肾气丸及其拆方对糖尿病肾脏病小鼠肾功能与 AQP1 表达的影响*

裴海鹏，王献，张琳，邵恩茜，王楠，任天爱，冯鹭宝，梁一璐，吴培宇，谢毅强，李凯

海南医学院，海南 海口 571199

摘要：目的：探讨肾气丸及其拆方对糖尿病肾脏病（diabetic kidney disease，DKD）小鼠肾功能与水通道蛋白（aquaporins，AQPs）的影响。方法：将 24 只 db/db 小鼠随机分为模型组（Mo 组）、肾气丸组（S－R 组，10.4 g·kg^{-1}）、肾气丸－补肾组（S－T 组，8.1 g·kg^{-1}）及肾气丸－利尿组（S－D 组，2.3 g·kg^{-1}），每组 6 只；另取 6 只 db/m 小鼠作为对照组（C 组）。取小鼠尾尖血检测空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）、糖化血清蛋白（glycosylated serum protein，GSP）水平。采用 ELISA 法检测血清总胆固醇（total cholesterol，TC）、甘油三酯（triglyceride，TG）、低密度脂蛋白胆固醇（low－density lipoprotein cholesterol，LDL－C）、高密度脂蛋白胆固醇（high－density lipoprotein cholesterol，HDL－C）、血肌酐（serun creatinine，SCr）、尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、微量白蛋白（microalbumin，mAlB）、尿肌酐（urine creatinine，UCr）水平以及 24 小时尿蛋白定量（24 hour urinary protein，UP）。HE 染色法检测肾脏皮质组织病理形态，Western blot 法检测肾脏组织 AQP1 蛋白表达水平。结果：与 C 组比较，Mo 组小鼠 FBG 水平升高（$P<0.01$）；与 Mo 组比较，S－D 组小鼠 FBG 水平降低（$P<0.01$）。与 C 组比较，Mo 组小鼠 GSP 水平升高（$P<0.01$）；与 Mo 组比较，S－R 组、S－D 组小鼠 GSP 水平降低（$P<0.05$）。与 C 组比较，Mo 组小鼠血清 TC、TG、LDL－C 水平升高，HDL－C 水平降低（$P<0.05$）；与 Mo 组比较，S－R 组、S－T 组小鼠血清 TC、TG、LDL－C 水平降低，HDL－C 水平升高（$P<0.05$）。与 C 组比较，Mo 组小鼠 SCr、BUN、mAlB、UP 水平升高，UCr 水平降低（$P<0.01$）；与 Mo 组比较，S－D 组小鼠 SCr、BUN、mAlB、UCr、UP 水平降低（$P<0.05$）；与 Mo 组比较，S－R、S－T 组小鼠 SCr、BUN、mAlB、UP 水平降低（$P<0.05$）。HE 染色显示，C 组小鼠肾皮质无明显病理变化；Mo 组小鼠肾皮质中肾小球系膜增生，伴基质沉积；S－R 组、S－T 组、S－D 组小鼠仅见皮质区肾小球系膜增生。与 C 组比较，Mo 组小鼠肾脏 AQP1 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）；与 Mo 组比较，S－R 组小鼠肾脏 AQP1 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。结论：肾气丸及其拆方均能改善 DKD 小鼠的肾损伤，其机制可能与调节 AQP1 蛋白表达有关。

关键词：肾气丸；肾气丸拆方；糖尿病肾脏病；水通道蛋白；AQP1；肾功能
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.06.212
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674－8999(2025)06－1318－07

Effects of Shenqi Pill and Its Modified Formula on Renal Function and AQP1 Expression in Mice with Diabetic Kidney Disease

PEI Haipeng，WANG Xian，ZHANG Lin，SHAO Enqian，WANG Nan，REN Tianai，
FENG Lubao，LIANG Yilu，WU Peiyu，XIE Yiqiang，LI Kai

Hainan Medical College，Haikou Hainan China 571199

Abstract：Objective：To investigate the effects of Shenqi Pill and its modified formula on renal function and aquaporins（AQPs）in diabetic kidney disease（DKD）in mice. Methods：Twenty－four db/db mice were randomly divided into the model group（Mo group），Shenqi Pill group（S－R group，10.4 g·kg^{-1}），Shenqi Pill－kidney tonic group（S－T group，8.1 g·kg^{-1}），and Shenqi Pill－diu-

