

· 论 坛 ·

“肾的研究”通过“与时俱进”而不断进取

沈自尹

中医学理论博大精深,富有哲理和科学内涵,要用最新科学前沿、符合整体观点的研究方法进行研究,才能不断进取。

中西医结合研究中医基础理论——“肾”本质已有半个世纪,“肾”虽归属于五脏,但肾的功能涉及面最广,亦最根本,肾不但是先天之本,明代著名学者孙东宿、张景岳、赵养葵倡导的“命门”学说,把“肾”看得像生命之门那样重要,由于肾阳温煦着全身各脏器的阳,肾阴滋养着全身各脏器的阴,“肾”表现为人体各脏器的调节中心。

“肾”的研究起源于上海医学院,各临床医院辨证论治小组有 6 种疾病都是以补肾方药提高疗效,于是在 1960 年成立了“脏象专题研究组”,笔者有幸参加并主持协同研究,研究思路是既然异病可以同治,则必有其共同的物质基础——肾虚,因此值得探索。

1 从异病同治探索肾阳虚证的物质基础 首先邀请上海市名老中医按照《内经》理论结合实际病例进行讨论,建立了肾虚辨证标准,该标准经 1978 年、1982 年、1986 年多次修订沿用至今,被全国广泛采用和引用,按此辨证标准,选出数十例典型肾虚患者,经多项生理、生化指标筛选,发现只有尿 17 羟皮质类固醇(尿 17 羟)在肾阳虚患者中普遍很低,具有规律性。由于这项指标反映了内分泌重要腺体——肾上腺皮质的功能,而古人对命门的位置描述为“在十四椎两肾之间有两窍,为水火所以出”,这提示命门与肾上腺皮质密切相关。这项测定研究结果标志着通过“异病同治”^[1]这一研究途径找到了肾阳虚证的初步物质基础,也可以说找到了一个中西医结合点。

由于肾上腺皮质处于下丘脑——垂体——肾上腺皮质轴的终端,因此顺藤摸瓜追本溯源地进行科研设计。采用兴奋肾上腺皮质的促肾上腺皮质激素,静脉滴注两日试验,采用反映垂体储备功能的甲吡酮试验,采用反映下丘脑调节皮质醇水平的血皮质酮昼夜节律

变化试验,这三项试验对健康人、肾阴虚、肾阳虚三组人群做了完整测试,以求了解下丘脑——垂体——肾上腺皮质轴的全面情况,从三组(健康人、肾阴虚、肾阳虚患者)人群的比较中,得出了肾阳虚患者下丘脑——垂体——肾上腺皮质轴上不同环节(层次)、不同程度功能紊乱的结论^[2,3],使肾阳虚的研究达到有客观判定指标的水平,该研究在 20 世纪 60 年代领先于国际。

1979 年起有研究对下丘脑——垂体所辖的甲状腺轴、性腺轴进行了与肾上腺皮质轴相同的全套功能测定,结果可见此两轴上肾阳虚证患者都有与肾上腺皮质轴相同的功能紊乱^[4],而且用温补肾阳药治疗后靶腺功能明显恢复。至此,三条轴上紊乱的病源指向下丘脑。由于下丘脑的定位研究只能在动物模型上进行,在老年大鼠(衰老是生理性肾虚)模型上,取材下丘脑,观察到用补肾药可提高下丘脑双氢睾酮受体亲和力,说明补肾药可直接作用于下丘脑^[5]。采用温肾药干预可使皮质酮大鼠(肾阳虚模型)下丘脑室旁核与正中隆起的促肾上腺皮质释放激素(corticotrophin-releasing hormone, CRH)含量明显增加,CRH 神经元与神经纤维明显增加,亦显示温肾药可直接作用于下丘脑^[6]。采用三类复方(补肾、健脾、活血)制剂,观察到补肾药能明显地提高皮质酮大鼠已受抑的下丘脑 CRH mRNA 的表达量,从而在分子水平上将肾阳虚的主要调节点定位在下丘脑^[7]。一系列的探索性研究说明“肾”确为命门学说中的人体重要脏器的调节中心,亦表明必须采用时代前沿的研究理论和手段才能提高实验结果的可信度。

