

敦煌医方四时常服方对镉染毒大鼠骨和肾功能的影响

张亚维¹ 颜春鲁^{2,3}

[摘要] **目的:**研究敦煌医方四时常服方对镉染毒大鼠骨和肾功能的影响。**方法:**将 6 组大鼠按照第一组(空白对照组)腹腔注射 0.9%NaCl,其余五组(模型组、乙酰半胱氨酸组、四时常服方高中低剂量组)均腹腔注射 0.1%氯化镉,1.5 mg/kg 注射(相当于 1.5 mL/kg),每周 5 次,共 5 周。染毒的同时,分别给予相应干预,乙酰半胱氨酸泡腾片溶液(5.4 mg/mL)1 mL/100 g、四时常服方各种剂量(2.6 g/mL,中 1.3 g/mL,低 0.65 g/mL)1 mL/100 g 灌胃治疗,每天 1 次,连续 5 周。最后一次注射后,取血检测。**结果:**与空白对照组比较,模型组大鼠血清钙(Ca^{2+})、磷(P)、骨钙素显著降低,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,乙酰半胱氨酸组、四时常服方高中低剂量组大鼠血清钙、磷、骨钙素(OC)显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与空白对照组比较,模型组大鼠血清碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRACP-5b)、尿素氮(BUN)显著升高,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,乙酰半胱氨酸组、四时常服方高中低剂量组大鼠血清碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b、尿素氮显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**四时常服方对于镉染毒大鼠骨和肾功能具有一定的修复作用。

[关键词] 镉染毒;四时常服方;骨代谢;肾损伤

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)04-0001-04

Effect of Dunhuang Sishichangfu Prescription on Bone and Renal Function in Rats Infected with Cadmium

ZHANG Yawei¹ YAN Chunlu^{2,3}

¹Gansu Hospital of Traditional Chinese Medicine,Lanzhou 730050,China;

²Gansu University of Traditional Chinese Medicine,Lanzhou 730000,China;

³ Key Laboratory of Dunhuang Medical and Transformation at the Provincial and Ministerial Level of Education,Lanzhou 730000,China.

Abstract Objective: To study the Dunhuang Sishichangfu prescription on bone and renal function in rats infected with cadmium. **Methods:** The rats were divided into six groups. The first group was injected intraperitoneally with normal saline, the remaining five groups were injected intraperitoneally with 0.1% cadmium chloride,1.5 mg/kg, equivalent to 1.5 mL/kg, five times a week for 5 weeks. At the same time the rats were given corresponding intervention respectively: acetylcysteine effervescent tablets solution(5.4 mg/mL)1 mL/100 g, Sishichangfu prescription of the various doses(high 2.6 g/mL, medium 1.3 g/mL, low 0.65 g/mL)1 mL/100 g were given by gavage, once a day for five weeks. After the last injection, blood tests were taken. **Results:** Compared with the blank control group, the level of serum calcium(Ca^{2+}), phosphorus(P) and osteocalcin(OC) were decreased significantly in the model group($P<0.05$). Compared with the model group, the level of serum Ca^{2+} , P and OC were increased significantly in the acetylcysteine group and Sishichangfu prescription of high and low doses groups($P<0.05$). Compared with the blank control group, serum alkaline phosphatase(ALP), tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP-5b) and urea nitrogen (BUN) were significantly increased in the model group($P<0.05$). Compared with the model group, the level of serum ALP, TRACP-5b and BUN were decreased significantly in the acetylcysteine group and Sishichangfu prescription of high and low doses groups($P<0.05$). **Conclusion:** Sishichangfu prescription has a certain repair effect on bone and renal function in rats infected with cadmium.

基金项目:甘肃省自然科学基金项目(1508RJZA046)

甘肃中医药大学中青年基金项目(ZQ2014-9)

敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室开放

基金项目(DHYX1213-004)

¹ 甘肃省中医院(兰州,730050)

² 甘肃中医药大学

³ 敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室

trate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP-5b) and urea nitrogen (BUN) were significantly increased in the model group($P<0.05$). Compared with the model group, the level of serum ALP, TRACP-5b and BUN were decreased significantly in the acetylcysteine group and Sishichangfu prescription of high and low doses groups($P<0.05$). **Conclusion:** Sishichangfu prescription has a certain repair effect on bone and renal function in rats infected with cadmium.

