

# “脾虚及肾”研究思路与方法探索

侯丽颖<sup>1\*</sup> 季丰妹<sup>2</sup> 曾常春<sup>1</sup>

(1. 华南师范大学信息光电学院, 广东省广州市天河区石牌, 510631; 2. 广州中医药大学)

基金项目: 第四十五批中国博士后科学基金面上资助项目(20090450096); 广东省中医药局科研课题(2009215)

\* 通讯作者: theme921@yahoo.com.cn, 13798100509

**[摘要]** 中医脾肾相关学说是中医五脏相关学说的一个子系统,“脾虚及肾”是中医脾肾相关的动态病理变化之一,但在研究思路方面仍处于初始阶段。对体现“脾虚及肾”特点的单一动物模型做出了评价,并提出应用线粒体蛋白质组学研究“脾虚及肾”的思路和方法,以期阐明脾虚及肾的动态传变病理机制,丰富和发展脾肾相关学说。

**[关键词]** 脾虚及肾; 动物模型; 线粒体; 蛋白质组学

中医脾肾相关学说是中医脏腑学说的重要组成部分,是五脏相关学说的子系统,有其丰富的理论内涵和实质内容。著名中医学家邓铁涛教授自 20 世纪 60 年代起,就开始对脾肾相关理论进行深入的探讨,并运用此理论指导临床辨治,取得了显著成效<sup>[1]</sup>。

脾肾为先后天之本,在生理上相互资助,使得气血旺盛,元气充沛,诸病不染;在病理上相互影响,互为因果,导致一系列疾病。如《景岳全书》所说:“或先伤于气,气伤必及于精;或先伤于精,精伤必及于气。”“脾虚及肾”是临床上常见的证型。但如何探讨脾虚及肾的动态生理和病理特性? 特别在动物实验研究中,如何体现这种状态是值得深入研究的课题。

## 1 “脾虚及肾”动物模型研究的评价

随着临床病证诊断标准的规范化和实验动物模型的建立,脾虚、肾虚证的研究已经取得了重大的发展。而五脏相关中的脾肾相关仍处于初始阶段,在单一动物造模方面、研究思路方面需要有长足的研究和发展。在现代科学技术和方法更新的前提下,脾虚、肾虚证本质研究发展迅速,而脾肾相关方面的研究仍处于初始阶段。“脾虚及肾”是由脾病累及至肾,最后导致脾肾两虚证候的结果以及其病理传变过程总的概括,它包括两个含义:一是由脾病发展,二是脾肾俱虚的病理状态。在实验研究中,这就要求“脾虚及肾”动物模型要具备“运动性”和“整体性”。从单一动物模型来阐明“脾虚及肾”的传变整体特征,会更符合中医“脾虚及肾”的理论。脾肾相关研究重点要解决的是整体动物模型与病证相结合,有研究发现,选用苦寒药大黄来复制“脾虚”模型,大鼠在服用大黄 4—5d 后,开始出现脾虚症状,

当脾失健运,化生气血不足,肾亦不能正常地“受五脏六腑之精而藏之”,脾虚日久最后必然会引起肾的虚损,随着造模时间的延长,出现形寒畏冷和脱肛现象,此乃中气下陷,脾肾气虚的证象<sup>[2]</sup>,即“脾虚及肾”所导致的脾肾两虚证候。