2 对于肾虚、肾阳虚证的神经内分泌免疫网络调控的研究 自从 Basedovsky 1977 年提出了著名的“神经内分泌免疫(neuro-endocrine-immunity, NEI)网络”学说,淋巴细胞可分泌各种递质、激素、神经肽传递给神经内分泌系统;同样,神经内分泌系统亦可将各种递质、激素、神经肽传递给淋巴细胞,这样神经、内分泌、免疫三大系统已不是过去互不相干、各司其职,而是构成了一个完整的网络系统,这是现代医学从局部观点到整体观念的一大发展和进步,但还缺少调节平衡的手段,将它借鉴过来,必然有利于中医

“证”的研究。

有研究在皮质酮大鼠模型上,以正常大鼠为对照,观察温补肾阳的右归饮^[8]及自拟命门合剂^[9]的调节作用,结果显示,模型大鼠下丘脑单胺类递质含量紊乱,下丘脑——垂体——肾上腺——胸腺(Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Thymus, HPAT)轴形态及细胞免疫功能全面受到抑制,两个方药均能有效纠正上述受抑指标。说明肾阳虚证与 NEI 网络有内在联系,补肾药是调节下丘脑、NEI 网络、HPAT 轴的有效手段,亦成为肾阳虚证定位研究的重要佐证。

21 世纪是基因组学的世纪,基因表达谱可以全面地反映基因分子网络的活动规律,基因芯片则是一种杂交技术,可以高效率、高通量从上万个基因中筛选出被上调或下调的差异表达基因。2004 年笔者课题组选用美国 Affymetrix 公司的全基因组大鼠芯片,采取淫羊藿总黄酮(epimedium flavonoids, EF)以药测证^[10]。实验分两组,肾虚组采用自然衰老大鼠;肾阳虚组采用皮质酮大鼠,都以正常青年组为对照,再设 EF 治疗组。基因芯片用了 24 张,实验分别取 HPAT 轴的下丘脑、垂体、肾上腺、淋巴组织,提取 RNA,结果可见肾虚组老年大鼠多项神经递质、生长激素、性激素、淋巴组织基因下调,EF 治疗则使之全部上调。肾阳虚组大鼠多项神经递质、生长激素、性激素、肾上腺皮质激素、甲状腺激素基因下调,EF 治疗则使之全部上调。2005 年再进行相同的实验,基因芯片亦用了 24 张,得到重复一致的结果。经过两次重复两组模型大鼠基因表达差异谱及分子网络的比较,阐明了两种大鼠模型具有同样的肾虚内涵。从脏腑辨证着手,由 3 个轴的功能紊乱推论,肾阳虚证发病环节在下丘脑;从方剂辨证着手,认为肾阳虚证涵盖着 NEI 网络,其调控中心在下丘脑,可见,证是一种综合性的功能态,有具体的功能网络和调控中心。

3 从补肾延缓衰老到延长“健康寿命”的探索研究发现肾虚与衰老具有相同的 NEI 网络功能紊乱低下^[11],经过补肾药与非补肾药、单味药与复方的筛选,又发现补肾药淫羊藿的主要成分——EF 及其有效单体淫羊藿苷(Icariin, ICA)可以代表几个补肾复方(补肾益寿片、温阳片、右归饮)提高 NEI 网络功能^[12]。在此基础上,课题组进行了 EF、ICA 延长健康寿命的基础研究。

健康寿命的概念在 21 世纪初出现,英文“health span”是由两个词语“health”与“life span”组合而成的新名词,亦是对延长寿命的更高要求。课题组对此的研究方法采取中医学传统的“以药测证”,通过特定