Keywords: cadmium infected; Sishichangfu prescription; bone metabolism; kidney injury

骨骼是镉毒性靶器官之一^[1]。镉可通过被污染的饮用水、被污染的食物、吸烟及职业接触等途径转移进入生物体内,继而对人体各个器官组织如骨、肾等造成不同程度的影响。镉对人体健康的主要危害部位是肾脏,损害肾小球和肾小管,导致低分子蛋白尿,尿中如微球蛋白和视黄醇结合蛋白排泄增加,严重者引起肾功能衰退,骨骼钙质疏松等许多病理损伤^[2,3]。在研究镉对人体的毒害作用时,骨骼系统是一个不可忽略的器官。已有大量研究表明,镉可导致骨代谢紊乱,骨量丢失,引起骨软化与骨质疏松^[4]。四时常服方选自敦煌医方的韦慈藏四时常服方,“菟丝子三升、酒浸茯神五两(人)参三两远志三两桂心二两,右捣筛为散,以酒服之二分匕,日再服,服别再加至三匕,(日)忌大酢,热面,余并无妨,韦慈藏。”方中菟丝子补益肝肾,益精填髓;茯神、远志健脾调中,补心安神;人参、桂心益气生津,补火助阳。相关研究证实,镉中毒可以造成多器官多系统损伤,其中以肾损伤最为常见^[2,3]。而本方重在补肾益气,属于补肾良药。因此本课题以大鼠为实验对象,制备镉染毒模型,选用敦煌医方四时常服方进行干预,探讨镉染毒对大鼠肾、骨功能的影响及其四时常服方干预效应为中药防治镉染毒的研究提供新思路和新方法。

1 材料与方法

1.1 动物分组

60只SPF级Wistar大鼠,体质量(180±20)g,雌雄各半,由甘肃中医药大学科研试验中心提供。实验动物质量合格证编号SYXK(甘)2015-0002。按体质量随机分为6组:空白对照组、模型组、乙酰半胱氨酸组、四时常服方高剂量干预组、四时常服方中剂量干预组、四时常服方低剂量干预组。

1.2 药物

乙酰半胱氨酸泡腾片(富露施,注册证号H20090620),四时常服方水煎液(甘肃中医药大学附属医院药剂科制备)由菟丝子27g,茯神45g,人参27g,远志27g,桂心18g组成,制备后放冰箱4℃保存,备用。

1.3 主要试剂

氯化镉(天津市巴斯夫化工有限公司,批号20110510),Ca试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20151127),磷测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20151204),尿素氮试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20151223),碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20151022),骨钙素ELISA测试盒(上海源叶生物科技有限公司,批号20151201A),TRACP-5b ELISA测试盒(上海源叶生物科技有限公司,批号20151201A)。

1.4 主要仪器

全自动酶标分析仪(美国Bio-Rad公司,型号iMark),医用低速离心机(金坛市恒丰仪器厂,型号LX-820),电子天平(上海精密科学仪器有限公司,型号FA2004N),超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,型号KQ-5200)。

1.5 实验方法

空白对照组腹腔注射0.9%NaCl,其余5组均腹腔注射0.1%氯化镉,按1.5mg/kg注射(相当于1.5mL/kg),每周5次,共5周。染毒的同时在相应组别分别给予干预,乙酰半胱氨酸泡腾片溶液(5.4mg/mL)1mL/100g、四时常服方各种剂量(高2.6g/mL,中1.3g/mL,低0.65g/mL)1mL/100g灌胃治疗,每天1次,连续5周。最后一次注射后,取血检测。

1.6 指标检测

实验第5周末,大鼠末次给药24h后,动脉采血5mL,注入试管内,4℃离心3500r/min,15min,分离血清,分别按试剂盒说明书测定各组大鼠血清中钙、磷、骨钙素、血清碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶5b和尿素氮的表达。

1.7 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件分析,将实验数据所得结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析(One-Way-Anova),组间比较方差齐时用LSD分析,方差不齐时用Dunnett's法分析。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨代谢标志物