研究表明,对“脾虚及肾”动物模型的评价主要体现在“脾虚及肾”所表现的动态病理变化及与单纯肾虚表现指标的不同两个方面:①灌服健脾补肾方的大鼠,其脾虚症状较脾虚模型组有所改善,并可使体重增加,脾脏/胸腺比值增大,肾脏比值减轻,表明健脾补肾方药对脾虚证大鼠有一定的保护作用,这是中医“脾肾相关”理论在实验研究中客观体现<sup>[3]</sup>。②健脾补肾方药能降低实验性脾虚证大鼠 cAMP 含量及 cAMP/cGMP 比值,提高 T<sup>3</sup>、T<sup>4</sup> 水平。生理水平的甲状腺素,正是肾主生长、主藏精、主骨生髓的物质基础,而脾虚模型动物出现以上这种甲状腺激素等指标的变化,都符合中医“脾虚及肾”这一理论<sup>[4]</sup>。③脾虚大鼠造模 10d 时血清 E<sub>2</sub>、T 含量均比正常对照组显著升高( $P < 0.05 \sim 0.01$ ),而 E<sub>2</sub>/T 比值差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),这与陈芝喜报道的结果相符<sup>[2]</sup>,但与单纯肾虚表现的 E<sub>2</sub> 含量升高, T 含量下降,使得 R/T 比值升高<sup>[5]</sup>的表现完全不同。脾虚组动物造模延长到 20d 时,血清 E<sub>2</sub> 含量比正常对照组显著升高( $P < 0.01$ ), T 含量则显著下降( $P < 0.01$ )。以上结果提示,从单一动物模型来阐明脾肾互相关系更符合中医“脾虚及肾”这一理论<sup>[2]</sup>。

虽然该证的动物模型还达不到与人的证候状态完全相同的水平,但只要有部分相似或部分说明问题也是可取的。因为在没有更好的研究方法出现之

前,利用证的动物模型仍是研究中医基础理论的较好方法。所以对证本质或机理的研究必须用到动物模型,否则对中医基础理论的实验研究是难以深入的<sup>[6]</sup>。

## 2 线粒体——“脾虚及肾”研究的切入点

线粒体是一种将物质代谢、能量代谢和遗传变异三大基本生命活动形式融于一体的半自主性细胞器,线粒体几乎存在于人体全身的组织细胞之中,是细胞对食物进行生物氧化产能的细胞器,有“ATP的生产基地”、“细胞的动力站”之称。这与中医脾为“气血生化之源”、“后天之本”有着密切的联系。

既往课题组研究脾虚病证线粒体形态结构和功能方面研究历时20余年,较深入地进行了中医脾与线粒体相关性研究<sup>[7]</sup>,总结起来,主要体现在以下三方面:①从生理上看,脾主运化不仅仅是指食物在消化道的消化吸收,更重要的是指食物在线粒体内的氧化磷酸化过程。将其与中医的脾主肌肉、主四肢,主统血,脾开窍于口,其华在唇的论点相联系,将有助于解释脾与五脏相关的学说。②从病理上认识,脾虚证通常会出现细胞线粒体数目减少,线粒体肿胀,基质变淡,嵴断裂,膜缺损等变化。并且线粒体的质与量的改变与脾胃气虚的症状及病情轻重密切相关。③从诊断、治疗上来认识,进行线粒体观察有助于脾胃气虚的诊断及对脾胃气虚程度作出判断;健脾方药可在有效改善线粒体结构与功能的同时使得脾气强健,运化正常。因此,把线粒体作为“脾”的重要组成部分,既能较确切地解释中医“脾”的机能,又能使“脾”的生理机能解释建立在客观实在的物质形态学基础上。

脾为后天之本,脾虚则生化无源,脏腑失养;肾也需依赖脾胃水谷精气的滋养,脾虚日久最后必然会引起肾的虚损。线粒体能量代谢障碍是脾虚证的生物学基础,脾虚及肾,以线粒体建立中医脾气虚和脾肾两虚证之间的关系,可很好地解释“脾虚及肾”动态病理变化机制。

## 3 线粒体蛋白质组学——研究“脾虚及肾”的新技术

### 3.1 蛋白质组学与中医证候的相关性

中医的证是一个综合的病理概念。中医以证来认识疾病,实际上就是通过综合归纳各种疾病表现,形成证候系统以辨析疾病机制的病机研究方法,它是从整体、动态角度把握疾病的本质。而实验研究中寻求证指标的特异性、确定性,本身与证的特点不