的中药,对证的干预后可见证的变化轨迹以及效验。首先进行了细胞衰老模型的研究,结果提示 EF 含药血清能显著提高人胚肺二倍体成纤维细胞的传代次数($P < 0.01$),而且明显延缓了端粒长度的缩短($P < 0.01$),老年治疗组非常接近于年轻组,这是一种逆转衰老的表现,而且端粒长度亦是细胞健康的重要标志^[13]。进一步对低等模型生物蠕虫类秀丽线虫进行实验,与空白组及限食组比较,EF 组平均寿命与最大寿命均明显延长($P < 0.01$),线虫在急性热应激环境中的生存率显著提高($P < 0.01$),老年期线虫运动能力的衰退显著改善,肌肉细胞的流失受到抑制,从而改善健康状况^[14]。继而对节足类黑腹果蝇进行实验,实验分 4 组,老年对照组、VitE 组、EF 高剂量组、EF 低剂量组,每组 200 只果蝇。与老年对照组比较,高、低剂量 EF 均显著延长果蝇的平均寿命和最高寿命($P < 0.05$),EF 延长果蝇寿命显示一定程度的疗效关系^[15]。采用 Affymetrix 公司的果蝇芯片作基因表达谱的干预实验,结果可见 EF 使自由基清除酶基因上调,促进神经递质基因、细胞周期基因、免疫相关基因、抗凋亡基因等上调,而蛋白降解酶基因下调,这些都显示 EF 不单延长果蝇寿命,而且有利于健康。最后对小鼠进行实验,197 只 12 月龄小鼠分为 4 组,对照组、限食组、EF 组、ICA 组,喂食喂药至 24 月龄作寿命试验,结果显示 EF、ICA 限食均能延长小鼠的平均寿命和最大寿命^[16]。另以 49 只小鼠分组进行生存质量的比较观察,(1)转棒实验:结果显示 EF 组、ICA 组、限食组的转棒潜伏期时间明显高于对照组($P < 0.05$),说明神经肌肉协调能力得到提高。(2)Morris 水迷宫实验:EF 组、ICA 组、限食组穿越平台的平均次数增加,说明学习记忆能力有所提高。(3)股骨密度:ICA 组小鼠股骨密度明显提高($P < 0.05$),其作用优于 EF 组和限食组。(4)DNA 损伤反应的检测:EF 组、ICA 组、限食组众多组织(心、肝、脾、肺、肾、脑)中 DNA 损伤标志物 γ -H2AX、突变基因(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)、乳腺癌基因 1(breast cancer gene 1, Brca 1)、肝组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,均有不同程度提高,提示小鼠抗氧化能力提高,氧化应激对 DNA 造成的损伤减轻。对于多种模式生物和啮齿类动物,限食可减少活性氧的产生、减轻氧化损伤从而延长寿命是国际公认的。但对人类限食须在生命早期进行,这样影响生长发育,缺少营养与热能,表现虚弱而不能维持工作学习,与适应社会竞争,因此,对人类来说以限食来延长寿命并不可取。

21 世纪兴起的系统生物学,是从整体角度了解生物体各活性物质,以及构成系统各元素之间的关系及层次性,利用数学模型进行定量预测。从 3 个层面进行研究,第一个层面是基因表达差异谱,以 4、10、18、24 月龄大鼠(青年、壮年、老年前期、老年)来研究肾气由盛至衰过程中与肾相关的 7 个组织(下丘脑、垂体、肾上腺、淋巴细胞、骨、肝、肾)的基因表达差异谱,随增龄而表达降低,至 24 月龄降为谷底,经 EF 干预 24 月龄,并以归一化和主成分分析处理,再以神经网络学习算法运算,发现 EF 能将各组织块年轻化到 1~13 月龄水平,反映 EF 对神经内分泌免疫和骨代谢的衰老相关基因有很强的逆转作用。第二个层面是在分子调控网络中处于枢纽地位的核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB),选用 NF- κB 寡核苷酸基因芯片,仍与以上相同的动物分组与组织检测,结果显示 NF- κB 信号通路随增龄而下降,EF 作用之后上升,经神经网络模型运算能将该通路基因表达水平从 24 月龄逆转到 10.5 月龄水平。第三个层面是代谢组学,取以上不同月龄和 EF 干预大鼠的血清样本,采用液相色谱和质谱检测,经多元统计有 12 个生物标志物,具有共同特征即年龄依赖关系,经 EF 作用后又上升,神经网络模型运算结果显示 EF 能将 12 个代谢物从 24 月龄逆转到 18 月龄水平。以上 3 个层面的基因之间的联系与网络由于 EF 的干预经数学模型的运算都能逆转到 10~18 月龄水平,这是按照系统生物学的观点进行研究,从不同分子层面上有力地佐证 EF 能延长健康寿命^[17]。

