

加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠肾/骨组织损伤的影响[△]

郭华慧^{1*}, 梁群卿², 李贺生³, 杨义龙³, 黄家晟³, 陈鹏辉³, 兰聪颖³, 黄仁发^{3#}[1.广西中医药大学研究生院, 南宁 530200; 2.广西中医药大学附属瑞康医院健康体检中心, 南宁 530011; 3.广州中医药大学深圳医院(福田)肾病科, 广东深圳 518034]

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)06-0690-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.06.08

摘要 目的:研究加味六味地黄汤对慢性肾脏病矿物质和骨异常(CKD-MBD)模型大鼠肾/骨组织损伤的影响。方法:将雄性SD大鼠随机分为正常组($n=10$)、单纯高磷组($n=30$)、模型组($n=30$)、骨化三醇组(阳性对照, $0.09 \mu\text{g}/\text{kg}$, $n=30$)和加味六味地黄汤组(以生药总量计 $10 \text{g}/\text{kg}$, $n=30$)。采用高磷联合腺嘌呤饲料饲养6周的方法建立CKD-MBD模型。造模后,正常组和模型组大鼠继续以普通饲料/高磷饲料饲养并灌胃蒸馏水;各药物组大鼠改为普通饲料饲养并灌胃相应药液(溶剂均为水);按 $0.1 \text{mL}/\text{kg}$ 每天按时灌胃1次,连续6周。正常组大鼠末次给药后取血、处死,其余各组大鼠分别于给药2、4、6周时随机取10只取血、处死。检测各组大鼠血清中尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)、钙、磷、全段甲状旁腺激素(iPTH)、成纤维细胞生长因子23(FGF-23)、核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)和骨钙素含量,测定股骨头的骨密度,观察肾组织和骨组织的形态学变化并计算肾小管损伤百分比和肾间质纤维化分值。结果:与正常组比较,单纯高磷组大鼠各时间点上上述指标均无明显变化($P>0.05$),肾/骨组织亦无异常改变。与单纯高磷组相同时间点比较,模型组大鼠各时间点血清中BUN、Scr、磷、iPTH、FGF-23、RANKL、骨钙素含量和肾小管损伤百分比、肾间质纤维化分值均显著升高,血清中钙含量和股骨头的骨密度均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肾组织呈弥散性纤维化,骨小梁宽度增加、成骨细胞减少。与模型组相同时间点比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组大鼠各时间点血清中BUN(加味六味地黄汤组给药2周除外)、Scr、血磷、iPTH、FGF-23、RANKL、骨钙素含量和肾小管损伤百分比、肾间质纤维化分值均显著降低,血清中钙含量和骨密度(给药2周除外)均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肾/骨组织病理变化明显改善;而加味六味地黄汤组和骨化三醇组上述各指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:加味六味地黄汤可改善CKD-MBD模型大鼠肾/骨组织损伤,提高其骨密度并调节钙磷代谢紊乱。

关键词 加味六味地黄汤;慢性肾病矿物质和骨代谢异常;肾组织;骨组织;损伤;大鼠

- 学杂志, 2019, 31(11):1246-1249.
- [15] 李娜, 赵玉民, 陈正元, 等. 抗生素诱导肠道菌群失调对肠黏膜屏障和肝脏功能的动态影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(3):1278-1287.
- [16] HUI H, WU Y, ZHENG T, et al. Bacterial characteristics in intestinal contents of antibiotic-associated diarrhea mice treated with Qiweibaizhu powder[J]. Med Sci Monit, 2020, 13(26):e921771.
- [17] 高璐, 于锋, 王坚. 益生菌制剂在慢性肝脏疾病中的应用进展[J]. 中国药房, 2016, 27(3):426-429.
- [18] SHARIF S, MEADER N, ODDIE SJ, et al. Probiotics to prevent necrotising enterocolitis in very preterm or very low birth weight infants[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2020, 15(10):CD005496.
- [19] 姜琳, 苏艳琦, 郎会利, 等. 益生菌预防小儿抗生素相关性腹泻的疗效探讨[J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(6):153-154.
- [20] 伍静, 苏春萍, 王显超, 等. 乳酸菌和双歧杆菌制剂对小鼠肠道菌群失调模型的调节作用[J]. 科学技术与工程, 2013, 13(16):4497-4500.
- [21] 贺美玲, 王纯洁, 贾知锋, 等. 乳酸链球菌素对腹泻小鼠盲肠菌群结构及脂代谢的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(7):2782-2790.
- [22] 赖本聪. 复方嗜酸乳杆菌片联合蒙脱石散治疗小儿腹泻临床疗效观察[J]. 中国处方药, 2020, 18(1):73-74.
- [23] HRÓBJARTSSON A. What are the main methodological problems in the estimation of placebo effects[J]. J Clin Epidemiol, 2002, 55(5):430-435.
- [24] 张玲玲, 邓平. 左卡尼汀的肠道菌群代谢和心血管疾病风险的相关性研究进展[J]. 中国临床研究, 2015, 28(5):670-672.
- [25] VAN HERREWEGHEN F, DE PAEPE K, MARZORATI M, et al. Mucin as a functional niche is a more important driver of in vitro gut microbiota composition and functionality than supplementation of Akkermansia muciniphila[J]. Appl Environ Microb, 2020, 84(4):e02467-20.
- [26] HANNINEN A, TOIVONEN R, POYSTI S, et al. Akkermansia muciniphila induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice[J]. GUT, 2018, 67(8):1445-1453.
- (收稿日期:2020-09-30 修回日期:2020-12-31)
(编辑:林静)

