

肾性骨病方对 5/6 肾切除术后小鼠骨丢失影响的作用机制研究

张浩^{1,2} 王晶^{1,3,4,5*} 周琳^{1,2} 赵东峰^{1,3,4} 赵永见^{1,3,4}
卫晓恩^{1,2} 王拥军^{1,3,4} 舒冰^{1,3,4△}

[摘要] 目的:比较肾性骨病方对不同阶段 5/6 肾切除小鼠骨丢失的保护作用机制。方法:3 个月龄 C57BL/6J 小鼠 150 只,建立慢性肾衰小鼠模型,术后随机分为假手术组、模型组、罗盖全组、肾性骨病方组,分别在术后 1 周和 4 周时给予肾性骨病方以及罗盖全灌胃。各组给药 8 周后,取小鼠 L₅ 椎体、血清和肾脏组织,分别检测血清肌酐(CREA)、尿素氮(BUN),以评估肾脏功能;L₅ 椎体进行阿尔辛兰/橙黄 G 染色、Micro-CT 扫描加重建、免疫组化检测评估骨质情况。结果:和假手术组相比,模型组小鼠血清肌酐、血清尿素氮明显升高;和模型组相比,早期应用肾性骨病方干预后小鼠腰椎骨丢失情况较晚期各组得到明显改善;早期组小鼠 L₅ 腰椎 Osterix 表达明显升高而 Cathepsin K 表达明显降低;与之一致,TRAP 染色显示早期应用肾性骨病方可以显著抑制破骨细胞活性,降低破骨细胞数量。结论:早期应用肾性骨病方可以有效改善 5/6 肾切除小鼠肾功能,缓解骨丢失。

[关键词] 肾性骨病;5/6 肾切除;肾性骨病方;肾功能;骨丢失

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)10-0001-08

Study on the Mechanism of Shenxinggubing Decoction on Bone Loss in Mice after 5/6 Nephrectomy

ZHANG Hao^{1,2} WANG Jing^{1,3,4,5*} ZHOU Lin^{1,2} ZHAO Dongfeng^{1,3,4}
ZHAO Yongjian^{1,3,4} WEIXiaoen^{1,2} WANG Yongjun^{1,3,4} SHU Bing^{1,3,4△}

¹ Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China;

² Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

³ Institute of Spinal Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China;

⁴ Key Laboratory of Ministry of Education (Theory and Therapy of Muscles and Bones), Shanghai 200032, China;

⁵ Shanghai Geriatric Institute of Chinese Medicine, Shanghai 200000, China.

Abstract Objective: To compare the protective mechanism of shenxinggubing decoction on bone loss in 5/6 nephrectomized mice at different stages. **Methods:** A total of 150 male

C57BL/6J mice of 3-month-old were selected to establish the mouse model of chronic renal failure and randomly divided into sham group, model group, Shenxinggubing (SXGBF) group and Rocaltrol group. Shenxinggubing decoction and Rocaltrol were orally administrated at postoperative 1 week stage and 4 weeks stage respectively. After 8 weeks administration, L₅ vertebrae, serum and kidney tissue of mice were taken to detect serum creatinine (CREA) and blood urea nitrogen (BUN). Arsin blue/orange G, Micro-CT scanning and reconstruction, and immunohistochemistry was used to evaluate bone condition in lumbar 5 vertebrae (L₅). **Results:** Compared with sham group, serum CREA and BUN were significantly increased in model group. Compared with the model group, the bone loss of mics lumbar vertebra in the groups with early intervention of SXGBF decoction were sig-

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1704300)

国家自然科学基金项目(81673991,81973876)

上海市重中之重临床医学中心建设项目
(2017ZZ01010)

上海市卫计委科研项目(20174Y0192)

教育部创新团队发展计划项目(IRT1270)

科技部重点领域创新团队项目(2015)

¹ 上海中医药大学附属曙光医院(上海,200000)

² 上海中医药大学

³ 上海中医药大学脊柱病研究所

⁴ 教育部重点实验室(筋骨理论与治法)

⁵ 上海市中医老年病研究所

* 共同第一作者

△通信作者 E-mail:siren17721101@163.com

nificant improved than the late groups. In the early group, the expression of osterix in L₅ lumbar vertebra was significantly increased and Cathepsin K was significantly decreased. In accordance with this, TRAP staining showed that early application of kidney osteopathy prescription could significantly inhibit the activity of osteoclasts and reduce the number of osteoclasts. **Conclusion:** The early application of SXGBF decoction effectively relieve renal insufficiency and bone loss in 5/6 nephrectomized mice.