4 “肾藏精”理论借助干细胞研究得以现代科学演绎 “肾藏精”在脏象学说中非常重要,在此拟用生命科学最前沿的成果——干细胞的再生反应,以及以药测证方法,分 3 方面 8 项实验演绎肾藏精的科学内涵^[18]。

4.1 肾藏先天之精主要反映在干细胞 《内经》:“两神相搏,合而成形,常先身生,是为精”,指“精”在胚胎。3 个实验采用 EF、ICA 以药测证,对来自 3 个不同胚层的干细胞进行自我更新、定向分化的检测。实验 1:ICA、EF 促使肾上腺皮质干细胞(源自内胚层)增殖与迁移。实验 2:ICA、EF 促使神经干细胞(源自外胚层)增殖。实验 3:ICA、EF 促使骨髓间充质干细胞(源自中胚层)增殖与分化。鉴于胚胎干细胞可分化为 3 个不同胚层来源的所有细胞,多种中药只对一种成体干细胞有效,而 ICA、EF 可激活来自三个不同胚层的成体干细胞,推论“精”具有胚胎干细胞多能性的特点。实验 4:在体外胚胎干细胞培养中,

观察到 ICA 促使胚胎干细胞自我更新与增殖,而对照组的川芎嗪与柴胡皂苷则不能,从而直接显示了干细胞具有先天之精的属性。

4.2 肾精平时藏而不露是为了应急 《内经》:“肾者主蛰藏,封藏之本,精之处也”,干细胞平时多处于休眠沉默状态。大脑海马齿状回富集两种(沉默与活跃增殖型)并存的神干细胞。实验 5:三组老年大鼠(对照组、ICA 组、川芎嗪组)灌胃给药 3 个月,用阿糖胞苷杀灭增殖期干细胞,可测得唯有 ICA 显著增加干细胞沉默型向活跃型的转变。

4.3 肾藏精被激活的过程与结果 《内经》云:“精化气、气成形”,肾精被 ICA 唤醒,通过转录因子激活内源性干细胞提高再生反应。实验 6:精化气实验,以皮质酮大鼠为模型,采用干细胞基因芯片,结果唯有 ICA 组核心转录因子——[SRY (sex determining region Y)-box 2, Sox2]、Nanog 上调。实验 7:体外培养间充质干细胞,ICA 干预后 Sox2、Nanog 开始上调维持到 30 天,说明 ICA 能使该细胞株多能性发挥作用。实验 8:气成形实验,观察到 ICA 能促使胚胎干细胞向心肌细胞分化。

“肾藏精”采用 ICA 以药测证的实验,通过激活核心转录因子促使沉默型转变为活跃型干细胞向心肌细胞分化,演绎了肾藏精的科学内涵。现代医学对干细胞的应用主要放在将干细胞移植至病所,通过肾藏精理论研究对干细胞的应用则是另一途径,即用温肾药 ICA 通过动员与提高激素、细胞因子水平激活内源性干细胞^[18],发挥机体储藏的潜力,这是调节整体改善局部,最具有中医特色的治疗策略。

5 结语 肾的研究在中医基础理论研究中涉及的知识面广,难度亦大,由于密切关注现代科学前沿的进展,得以能在科研设计上以高起点而不断拓宽并引向深入,循此以往,中医基础理论研究会不断出现新的局面,还将对生命科学作出贡献。

参 考 文 献

- [1] 沈自尹. 同病异治和异病同治[J]. 科学通报, 1961, 12(10): 51.
- [2] 沈自尹. 对祖国医学肾本质的探讨[J]. 中华内科杂志, 1976, 1(2): 34-36.
- [3] 沈自尹, 张丽丽, 查良伦, 等. 肾虚病人的垂体肾上腺皮质系统的改变[J]. 上海中医药杂志, 1979, 14(2): 34-37.
- [4] 沈自尹, 王文健, 陈响中, 等. 肾虚证的下丘脑—垂体—甲状腺、性腺、肾上腺皮质轴功能的对比观察[J]. 医学研究通讯, 1983, 12(10): 21-25.