Effects of Modified Liuwei Dihuang Decoction on Kidney/Bone Injury of CKD-MBD Model Rats

GUO Huahui¹, LIANG Qunqing², LI Hesheng³, YANG Yilong³, HUANG Jiasheng³, CHEN Penghui³, LAN Congying³, HUANG Renfa³[1. Graduate School, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China; 2. Health Examination Center, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 3. Dept. of Nephrology, Shenzhen Hospital (Futian), Guangzhou University of TCM, Guangdong Shenzhen 518034, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of Modified liuwei dihuang decoction on kidney/bone injury of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) model rats. **METHODS:** The male SD rats were randomly divided into normal group ($n=10$), high phosphorus group ($n=30$), model group ($n=30$), calcitriol group (positive control, $0.09 \mu\text{g}/\text{kg}$, $n=30$), Modified liuwei dihuang decoction group ($10 \text{ g}/\text{kg}$ by crude drug, $n=30$). CKD-MBD model was established by high phosphorus and adenine diet for 6 weeks. After modeling, normal group and model group were given normal diet/high phosphorus diet and intragastric administration of water. Administration groups were fed with normal diet and given corresponding solution intragastrically (water as solvent), $0.1 \text{ mL}/\text{kg}$, once a day, for consecutive 6 weeks. Blood sample of rats in the normal group were collected, and they were sacrificed after the last administration. Blood sample of 10 rats in each other group were collected, and they were sacrificed at 2, 4 and 6 weeks after administration. The contents of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), calcium, phosphorus, iPTH, FGF-23, RANKL and osteocalcin in serum were detected in each group. The bone mineral density (BMD) of femoral was measured, the morphological changes of renal tissue and bone tissue were observed, and the percentage of renal tubular injury and the score of renal interstitial fibrosis were calculated. **RESULTS:** Compared with normal group, above indexes in high phosphorus group had no significant change at different time points ($P>0.05$). There was no abnormal change in renal/bone tissue. Compared with high phosphorus group at the same time point, the contents of BUN, Scr, phosphorus, iPTH, FGF-23, RANKL and osteocalcin in serum, the percentage of renal tubular injury and the score of renal interstitial fibrosis in the model group were significantly increased, while the contents of calcium in serum and the BMD of femoral were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The renal tissue showed diffuse fibrosis. The width of trabecular bone was increased and the number of osteoblasts was decreased. Compared with the model group at the same time point, the contents of BUN (except for Modified liuwei dihuang decoction group after 2 weeks of administration), Scr, serum phosphorus, iPTH, FGF-23, RANKL and osteocalcin, the percentage of renal tubular injury and the score of renal interstitial fibrosis in Modified liuwei dihuang decoction group and calcitriol group were decreased significantly at each time point; serum calcium content and BMD (except for 2 weeks of administration) were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the pathological changes of renal/bone tissue were significantly improved; there was no statistical significance in above indexes between Modified liuwei dihuang decoction group and calcitriol group ($P>0.05$). **CONCLUSIONS:** Modified liuwei dihuang decoction can improve kidney/bone injury of CKD-MBD model rats, and improve BMD and regulate disorder of calcium and phosphorus metabolism.

KEYWORDS Modified liuwei dihuang decoction; Chronic kidney disease-mineral and bone disorder; Renal tissue; Bone tissue; Injury; Rats

慢性肾脏病矿物质和骨异常(Chronic kidney disease-mineral and bone disorder, CKD-MBD),旧称肾性骨病,是慢性肾脏病(Chronic kidney disease, CKD)患者在疾病进展过程中常见的并发症,主要的临床表现为低钙高磷的钙磷代谢紊乱、继发性甲状旁腺功能亢进、骨代谢异常和转移性钙化等,此症不仅会引起骨质疏松、骨痛、骨折和骨骼畸形等,还会导致血管及其他软组织发生转移性钙化并诱发心血管事件,严重影响CKD患者的生存质量及长期预后^[1]。众所周知,骨转换异常是CKD-MBD的重要病理特征^[2],而骨转换主要涉及骨吸收和骨形成两方面。其中,破骨细胞负责吸收老化的旧骨,成骨细胞则生成等量新骨,破骨细胞的标志物有核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL),成骨细胞的标志物有骨钙素;若骨吸收和骨形成不平衡则可导致患者骨

异常,从而引发骨质疏松等疾病^[3]。近期研究发现,骨细胞可通过分泌成纤维生长因子23(FGF-23)、骨硬化蛋白、Wnt经典信号通路抑制因子Dickkopf 1(Dkk1)等来影响成骨细胞和破骨细胞的功能,在骨代谢和骨发育中发挥重要作用,其中FGF-23水平在CKD早期即可见明显升高,被认为是CKD早期诊断的标志物^[4]。