* **基金项目：**国家自然科学基金项目（82160897，82205087）；海南省“南海新星”教育平台项目（JYNHXX2023－16G）；海南医学院 2022 年大学生创新创业训练计划项目（202211810015）

retic group (S－D group, 2.3 g·kg^{-1}), with six mice in each group; and six db/m mice were taken as the control group (C group). Fasting blood glucose (FBG) and glycosylated serum protein (GSP) levels were measured by taking the tail tip blood of mice. Serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low－density lipoprotein cholesterol (LDL－C), high－density lipoprotein cholesterol (HDL－C), and triglyceride (TG) were measured by ELISA. density lipoprotein cholesterol (HDL－C), serun creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), microalbumin (mAlB), urine creatinine (UCr), and urinary creatinine (UCr). The levels of serun creatinine (SCr), urea nitrogen (bloodurea nitrogen, BUN), microalbumin (mAlB), urinary creatinine (UCr), and 24 hour urinary protein (UP) were quantified at 24 h. The pathological morphology of renal cortical tissues was detected by HE staining method, and the protein expression level of AQP1 in renal tissues was detected by Western Blot method. Results: Compared with group C, the FBG level of mice in Mo group was increased ($P<0.01$); compared with Mo group, the FBG level of mice in S－D group was decreased ($P<0.01$). Compared with group C, the level of GSP in mice in Mo group was increased ($P<0.01$); compared with Mo group, the level of GSP in mice in S－R and S－D groups was decreased ($P<0.05$). Compared with group C, the serum TC, TG, LDL－C levels of mice in Mo group were increased, and HDL－C levels were decreased ($P<0.05$); compared with Mo group, the serum TC, TG, LDL－C levels of mice in S－R group and S－T group were decreased, and HDL－C levels were increased ($P<0.05$). Compared with group C, mice in Mo group had increased levels of SCr, BUN, mAlB, and UP, and decreased levels of UCr ($P<0.01$); mice in S－D group had decreased levels of SCr, BUN, mAlB, UCr, and UP compared with Mo group ($P<0.05$); and mice in S－R and S－T groups had decreased levels of SCr, BUN, mAlB, and UP compared with Mo group ($P<0.05$). HE staining showed that there were no obvious pathological changes in the renal cortex of mice in group C; glomerular thylakoid hyperplasia in the renal cortex of mice in group Mo, accompanied by matrix deposition; and glomerular thylakoid hyperplasia in the cortical area only was seen in mice in groups S－R, S－T, and S－D. Compared with group C, the renal AQP1 protein expression level of mice in Mo group was reduced ($P<0.01$); compared with Mo group, the renal AQP1 protein expression level of mice in S－R group was increased ($P<0.05$). Conclusion: Shenqi Pill and its modified formula can improve renal injury in DKD mice, and its mechanism may be related to the regulation of AQP1 protein expression.

Key words: Shenqi Pill; modified formula of Shenqi Pill; diabetic kidney disease; aquaporin; AQP1; renal function

糖尿病肾脏病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者常见的慢性微血管并发症之一,也是导致终末期肾衰竭的主要原因[1]。据国际糖尿病联合会(IDF)的数据显示,2021年全球20～79岁人群中DM患者为5.37亿,其中约40%的患者发展为DKD。预测至2030年,DM患者总数将上升至6.43亿,而到2045年,预计将达到7.84亿[2]。DM引起的肾脏病变已然成为全球慢性肾脏疾病及全球疾病经济负担增加的主要原因。

《金匮要略》记载:"消渴,小便反多,以饮一斗,小便一斗,肾气丸主之。"研究发现,肾气丸治疗DKD疗效显著[3-4]。肾气丸可改善DKD患者肾功能,缓解多尿等临床症状。关于肾气丸的临床运用仍存在两大争议,亟待深入探讨:第一,针对"小便一斗"的多尿症状,为何要在肾气丸方中配伍使用具有"利水"作用的泽泻、茯苓?在教学过程中,有学生甚至提出,在治疗消渴多尿时,能否去掉方中的茯苓、泽泻;第二,肾气丸究竟是利尿剂还是缩尿剂?《金匮要略·血痹虚劳病脉证并治》言肾气丸治疗虚劳腰痛见"小便不利",《金匮要略·痰饮咳嗽病脉证并治》言肾气丸治疗饮邪"当从小便去之"。上述关于肾气丸利尿功效的记载与其治疗消渴多尿的功效存在明显矛盾,现行教材将肾气丸的缩尿与利尿功效解释为"病异证同可异病同治"[5]。此种解释虽符合中医特色,但过于理论化和抽象化,使学生难以理解。因此,本研究旨在对以上问题进行深入分析,以期为临床应用提供科学指导。

水通道蛋白(aquaporins, AQPs)在人体器官的分布与中医学中调控水液代谢的主要脏腑十分类似。有学者归纳中医水液代谢内涵及其与AQPs的相关性[6],AQPs是一类位于细胞膜上的蛋白质家族,具有水分子通道功能,并介导水分子的转运[7]。研究发现,AQPs与DM、DKD、急性肾损伤等多种肾脏疾病密切相关[8-9]。因此,探究AQPs在中药调节人体水液代谢中的作用机制具有重要意义。本研究旨在分析肾气丸及其拆方(补肾组、利尿组)在DKD动物模型中对尿量的影响,并探讨其调节机制是否与AQPs相关,为解析肾气丸的方义及其在DKD临床治疗中的应用提供基础依据。

