肾安颗粒对肾性骨病模型大鼠骨组织骨保护素表达的影响

邹新蓉　王小琴　王长江　袁　军　朱守志
（湖北省中医院，湖北武汉 430061）

摘　要　目的：探讨肾性骨病（ROD）模型大鼠股骨组织骨保护素（OPG）表达与骨代谢的关系及中药方肾安颗粒干预骨代谢的作用机制。方法：应用5/6肾切除加高磷饮水建立大鼠ROD模型，随机分为正常对照组、假手术组、模型组、骨化三醇组和肾安低、高剂量组，分别给予相应药物灌胃8周，给药前后检测大鼠血清BUN、Scr、Ca、P、ALP，化学发光法测iPTH，双能X射线测骨密度，Western blot、免疫组织化学法检测股骨OPG表达。结果：肾安低、高剂量组大鼠血BUN、Scr与骨化三醇组、模型组比较明显降低；肾安低、高剂量组血Ca、骨密度与模型组比较明显升高，血P、ALP、iPTH与模型组比较明显降低；各组大鼠骨组织OPG蛋白表达，模型组显著低于正常对照组和假手术组，骨化三醇组和肾安低、高剂量组明显高于模型组；肾安低、高剂量组免疫组织化学表达比模型组明显增强。结论：ROD模型大鼠OPG表达异常与骨代谢密切相关，肾安颗粒可能通过上调OPG表达改善ROD骨代谢。

关键词　肾性骨病　肾安颗粒　OPG　实验研究
中图分类号　R692.05　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1672-397X(2014)07-0071-04

肾性骨病（renal osteodystrophy，ROD）是由慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）引起的矿物质代谢紊乱和内分泌失调所导致的骨病[1]，是CKD患者最常见和难治的并发症，也是终末期肾脏病患者致残的重要原因之一。导致ROD的生理病理机制十分复杂，由于肾脏结构和功能的破坏导致肾脏羟化酶系活性降低，1,25 $(OH)_2VitD_3$的生成相对或绝对不足，甲状旁腺激素（parathyroid hormone，PTH）的合成与释放失控，是ROD发病的核心环节。但肾脏、骨骼分泌的多种局部及循环激素和细胞因子，如骨形成蛋白-7、成纤维细胞生长因子、骨保护素（osteoprotegerin，OPG）等也参与其中。OPG作为骨形成与骨吸收动态平衡调节的重要因子，在ROD中表达情况及与骨代谢的关系如何？本实验观察ROD模型大鼠钙磷代谢、骨密度、PTH与OPG表达的关系及肾安颗粒干预后的变化，以期探讨中药复方干预ROD的可能机制。

1　实验材料

1.1　实验动物　SPF级Wistar雄性大鼠，8周龄，体质量120~150g，由湖北省实验动物研究中心提供，合格证号：00009457。

1.2　药物与试剂　肾安颗粒（药物组成：淫羊藿、黄芪、大黄，剂量比2:2:1）由湖北省中医院制剂室制备，用蒸馏水配制成混悬液，质量浓度分别为2.25g/mL、4.5g/mL；骨化三醇（规格：0.25μg/片）由海尔药业提供，用蒸馏水配制成质量浓度为50μg/100mL的悬浊液；血iPTH免疫检测试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技有限公司），山羊抗OPG抗体（美国Santa Cruz公司），辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗（pierce），小鼠抗大鼠β-actin（美国abcam公司），两步法抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒配制DAB溶液（丹麦DAKO公司）。

2　实验方法

2.1　5/6肾切除建立ROD大鼠模型　SPF级Wistar大鼠适应性喂养1周，以3%戊巴比妥钠（3mg/100g）腹腔注射麻醉。打开腹腔，暴露左侧肾脏，剥离肾包膜，结扎左肾上下极并切除，观察无出血后关闭腹腔。术后第2天开始给予高磷饮水（0.5g/d NaH_2PO_4）。1周后再次打开腹腔夹住右侧肾动脉和右侧输尿管并结扎，切除右肾并关闭腹腔。