六味地黄汤出自于《景岳全书》卷五十三,即《小儿药证直诀》,具有滋阴补肾之功效,主治肝肾阴虚、真阴亏损、精血枯竭等^[5]。加味六味地黄汤是在六味地黄汤的基础上,加入大黄、桂枝、丹参、黄芪、淫羊藿等药制得;取大黄祛瘀攻逐解毒,桂枝温阳利水,丹参活血祛瘀,黄芪健脾益气利水,淫羊藿补肾阳、强筋骨等功效,全方具有补肾利水、祛瘀排毒及强筋骨之功效。本课题组前期研究显示,加味六味地黄汤可通过抑制肾组织中

FGF-23的表达而发挥肾保护作用^[6];此外,新加药味中的淫羊藿可促进成骨细胞增殖,可通过加快骨骼矿物质生成和骨代谢、减少钙丢失、增加骨形成来发挥抗骨质疏松的作用^[7-9]。基于此,本研究拟考察加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠肾/骨组织损伤的影响,旨在为进一步促进加味六味地黄汤的临床应用奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括SpectraMax Plus 384型全波长酶标仪(美国Molecular Devices公司)、TDZ-4WS型低速自动平衡离心机(湖南湘仪国际贸易有限公司)、X-ray System型骨密度成像仪(美国Carestream Image Station System公司)、C501型全自动生化分析仪(罗氏诊断产品有限公司)、BX43型光学显微镜(日本Olympus公司)等。

1.2 主要药品与试剂

加味六味地黄汤(规格1 g/mL,以生药总量计)购自广西中医药大学附属瑞康医院中药房,骨化三醇软胶囊(阳性对照,批号1902111,规格0.25 μg/粒)购自正大制药(青岛)有限公司,Masson染液(批号20190421JH)、Goldner's染液(批号20181220)均购自北京索莱宝生物科技有限公司,尿素氮(BUN)测试盒(批号20190424)、钙测试盒(批号20190405)、磷测试盒(批号20190305)均购自南京建成生物科技有限公司,血肌酐(Scr)检测试剂盒(批号Mar2019)、全段甲状旁腺激素(iPTH)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号Feb2019)均购自上海莱生物科技有限公司,FGF-23 ELISA试剂盒(批号190201)、RANKL ELISA试剂盒(批号181213)和骨钙素ELISA试剂盒(批号180405)均购自武汉优尔生科技股份有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯化水。

1.3 动物与饲料

健康SPF级SD大鼠130只,雄性,体质量(250±20)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(湘)2019-0014。所有大鼠均由广西中医药大学第一临床医学院动物实验部饲养,饲养条件为室温18~25℃、相对湿度50%~60%、人工12 h昼/夜循环照明。每日定时更换垫料、清洗笼舍,所有大鼠自由摄食、饮水。高磷饲料(磷含量1.03%)、腺嘌呤饲料(腺嘌呤含量0.75%)均购自北京科澳协力饲料有限公司。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

所有SD大鼠适应性饲养1周后,按体质量随机分为正常组($n=10$)、单纯高磷组($n=30$)、模型组($n=30$)、骨化三醇组(0.09 μg/kg, $n=30$)和加味六味地黄汤组(以生药总量计10 g/kg, $n=30$)。采用高磷联合腺嘌呤

饲料饲养6周的方法建立CKD-MBD模型。正常组大鼠以普通饲料饲养,单纯高磷组大鼠以高磷饲料饲养,模型组和各药物组大鼠以腺嘌呤饲料和高磷饲料饲养(第1~4周喂养腺嘌呤饲料,第5~6周喂养高磷饲料),共6周。造模后,正常组和模型组大鼠继续以普通饲料/高磷饲料饲养并灌胃水;各药物组大鼠改以普通饲料饲养并灌胃相应药液(溶剂均为水);按0.1 mL/kg每天灌胃1次,连续6周。正常组大鼠末次给药后取血、处死,其余各组分别于给药2、4、6周时随机取10只大鼠取血、处死。

2.2 大鼠血清中BUN、Scr、钙、磷含量检测

取各时间点各组大鼠无抗凝血液样本适量,静置1 h后以3 000 r/min离心15 min,取上清液,按照测试盒说明书进行操作,使用全自动生化仪检测大鼠血清中BUN、Scr、钙和磷含量。

2.3 大鼠血清中iPTH、FGF-23、RANKL、骨钙素含量检测

采用ELISA法进行检测。取各时间点各组大鼠无抗凝血液样本适量,静置1 h后以3 000 r/min离心15 min,取上清液,按照ELISA试剂盒说明书进行操作,使用酶标仪于450 nm波长处测定光密度值并计算大鼠血清中iPTH、FGF-23、RANKL、骨钙素含量。