1　材料

1.1　动物　6～8周龄SPF级雄性db/db小鼠24只,体质量(40±3) g;6～8周龄SPF级雄性db/m小鼠6只,体质量(20±1) g,均购自成都药康生物

科技有限公司，实验动物使用许可证号：SYXK（川）2020－225，实验动物生产许可证号：SCXK（渝）2018－0003。动物饲养在温度 20～21 ℃，相对湿度 46%～58%，12 h/12 h 昼夜明暗交替的环境中。本研究获得海南医学院伦理委员会审批，批号：HYLL－2022－216。

1.2　试剂与药物　生理盐水（四川科伦药业股份有限公司，批号：G219110306）；甘油三酯（triglyceride，TG）、总胆固醇（total cholesterol，TC）、低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein－cholesterol，LDL－C）、高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein－cholesterol，HDL－C）、血肌酐（serum creatinine，SCr）、尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、糖化血清蛋白（glycated serum protein，GSP）测试盒（南京建成生物工程研究所有限公司，规格：96T，货号：A110－1－1、A111－1－1、A113－1－1、A112－1－1、C011－2－1、C013－2－1、A037－2－1）。熟地黄、桂枝、山茱萸、附子（炮）、茯苓、山药、牡丹皮、泽泻（四川省中药饮片有限责任公司，批号：191008、2203140、2009027、2112071、2111024、2201032、210817、220216）；肾气丸方药剂量参考《金匮要略》与“十四五”《方剂学》教材[10]：熟地黄 24 g，山药 12 g，山茱萸 12 g，泽泻 9 g，茯苓 9 g，牡丹皮 9 g，桂枝 3 g，附子（炮）3 g。

1.3　仪器　高速冷冻离心机（湖南长沙湘仪检测设备有限公司，型号：H1850R）；漩涡混匀器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司，型号：XW－80A）；生物样品均质仪（北京奥盛创新科技有限公司，型号：Bioprep－6）；全自动封闭式组织脱水机、病理组织漂烘仪（常州市中威电子仪器有限公司，型号：JSD－QD、PHY－Ⅲ）；摊片机、切片机、全自动染色机、光学显微镜（德国 Leica，型号：HI1210、RM2245、ST5010、DM500）。

2　方法

2.1　分组与造模　实验期间，各组小鼠自由饮水，适应性喂养 1 周后，尾尖取血检测空腹血糖（fasting blood glucose，FBG），以不同日 FBG＞7.0 mmol·L^{-1} 且随机血糖≥11.1 mmol·L^{-1} 作为 db/db 小鼠 DKD 成模条件[11]。将 24 只 db/db 小鼠按血糖随机分为模型组（Mo 组）、肾气丸组（S－R 组）、肾气丸－补肾组（S－T 组）及肾气丸－利尿组（S－D 组），每组 6 只；另取 6 只 db/m 小鼠作为对照组（C 组）。其中，S－R 组小鼠按原方给药，灌胃剂量为 10.4 g·kg^{-1}，质量浓度 1.04 g·mL^{-1}；S－T 组仅取熟地黄、山药、山茱萸、牡丹皮、桂枝、附子（炮），灌胃剂量为 8.1 g·kg^{-1}，质量浓度 0.81 g·mL^{-1}；S－D 组仅取泽泻、茯苓，灌胃剂量为 2.3 g·kg^{-1}，质量浓度为 0.23 g·mL^{-1}；C 组和 Mo 组小鼠灌胃生理盐水，连续 8 周。

2.2　样本制备　在给药第 0—8 周，每周将小鼠放入代谢笼中收集尿液用于动态尿量监测。给药结束前 1 d 收集 24 h 尿液，3 500 r·min^{-1} 离心 10 min，－80 ℃保存；尿液解冻后，振荡混匀，3 500 r·min^{-1}、4 ℃ 离心 5 min，冰浴暂存。8 周实验结束后，小鼠禁食不禁水，次日用乙醚吸入法麻醉，眼眶后静脉丛采血（无抗凝剂），室温放置 30 min，2 000 r·min^{-1}、4 ℃离心 10 min；取上清置于 1.5 mL 无菌离心管中，2 000 r·min^{-1}、4 ℃离心 5 min，取上清－80 ℃冻存；血清解冻后，振荡混匀，2 000 r·min^{-1}、4 ℃离心 5 min，冰浴暂存。无菌条件下摘取小鼠左侧肾脏，扇形纵切后取 100 mg 组织冻存，剩余组织置于中性福尔马林固定。

2.3　血清、尿液指标检测　给药前和给药后取小鼠尾尖血测定 FBG、GSP 水平。按照 ELISA 试剂盒方法分别测定血清中 TG、LDL－C、HDL－C、SCr、BUN、微量白蛋白（microalbumin，mAlB）、尿肌酐（urine creatinine，UCr）水平以及 24 小时尿蛋白定量（24 hour urinary protein，UP）。