2.2　分组与给药　48只大鼠随机分为正常对照组（8只）、假手术组（8只）、造模组（32只）。正常对照组不实施任何手术。假手术组仅打开腹腔然后关闭，不切除肾脏。造模组按上述方法行5/6肾切除术后1个月，随机分为模型组、骨化三醇组、肾安低剂量（2.25g/mL）组、肾安高剂量（4.5g/mL）组，每组8只。肾安颗粒用蒸馏水配制成混悬液，骨化三醇用蒸馏水配制成浓度为50%的悬浊液，药物配制后置4℃冰箱保存备用。术后1个月开始给予相应药物灌胃，大鼠灌胃容量为每日1mL/100g，正常对照组、假手术组和模型组给予等容量生理盐水灌胃，持续8周。灌胃第3周，模型组和骨化三醇组大鼠各死亡1只。

2.3　标本采集　给药前后眼球取血，测定尿素氮（BUN）、血

基金项目：国家临床重点专科建设项目（财社【2011】172号）；武汉市重点学科带头人项目（201051730560）；武汉市软科学研究计划项目（20107105038）

肌酐(Scr)、血磷(P)、血钙(Ca)、血清碱性磷酸酶(ALP)、血清全段甲状旁腺激素(iPTH)。给药结束后处死大鼠取完整双侧股骨,剥离肌肉,一侧干燥后测定股骨头部的骨密度(BMD),另一侧置于4%多聚甲醛中用于Western blot和免疫组织化学标本的制备。

2.4 生化指标及iPTH测定 TOSHIBA120全自动生化分析仪检测BUN、Scr、P、Ca、ALP,IMMULITE 1000型免疫分析仪化学发光法检测血iPTH。

2.5 骨密度测定 美国双能X线骨密度床机GE DPX-NT测定股骨头部骨密度。

2.6 Western blot检测 提取大鼠股骨组织总蛋白,用Braford法检测蛋白含量,PAGE凝胶电泳仪制胶,每孔上样体积为40μL,电泳1.5h后取胶,在转膜仪上转膜。转完后放入TrisNaCl中清洗10min,转入5%脱脂奶粉中封闭1h以上,用PBST洗涤3次,每次10min,孵山羊抗OPG一抗,4℃冰箱过夜,取出后PBST洗涤3次,每次10min,孵二抗室温1h,TBST洗涤3次,每次10min,DAB显色,凝胶分析系统行密度扫描。

2.7 免疫组织化学检查 骨组织石蜡切片烘片脱蜡,用PBS冲洗3次,每次5min;以EDTA微波修复;自然冷却后PBS洗3次,切片放入3%过氧化氢溶液室温孵育10min,PBS洗3次,甩干后5%BSA(牛血清白蛋白)封闭20min;甩去BSA液,加一抗,4℃过夜;PBS冲洗3次甩干,每张切片加50~100μL A液室温下孵育45min;PBS洗3次甩干,每张切片加50~100μL新鲜配制的DAB溶液,显微镜控制显色;显色完全后蒸馏水冲洗,苏木素复染,盐酸酒精分化,自来水冲洗,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,光镜下观察。设不加一抗的阴性对照,以有棕黄色颗粒着色者为阳性,对每个染色后的标本顺序选取20个骨视野(×200),利用图像分析系统(HIPAS-1000)进行测量,染色阳性部位的深浅及范围大小以平均吸光度表示。

2.8 统计学方法 实验数据以($\bar{x}\pm s$)表示,应用SPSS11.5软件包进行统计分析,采用One-Way ANOVA检验。$P<0.05$为有显著性差异,$P<0.01$为有非常显著性差异。

3 实验结果

3.1 各组大鼠用药前后BUN、Scr、iPTH检测结果 见表1。

3.2 各组大鼠用药前后血Ca、P、ALP检测结果 见表2。

3.3 各组大鼠股骨BMD检测结果 模型组大鼠BMD明显低于正常对照组和假手术组($P<0.05$);骨化三醇组、肾安低剂量组、肾安高剂量组与模型组比较骨密度明显增高($P<0.05$);骨化三醇组、肾安低剂量组、肾安高剂量组3组间骨密度比较无明显差异。见表3。