2.4 大鼠骨密度检测

取各时间点各组大鼠左侧股骨置于骨密度成像仪托盘上,进行扫描后成像并应用Carestream V2.1软件分析其股骨头的骨密度。

2.5 大鼠肾组织和骨组织形态学观察

取各时间点各组大鼠左侧1/2肾脏和股骨,置于4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中,待骨组织脱钙后,将肾组织和股骨组织依次脱水、透明、石蜡包埋、切片(厚度4 μm)。肾脏行Masson染色,股骨行Goldner's三色染色,使用光学显微镜观察大鼠肾组织和股骨组织的病理变化。按文献[9]方法进行评估:首先计算30个高倍视野(×400)肾皮质中发生损伤(肾小管扩张、萎缩、管型、坏死或小管炎)的肾小管数和总肾小管数,以损伤的肾小管数占总肾小管数的百分比表示肾小管损伤百分比;对肾皮质间质纤维化程度进行半定量评估,分值为0~4分,其中0分为正常、1分为肾间质纤维化面积不超过视野的25%、2分为肾间质纤维化面积25%~49%、3分为肾间质纤维化面积50%~75%、4分为肾间质纤维化面积超过75%,取30个肾皮质间质视野(×40)内评分的平均值表示肾间质纤维化分值。

2.6 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。数据以均数±标准差或均数表示,多组间比较采用单因素方差

分析;组间两两比较采用 q 检验,组内均数比较采用配对 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠血清中BUN、Scr、钙、磷含量的影响

与正常组比较,单纯高磷组大鼠各时间点血清中BUN、Scr、钙、磷含量均无明显变化($P>0.05$)。与单纯高磷组相同时间点比较,模型组大鼠各时间点血清中BUN、Scr、磷含量均显著升高,钙含量显著降低($P<0.01$)。与模型组相同时间点比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组大鼠各时间点血清中BUN(加味六味地黄汤组给药2周除外)、Scr、磷含量均显著降低,钙含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点上上述指标含量比较差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表1。

表1 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠血清中BUN、Scr、钙、磷含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 1 Effects of Modified liuweidihuang decoction on the serum contents of BUN, Scr, calcium and phosphorus in CKD-MBD model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	时间点	BUN, mmol/L	Scr, μ mol/L	钙, mmol/L	磷, mmol/L
正常组	给药6周	5.36±1.35	15.47±1.39	2.83±0.18	2.29±0.16
单纯高磷组	给药2周	5.33±0.57	14.18±1.22	2.85±0.06	2.30±0.31
	给药4周	5.38±0.34	14.23±0.38	2.77±0.18	2.28±0.18
	给药6周	5.39±0.29	14.26±0.57	2.79±0.17	2.30±0.18
模型组	给药2周	16.88±2.31**	24.16±1.39**	1.89±0.06**	3.54±0.26**
	给药4周	17.44±3.79**	25.45±1.49**	1.83±0.12**	3.74±0.22**
	给药6周	18.73±4.32**	29.98±1.05**	1.69±0.13**	3.91±0.15**
加味六味地黄汤组	给药2周	14.70±1.18	21.48±1.56 [△]	2.12±0.07 [△]	2.98±0.12 [△]
	给药4周	13.43±1.99 [△]	20.57±1.56 [△]	2.23±0.24 [△]	2.91±0.08 [△]
	给药6周	12.06±1.86 [△]	19.33±1.05 [△]	2.49±0.18 [△]	2.80±0.18 [△]
骨化三醇组	给药2周	13.62±2.23 [△]	22.41±0.35 [△]	2.19±0.23 [△]	2.92±0.04 [△]
	给药4周	12.41±2.43 [△]	20.97±1.12 [△]	2.42±0.35 [△]	2.86±0.10 [△]
	给药6周	11.48±1.87 [△]	18.05±1.73 [△]	2.63±0.31 [△]	2.72±0.22 [△]

注:与单纯高磷组相同时间点比较,** $P<0.01$;与模型组相同时间点比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

Note: vs. high phosphorus group at the same time point, ** $P<0.01$; vs. model group at the same time point, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$

3.2 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠血清中iPTH、FGF-23、RANKL、骨钙素含量的影响

与正常组比较,单纯高磷组大鼠各时间点血清中iPTH、FGF-23、RANKL、骨钙素含量均无明显变化($P>0.05$)。与单纯高磷组相同时间点比较,模型组大鼠各时间点血清中iPTH、FGF-23、RANKL、骨钙素含量均显著升高($P<0.01$)。与模型组相同时间点比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组大鼠各时间点血清中iPTH、FGF-23、RANKL、骨钙素含量均显著降低($P<0.01$);而加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点上上述指标含量比较差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表2。

表2 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠血清中iPTH、FGF-23、RANKL、骨钙素含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