2.4　小鼠肾脏病理形态观察　取固定的肾脏皮质组织，石蜡包埋制备组织蜡块，常规连续切片后，脱蜡水化，HE 染液染色，封片后观察肾皮质组织的一般形态、炎症细胞（单核细胞、中性粒细胞）浸润及肾小球、肾小管、间质的病理形态。

2.5　Western blot 法检测肾脏组织 AQP1 表达情况　取冻存的肾脏组织，预冷裂解液提取总蛋白，BCA 蛋白定量试剂盒计算蛋白浓度。取蛋白样品 30 g，加入上样缓冲液离心后上样。10% SDS－PAGE 分离胶和 4% 浓缩胶电泳分离蛋白，72 V 恒压 2 h 转至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 30 min。加入稀释的一抗，室温孵育 1 h，用 1×TBST 漂洗 3 次，分别为 15 min、5 min、5 min。加入稀释的二抗，室温孵育 1 h，再次用 1×TBST 进行漂洗，方法同上。将 ECL 化学发光检测试剂盒的 A 液、B 液按照 1∶1 比例混合，均匀滴在 PVDF 膜上，室温孵育 1 min。使用 Clarity™ Western ECL Substrate 显影，全自动化学发光凝胶成像系统采集图

片，Image J 软件用于图像分析。

2.6　统计学方法　采用 SPSS 21.0 统计软件分析数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。若数据符合正态分布，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 *LSD* 检验；若数据不符合正态分布，采用非参数检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　各组小鼠一般状态比较　C 组小鼠精神状况良好，反应灵敏，行动敏捷，毛发润泽，摄水、摄食及二便正常；Mo 组小鼠精神萎靡不振，反应迟钝，懒散，嗜睡，毛发晦暗无光，甚则脱毛，“三多”症状明显；S－R 组、S－T 组及 S－D 组小鼠上述症状较 Mo 组均有不同程度改善。

3.2　肾气丸及其拆方对 DKD 小鼠尿量的影响　与 C 组比较，Mo 组小鼠总尿量、0～4 周总尿量、5～8 周总尿量均增加（$P < 0.01$）；与 Mo 组比较，S－R 组小鼠 5～8 周总尿量减少（$P < 0.01$）；与 S－R 组比较，S－T 组、S－D 组小鼠 5～8 周总尿量增加（$P < 0.01$）。与 0～4 周比较，Mo 组、S－R 组、S－T 组及 S－D 组小鼠 5～8 周总尿量均增加（$P < 0.01$），见表 1。

3.3　肾气丸及其拆方对 DKD 小鼠糖脂代谢的影响　给药前，与 C 组比较，Mo 组小鼠 FBG 水平升高（$P < 0.01$）；Mo 组、S－R 组、S－T 组及 S－D 组小鼠 FBG 水平比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。与给药前比较，Mo 组、S－R 组及 S－T 组小鼠给药后 FBG 水平升高（$P < 0.05$）。给药后，与 C 组比较，Mo 组小鼠 FBG 水平升高（$P < 0.01$）；与 Mo 组比较，S－D 组小鼠 FBG 水平降低（$P < 0.01$）；与 S－D 组比较，S－R 组、S－T 组小鼠 FBG 水平升高（$P < 0.01$），见图 1。

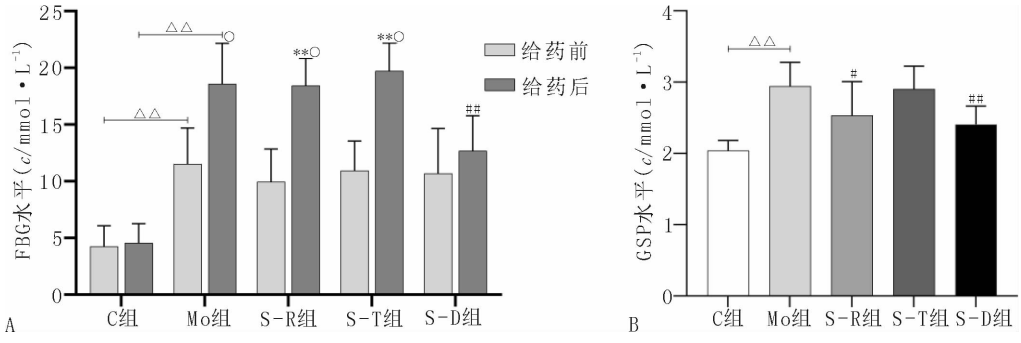
给药后，与 C 组比较，Mo 组小鼠 GSP 水平升高（$P < 0.01$）；与 Mo 组比较，S－R 组、S－D 组小鼠 GSP 水平降低（$P < 0.05$），见图 1。

给药后，与 C 组比较，Mo 组小鼠血清 TC、TG、LDL－C 水平升高，HDL－C 水平降低（$P < 0.05$）；与 Mo 组比较，S－R 组、S－T 组小鼠血清 TC、TG、LDL－C 水平降低，HDL－C 水平升高（$P < 0.05$）；与 Mo 组比较，S－D 组小鼠血清 TG 水平降低，HDL－C 水平升高（$P < 0.05$）；与 S－D 组比较，S－T 组小鼠血清 TC、LDL－C 水平降低（$P < 0.05$），见表 2。