Keywords: renal osteodystrophy; Shenxinggubing decoction; 5/6 nephrectomy; renal function; bone loss

慢性肾功能不全患者常遭遇一系列骨骼疾病及血钙磷代谢紊乱,被称为肾性骨营养不良或肾性骨病。其中慢性肾脏疾病及骨矿物质代谢异常被称为慢性肾脏病矿化性骨病(CKD-MBD)。在中低收入的慢性肾脏病患者中,肾性骨病的患病率高达 30%。在这些患者中,几乎 100%的晚期肾脏病患者都患有肾性骨病^[1]。研究表明,慢性肾脏病早期即已出现了骨形成率的降低和低转换型骨代谢的表现^[2-3],这表明在肾功能不全早期就已经出现了骨代谢异常,如果能早期进行有效干预,则有可能延缓肾性骨病的发生发展。笔者分析了中医骨伤大家施杞教授治疗原发性骨质疏松症以及伴有慢性肾病患者的 2 000 多张中药处方,经过配伍网络分析、核心药物及药对发现等方法,形成了防治该病的肾性骨病基础方,并使用国际上经典的了肾性骨病动物模型一两阶段 5/6 肾切除模型,分别于早期(手术后 1 周)、晚期(手术后 1 个月)给予肾性骨病方干预并分析早期应用肾性骨病方治疗肾性骨病的疗效差异,为中医药治疗肾性骨病奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

所有动物实验均按上海中医药大学伦理委员会规定进行操作。选择 3 个月龄 SPF 级成年雄性 C57BL/6J 小鼠(Slac Laboratory,中国),饲养温度为(23±1)℃,湿度为 55%±5%,自由饮水、摄食。采用两阶段 5/6 肾脏切除的方法进行造模。予以腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg),待角膜反射消失、肌力下降后,俯卧位固定在手术台上,小鼠专用剃毛刀清除手术区域毛发,局部消毒后取后背正中旁开一指,肋骨下 0.5 cm 处纵行切口约 0.5 cm,依次切开皮肤、皮下组织及肌肉组织,暴露左侧肾脏,剥离肾脏包膜,保护肾上腺,于肾脏中上及中下 1/3 处斜形切除上下肾极,压迫止血后,回纳左肾,逐层关闭伤口。1 周后完整切除右侧肾脏;假手术组小鼠钝性剥除肾脏包膜后,不切除肾脏。

70 只 3 个月龄 C57BL/6J 小鼠随机分为 7 组,每组 10 只,分为假手术组(0 个月、1 个月、2 个月、3 个月)和模型组(1 个月、2 个月、3 个月)。模型组行 5/6 肾切除术后 1、2、3 个月取材,假手术组分别在假手术时、假手术后 1 个月、2 个月、3 个月取材。

80 只 3 个月龄 C57BL/6J 小鼠随机分为 8 组,每

组 10 只,分别为早期组(包括假手术组、模型组、肾性骨病方组和罗盖全组)和晚期组(包括假手术组、模型组、肾性骨病方组和罗盖全组)。早期组于术后 1 周开始给药,晚期组于术后 1 个月开始给药,各组均采用灌胃给药,1 次/d,给药 8 周后取材。其中假手术组和模型组小鼠给予等量的生理盐水。

1.2 试验药物

肾性骨病方由淫羊藿 12 g、补骨脂 9 g、女贞子 12 g、墨旱莲 9 g、蛇床子 12 g、枸杞子 12 g、骨碎补 15 g、桃仁 12 g、鸡血藤 12 g、海螵蛸 12 g、三棱 9 g、莪术 9 g、熟地黄 15 g、牛膝 15 g、知母 12 g、制大黄 12 g 组成。肾性骨病方中各药材及罗盖全胶丸(0.25 μg×10 粒/盒,罗氏制药)均购自上海中医药大学附属龙华医院。肾性骨病方采用传统方法煎煮 2 次后浓缩保存,罗盖全于生理盐水中制成混悬液备用。肾性骨病方浓缩煎剂和罗盖全混悬液的小鼠用量按照 Meeh-Rubner 氏公式,根据人与小鼠体表面积进行换算,等效剂量为 0.186 付(片)/kg/d。将每付中药煎成 50 mL 汤剂,每粒罗盖全配制成 50 mL 混悬液,按每只小鼠每次 0.1 mL/10 g 灌胃。

1.3 实验试剂及仪器

1.3.1 实验试剂 兔 IgG 免疫组化试剂盒(SA1022),武汉博士德生物工程有限公司;苏木素染液(D005),南京建成科技有限公司;阿尔辛蓝染液(A5268-25G),美国 Sigma;橙黄 G(O3756-25G),美国 Sigma;萘酚 AS-BI 磷酸盐,美国 Sigma;蔷薇苯胺,美国 Sigma;马松染试剂盒(D026-1-1),南京建成生物工程研究所;Rb mAb to beta catenin(ab32572,1:500 稀释),Abcam;抗骨钙蛋白抗体(ab13420,1:200 稀释),Abcam;抗 Osterix 抗体(ab22552,1:200 稀释),Abcam;抗 MMP9 抗体(ab38898,1:200 稀释),Abcam。