Tab 2 Effects of Modified liuweidihuang decoction on the serum contents of iPTH, FGF-23, RANKL and osteocalcin in CKD-MBD model rats ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	时间点	iPTH	FGF-23	RANKL	骨钙素
正常组	给药6周	39.47±0.87	122.92±25.85	16.99±5.11	303.51±61.17
单纯高磷组	给药2周	40.33±1.62	125.06±22.23	18.65±3.14	300.79±46.30
	给药4周	40.99±1.10	127.36±17.66	18.82±3.87	326.86±35.52
	给药6周	41.57±1.28	132.42±17.35	18.31±5.28	315.69±24.19
模型组	给药2周	80.19±0.96**	222.97±31.10**	88.13±7.34**	729.61±84.81**
	给药4周	84.26±2.22**	242.55±25.54**	100.96±6.94**	821.51±91.56**
	给药6周	97.89±8.94**	263.25±23.71**	114.89±7.68**	944.23±47.25**
加味六味地黄汤组	给药2周	77.26±1.29 [△]	202.74±23.91 [△]	66.46±7.58 [△]	631.05±41.71 [△]
	给药4周	71.81±1.91 [△]	192.98±25.88 [△]	53.80±4.27 [△]	570.90±70.42 [△]
	给药6周	59.82±3.22 [△]	182.89±25.26 [△]	42.27±4.47 [△]	501.06±62.08 [△]
骨化三醇组	给药2周	77.43±2.92 [△]	196.39±25.42 [△]	51.04±4.05 [△]	594.74±39.99 [△]
	给药4周	72.25±2.23 [△]	184.89±24.87 [△]	39.44±4.64 [△]	516.32±79.14 [△]
	给药6周	63.71±2.90 [△]	174.55±25.99 [△]	31.56±3.04 [△]	461.41±50.08 [△]

注:与单纯高磷组相同时间点比较,** $P<0.01$;与模型组相同时间点比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

Note: vs. high phosphorus group at the same time point, ** $P<0.01$; vs. model group at the same time point, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$

3.3 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠骨密度的影响

正常组大鼠股骨头的骨密度为(6.053 ± 6.327) g/cm^3 。与正常组比较,单纯高磷组大鼠各时间点股骨头的骨密度均无明显变化($P>0.05$)。与单纯高磷组相同时间点比较,模型组大鼠各时间点股骨头的骨密度均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组相同时间点比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组大鼠给药4、6周时股骨头的骨密度均显著升高($P<0.01$);而加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点股骨头的骨密度比较差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表3。

表3 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠骨密度的影响($\bar{x}\pm s, n=10, \text{g/cm}^3$)

Tab 3 Effects of Modified liuweidihuang decoction on BMD of CKD-MBD model rats ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{g/cm}^3$)

组别	给药2周	给药4周	给药6周
单纯高磷组	5.446±0.584	5.350±1.425	5.598±1.073
模型组	3.576±0.273*	2.808±0.049*	1.824±0.375**
加味六味地黄汤组	3.370±0.842	4.235±0.351 [△]	5.117±0.793 [△]
骨化三醇组	3.109±1.003	4.127±0.655 [△]	5.212±0.411 [△]

注:与单纯高磷组相同时间点比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相同时间点比较,[△] $P<0.01$

Note: vs. high phosphorus group at the same time point, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group at the same time point, [△] $P<0.01$

3.4 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠肾组织形态学的影响

与正常组比较,单纯高磷组大鼠各时间点肾小管及肾间质形态学均无明显改变。模型组大鼠各时间点可见肾组织呈弥散性纤维化,细胞间隙可见胶原纤维填充,部分肾小球被纤维结缔组织取代(纤维结缔组织经Masson染色后表现为蓝色)。与模型组相同时间点比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组大鼠各时间点肾组织病理变化明显改善,而加味六味地黄汤组与骨化三醇组各时间点肾组织形态学差异不大,详见图1A、图2。

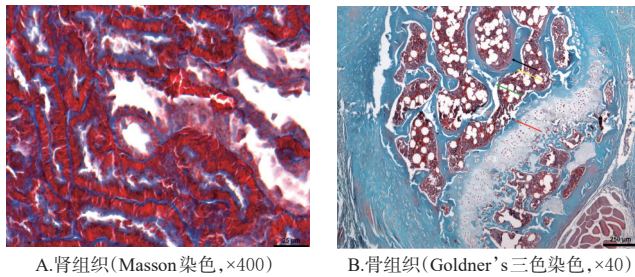


图1 正常组大鼠肾/骨组织病理显微图

Fig 1 Pathological micrographs of renal/bone tissue of rats in normal group

与正常组比较,单纯高磷组大鼠各时间点肾小管损伤百分比和肾间质纤维化分值均无明显变化($P > 0.05$)。与单纯高磷组相同时间点比较,模型组大鼠各时间点肾小管损伤百分比和肾间质纤维化分值均显著升高($P < 0.01$)。与模型组相同时间点比较,加味六味地黄汤组与骨化三醇组大鼠各时间点肾小管损伤百分比和肾间质纤维化分值均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而加味六味地黄汤组与骨化三醇组各时间点上上述指标

比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表4。

3.5 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠骨组织形态学变化的影响

与正常组比较,单纯高磷组大鼠各时间点的骨小梁、骨细胞和成骨细胞等均无明显变化。与单纯高磷组相同时间点比较,模型组大鼠各时间点的骨小梁宽度增加,平均类骨质面积增加,成骨细胞减少。与模型组相同时间点比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组大鼠各时间点的骨小梁宽度和平均类骨质面积均有所减少,成骨细胞数量增多;而加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点无明显差异,详见图1B、图3(图中,黑色箭头表示类骨质,黄色箭头表示骨小梁,红色箭头表示破骨细胞,绿色箭头表示成骨细胞)。