表 1　各组小鼠总尿量比较　（$\bar{x} \pm s$，mL）

组别	n	总尿量	0～4 周总尿量	5～8 周总尿量
C 组	6	36.50 ± 2.14	35.64 ± 1.66	37.58 ± 2.40
Mo 组	6	87.11 ± 29.35$^{\triangle\triangle}$	65.92 ± 20.69$^{\triangle\triangle}$	113.60 ± 6.51$^{\triangle\triangle\bigcirc\bigcirc}$
S－R 组	6	76.49 ± 20.16	64.18 ± 19.44	91.88 ± 3.41$^{\#\#\bigcirc}$
S－T 组	6	88.30 ± 30.05	67.74 ± 24.82	114.00 ± 1.16$^{\dagger\dagger\bigcirc}$
S－D 组	6	85.89 ± 28.11	65.80 ± 20.29	111.00 ± 6.69$^{\dagger\dagger\bigcirc\bigcirc}$

注：与 C 组比较，$\triangle\triangle P < 0.01$；与 Mo 组比较，$\#\#P < 0.01$；与 S－R 组比较，$\dagger\dagger P < 0.01$；与 0～4 周比较，$\bigcirc P < 0.05$，$\bigcirc\bigcirc P < 0.01$。



注：A：FBG 水平比较；B：GSP 水平比较；与 C 组比较，$\triangle\triangle P < 0.01$；与本组给药前比较，$\bigcirc P < 0.05$；与 Mo 组给药后比较，$\#P < 0.05$，$\#\#P < 0.01$；与 S－D 组给药后比较，$**P < 0.01$。

图 1　各组小鼠空腹血糖、糖化血清蛋白水平比较

表 2　各组小鼠血脂指标水平比较　（$\bar{x} \pm s$，mmol·L^{-1}）

组别	n	TC	TG	LDL－C	HDL－C
C 组	6	2.54 ± 0.58	1.96 ± 0.34	0.54 ± 0.37	5.62 ± 0.67
Mo 组	6	4.84 ± 0.93$^{\triangle\triangle}$	2.79 ± 0.65$^{\triangle}$	1.20 ± 0.51$^{\triangle\triangle}$	3.85 ± 0.56$^{\triangle\triangle}$
S－R 组	6	3.68 ± 0.63$^{\#\#}$	2.16 ± 0.39$^{\#}$	0.69 ± 0.27$^{\#}$	5.43 ± 0.90$^{\#\#}$
S－T 组	6	3.40 ± 0.78$^{\#\#**}$	1.71 ± 0.40$^{\#\#}$	0.58 ± 0.26$^{\#\#*}$	5.37 ± 0.66$^{\#\#}$
S－D 组	6	4.76 ± 0.43	1.97 ± 0.73$^{\#}$	1.03 ± 0.39	4.89 ± 0.80$^{\#}$

注：与 C 组比较，$\triangle P < 0.05$，$\triangle\triangle P < 0.01$；与 Mo 组比较，$\#P < 0.05$，$\#\#P < 0.01$；与 S－D 组比较，$*P < 0.05$，$**P < 0.01$。

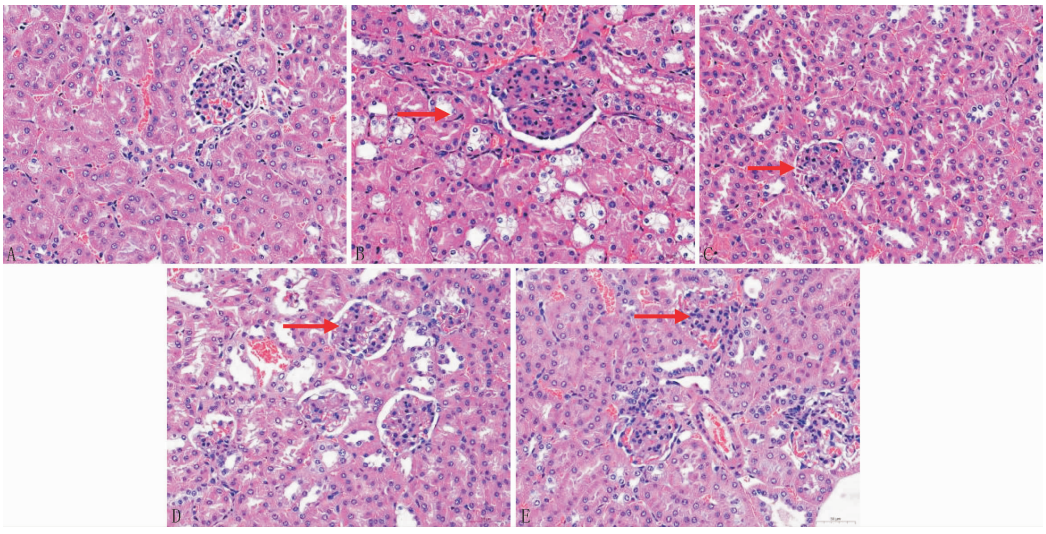
3.4　肾气丸及其拆方对 DKD 小鼠肾功能的影响　给药后，与 C 组比较，Mo 组小鼠 SCr、BUN、mAlB、UP 水平升高，UCr 水平降低（$P<0.01$）；与 Mo 组比较，S－D 组小鼠 SCr、BUN、mAlB、UCr、UP 水平降低（$P<0.05$）；与 Mo 组比较，S－R、S－T 组小鼠 SCr、BUN、mAlB、UP 水平降低（$P<0.05$），S－R、S－T 组小鼠 UCr 水平升高（$P<0.05$），见表 3。