相容。所以在以后的研究中从多层次、多角度、多指标及结合整体、细胞分子水平探讨证的本质是十分必要的。

蛋白质组学,就是从整体角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,了解蛋白质间相互作用与联系,揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律的一个研究领域<sup>[8]</sup>。它的研究方法学内容与中医学的整体观有许多相似之处,其思路与概念和中医认识疾病的整体观有着趋同性。中医外在病证是对疾病发展过程中某一阶段的病机概括,是机体内因和环境外因综合作用的机体反应状态,并随着病程的发展而相应发生变化。相对地蛋白质组是从蛋白质水平反映了细胞或组织特异性表型和表达模式,与临床上出现的症状和体征有必然内在联系。中医病证的多样性与蛋白质组表达的差异性都是机体即时性功能状态的反映。中医病证具有复杂的多样性和开放式网络的特点,它的存在必然有内在的改变,而蛋白质的多样性和分子间的复杂网络关系亦呈现了细胞的各种功能活性,它的改变必然导致外在的表现。在这种特定的关系上,使我们的研究成为可能。

### 3.2 线粒体蛋白质组学在与脾肾相关疾病研究中的应用

研究发现,许多与脾、肾有关的疾病往往会引起线粒体蛋白质结构与功能的变化,如退行性疾病<sup>[9]</sup>、衰老<sup>[10]</sup>和癌症<sup>[11-12]</sup>等。

肌萎缩性(脊髓)侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一类致死性的神经退行性疾病,Fukada等<sup>[13]</sup>进行小鼠胚胎脊髓成神经细胞瘤细胞系 NSC34 细胞 G<sup>93A</sup>-SOD1 突变和野生型线粒体蛋白质组比较研究,结果发现,有45个差异表达蛋白点,经质谱鉴定它们与线粒体膜转运、线粒体凋亡、呼吸链、分子伴侣等功能有关。其中VDAC2翻译后修饰蛋白的改变影响了线粒体膜渗透和线粒体凋亡通路的激活。认为G<sup>93A</sup>-SOD1突变引起的线粒体蛋白改变是导致线粒体功能异常和细胞死亡的主要原因。老年性痴呆(alzheimer's disease, AD)是一种常见的神经退行性疾病,对AD的研究主要集中在对淀粉 $\beta$ 肽的研究上,Lovell等<sup>[14]</sup>对原代培养的神经细胞给予淀粉 $\beta$ 肽处理,发现线粒体蛋白质组改变,其中10个蛋白的表达与对照组相比差异显著,包括在能量代谢中具有重要作用的酶,这种表达的增加很可能是对氧化压力引起的线粒体膜电势

减少的一种补偿。Dundas 等<sup>[11]</sup>利用线粒体蛋白质组学的研究则发现,线粒体蛋白 Hsp70 在结肠癌中高表达,而且与肿瘤的预后相关。Nishigaki 等<sup>[12]</sup>的研究也发现,线粒体蛋白 CLPP、COX5A 和 ECH1 在胃癌组织中表达发生了改变。

线粒体蛋白质组是蛋白质组学研究的新领域,可全景式地研究线粒体在各种特定情况下的蛋白质表达谱。对线粒体蛋白质结构、定位、表达规律、生物功能和蛋白质与蛋白质相互作用的研究,能为阐明生命现象的本质提供直接的基础,并能从整体角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态。可见对于“脾虚及肾”研究,线粒体蛋白质组学是一种适用的技术手段,通过探索藏象功能、证候、蛋白质组学之间的关系,建立一个“证候—蛋白质表达谱”,可揭示中医证候的科学内涵,为其客观诊断提供依据和方法。

#### 4 思考与展望

“脾虚及肾”是脾肾相关学说的一个重要内容,从动物实验探究“脾虚及肾”具有重要的研究意义,但遗憾的是研究鲜有成果。究其原因很可能是研究的思路和方法有问题,以及研究手段受到限制,因此,必须重新审视既往的研究内容,调整思路,利用现代最新的技术手段,探讨新的研究途径。

