的变化可以反映大鼠机体免疫力的情况。cAMP、cGMP 与机体神经内分泌系统的功能有关^[4],有学者研究当患者出现阴阳失衡、阴液流失处于阴虚内热的虚热状态时,环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP)、cAMP/cGMP 比值会出现异常^[5]。气虚同样和患者的能量代谢有关,钠钾泵酶 (Sodium potassium pump enzyme, Na^+/K^+-ATP)、钙镁泵酶 (calcium magnesium pump enzyme, $Ca^{2+}/Mg^{2+}-ATP$) 是和能量代谢有关的酶,它可将三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 分解为二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 并释放能量^[6]。糖尿病肾病检验中尿蛋白是判断患者身体健康状况的重要检验指标,借助尿蛋白区分糖尿病肾病的差异性,为其诊治提供科学参考依据^[7]。

研究表明,肠道菌群紊乱与 DKD 的发生有关,肠道微生物可以调节 DKD 小鼠模型肾功能^[8]。DKD 患者肾小球滤过率下降,尿酸、草酸盐等大量代谢废物聚集于结肠,肠道环境变化,导致肠道菌群

失调,研究表明 DKD 患者肠道中有益菌减少,致病菌增加,导致炎性因子在机体循环中大量增加,加剧肾的炎性损伤^[9]。目前对于 DKD 中医药研究多采用西医 DKD 模型,缺乏与糖尿病肾脏疾病该领域的研究受到了一定程度的限制。因此,如何建立病证结合动物模型已经成为中医科研动物模型研究中的热点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

实验采用 30 只健康 6 周龄雄性 SPF 级 Wistar 大鼠,体重 200 ~ 220 g,购自新疆医科大学动物实验中心 (SCXK (新) 2018-0002),饲养于新疆医科大学 SPF 级动物实验中心 (SYXK (新) 2018-0003),室温 20 ~ 23 °C,相对湿度 50% ~ 60%,所有实验方案取得新疆医科大学实验动物伦理委员会批准 (IACUC-20210303-19),遵从 3R 原则。

1.1.2 饲料和药材

高糖高脂饲料购自北京博爱港生物技术有限公司 (饲料配比为基础饲料 52.6%,猪油 10%,蔗糖 13%,蛋黄粉 15%,酪蛋白 5%,胆固醇 1.2%,胆酸盐 0.2%,维生素混合物 0.5%,麦芽糊精 1.5%,矿物混合物 1%)、青皮 (新疆和济中药饮片有限公司,产地湖北,批号:163301-01)、附子 (黄冈金贵中药产业发展有限公司,产地:四川,批号:D5120601)、枳实 (新疆和济中药饮片有限公司,产地江西,批号:174301-02)。青皮、附子、枳实汤剂采用水煮传统工艺,加入 5 倍量的水,煎煮 1 h,过滤后,浓缩至 0.5 g/mL,放置于 4 °C 冰箱中以备用。

1.1.3 主要的试剂及仪器

链脲佐菌素 (Meilunbio, 货号: MB-1227-1); 粪便 DNA 提取试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司,货号: Cat#D2700); 毒蕈碱型胆碱受体 M3 (muscarinic

type choline receptor M3, M₃R) (北京博奥森生物有限公司, 批号: bs-1289R); 5-羟色胺受体 3A (5-hydroxytryptamine receptor 3A, 5-HT_{3A}) (北京博奥森生物有限公司, 批号: bs-12051R); 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (Affinity Bioscience, 批号: AF8410); 白介素-6 (Interleukin-6, IL-6) (Affinity Bioscience, 批号: AF6087); 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI applied biosystems 7500 fast System)。