3.4 Western blot检测各组大鼠股骨OPG蛋白的表达 模型组大鼠股骨OPG蛋白表达明显低于正常对照组和假手术组;骨化三醇组、肾安低剂量组、肾安高剂量组表达明显高于模型组,其中以肾安低剂量组OPG蛋白表达增强更为明显。见图1。

3.5 免疫组织化学检测各组大鼠股骨OPG表达结果 免疫组织化学所见棕色为OPG阳性表达。模型组大鼠股骨OPG表达与正常对照组、假手术组比较明显减弱;骨化三醇组、肾

表1 各组大鼠用药前后BUN、Scr、iPTH测值($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	BUN(mmol/L)		Scr(μmol/L)		iPTH(pg/dL)	
		用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后
正常对照组	8	7.47±0.88	7.33±0.59	23.57±5.88	33.86±5.40	9.28±2.05	9.74±2.36
假手术组	8	7.86±0.80	7.09±0.83	24.14±3.29	33.71±5.91	10.82±2.94	9.28±2.05
模型组	7	17.04±3.77#	20.2±4.57	73.57±23.07#	100.14±26.71	13.08±6.65#	14.04±4.50
骨化三醇组	7	15.90±2.62#	15.75±4.33	65.83±10.74#	73.50±19.68	12.12±3.92#	9.62±1.51▲▲★★
肾安低剂量组	8	15.67±4.18#	12.5±2.51▲★	72.33±21.40#	59.67±9.37▲★※	12.36±2.19#	8.72±1.21▲▲★★
肾安高剂量组	8	15.72±3.84#	13.7±2.34▲★	74.60±16.50#	60.80±8.32▲★※	11.95±3.47#	9.30±0.73▲▲★★

注:与正常对照组用药前比较,#$P<0.01$;与本组用药前比较,▲$P<0.05$,▲▲$P<0.01$;与模型组用药后比较,★$P<0.05$,★★$P<0.01$;与骨化三醇组用药后比较,※$P<0.05$。

表2 各组大鼠用药前后血Ca^{2+}、P^{3+}、、ALP测值($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	Ca^{2+}(mmol/L)		P^{3+}(mmol/L)		ALP(IU/L)	
		用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后
正常对照组	8	2.99±0.15	2.93±0.05	2.11±0.30	1.82±0.25	156.57±23.25	122.43±29.11
假手术组	8	3.07±0.08	3.16±0.16	2.36±0.48	2.47±0.42	156.14±28.02	128.71±48.93
模型组	7	1.99±0.41#	1.87±0.45	3.84±0.59#	4.13±0.91	181.57±42.27	197.00±31.53
骨化三醇组	7	2.11±0.84#	2.98±0.12▲★	3.65±0.74#	3.41±0.73	167.33±21.95	130.67±22.98▲★
肾安低剂量组	8	2.00±0.26#	2.76±0.12▲★	3.48±0.64#	2.56±0.15▲★※	172.00±38.29	135.17±23.37▲★
肾安高剂量组	8	2.06±0.05#	2.88±0.08▲★	3.70±0.65#	2.74±0.26▲★※	182.20±20.69	133.60±40.67▲★

注:与正常对照组用药前比较,#$P<0.05$;与本组用药前比较,▲$P<0.05$;与模型组用药后比较,★$P<0.05$;与骨化三醇组用药后比较,※$P<0.05$。

表3 各组大鼠用药后BMD测值($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	BMD(g/cm²)
正常对照组	8	164.75±41.60
假手术组	8	168.36±13.45
模型组	7	120.15±12.02#
骨化三醇组	7	160.13±4.86★
肾安低剂量组	8	165.73±8.22★