4 讨论

目前有关FGF-23在CKD-MBD的作用是学者研究的热点之一,普遍认为FGF-23是钙磷代谢的主要调节因子之一,可通过抑制肾近曲小管钠-磷协同转运,减少磷的重吸收,使磷酸盐排出增多,进而降低血磷^[10-11]。FGF-23在高磷血症和1,25-二羟基维生素D₃[1,25-(OH)₂D₃]水平升高的刺激下,由骨细胞分泌合成,且随着CKD的进展,肾小球滤过率下降,FGF-23水平随之升高^[12]。因此认为,FGF-23不仅是CKD-MBD诊断的早期诊断标志物,而且也是CKD-MBD进展的关键因素。

RANKL是一种骨代谢调节因子,与核因子κB受体激活剂(RANK)、骨保护素(OPG)结合,在调节成骨细胞和破骨细胞的分化方面发挥重要作用^[13]。研究显示,RANK/RANKL/OPG信号转导对成骨细胞和破骨细胞生理功能具有重要调控作用,与骨重建和骨密度密切相关

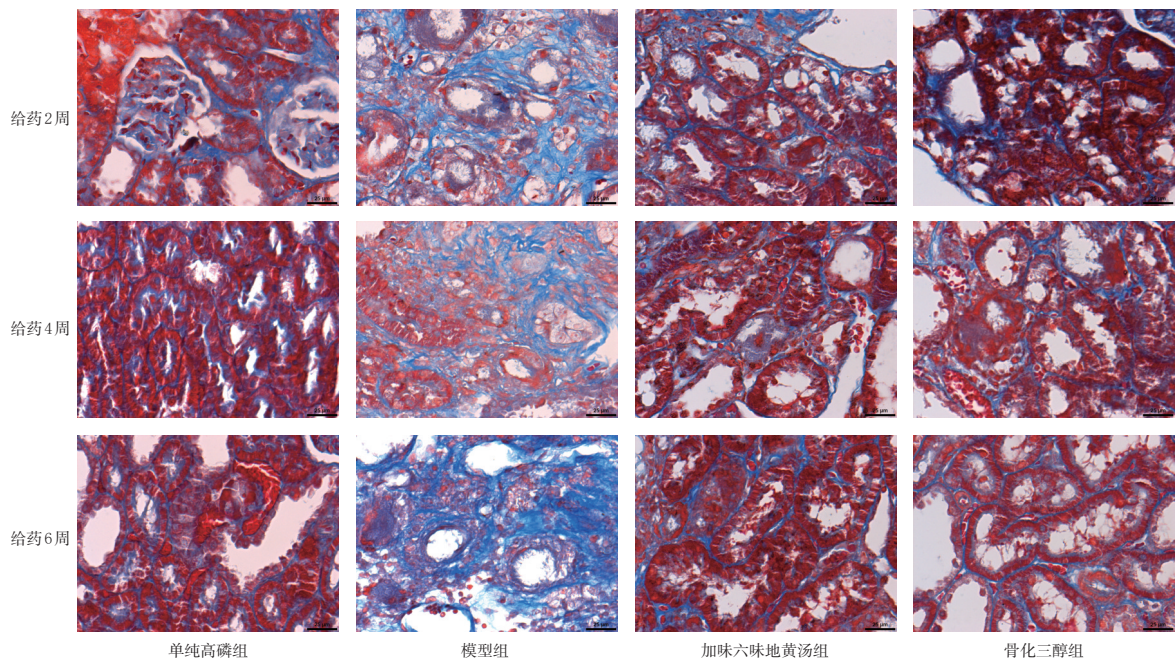


图2 各组大鼠各时间点肾组织病理显微图(Masson染色,×400)

Fig 2 Pathological micrographs of renal tissue of rats in each group at each time point (Masson staining, ×400)

表4 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠肾组织形态学相关参数的影响($n=10$)

Tab 4 Effects of Modified liuweidihuang decoction on the related indexes of morphology of renal tissue in CKD-MBD model rats($n=10$)

组别	时间点	肾小管损伤百分比, %	肾间质纤维化分值, 分
正常组	给药6周	4.48	0.10
单纯高磷组	给药2周	4.22	0.17
	给药4周	4.54	0.23
	给药6周	4.57	0.17
模型组	给药2周	57.07**	1.77**
	给药4周	61.70**	2.03**
	给药6周	86.07**	2.83**
加味六味地黄汤组	给药2周	33.91 [#]	1.40 [#]
	给药4周	32.99 [#]	0.87 [#]
	给药6周	22.79 [#]	0.40 [#]
骨化三醇组	给药2周	29.22 [#]	1.47 [#]
	给药4周	23.90 [#]	1.00 [#]
	给药6周	16.16 [#]	0.50 [#]

注:与单纯高磷组相同时间点比较, ** $P<0.01$;与模型组相同时间点比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

Note: vs. high phosphorus group at the same time point, ** $P<0.01$; vs. model group at the same time point, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