1.2 方法

1.2.1 动物的分组及造模

选择 30 只 200 g 左右的雄性 Wistar 大鼠, 将这 30 只 Wistar 大鼠随机分为正常组 (normal, Nor) (10 只)、模型组 (20 只)。正常组喂养普通饲料, 模型组继续喂养高糖高脂饲料, 4 周后, 对模型组大鼠腹腔注射 STZ (25 mg/kg), 一周后进行血糖检测, 筛选血糖大于 16.7 mmol/mL 的大鼠, 得到符合条件糖尿病模型大鼠。待糖尿病大鼠 24 h 尿蛋白值显著高于非糖尿病的大鼠, 提示具备肾功能损伤, 具备 DN 的基本特征。在第 5 周后, 把糖尿病大鼠按照 24 h 尿蛋白值 > 20 mg, 分配到糖尿病肾病疾病模型组 (DKD) (10 只)、气阴两虚病证结合模型组 (model, Mod) (10 只), 并且两组在血糖、24 h 尿蛋白值等指标无显著性差异, 随后对气阴两虚病证结合模型组大鼠按 6:5:6 用青皮、附子、枳实汤剂再灌服 8 周时间^[10], 按照 13 g/kg 的体质量给药 (正常组、糖尿病肾脏疾病模型组以等体积的生理盐水灌胃)。实验期间对两组模型组大鼠均高糖高脂饲料喂养, 8 周后, 禁食不禁水 12 h, 2.5% 的戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉处理动物。

1.2.2 对血清中 IgG、IgM、cAMP、cGMP 含量的测定及 cAMP/cGMP 的计算

实验结束后, 对大鼠采用腹主动脉取血, 离心后

得到血清, 采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测血清中 IgG、IgM、cAMP、cGMP, 并计算 cAMP/cGMP 值。

1.2.3 对肾脏组织中 Na⁺/K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶含量测定

实验结束后, 取肾脏组织加入玻璃匀浆器中匀浆, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 具体方法参考 ELISA 说明书。

1.2.4 对 24 h 尿蛋白 (24 h-Pro) 的测定

实验结束前最后一天, 选取每组大鼠, 放入代谢笼收集 24 h 尿液, 统计各组大鼠尿量, 放入 -80 °C 冰箱保存。ELISA 试剂盒测定各组大鼠尿液的尿蛋白浓度, 计算 24 h-Pro 的值。

1.2.5 肾脏组织、结肠组织病理观察

实验结束后, 取左肾、结肠将其固定在 4% 的多聚甲醛溶液中, HE 染色。

1.2.6 Western blot

实验结束后, 分别取冻存的肾脏组织、结肠组织 50 mg 在研磨仪进行研磨, 随后加入 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白。采用 10% 分离胶对蛋白进行电泳分离和转膜, 5% 牛奶封闭 2 h, 4 °C 一抗孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h。采用化学发光法在 Azure Biosystems 多功能分子成像系统下曝光成像, ImageJ 软件进行目标蛋白灰度值分析。

1.2.7 肠道菌的分析

在处理动物之前, 采用无菌的 5 mL 冻存管收集粪便, 保存于 -80 °C 冰箱。用试剂盒所述的方法提取 DNA, 用普通 PCR 扩增回收, 随后在荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 扩增条件是: 预变性 95 °C, 10 min; 循环 (40 次) 95 °C; 解曲线 60 °C → 95 °C。对肠道菌群进行 qPCR 检测 (见表 1), 进行标准曲线构建。PCR 数据分析参考文献^[11]进行。

表 1 检测肠道菌的相关 PCR 序列

Table 1 Related PCR sequences for detecting intestinal bacteria

项目 Item	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
乳酸杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	AGCAGTAGGGAATCTTC	CACCGCTACACATGGAG
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	GTCAGCTCGTGTCTGAG	GTCGCATCCCGTTGTACC
肠杆菌 <i>Enterobacter</i>	CATTGACGTTACCCGAGAAG	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC

续表 1 (Continued Tab. 1)

项目 Item	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
拟杆菌门 Bacteroides	GGAGYATGTGGTTTAATTCG	AGCTGACGACAACCATGCAG
厚壁菌门 Firmicutes	GGAGYATGTGGTTTAATTCG	AGCTGACGACAACCATGCAC
粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	TCAGTTCATGGCATAACAGCAG	AGGCAACGTTGTTCCCGTTCCA
梭杆菌属 <i>Fusobacterium</i>	GTATGTCRCAAGCGTTATCC	AACGCAATACRGAGTTGAGC
毛螺菌科 Trichospirillaceae	AGCTCTATCAGCAGGGAA	ATTACCGCGCTGCTGCC
梭菌属 <i>Clostridium</i>	CATCCTGATGACGGTTTC	GTTGCGGGACTTAACCCA

1.2.8 统计分析

用 SPSS22 软件对数据进行统计学分析,数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间采用单因素方差分析,组内比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 对血清中 IgG、IgM、cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 的测定结果