2.1.1 四时常服方对镉染毒大鼠血清钙(Ca^{2+})、磷(P)、碱性磷酸酶(ALP)的影响

与空白对照组比较,模型组大鼠血清钙含量显著降低,模型组及各干预组大鼠血清磷含量显著降低,而碱性磷酸酶活性显著升高,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,乙酰半胱氨酸组、四时常服方各干预组大鼠血清钙、磷含量显著增加,而碱性磷酸酶活性显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);并且随着剂量的增加,钙、磷含量逐渐增加,碱性磷酸酶活性逐渐降低,呈现剂量依赖性。与四时常服方高剂量组比较,其低剂量组大鼠血清磷含量明显降低,低、中剂量组大鼠血清碱性磷酸酶活性明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与乙酰半胱氨酸组比较,四时常服方低剂量组磷含量显著降低,各剂量组大鼠血清碱性磷酸酶活性明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。钙含量在各剂量组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表 1 各组血清钙、磷及碱性磷酸酶比较(±s)

组别	鼠数	钙(mmol/L)	磷(mmol/L)	碱性磷酸酶(金氏单位/100 mL)
空白对照组	10	5.51±0.33	6.35±0.52	13.27±2.08
模型组	10	2.89±0.18 ¹⁾	3.36±0.30 ¹⁾	31.65±1.55 ¹⁾
乙酰半胱氨酸组	10	4.73±0.33 ³⁾	5.79±0.67 ³⁾	15.75±0.80 ²⁾³⁾
四时常服方高剂量组	10	4.00±0.32 ³⁾	5.56±0.30 ¹⁾³⁾	19.77±1.40 ¹⁾³⁾⁵⁾
四时常服方中剂量组	10	3.77±0.25 ³⁾	5.49±0.50 ¹⁾³⁾	22.27±0.92 ¹⁾³⁾⁵⁾⁷⁾
四时常服方低剂量组	10	3.59±0.18 ⁴⁾	4.83±0.24 ¹⁾³⁾⁵⁾⁸⁾	23.00±1.66 ¹⁾³⁾⁵⁾⁷⁾

注:与空白对照组比较,1) $P<0.01$,2) $P<0.05$;与模型组比较,3) $P<0.01$,4) $P<0.05$;与乙酰半胱氨酸组比较,5) $P<0.01$,6) $P<0.05$;与四时常服方高剂量组比较,7) $P<0.01$,8) $P<0.05$.

2.1.2 四时常服方对镉染毒大鼠血清骨钙素(OC)和抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRACP-5b)的影响

与空白对照组比较,模型组、四时常服方低、中剂量组大鼠血清骨钙素含量显著降低,模型组大鼠血清抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 活性显著升高,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,

乙酰半胱氨酸组和四时常服方高、中、低剂量组大鼠血清骨钙素含量显著增加,抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 活性显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);并且随着剂量的增加,骨钙素含量逐渐增加,抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 活性逐渐降低,呈现剂量依赖性。但是各剂量组之间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2.

表 2 各组血清骨钙素、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b 比较(±s)

组别	鼠数	骨钙素(ng/mL)	抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(U/L)
空白对照组	10	1.45±0.13	0.34±0.07
模型组	10	1.05±0.17 ¹⁾	0.69±0.13 ¹⁾
乙酰半胱氨酸组	10	1.37±0.09 ³⁾	0.41±0.03 ³⁾
四时常服方高剂量组	10	1.39±0.18 ³⁾	0.43±0.10 ³⁾
四时常服方中剂量组	10	1.32±0.06 ³⁾	0.46±0.06 ²⁾³⁾
四时常服方低剂量组	10	1.28±0.14 ⁴⁾	0.49±0.08 ²⁾³⁾

注:与空白对照组比较,1) $P<0.01$,2) $P<0.05$;与模型组比较,3) $P<0.01$,4) $P<0.05$.

2.2 肾损伤标志物

2.2.1 四时常服方对镉染毒大鼠血清尿素氮的影响

与空白对照组比较,模型组,四时常服方低、中剂量组大鼠血清尿素氮含量显著升高,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,乙酰半胱氨酸组和四时常服方各剂量组大鼠血清尿素氮含量显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);并且随着剂量的增加,血清尿素氮含量逐渐降低,呈现剂量依赖性。与四时常服方高剂量组比较,其低剂量组大鼠血清尿素氮含量明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与乙酰半胱氨酸组比较,四时常服方低剂量组尿素氮含量显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 3.