表 3　各组小鼠肾功能指标水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	SCr（c/μmol·L^{-1}）	BUN（c/mmol·L^{-1}）	mAlB（ρ/mg·L^{-1}）	UCr（c/μmol·L^{-1}）	UP（ρ/mg·L^{-1}）
C 组	6	34.03±8.30	17.67±1.13	23.92±2.95	1092.41±45.72	2.45±0.36
Mo 组	6	53.19±8.86$^{\triangle\triangle}$	27.34±1.79$^{\triangle\triangle}$	32.69±2.35$^{\triangle\triangle}$	497.41±44.18$^{\triangle\triangle}$	3.55±0.46$^{\triangle\triangle}$
S－R 组	6	36.57±7.66$^{\#\#}$	19.98±1.36$^{\#\#}$	29.29±1.92$^{\#}$	513.57±49.56*	2.99±0.31$^{\#}$
S－T 组	6	38.97±7.34$^{\#\#}$	20.53±1.47$^{\#\#}$	29.68±2.80$^{\#}$	470.59±65.67**	2.94±0.45$^{\#}$
S－D 组	6	42.62±8.05$^{\#}$	20.28±1.32$^{\#\#}$	28.88±2.48$^{\#}$	404.25±50.96$^{\#\#}$	2.90±0.44$^{\#}$

注：与 C 组比较，$\triangle\triangle P<0.01$；与 Mo 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$；与 S－D 组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$。

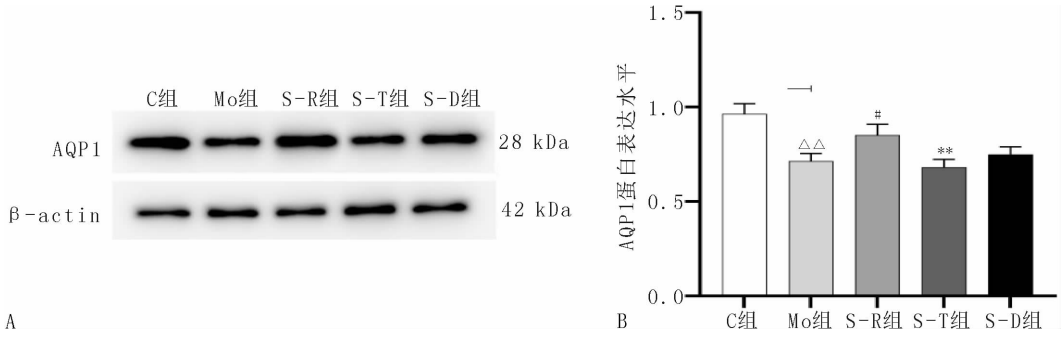
3.5　肾气丸及其拆方对 DKD 小鼠肾组织病理变化的影响　HE 染色显示，C 组小鼠肾皮质结构较清晰，肾小球无坏死，肾小管无萎缩，间质无明显炎症细胞浸润及渗出；Mo 组小鼠肾皮质见较多肾小球系膜增生，肾小球系膜细胞增多，系膜基质沉积；S－R 组、S－T 组、S－D 组小鼠仅见皮质区肾小球系膜不同程度增生，未见其他明显病理改变，见图 2。



注：A：C 组；B：Mo 组；C：S－R 组；D：S－T 组；E：S－D 组；→：系膜增生。

图 2　各组小鼠肾皮质组织 HE 染色图（×400）

3.6　肾气丸及其拆方对肾脏组织 AQP1 表达的影响　与 C 组比较，Mo 组小鼠肾脏 AQP1 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）；与 Mo 组比较，S－R 组小鼠肾脏 AQP1 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与 S－R 组比较，S－T 组小鼠肾脏 AQP1 蛋白表达水平降低（$P<0.01$），见图 3。



注：A：AQP1 蛋白条带图；B：AQP1 蛋白表达水平；与 C 组比较，$\triangle\triangle P<0.01$；与 Mo 组比较，$\#P<0.05$；与 S－R 组比较，$**P<0.01$。