结果显示(见表 2),与 Nor 比较,DKD 和 Mod 的 IgG、IgM 含量显著下降($P < 0.05$),cAMP 的含量

显著升高($P < 0.05$),cAMP/cGMP 的比值显著升高。与 DKD 比较,Mod 的 IgM 含量显著下降($P < 0.05$),cAMP 的含量,cAMP/cGMP 的比值显著升高($P < 0.05$)。

2.2 对肾脏组织中 Na^+/K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶含量测定结果

结果显示(见表 3),与 Nor 相比,DKD 和 Mod 的 Na^+/K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶含量显著降低($P < 0.05$),与 DKD 比较,Mod 的 Na^+/K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶含量也显著降低($P < 0.05$)。

表 2 血清中的 IgG、IgM、cAMP、cGMP 的含量($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Content of IgG, IgM, cAMP and cGMP in serum ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组 Group	IgG (g/L)	IgM (g/L)	cAMP (mmol/L)	cGMP (mmol/L)	cAMP/cGMP
Nor	1.5 ± 0.3	24.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2
DKD	0.8 ± 0.2*	19.6 ± 2.1**	0.6 ± 0.2*	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.3*
Mod	0.5 ± 0.1#	14.2 ± 0.6**	0.9 ± 0.2**	0.3 ± 0.1*	3.0 ± 0.5**

注:与 Nor 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 DKD 比较,# $P < 0.05$,下同。

Note:Compared with Nor,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;Compared with DKD,# $P < 0.05$,the same below.

表 3 肾脏组织中的 Na^+/K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的含量($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Content of Na^+/K^+ -ATPase and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase in kidney tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组 Group	Na^+/K^+ -ATP (U/mg)	$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP (U/mg)
Nor	1.7 ± 0.2	3.9 ± 0.5
DKD	0.9 ± 0.1**	2.5 ± 0.7*
Mod	0.8 ± 0.3***	2.0 ± 0.3**

2.3 对 24 h 尿蛋白(24 h-Pro)的测定

结果显示(见表 4),与 Nor 相比,DKD 和 Mod 的尿蛋白含量、尿量、24 h-Pro 量显著升高($P <$

0.01),DKD 和 Mod 没有显著性差异。24 h-Pro 量显著增加,提示肾功能可能出现了损伤。

2.4 肾脏组织、结肠组织病理观察

通过对大鼠肾脏 HE 结果观察,与 nor 相比,DKD 和 Mod 的大鼠肾小球系膜基质增生,少量肾小

管扩张,上皮细胞水肿,出现大量的炎性浸润,Mod 的肾小球系膜基质增生,炎性浸润更加显著(见图 1)。

表 4 尿蛋白含量、体积、24 h 尿蛋白测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Urine protein content, volume and 24 h-Pro were determined ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组 Group	尿蛋白含量 Urinary protein content(mg/mL)	尿液体积 Urine volume(mL)	24 h-Pro(mg)
Nor	0.3 ± 0.1	10.4 ± 2.1	3.2 ± 0.7
DKD	0.3 ± 0.1	130 ± 15.5 **	34.6 ± 4.1 **
Mod	0.2 ± 0.1	161 ± 14.6 **	32.9 ± 2.7 **

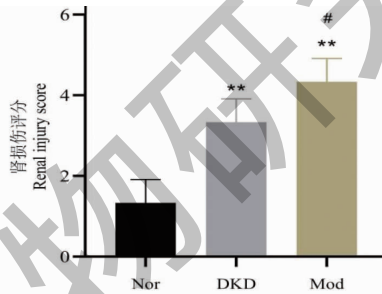
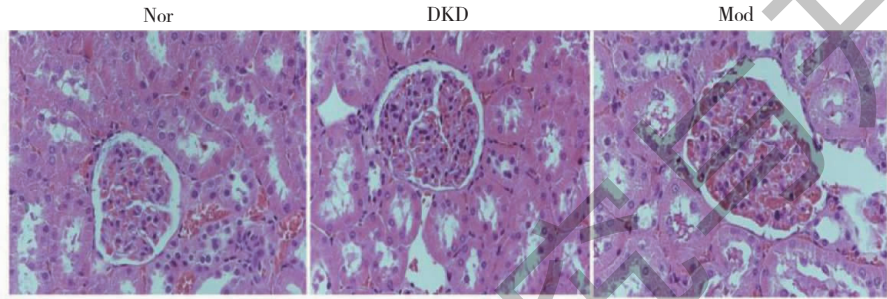