表 3 四时常服方对镉染毒大鼠血清尿素氮的影响(±s)

组别	鼠数	尿素氮(mmol/L)
空白对照组	10	4.17±0.98
模型组	10	10.61±0.87 ¹⁾
乙酰半胱氨酸组	10	4.96±1.03 ²⁾
四时常服方高剂量组	10	5.11±0.47 ²⁾
四时常服方中剂量组	10	6.23±1.31 ¹⁾²⁾
四时常服方低剂量组	10	7.49±1.55 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注:与空白对照组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.01$;与乙酰半胱氨酸组比较,3) $P<0.01$;与四时常服方高剂量组比较,4) $P<0.01$.

3 讨论

镉对人体健康的危害主要来源于工业生产所造成的环境污染,通过食物链进入体内。当镉毒进入人体后极难排泄,极易干扰肾功能。镉会取代骨中钙,使骨骼严重软化,骨头寸断;镉会引起胃肠功能失调,使锌镉比降低^[5-7]。镉有较强的毒性,急性和慢性接触镉,均可以引起中毒。人长期摄入过量的镉,会影响体内其他有益元素的效能,可造成肝肾损伤、肺气肿。镉转移至动脉,使血压上升,引致血管脂肪化,另外镉也是一种致癌物质,可能诱发前列腺癌症^[8,9]。

敦煌古医方正是来源于敦煌莫高窟藏经洞的敦煌遗书,其中的中医学内容成为“敦煌学”研究的重要领域之一。这些隋唐五代时期医学家们留下的经验医方,涉及范围非常广泛,而本课题所采用的四时常服方正是出自于敦煌古医方。该方由菟丝子、茯神、人参、远志、桂心组成。方中菟丝子补肾阳,益精髓,为君药。臣以辛热之桂心温肾助养,助菟丝子补肾阳,同时又能引火归元,使上浮之元阳下归于肾。人参培补后天,助气血生化,以养先天。茯神通心气下达于肾,远志通肾气上达于心。全方脾肾同补,主治肾阳不足,心肾不交证。四时常服方对于治疗镉中毒具有显著的作用,镉致体内细胞的氧化损害是其发病的主要机理之一,四时常服方不但对机体脂质过氧化有一定的保护作用,

而且可促进尿镉的排出,还可防止体内自由基的产生,降低机体肾脏损伤程度,有效拮抗镉的慢性毒性,因此对于治疗镉中毒有一定的作用^[10]。

镉性肾损伤中,由于钙离子和镉离子的离子半径相近,使得镉离子能够顺利通过钙离子通道,从而破坏机体胞内的钙稳态平衡^[11,12]。随着镉作用时间的延长,肾胞浆中钙显著增高,导致磷的排泄也受到影响。由于镉在体内的大量蓄积,从而导致了肾功能的损害,进而影响骨骼,骨代谢异常,易造成骨质疏松。碱性磷酸酶是胞浆结合酶,镉与碱性磷酸酶蛋白质巯基的结合比较稳定,故镉能和碱性磷酸酶中的磷结合紧密,导致碱性磷酸酶活性下降,造成血清碱性磷酸酶含量增多,可引起肾、骨等不同的损伤及危害。也有研究发现:单纯染镉6周的大鼠可通过尿蛋白含量和酶活性的高低反映肾损伤的程度^[13],并且随着染镉剂量的增加,肾小管逐渐出现损伤和坏死,会释放出大量的乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶等胞内酶,产生其特有的肾脏毒性^[14]。骨钙素是成骨细胞合成分泌的,比较稳定,镉对其的含量增多有非常大的促进作用,便会出现骨质疏松,尤其是肾损伤后期。血清肌酐一般认为是内生血肌酐,内生肌酐是人体肌肉代谢的产物。在肌肉中,肌酸主要通过不可逆的非酶脱水反应缓缓地形成肌酐,再释放到血液中,随尿排泄,因此血肌酐与体内肌肉总量关系密切,不易受饮食影响。尿素氮是人体蛋白质代谢的主要终末产物,通常肾脏为排泄尿素的主要器官,尿素从肾小球滤过后在各段小管均可重吸收,但肾小管内尿流速越快重吸收越少,也即达到了最大清除率。和血肌酐一样,由于体内镉的含量增加,致使肾损害严重,在肾功能损害早期,血尿素氮可在正常范围。当肾小球滤过率下降到正常值的50%以下时,血尿素氮的浓度才迅速升高^[15,16]。本研究结果显示,与空白对照组比较,模型组大鼠血清钙、磷、骨钙素显著降低;与模型组比较,乙酰半胱氨酸组、四时常服方高中低剂量组大鼠血清钙、磷、骨钙素显著增加。与空白对照组比较,模型组大鼠血清碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶5b、尿素氮显著升高;与模型组比较,乙酰半胱氨酸组、四时常服方高中低剂量组大鼠血清碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶5b、尿素氮显著降低。四时常服方具有温补肾阳的作用,肾主骨生髓,对于镉引起的肾和骨损伤具有显著的治疗作用^[17-19]。综上所述,四时常服方对于镉染毒大鼠骨和肾功能具有一定的恢复作用。