关,该通路的任何一个环节异常都有可能导导致骨代谢紊乱^[14]。骨钙素是骨骼衍生的多功能激素,由成骨细胞合成并分泌到骨细胞外基质中,可通过调节成骨细胞和破骨细胞的活性,进而参与骨代谢过程^[15]。最新的研究表明,破骨细胞是骨骼重塑因子的重要来源,包括FGF-23、RANKL、OPG和硬化蛋白,这些因子会影响破骨细胞和成骨细胞的活性^[16]。此外,RANKL与骨钙素的分泌还受iPTH等多种因素影响。当CKD发生时,患者体内

iPTH分泌增多,可刺激RANKL和骨钙素分泌^[17]。在CKD早期阶段,FGF-23可降低血清1,25-(OH)₂D₃分泌,并阻止iPTH的过度生成^[11];随着CKD不断进展,iPTH含量的不断增加进一步刺激了FGF-23、RANKL和骨钙素的合成,导致骨代谢紊乱和CKD-MBD发生^[18]。由此可见,调节骨代谢平衡对延缓CKD-MBD进展具有重要作用。已有研究表明,0.75%的腺嘌呤饮食可导致机体肾衰竭发生、肾脏代偿性排磷能力下降、血清磷升高,加之长期高磷饮食,可引发CKD-MBD^[18]。本研究结果显示,与正常组比较,单纯高磷饲养的大鼠肾脏及骨骼均未见明显病变,而高磷联合腺嘌呤饲养可使大鼠血清中BUN和Scr含量升高,钙磷代谢紊乱,肾组织和骨组织均出现明显病变,提示CKD-MBD模型建立成功。由此可见,正常大鼠高磷饮食并未对机体造成损害。此外,本研究还发现,与单纯高磷组相同时间点比较,模型组大鼠血清中FGF-23、RANKL和骨钙素含量均显著升高,且升高水平与肾功能损伤程度趋势基本一致,提示上述因子可能参与了CKD-MBD的发生发展过程。

中医学上并无“CKD-MBD”一词,而根据CKD-MBD的临床表现,该病属于中医“骨痹”“骨痿”范畴,病变在骨,其本在肾。笔者前期研究证实,加味六味地黄汤具有肾保护作用,可明显改善单侧输尿管梗阻模型大鼠肾小管间质纤维化病变^[6,19-21]。本研究进一步发现,随着时间推移,模型组大鼠的肾损伤有不断加重的趋势,钙磷代谢紊乱,iPTH、FGF-23、RANKL和骨钙素含量也有不断升高的趋势。而加味六味地黄汤可上调血清钙含量,下调血清磷、iPTH、FGF-23、RANKL和骨钙

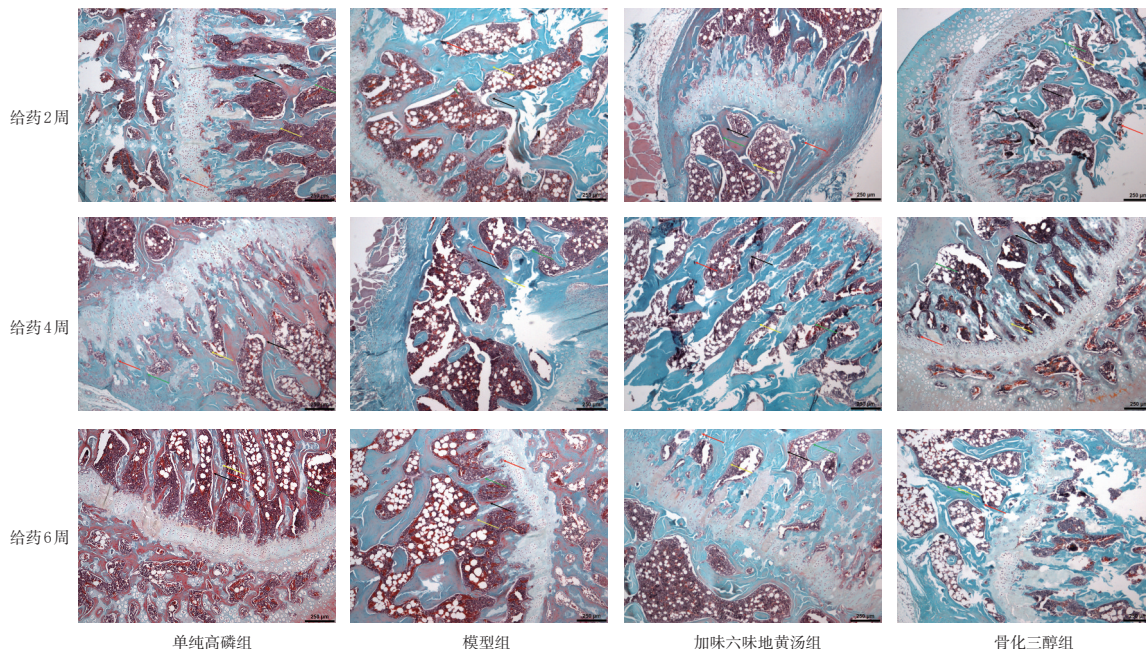


图3 各组大鼠各时间点骨组织病理显微图(Goldner's三色染色,×40)

Fig 3 Pathological micrographs of bone tissue of rats in each group at each time point(Goldner's trichrome staining, ×40)