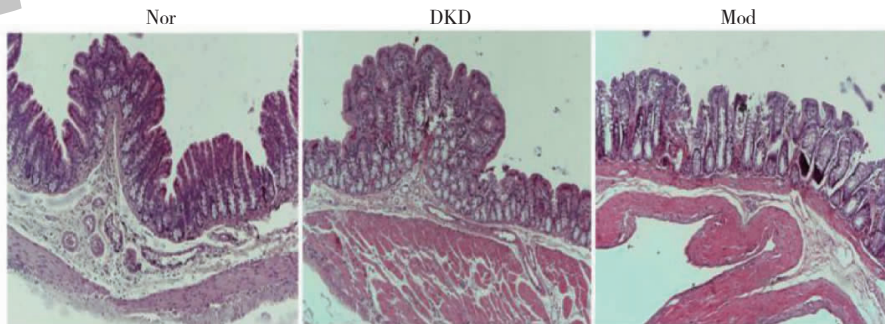
图 1 大鼠肾脏组织的 HE 结果($\times 400$)($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 HE results of rat kidneys tissue ($\times 400$) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:与 Nor 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DKD 比较, # $P < 0.05$, 下同。Note: Compared with Nor, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with DKD, # $P < 0.05$, the same below.

通过对大鼠结肠 HE 结果观察,与 Nor 相比,DKD 和 Mod 的大鼠杯状细胞数量、黏液厚度、肠壁厚度明显减少,绒毛高度也明显降低,且有炎性细胞

侵入,Mod 的大鼠杯状细胞数量、肠壁厚度明显、绒毛高度减少更加显著(见图 2)。



续图 2 (Continued Fig.2)

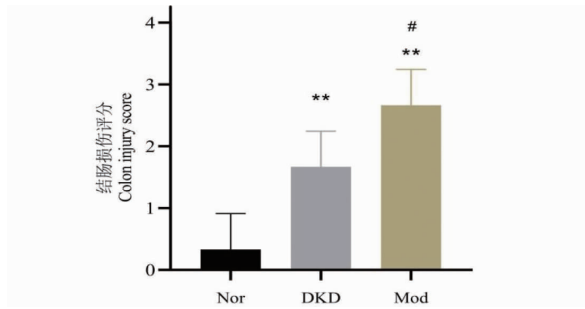


图2 大鼠结肠组织的 HE 结果(×100) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 HE results in the colon tissue of the rats (×100) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.5 大鼠肾脏 IL-6、TNF- α 的表达

IL-6 蛋白表达比 DKD 增加显著 ($P < 0.05$) (见图 3)。

结果显示,大鼠肾脏,与 Nor 相比,DKD 和 Mod 的 IL-6、TNF- α 的表达量都升高 ($P < 0.05$),Mod 的

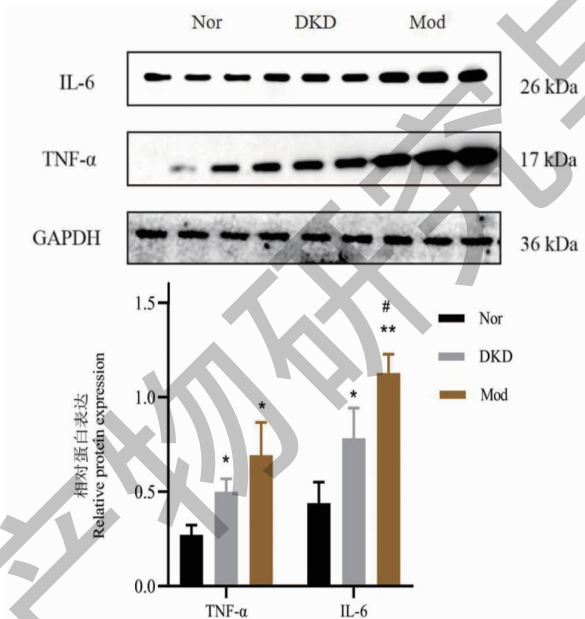


图3 鼠肾脏 IL-6、TNF- α 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Expression of IL-6 and TNF- α proteins in rat kidney ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.6 大鼠结肠肠道屏障蛋白及 IL-6、TNF- α 的表达