图 3　各组小鼠肾脏 AQP1 蛋白表达水平比较

4　讨论

DKD 属中医“消渴病”继发的“消渴肾病”“尿浊”“水肿”“关格”“虚劳”等范畴，是消渴病日久不愈病情发展的结果[12]。DKD 病因病机较为复杂，清代医家陈士铎在《辨证录》[13]提到：“夫消渴之症，皆脾坏而肾败。脾坏则土不胜水，肾败则水难敌火，二者相合而病成。倘脾又不坏，肾又不败，宜无消渴之症矣。”马锋锋等[14]提出，肾脏是 DKD 最核心和最基本的病位。高慧娟等[15]认为，肾虚是 DKD 的主要病机，肾虚则不能主水，肾精亏虚，气化功能失常，开合失灵，则水液、浊毒停留在内，病情进一步加重。肾气丸的功效为温补肾气[16]，清代医家柯韵伯指出其方义为“此肾气丸纳桂、附于滋阴剂中十倍之一，意不在补火，而在微微生火，即生肾气也”。

本团队前期已探讨了肾气丸治疗 DKD 的理论依据[17]。为进一步验证肾气丸中补肾药物（熟地黄、山药、山茱萸、牡丹皮、桂枝、炮附子）与利尿药物（茯苓、泽泻）对 DKD 小鼠尿量的影响，以及探讨肾气丸在治疗多尿症中的配伍机制，本研究进行了拆方实验。结果显示，DKD 小鼠经肾气丸治疗后一般状态有所改善，GSP、TC、TG、LDL－C、SCr、BUN、UP、mAlB 均降低，总尿量减少，病理仅见皮质区肾小球系膜不同程度增生，未见其他明显病理改变。该结果与其他研究一致，刘雨梦等[18]研究发现，肾气丸可减轻 ZDF 大鼠的肾组织病理损伤，减少 24 小时蛋白尿，证实肾气丸对肾功能具有一定的保护作用。刘冬梅等[3]对 124 例阴阳两虚型 DKD 患者的临床数据分析发现，金匮肾气丸有助于改善患者的肾功能及调节血糖水平。另外，拆方实验显示，S－R 组与 S－D 组小鼠的 GSP 水平较 Mo 组均降低，S－T 组改善不明显，表明茯苓、泽泻在调节 DKD 小鼠血糖方面发挥关键作用。与 Mo 组比较，S－T、S－D 组小鼠 TG 水平降低，S－T 组小鼠 TC 水平降低，而 S－D 组无明显改善，表明补肾药物对血脂改善效果显著。与 Mo 组比较，S－T、S－D 组小鼠 mAlB、BUN、UP、SCr 水平均降低，表明拆方给药对 DKD 小鼠肾脏具有保护作用。

DKD 患者早期表现为肾小球高滤过率，进而出现多尿[19]。本研究中，Mo 组较 C 组小鼠总尿量增多，给予肾气丸治疗后减少，提示肾气丸可缓解 DKD 引起的小鼠多尿症状。拆方实验显示，S－T 组较 S－R 组小鼠总尿量有所增加，此结果与茯苓、泽泻利水功效不符。Mo、S－T、S－D 组小鼠总尿量比较，差异无统计学意义，表明仅用补肾药物并不能有效减少 DKD 小鼠尿量，而仅用利水药物对小鼠尿量亦无明显影响。前期研究发现，去掉茯苓后小便量反而增多[20]，并提出“桂枝－茯苓”药对起效的关键在于促进机体津液气化，而非单纯利水。《素问·经脉别论》论述人体津液气化：“饮入于胃，游溢精气，上输于脾，脾气散精，上归于肺，通调水道，下输膀胱，水精四布，五经并行。”人体津液的运输、分布、排泄受五脏六腑的协同调控。本研究表明，单纯补肾或利水并未涵盖津液气化的全过程。肾气丸中的补肾组分（熟地黄、山药、山茱萸、牡丹皮、桂枝、炮附子）以补肾气为主，同时兼顾肺、脾，以促进脏腑功能；利尿组分（茯苓、泽泻）促进津液的运行与敷布，而非单纯渗利小便。肾气丸的功效实质为使津液气化得复，实现“水精四布，五经并行”，其利尿与缩尿的疗效都是津液气化功能恢复的体现。

中医对水液代谢的认识与 AQPs 分布于全身组织器官以介导水的跨膜运输现象十分相似。王沐晨等[6]梳理“肾主水”与 AQPs 的相关性提出，AQPs 的正常表达可能是机体“肾主水”功能的分子生物学基础，强调 AQPs 作为水液代谢紊乱潜在治疗靶点的重要性。人类的水通道蛋白家族包含 11 个蛋白（AQP 0－12）[21]，其中 8 个 AQPs 在肾脏表达（AQP 1－7、AQP11），这些蛋白与肾脏尿液浓缩、水分子重吸收及代谢等生理功能密切相关[22]。AQP1 分布在近曲小管和髓袢的下降支，参与肾小球滤过液的重吸收[23]。董文鹏[24]观察 DKD 小鼠 *AQP1* 基因敲除后饮水量与尿量发现，小鼠出现尿崩症，饮水量增多，从而证实 AQP1 对肾脏水调控起到重要作用，且对机体有保护作用。本研究中，Mo 组小鼠 AQP1 表达水平较 C 组降低，S－R 组小鼠 AQP1 表达水平高于 Mo、S－T 组，表明肾气丸可能通过调节肾脏 AQP1 表达以缓解 DKD 小鼠多尿，为进一步研究肾气丸调节机体尿量以及水液代谢的机制提供基础。