- [5] 王文健,沈自尹,张新民,等. 补肾法对老年男性下丘脑—垂体—性腺轴作用的临床和实验研究[J]. 中医杂志,1986,27(4): 32-36.
- [6] 蔡定芳,沈自尹. 乌头碱对大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素含量的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1996,16(9): 554-556.
- [7] 沈自尹. 肾阳虚证的定位研究[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(1): 50-52.
- [8] 蔡定芳,沈自尹,张玲娟,等. 右归饮对大鼠下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴抑制模型的影响[J]. 中国免疫学杂志,1994,10(7): 236-238.
- [9] 蔡定芳,沈自尹,张玲娟,等. 命门合剂对大鼠神经内分泌网络的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1995,15(3): 159-162.
- [10] 沈自尹,黄建华,陈伟华. 以药测证对肾虚和肾阳虚大鼠基因表达谱的比较研究[J]. 中国中西医结合杂志,2007,27(2): 135-137.
- [11] 张新民,沈自尹,王文健,等. 补肾中药对老年神经—内分泌和免疫系统作用机理的研究[J]. 中国中西医结合杂志,1994,14(11): 686-688.
- [12] 沈自尹,陈瑜,黄建华,等. EF 延缓 HPAT 轴衰老的基因表达谱研究[J]. 中国免疫学杂志,2004,20(1): 59-62.
- [13] 胡作为,沈自尹,黄建华. 淫羊藿总黄酮保护衰老细胞端粒长度缩短的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2004,24(12): 1094-1097.
- [14] 蔡外娇,张新民,黄建华,等. 淫羊藿总黄酮延缓秀丽隐杆线虫衰老的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2008,28(6): 522-525.
- [15] 沈自尹,袁春燕,黄建华,等. 淫羊藿总黄酮延长果蝇寿命及其分子机制[J]. 中国老年学杂志,2005,25(9): 1061-1063.
- [16] 沈自尹,张新民,黄建华,等. 关于延长“健康寿命”这一老龄社会新医学模式的探索[J]. 中国中西医结合杂志,2014,34(10): 1157-1159.
- [17] 沈自尹,黄建华,林伟,等. 从整体论到系统生物学进行肾虚和衰老的研究[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(6): 548-550.
- [18] 沈自尹,黄建华,吴斌,等. 淫羊藿激活内源性干细胞及其机制研究[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(3): 251-254.

(收稿:2015-05-18)

第十届全国中西医结合学会围手术期专题研讨会征文通知

中国中西医结合学会围手术期专业委员会定于2015年10月16—17日在上海市举办“第十届全国中西医结合围手术期医学专题研讨会”,以“围手术期中西医结合快速康复”为主题,通过学术探讨和经验交流,邀请我国相关领域院士、著名专家作专题报告,探讨围手术期新理论和新发展,推动围手术期中西医结合医学的发展。现征文如下。

征文内容 (1)围手术期中西医结合快速康复发展趋势与展望;(2)癌症的围手术期处理;(3)感染防治学;(4)营养支持学;(5)器官功能保护学;(6)医学心理学;(7)中西医结合围手术期的其他相关内容。

论文要求 (1)论文内容真实可靠,具备科学性、先进性、实用性;(2)全文3000字以内,需附400字左右中文摘要;(3)用E-mail传送论文电子版至610207494@qq.com(请注明“围手术期正文”字样);(4)请务必注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编和联系电话,是否同意参加大会交流;(5)论文截稿日期:2015年9月1日。