WB 检测结肠组织的蛋白显示(见图 4),与 Nor 相比,DKD 和 Mod 的 M3R、5-HT_{3A}、Occludin、ZO-1 蛋白的表达量都显著降低 ($P < 0.05$),IL-6、TNF- α 的表达量都显著增加 ($P < 0.05$);与 DKD 相比,Mod 的 5-HT_{3A}、Occludin、ZO-1 的表达量降低显著 ($P < 0.05$),TNF- α 表达量显著增加 ($P < 0.05$)。

2.7 肠道菌的分析结果

主成分分析(PCA)结果显示,以可视化三组之间粪便微生物群的差异(见图 5;PC1 和 PC2 分别为 63.3% 和 16.3%)。在不同组中肠道菌的相对变化

的也有不同的变化,Mod 的含量变化明显高于其他两组的含量变化,与 Nor 相比,DKD 和 Mod 的乳酸杆菌属、拟杆菌门、梭菌属、双歧杆菌属有益菌的含量都显著减少 ($P < 0.05$),而厚壁菌门的量显著增加,其中拟杆菌/厚壁菌门的比例也显著降低 ($P < 0.05$)(见图 6A),梭杆菌属、毛螺菌科、肠杆菌,粪肠球菌致病菌的含量都显著升高 ($P < 0.05$)(见图 6B),其中与 DKD 相比,Mod 的乳酸杆菌属,梭菌属,双歧杆菌属的含量明显下降 ($P < 0.05$),梭杆菌属、毛螺菌科、粪肠球菌的含量明显上升 ($P < 0.05$)

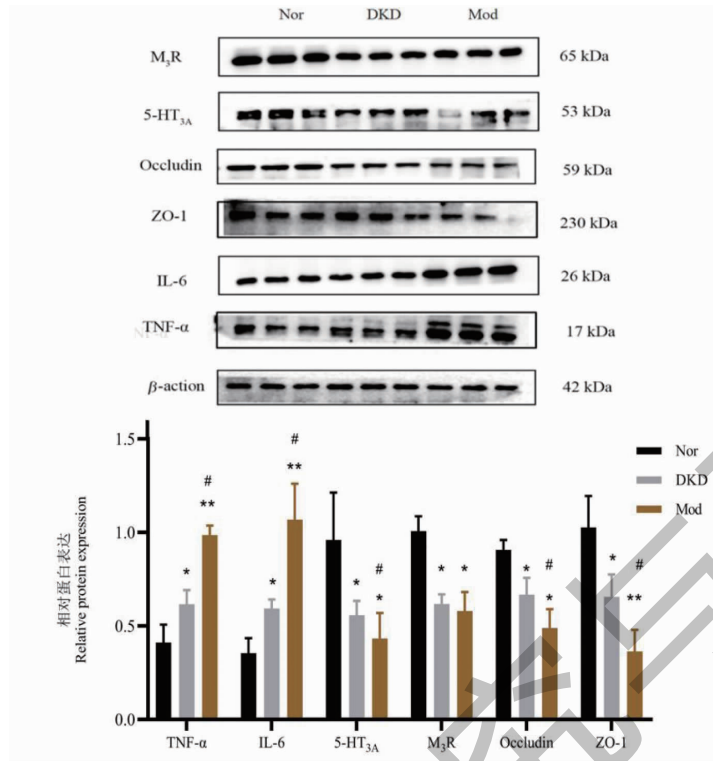


图4 大鼠结肠肠道屏障蛋白及 IL-6、TNF- α 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Expression of intestinal barrier protein, IL-6, TNF- α protein in rat colon ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