综上所述，肾气丸及其拆方均能改善 DKD 小鼠的肾损伤，其机制可能与调节 AQP1 蛋白表达有关。

参考文献：

[1] 中国老年型糖尿病防治临床指南编写组，中国老年医学学会老年内分泌代谢分会，中国老年保健医学研究会老年内分泌与代谢分会，等. 中国老年 2 型糖尿病防治临床指南（2022 年版）[J]. 中华内科杂志，2022，61（1）：12－50.

[2] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country - level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109119.
[3] 刘冬梅, 林钟鸿. 金匮肾气丸对阴阳两虚型糖尿病肾病患者血糖水平及肾功能的改善效果[J]. 内蒙古中医药, 2022, 41(7): 18 - 19.
[4] 吴小翠, 程亚伟, 张永杰, 等. 加味金匮肾气丸对糖尿病肾病(脾肾阳虚型)患者 RBP4、GSK - 3β、TGF - β1、NAG 及肾功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(7): 1676 - 1680.
[5] 范永升, 姜德友. 全国中医药行业高等教育"十四五"规划教材 金匮要略[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 149
[6] 王沐晨, 单思, 刘红宁. 水通道蛋白与"肾主水"理论的关系探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18): 205 - 212.
[7] MAGOULIOTIS D E, TASIOPOULOU V S, SVOKOS A A, et al. Aquaporins in health and disease[J]. Adv Clin Chem, 2020, 98: 149 - 171.
[8] HE J, YANG B. Aquaporins in renal diseases[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2): 366.
[9] GALLI M, HAMEED A, ZBIKOWSKI A, et al. Aquaporins in insulin resistance and diabetes: More than channels! [J]. Redox Biol, 2021, 44: 102027.
[10] 李冀, 季旭明. 方剂学[M]. 3 版. 北京: 中国中医药出版社, 2023.
[11] 彭川, 胡学芳, 陈正涛, 等. 基于 16S rRNA 技术研究萎连丸对 2 型糖尿病 db/db 小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(12): 63 - 70.
[12] 中国医师协会中西医结合医师分会内分泌与代谢病学专业委员会. 糖尿病肾病病证结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2022, 63(2): 190 - 197.
[13] 陈士铎. 辨证录[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 25.
[14] 马锋锋, 范增慧. 糖尿病肾病中医病因病机研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(8): 1373 - 1377.
[15] 高慧娟, 冯兴中. 健脾固肾、化痰活血解毒法治疗糖尿病肾病浅析[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 155 - 158.
[16] 江泳, 陈建杉. 《金匮要略》肾气丸新解[J]. 四川中医, 2006, 24(1): 36 - 37.
[17] 王献, 刘畅, 张帆帆, 等. 基于《金匮要略·消渴小便不利淋病脉证并治第十三》探讨糖尿病肾病络瘀的病机特点及辨治启示[J]. 中医研究, 2022, 35(10): 1 - 4.
[18] 刘雨梦, 李姝玉, 冯婧, 等. 肾气丸减轻糖尿病 ZDF 大鼠的肾损伤研究[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 19 - 26.
[19] NAKAMURA T, SAITO T, KUSAKA I, et al. Decrease in urinary excretion of aquaporin - 2 associated with impaired urinary concentrating ability in diabetic nephropathy[J]. Nephron, 2002, 92(2): 445 - 448.
[20] 李凯. 温阳化饮法调控 ANGⅡ - NADPH 氧化酶 - ROS 通路防治 CHF 大鼠心室重构的实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
[21] VERKMAN A S. Aquaporins in clinical medicine[J]. Annu Rev Med, 2012, 63: 303 - 316.
[22] NODA Y, SOHARA E, OHTA E, et al. Aquaporins in kidney pathophysiology[J]. Nat Rev Nephrol, 2010, 6(3): 168 - 178.
[23] MA T, YANG B, GILLESPIE A, et al. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin - 1 water channels[J]. J Biol Chem, 1998, 273(8): 4296 - 4299.
[24] 董文鹏. 水通道蛋白 - 1 在糖尿病肾病转化中的作用[D]. 长春: 吉林大学, 2016.

收稿日期: 2024 - 12 - 20
作者简介: 裴海鹏(2000 -), 男, 甘肃敦煌人, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治内分泌代谢疾病。
通信作者: 李凯(1988 -), 男, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中西医结合防治内分泌代谢疾病。E - mail: 553578979@qq.com

编辑: 刘凯歌