注:与正常对照组比较,#$P<0.05$;与模型组比较,★$P<0.05$。

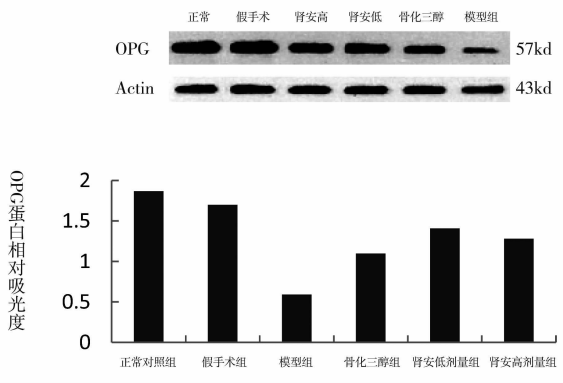

图1 Western blot检测各组大鼠股骨OPG蛋白的表达

安低剂量组、肾安高剂量组 OPG 表达与模型组比较明显增强，其中以肾安低剂量组更为明显。见图 2。

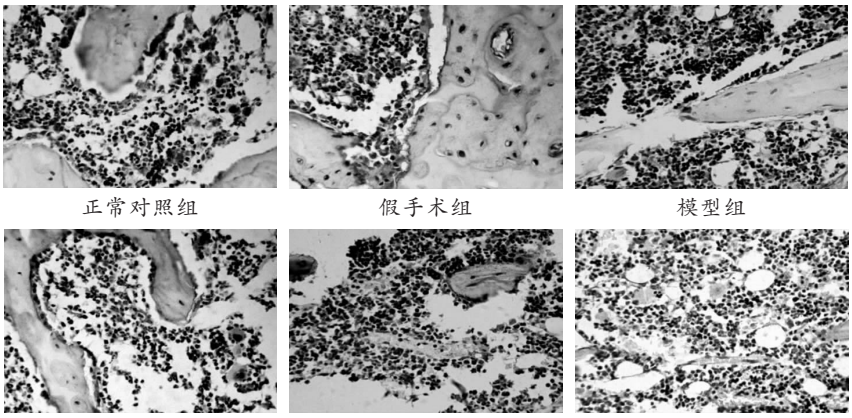

图 2　各组大鼠股骨 OPG 免疫组化染色结果(×400)

4　讨论

OPG 是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族新成员，是由基质细胞、成骨前体细胞、破骨前体细胞产生的一种跨膜结构域的分泌性蛋白[2]，作为假受体通过与 RANK 竞争结合 RANKL 阻断其作用，抑制破骨细胞的分化、成熟，诱导破骨细胞凋亡。OPGmRNA 在人体的多种组织和细胞系广泛表达，在肺、心脏、肾、肝、胃肠、脑、脊髓、甲状腺和骨中表达最多，动物实验表明以肾脏含量最多[3]。体外实验证实，OPG 抑制前体破骨细胞分化和成熟破骨细胞形成骨吸收陷窝，而 1,25 $(OH)_2D_3$ 能抑制 OPG mRNA 的表达及 OPG 蛋白的合成，促进破骨细胞前体分化成熟，使破骨细胞数量增加，促进骨吸收，维持骨代谢平衡；体内实验注射重组 OPG 可诱导破骨细胞凋亡[4]。

OPG 在体内的表达受多种因素调控，如 1,25$(OH)_2D_3$、PTH、TGF-α、TGF-β、NO、IL-1β、Ca^{2+}、雌激素、肾上腺素等。多种细胞因子和激素通过上调或下调 RANKL/OPG 间接对骨代谢发挥作用。实验表明，PTH 长时间持续刺激导致破骨细胞的活动加强，使骨吸收作用增加，从而骨量减少[5]。PTH 作为 ROD 进程中的核心环节之一，刺激破骨细胞的分化作用，是通过成骨细胞的 OPG/RANKL/RANK 系统的 PKA 信号通路，提高 RANKL 表达和降低成骨细胞生成 OPG 来完成[6-7]。OPG 在骨质疏松症、免疫性骨关节病、骨硬化症、骨肿瘤及心血管病等临床疾病中的研究较多，但其在 CKD 和 ROD 中的研究鲜少报道。

本研究中，各造模组大鼠给药前 BUN、Scr 较正常对照组明显升高，血钙降低，血磷上升，PTH 水平亦升高，血清 ALP 上升，表明随大鼠肾功能下降，其钙磷代谢紊乱，甲状旁腺功能亢进，骨重塑与形成减少。蛋白印迹及免疫组化的结果显示，各造模组大鼠股骨 OPG 的表达均较正常对照组和假手术组降低，给予骨化三醇和不同浓度肾安干预后能使 OPG 在骨组织中的表达水平升高，但以肾安 2.25g/mL 剂量用药对 OPG 的表达升高作用更为明显。给药后，不同浓度肾安组的肾功能均得到改善，且随着 OPG 水平的升高，骨密度的降低得到缓解，低钙、高磷、高 PTH 水平也明显改善。