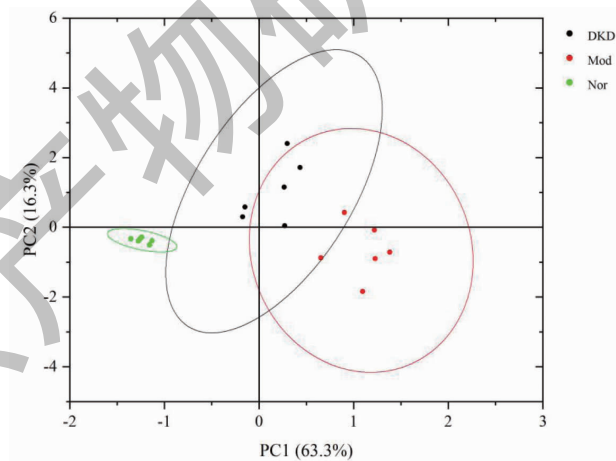


图5 肠道菌群 PCA 图

Fig. 5 PCA of intestinal flora

3 讨论与结论

糖尿病在不断发展进程中,会出现各种不同的并发症,其中最为常见的就是发展成为 DKD。实验结果显示,DKD 大鼠尿蛋白水平显著高于 Nor,并且 DKD 的肾脏和结肠的病理损伤明显区别于 Nor 大鼠,因此基本成功建立了 DKD 模型^[12]。

肠道菌群与 DKD 气阴两虚的关系成为近年关

注热点之一,认为肠道与肾脏在免疫及炎症反应、肠道黏膜屏障等方面起着至关重要的作用^[13]。如果肠道菌群组成、功能改变,会导致肠黏膜损伤,体内毒素转移至血液,诱发或加重免疫炎症反应,加快了 DKD 的进程^[14]。对 160 例气阴两虚型糖尿病肾病进行的研究,临床试验表明 DKD 患者中拟杆菌门、双歧杆菌、乳酸菌等明显低于对照组,而肠杆菌、

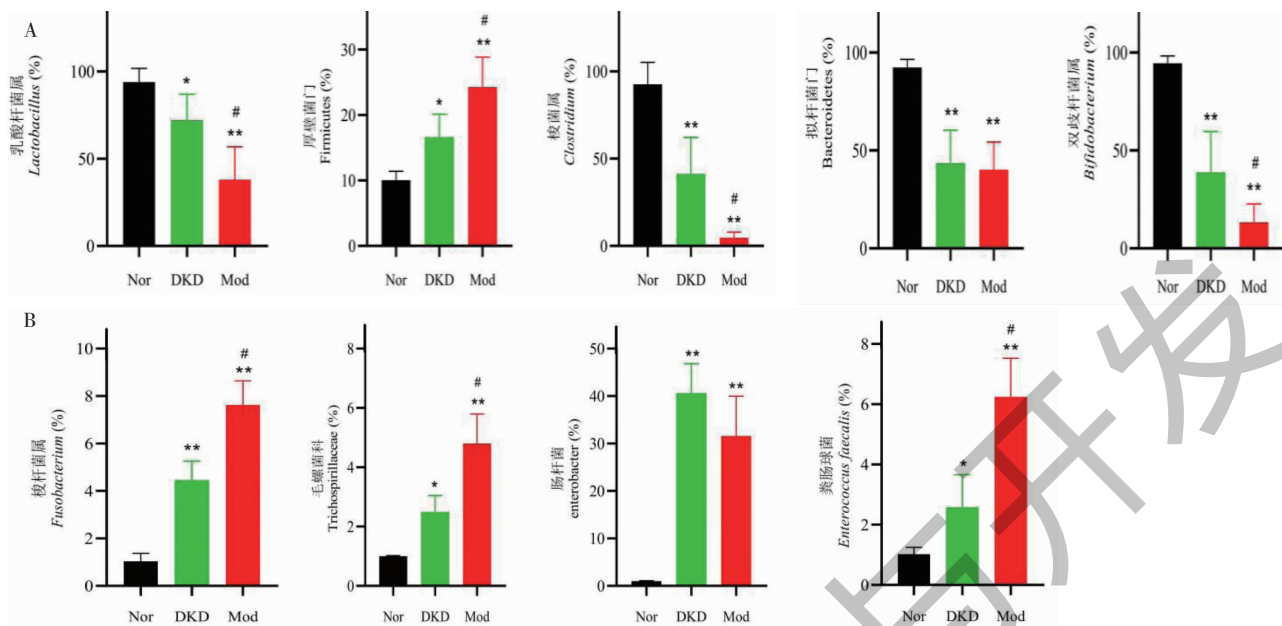


图6 肠道菌实时荧光定量 PCR 分析结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Real-time fluorescence quantitative PCR analysis results of intestinal bacteria($\bar{x} \pm s, n = 10$)