素含量;同时,骨密度检测和形态学观察结果显示,经加味六味地黄汤治疗后,大鼠的股骨头骨密度、成骨细胞数量、骨小梁宽度和平均类骨质面积均较模型组明显改善。骨化三醇可刺激肠道钙和磷酸盐吸收,使钙磷离子在细胞外液保持一定浓度,刺激原有破骨细胞活性或加速形成新的破骨细胞,使血清中钙、磷转移进入血循环,调节骨质代谢,已成为临床上延缓CKD-MBD进展的常用药物^[22]。与骨化三醇组比较,加味六味地黄汤组上述指标变化差异均无统计学意义。

综上所述,加味六味地黄汤可改善CKD-MBD模型大鼠的肾组织和骨组织损伤,提高骨密度,调节钙磷代谢紊乱。但加味六味地黄汤上述保护作用的具体机制还需进一步研究。

参考文献

[1] BURTON JO, GOLDSMITH DJ, RUDDOCK N, et al. Renal association commentary on the KDIGO (2017) clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of CKD-MBD[J]. BMC Nephrol, 2018, 19(1):240.

[2] MISOF BM, BLOUIN S, ROSCHGER P, et al. Bone matrix mineralization and osteocyte lacunae characteristics in patients with chronic kidney disease - mineral bone disorder (CKD-MBD) [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2019, 19(2):196-206.

[3] CHEN X, WANG Z, DUAN N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions[J]. Connect Tissue Res, 2018, 59(2):99-107.

[4] RUPP M, MERBOTH F, DAGHMA D, et al. Osteozyten[J]. Z Orthop Unfall, 2019, 157(2):154-163.

[5] 张介宾. 景岳全书[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1994: 763-776.

[6] 黄仁发, 梁群卿, 邓鸣, 等. 加味六味地黄汤对UUO大鼠肾组织Wnt4/ β -catenin信号通路介导调控FGF-23的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(4):285-289.

[7] 曲雷鸣, 龚伟. 淫羊藿含药血清对MC3T3-E1成骨细胞增殖及分化的影响[J]. 中国药房, 2013, 24(35):3283-3285.

[8] 徐众华, 莫雨晴, 周驰. 基于BMP/Runx2/Osx信号通路研究淫羊藿总黄酮改善绝经后骨质疏松模型大鼠的作用机制[J]. 中国药房, 2020, 31(19):2333-2338.

[9] SETHI S, D'AGATI VD, NAST CC, et al. A proposal for standardized grading of chronic changes in native kidney biopsy specimens[J]. Kidney Int, 2017, 91(4):787-789.

[10] BELLASI A, COZZOLINO M, MALBERTI F, et al. New scenarios in secondary hyperparathyroidism: etelcalcetide. Position paper of working group on CKD-MBD of the Italian Society of Nephrology[J]. J Nephrol, 2020, 33(2):211-221.

[11] PAZIANAS M, MILLER PD. Current understanding of mineral and bone disorders of chronic kidney disease and the scientific grounds on the use of exogenous parathyroid hormone in its management[J]. Bone Metab, 2020, 27(1):1-13.

[12] KULICKI P, ŻEBROWSKI P, SOKALSKI A, et al. Circulating bone turnover markers and their relationships in hemodialysis patients with vitamin D deficiency[J]. Wiad Lek, 2019, 72(11 cz 2):2202-2209.

[13] SUGATANI T. Systemic activation of activin a signaling causes chronic kidney disease-mineral bone disorder[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9):2490.

[14] ZNORKO B, PAWLAK D, OKSZTULSKA-KOLANEK E, et al. RANKL/OPG system regulation by endogenous PTH and PTH1R/ATF4 axis in bone: implications for bone accrual and strength in growing rats with mild uremia[J]. Cytokine, 2018, 106:19-28.

[15] HAN Y, YOU X, XING W, et al. Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts[J]. Bone Res, 2018, 6:16.

[16] PEACOCK M. Phosphate metabolism in health and disease[J]. Calcif Tissue Int, 2020, 108:3-15.

[17] GÜNEŞ G, DOĞRUER ÜNAL N, ESKANDARI G, et al. Determination of NF- κ B and RANKL levels in peripheral blood osteoclast precursor cells in chronic kidney disease patients[J]. Int Urol Nephrol, 2018, 50(6):1181-1188.

[18] ANDREWS ES, PERRENOUD L, NOWAK KL, et al. Examining the effects of uric acid-lowering on markers vascular of calcification and CKD-MBD; a post-hoc analysis of a randomized clinical trial[J]. PLoS One, 2018, 13(10):e0205831.

[19] 黄仁发, 梁群卿, 黄国东, 等. 加味六味地黄汤对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织Notch1/jagged-1信号通路的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(11):1401-1403.

[20] 黄仁发, 林心如, 梁群卿, 等. 加味六味地黄汤对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织CTGF和MMP-2的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(3):196-199.

[21] 黄仁发, 梁群卿, 吴金玉, 等. 加味六味地黄汤对UUO大鼠肾组织TGF- β_1 及EMT的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(6):737-739.

[22] 徐杨, 李普庆, 姜国芳, 等. 骨化三醇联合常规治疗对慢性肾脏病患者肾功能、炎症因子及钙磷代谢的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(4):756-759.

(收稿日期:2020-11-03 修回日期:2021-01-26)

(编辑:邹丽娟)