中医学理论认为，“肾藏精，精生髓，髓成骨”，“肾主骨”(《素问·宣明五气》)，“肾生骨髓”“肾充则髓实”(《素问·阴阳应象大论》)，“肾为先天之本”，肾所藏之精，所主之液皆可化生骨髓，为“肾主骨”提供了物质基础。若肾精充实，则髓化有源，骨得其养而坚固有力、活动灵便；若肾不藏精，肾精亏虚，则“肾主骨”功能亦失职，骨髓化生乏源骨失其养，将会出现骨骼脆弱、腰背疼痛、胫酸膝软、容易骨折等症状，发为“骨痿”、“虚劳”、“骨痹”。肾与骨的密切联系体现在 ROD 的整个发病过程中，脾肾亏虚，气血不足，又水湿、湿热、湿浊、瘀毒等邪实为患，使得骨失所养、髓化乏源，而肾虚浊瘀是 ROD 的发病关键。因此，针对 ROD 的发病机制，补肾泄浊是治疗 ROD 的根本方法。

肾安颗粒组方中淫羊藿能补肾壮阳、益精健骨，已有研究表明淫羊藿总黄酮(主要成分为淫羊藿苷)可能通过增加成骨细胞 OPG 的表达来抑制破骨细胞的分化和成熟，从而抑制骨吸收[8]。淫羊藿还可以提高肾脏 BMP-7 蛋白的表达，并作用于骨组织，上调骨组织 BMP-7 的表达，发挥其诱导成骨作用，增加骨形成，对抗糖皮质激素所引起骨损害[9]。黄芪能补益肺脾，黄芪甲苷是黄芪的代表性活性成分之一，能减轻小管间质的损伤，抑制肾纤维化。大黄功能清湿热化瘀祛浊排毒，抑制肾脏高代谢，抑制系膜细胞增生，改善脂质代谢，从多方面延缓慢性肾衰竭。既往的动物实验显示肾安颗粒能抑制 ROD 模型大鼠骨组织 FGF-23 的表达和上调 BMP-7 的表达[10-11]。

本实验证实，肾安颗粒在改善肾功能的同时能上调残余肾模型大鼠股骨组织 OPG 蛋白表达，从而改善 ROD 模型大鼠骨代谢，推测其改善骨代谢途径可能与上调 OPG 表达有关，但具体调节机制还有待进一步研究。

5　参考文献

[1] Simon M，Maresh JG，Harris SE，et al.Expression of bonemorphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult ratkidney. Am J Physiol，1999，276，F382

[2] Min H，MoronyS，SarosiI，et al.Osteoprogerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis.J Exp Med，2000，192(4)：463

[3] BostanciN，genliT，EmingilG，et al.Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases：implications of their relative ratio.J Clin Periodontol，2007，34(5)：370

[4] 田庆昱，黄公怡.1,25 二羟维生素 D_3 对小鼠成骨细胞 OPG 和 RNAKL 基因表达的影响. 中国医学科学院学报，2004，26(4)：418

[5] Lacey DL，Tan HL，Lu J，et al.Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo.Am J Pathol，2000，157(2)：435

[6] Anca Gal-Moscovici，Stuart M.Sprague. Bone health in chronic-kidney disease-mineral and bone disease.Advances in Chronickidney Disease，2007，14：27

清金益肺汤对痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠病理及免疫功能的影响

张　伟[1]　张雪玲[2]　朱　雪[1]　王国梁[2]　孟　芸[2]　张　莉[2]　张晓蕾[2]
(1.山东中医药大学附属医院,山东济南 250014; 2.山东中医药大学,山东济南 250011)