肠球菌、酵母菌、梭杆菌等高于对照组^[15]。实验结果显示 DKD 和 Mod 中拟杆菌门、乳酸杆菌属、双歧杆菌属、梭菌属等有益菌含量降低,梭杆菌属、毛螺菌科、肠杆菌、粪肠球菌等致病菌含量增加,结果与以前的研究基本一致^[16]。同时发现区别于 DKD,在 Mod 中厚壁菌门、梭杆菌、毛螺菌、粪肠球菌的量明显升高,乳酸杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属的量明显下降,提示这些菌属可能与气阴两虚病证密切相关。

肠道菌紊乱会导致肠道的内毒素合成增加、炎症反应加剧,肠道屏障破坏,有害物质发生转移,进而导致肾脏炎症的不断加剧,加快 DKD 的进程^[17]。实验结果显示,肾脏和结肠的 Mod 的 IL-6、TNF- α 蛋白表达明显升高,也证明了这一结论。Occludin、ZO-1 蛋白与肠道组织紧密连接状态相关^[18]。M₃R 也可以通过诱导肠道细胞因子起到保护肠道黏膜稳态的作用^[19],5-HT_{3A} 可以通过免疫系统细胞的表达,保护肠道免疫系统^[20]。结肠组织中相比 Nor,Mod 的 M₃R、5-HT_{3A}、Occludin、ZO-1 蛋白表达显著降低,说明肠道屏障的稳态可能发生了紊乱,这可能是有益菌和致病菌的含量变化所引起,最终导致 DKD 气阴两虚病证的产生。

气虚的产生是机体元气不足引起,气有的推动、固摄、运化、温煦等功能,气不足则可能导致脏腑机能减退,临床研究表明,糖尿病肾病患者的尿微量白

蛋白、免疫球蛋白 G 的含量均显著低于健康患者组^[21],实验结果中 Mod 的 IgG、IgM 蛋白浓度显著降低,说明 Mod 大鼠机体免疫力下降;对 172 例 DN 患者的研究中,发现 cAMP 水平与糖尿病肾病患者肾损伤程度呈正相关性^[22]。实验中得到相比 Nor,Mod 的 cAMP 的含量显著升高,cAMP/cGMP 的比值显著升高,cAMP/cGMP 比值出现异常偏高或偏低,cAMP 含量升高时,大量酪氨酸羟化酶会被激活,产生大量多巴胺作用于神经系统,对人的情绪产生影响,导致人的兴奋程度增强,所以虚热证多会亢奋^[23];研究还发现糖尿病肾病患者的 Na⁺/K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性明显的损害,这就导致细胞结构和功能受损、微循环阻滞、加重肾缺氧缺血,使血管通透性增加,尿蛋白漏出增多引起肾病的进一步发展^[24],实验结果也同样表明,Mod 的肾脏 Na⁺/K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性明显低于 Nor 和 DKD,慢性的肾脏疾病,由于病程日久导致元气耗伤,阴液损伤形成了气阴两虚证,故气阴两虚证糖尿病肾脏疾病会导致机体能量代谢发生紊乱。

综上所述,通过高糖高脂喂养 4 周联合腹腔注射链脲佐菌素、附子、青皮、枳实灌胃诱导大鼠 8 周,可部分形成气阴两虚证糖尿病肾脏疾病基本证候特征,大鼠中标志性肠道菌群以及测定指标的差异性,可一定程度反映病证结合模型的基本特征,用于评价气阴两虚证糖尿病肾脏疾病模型的特征。