参考文献

- [1] World Health Organization. Cadmium[R]. Environ Health Criteria Document, 1992, 134:146-151.
- [2] 刘爱萍,赵金垣,刘亚宁. 氧自由基在急性镉中毒性肾损伤中的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1998, 16(1): 22-25.
- [3] 常秀丽,金泰度,陈亮,等. 金属硫蛋白基因亚型表达在镉暴露中作为生物标志物的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(1):12-15.
- [4] 李广生. 地方性氟中毒发病机制[M]. 北京:科学出版社, 2004.
- [5] Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, et al. Environment expo-sure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures:prospective population study[J]. Lancet, 1999, 353(9159):1140-1144.
- [6] 史秀京,雷立健,郭建勇,等. 镉致大鼠肾脏微小 RNA-21 表达的生物信息学分析[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(2):113-118.
- [7] 杨洋,丁天云,张明,等. SD 大鼠亚慢性镉中毒试验模型的构建[J]. 毒理学杂志, 2016, 40(3):281-286.
- [8] 刘艳荣,葛振丹,黄厚今. 灵芝孢子粉对镉致雄性大鼠睾丸生殖细胞 DNA 氧化损伤的拮抗作用[J]. 毒理学杂志, 2016, 30(3):230-236.
- [9] 李晔,蔺怀,张倩茹,等. 矢车菊素-3-葡萄糖苷对重金属镉胁迫后大鼠氧化损伤的缓解作用[J]. 生态学杂志, 2016, 35(5):1358-1363.
- [10] 史秀京,雷立健,郭建勇,等. 镉致大鼠肾脏微小 RNA-21 表达的生物信息学分析[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(2):113-118.
- [11] Zhou X, Hao W, Shi H, et al. Calcium homeostasis disruption-A bridge connecting cadmium-induced apoptosis, autophagy and tumorigenesis [J]. Oncol Res Treat, 2015, 38(6):311-315.
- [12] Zou H, Liu X, Han T, et al. Alpha-lipoic acid protects against cadmium-induced hepatotoxicity via calcium signaling and gap junctional intercellular communication in rat hepatocytes [J]. J Toxicol Sci, 2015, 40(4):469-477.
- [13] 冯雪英,徐兆发,王飞,等. 原花青素和褪黑素对亚慢性染镉大鼠肾毒性的影响[J]. 毒理学杂志, 2009, 23(2):115-117.
- [14] 黎珊珊,徐兆发,李静慧,等. 姜黄素对染镉6周大鼠肾损伤的影响[J]. 环境与职业医学杂志, 2015, 32(2):118-122.
- [15] 李芳林,张凝宇,邓立华,等. 肾损伤分子-1 mRNA 在染镉肾小管细胞的表达[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(4):309-311.
- [16] 詹杰,刘永林,柳承希,等. 冠心康对镉染毒大鼠镉蓄积和钙浓度浓度的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(5):929-931.
- [17] 王世伟,刘文波,何桂群,等. 肾主骨与骨质疏松症[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(8):76-78.
- [18] 李宁,谢兴文,陈欣. “肾主骨、生髓”理论在骨质疏松症研究中的应用[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(4):70-72.
- [19] 曾建春,樊粤光,刘建仁,等. “肾主骨、生髓”与骨髓间充质干细胞定向分化的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(12):1-3.

(收稿日期:2016-11-05)