摘　要　目的:通过检测痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠应用清金益肺汤后肺组织 IL-8、TGF-β1 的表达水平及光镜下的病理变化,探讨清金益肺汤对痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠病理及免疫功能的影响。方法:清洁级健康雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为 5 组:空白对照组、痰热蕴肺型特发性肺纤维化模型组(模型组)、中药治疗组(中药组)、激素治疗组(激素组)、中药加激素治疗组(综合治疗组)。采用气管内滴入博来霉素的方法建立肺纤维化模型。造模结束后第 2 天气管内滴加脂多糖建立痰热蕴肺证模型。ELISA 法检测各组大鼠肺组织 IL-8、TGF-β1 的表达水平,光镜下观察各组大鼠肺组织的病理改变。结果:模型组、中药组、激素组、综合治疗组大鼠肺组织在光镜下均有肺纤维化的特征性病理改变,但程度有所不同。与空白对照组相比,其余各组大鼠 IL-8 及 TGF-β1 的表达水平均明显增高;模型组表达水平明显高于中药组、激素组和综合治疗组;综合治疗组明显低于中药组和激素组;中药组和激素组 IL-8 的表达水平差异无统计学意义;激素组 TGF-β1 水平明显高于中药组。结论:清金益肺汤可改善痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠的呼吸功能、结构改变,并能调节免疫,与激素联合可增强抗纤维化力度。

关键词　特发性肺纤维化　痰热蕴肺　清金益肺汤　IL-8　TGF-β1　病理学　实验研究
中图分类号　R563.905　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1672-397X(2014)07-0074-03

特发性肺纤维化(Idiopathic Pulmonary Fibrosis,IPF)是一组主要累及肺间质、肺泡和(或)细支气管的肺部弥漫性疾病,主要表现为渐进性劳力气促、限制性通气功能障碍伴弥散功能降低、低氧血症和影像学上的双肺弥漫性病变,其后期多因并发呼吸衰竭而死亡[1]。本病病因未明,发病机制亦未完全明确,但已有足够证据表明与免疫炎症损伤有关。清金益肺汤是在清金化痰汤的基础上,根据中医辨证论治理论而确立的有确切临床疗效的方剂,功在清热化痰、肃肺祛瘀。本实验拟通过检测痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠应用清金益肺汤后肺组织 IL-8、TGF-β1 的表达水平及光镜下的病理变化,以期探讨清金益肺汤对痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠病理及免疫功能的影响,为临床提供实验依据。

1　实验材料

1.1　实验动物　SPF 级健康雄性 SD 大鼠 40 只,鼠龄 10~12 周,体重(200±20)g。动物来自山东中医药大学实验动物中心,许可证号:SCXK(鲁)20110003。

1.2　实验试剂和药物　博来霉素(BLM),invitrogen 公司,批号:1134142;脂多糖(LPS),美国 Sigma 公司;10%水合氯醛,山东大学齐鲁医院,批号:20130305;PBS 缓冲液(pH=7.4);清金益肺汤(药物组成:炙麻黄 9g,炒白果 12g,炒杏仁 12g,桔梗 12g,川贝 12g,浙贝 12g,黄芩 12g,川芎 12g,栀子 12g,桑白皮 12g,知母 12g,瓜蒌 30g,金银花 30g,清半夏 9g,丹参 18g,蒲公英 30g,蜈蚣 2 条,生甘草 6g),煎液由山东中医药大学附属医院制备;泼尼松片,天津药业集团新郑股份有限公司,批号:20130123。

基金项目:泰山学者建设工程专项经费资助项目(ts20110819);山东省中医药科技发展计划(2011-050)

[7] QIAN Y,ZHU P,WANG WM,et al.Study of the PKA and PKC signal transduction pathway of regulation of OPG and RANKL mRNA expression by hPTH (1·34). Journal of Chinese Microcirculation,2007,11(5):293
[8] 刘亦恒,臧洪敏,张海英,等.淫羊藿总黄酮对成骨细胞中 OPG 和 RANKL mRNA 基因表达影响的实验研究. 中药材,2005,28(12):1076
[9] 周乐,吴燎,崔铁.淫羊藿对肾阳虚雄性大鼠肾脏和股骨 BMP-7 表达的影响.中国骨质疏松杂志,2008,14(2):90
[10] 邹新蓉,王小琴,马晓红,等.肾安颗粒对 ROD 模型大鼠骨组织 FGF-23 表达及骨代谢的影响. 临床肾脏病杂志,2012,12(9):418
[11] 邹新蓉,王小琴,王长江,等.肾安颗粒对肾性骨病模型大鼠骨组织 BMP-7 表达及骨代谢的影响. 湖北中医杂志,2013,35(4):11

第一作者:邹新蓉(1972-),女,博士,副主任医师,研究方向:中医药防治肾病。frank_judy@163.com

收稿日期:2014-03-14
编辑:吴　宁