参考文献

- 1 Zhou Y, Liu JT, Yang YF, et al. Pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy from the theory of deficiency, phlegm, stasis and toxicity[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2022, 24:78-81.
- 2 Lin YD. Establishment of a mouse model of Qi-yin deficiency syndrome in diabetic nephropathy and the intervention effect of Qizhu Granules[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences(中国中医科学院), 2020.
- 3 Zhang DD, Wang TH, Yu Y, et al. Effect and mechanism of total *Astragalus* saponins on qi deficiency in rats[J]. China Pharm(中国药房), 2020, 31:3020-3025.
- 4 Le N, Hou Y, Zhang JJ, et al. Effects of different extracts of *Dendrobium huoshanense* on temperature tendency, cyclic nucleotide and thyroid hormone in mice with kidney-yin deficiency syndrome and kidney-yang deficiency syndrome[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2021, 36:705-710.
- 5 Le N, Wang ZC, Liu JL, et al. Effects of maca on endocrine hormone and substance metabolism in rats with deficiency cold syndrome and deficiency heat syndrome[J]. Global Tradit Chin Med(环球中医药), 2021, 14:1554-1560.
- 6 Oliveira TN, Possidonio AC, Soares CP, et al. The role of Na^+/K^+ -ATPase during chick skeletal myogenesis[J]. PLoS One, 2015, 10:e0120940.
- 7 Miao CX, Guo LN, Zhong XL. Effect analysis of urinary protein and urinary microalbumin in diabetic nephropathy[J]. Diabetes New World(糖尿病新世界), 2022, 25:65-67.
- 8 Li Y, Su X, Gao Y, et al. The potential role of the gut microbiota in modulating renal function in experimental diabetic nephropathy murine models established in same environment[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866:165764.
- 9 Ju CG, Zhu L, Wang W, et al. *Cornus officinalis* prior and post-processing: regulatory effects on intestinal flora of diabetic nephropathy rats[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:1039711.
- 10 Zheng FJ, Li JL, Hu GZ. Study on evaluation criteria of Qi-yin deficiency model of type 2 diabetes mellitus[J]. Jilin J Chin Med(吉林中医药), 2009, 29:438-440.
- 11 Ling Z, Kong J, Liu F, et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis[J]. BMC Genomics, 2010, 11:488.
- 12 Wang X, Ma YC, Zhao LY, et al. Establishment and evaluation of streptozotocin combined with unilateral nephrectomy induced diabetic nephropathy model in rats and the intervention effect of Angelica Buxue Decoction[J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医药学报), 2022, 50:27-32.
- 13 Wang QH, Zhao YR, Han SX, et al. Chinese medicine treatment of chronic kidney disease based on entero-renal axis theory[J]. Clin J Tradit Chin Med(中医药临床杂志), 2022, 34:2016-2019.
- 14 Guo X, Wu FF. Research progress of intestinal flora involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Med Innov China(中国医学创新), 2021, 18:184-188.
- 15 Du XM, Pan W, Liang YL, et al. Effect of Shenqi Dihuang Decoction on diabetic nephropathy with deficiency of Qi and Yin and its effect on intestinal flora and inflammatory factors[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2021, 32:566-572.
- 16 Bi Q, Chen C. Relationship between intestinal flora disturbance and diabetic nephropathy[J]. J Chin Pract Diagn Ther(中华实用诊断与治疗杂志), 2020, 34:102-105.
- 17 Ni Y, Zheng L, Nan S, et al. Enterorenal crosstalks in diabetic nephropathy and novel therapeutics targeting the gut microbiota[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2022, 54:1406-1420.
- 18 Lu Y, Liu M, Tursi NJ, et al. Uropathogenic escherichia coli infection compromises the blood-testis barrier by disturbing mTORC1-mTORC2 balance[J]. Front Immunol, 2021, 12:582858.
- 19 McLean LP, Smith A, Cheung L, et al. Type 3 muscarinic receptors contribute to intestinal mucosal homeostasis and clearance of *Nippostrongylus brasiliensis* through induction of TH2 cytokines[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016, 311:G130-G141.
- 20 Liu F, Wei XP, Tang XG. Effects of Sijunzi Decoction on 5-HT₃ receptor, 5-HT₄ receptor and inflammatory indexes in patients with irritable bowel syndrome[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2021, 44:215-218.
- 21 Wang R, Tong CY. Detection and significance of urinary microalbumin, immunoglobulin G, transferrin and retinol-binding protein in diabetic nephropathy patients[J]. J Med Inform(医学信息), 2019, 32:175-176.
- 22 Zhang YF, Tong ML. Correlation analysis of serum AGEs, cAMP, PTH and renal injury degree in diabetic nephropathy patients[J]. Mod Pract Med(现代实用医学), 20, 32:1454-1455.
- 23 Wang ZC, Wang LY, Zhu YL, et al. Effects of Asai on cyclic nucleotide, nerve and immune levels in asthenic heat syndrome rats[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 2017, 40:148-154.
- 24 Wang Y, Cheng BC, Teng H, et al. Changes of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity on erythrocyte membrane in diabetic nephropathy patients[J]. J Nanjing Railway Med Coll(南京铁道医学院学报), 1998, 17:49-50.