蛋白质组学的概念与中医认识疾病的整体性有一定的趋同性。而线粒体形态结构和功能改变是中医脾虚证发生的重要机制。对于“脾虚及肾”的研究,若以线粒体为切入点,复制脾气虚、脾肾两虚证(脾虚及肾机制建立的)大鼠模型,通过对脾虚及肾发生过程中证候转变前后体内微观实在的线粒体蛋白质变化,探究该病证产生的物质基础支配机制,可能会从蛋白质水平阐明中医“脾虚及肾”的动态病理变化机制,丰富和发展脾肾相关学说。

#### 参考文献

- [1]刘成丽,邱仕君.邓铁涛教授对脾肾相关的理论阐释[M].北京:华夏出版社,2004:80—85.
- [2]陈芝喜,徐志伟,刘小斌,等.强肌健力饮对脾虚大鼠性激素水平的影响[J].放射免疫学杂志,2008,21(1):37—39.
- [3]陈芝喜,刘小斌,周名璐,等.健脾补肾药对脾虚大鼠细胞因子水平的影响[J].放射免疫学杂志,2003,16(4):217—221.
- [4]陈芝喜,刘小斌,周名璐,等.健脾补肾药对脾虚大鼠环核苷酸及甲状腺激素水平的影响[J].放射免疫学杂志,2003,16(5):278—280.

- [5]林炳辉,方素钦,叶盈,等.中老年人脾肾虚证实质的探讨[J].中国中西医结合杂志,2002,22(1):33.
- [6]张杰,李湔.关于中医证候物质基础研究路径的思考[J].中国中医基础医学杂志,2007,13(5):394—396.
- [7]刘友章.从亚细胞水平探讨中医脾的本质(附 51 例胃黏膜超微结构之研究)[D].广州:广州中医学院,1987.
- [8]Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, et al. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(9): 683—695.
- [9]Taylor RW, Tumbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(5): 389—402.
- [10]Chen XJ, Wang X, Kaufman BA, et al. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance[J]. Science, 2005, 307(5710): 714—717.
- [11]Dundas SR, Lawrie LC, Rooney PH, et al. Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival[J]. J Pathol, 2005, 205(1): 74—81.
- [12]Nishigaki R, Osaki M, Hiratsuka M, et al. Proteomic identification of differentially expressed genes in human gastric carcinomas[J]. Proteomics, 2005, 5(12): 3205—3213.
- [13]Fukada K, Zhang F, Vien A, et al. Mitochondrial proteomic analysis of a cell line model of familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(12): 1211—1223.
- [14]Lovell MA, Xiong S, Markesbery WR, et al. Quantitative proteomic analysis of mitochondria from primary neuron cultures treated with amyloid beta peptide[J]. Neurochem Res, 2005, 30(1): 113—122.

(收稿日期:2010—06—09;修回日期:2011—05—30)

[编辑:黄健]

## 《中华名医经验金鉴》征稿通知

为贯彻“传承与创新并重”中医战略方式,本院将陆续出版《中华名医经验金鉴》系列丛书。征稿如下:运用中医药(含膏、丹、散、丸、民间偏方、验方、祖传秘方)、中西医结合、针灸、推拿、按摩、刮痧、熏蒸、药浴、穴位埋线、小针刀、脊柱疗法等疗法治疗常见病、罕见病、多发病、疑难病的新经验、新技术、新思路、新成果。稿件体例不限,欢迎投稿。投稿者可获赠《中华名医经验金鉴》(第1卷,定价98元)1册,赠完为止。将组织部分稿件作者参加“大陆名医学术调研团”赴台湾、香港地区考察,有意参加者请在来稿中注明。本院战略合作范围:挂靠本院(设立分支机构、科研基地);协助申请专利、职称、注册、出版个人专著等。

截稿日期:2011年12月30日。来稿请寄:北京市丰台区丰管路48号,北京展旭医学研究院张文智收,邮编:100071。电子文稿:csb@chaxu.com.cn,电话:(010)5224958、18611263638,http://www.chaxu.com.cn。凡投稿超过15天未接到稿件处理通知者,请与本院联系。因编纂工作的需要,常年诚聘主编、副主编、编委。