1.3.2 主要试验仪器 徕卡轮转式石蜡切片机(RM2135)、徕卡摊片机(HI1210)、徕卡烘片机(HI1220)、徕卡组织脱水机(TP1020)、徕卡石蜡包埋机(EG1150 C+H),德国 Leica 公司;Micro-CT 仪(CT80),瑞士 Bassersdorf 公司。

1.4 方法

1.4.1 标本收集 腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)

麻醉小鼠后,迅速摘除小鼠眼球并取血,全血室温静置 30 min 后,于 4 ℃ 以 3 500 r/min 的速度离心 10 min,收集血清,−80 ℃ 保存备用。颈椎脱位处死小鼠,取 L₅ 椎体放于 10% 中性福尔马林固定液 24 h,随后流水冲洗 2 h,放于 75% 酒精中备用。

1.4.2 小鼠肾脏功能检测 采用双位点免疫放射测定法检测小鼠血尿酸氮(BUN)和血清肌酐(Scr)水平。具体操作按试剂盒说明书操作(Immutopics, Inc., San Clemente, 美国)。血清钙、磷总浓度分别采用邻甲酚他林络合物法和磷钼酸盐紫外比色法测定。

1.4.3 Micro-CT 扫描和三维重建 采用 Micro-CT, 以 55 kV 电压, 72 μA 电流, 300 ms 积分时间, 10 μm 横断面厚度及空间分辨率的参数扫描小鼠 L₅ 腰椎椎体, 并以 CT 阈值参数 250~1 000 范围, 重建三维结构和测量形态。采用 μCT 评估软件系统分析 BV/TV 结构参数, 包括骨小梁的体积(BV)、样本总体积(TV)及二者比值骨体积分数(BV/TV); 骨小梁数目(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁分离度(Tb. Sp)等骨小梁参数。

1.4.4 小鼠腰椎骨组织形态学检测 小鼠腰椎 Micro-CT 扫描完成后, 于 10% EDTA(pH 7.4) 脱钙液中脱钙, 每 2 d 换液, 脱钙 10 d 后常规脱水浸蜡后石蜡包埋。腰椎石蜡标本进行 4 μm 冠状位连续切片, 晾干后 60 ℃ 烤箱过夜进行阿尔辛兰/橙黄 G 染色。切片常规脱蜡至水, 在 1% 阿尔辛蓝染液中染色 30 min, 清水冲洗后分别在 1% 盐酸乙醇溶液中分化 5 s, 0.5% 氨水中返蓝 20 s。95% 乙醇溶液放置 1 min, 0.05% 橙黄 G 染液染色 1 min。常规脱水透明后中性树脂封片, 60 ℃ 烤箱过夜后, 于普通光镜下观察, 图像分析系统采片。

1.4.5 免疫组织化学染色 小鼠腰椎石蜡切片常规脱蜡至水, 放入 3% H₂O₂ 甲醇溶液(1:50 稀释)中 15 min 消除内源性过氧化物酶; 0.1% 胰蛋白酶 37 ℃ 消化 10 min, 5% 胎牛血清(BSA)室温封闭 1 h 后加入一抗(anti-Osterix, ab22552, Abcam; anti-Cathpsin K, ab19027, Abcam), 4 ℃ 摇床孵育过夜, PBS 清洗后, 给予相应生物素化二抗室温孵育 30 min; DAB 溶液显色后依次苏木素复染, 盐酸乙醇分化, 氨水返蓝, 常规脱水透明后中性树脂胶封片。

1.4.6 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色 小鼠腰椎石蜡切片常规脱蜡至水, 将 1.5 mL 萘酚 ASBI 磷酸盐/乙二醇单乙醚溶液加入 150 mL 的 Basic stock 中, 37 ℃ 孵育切片 10 min; 取 3 mL 的亚硝酸钠水溶液和 3 mL 副蔷薇苯胺/盐酸溶液混合, 静置 2 min 后加入 150 mL 的 Basic stock 中, 37 ℃ 孵育切片 5 min。切片依次经苏木素复染、盐酸乙醇分化、氨水返蓝, 常规脱水透明后中性树脂胶封片。

1.5 统计学方法

数据使用 SPASS 19.0 统计软件进行统计学分析。各组计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据之间比较, 满足正态分布的采用独立样本 *t* 检验; 不满足正态分布及方差不齐的资料, 则采用非参数检验。P<0.05 组间比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5/6 肾切除术后小鼠肾功能下降及骨丢失

为验证小鼠 5/6 肾切除模型的建立及药物干预时间, 分别于 5/6 肾切除术后 1、2、3 个月收集小鼠血清检测 CREA 和 BUN 水平, 并收集 L₅ 椎体检测骨密度变化。和假手术 0 个月组相比, 5/6 肾切除术后第 1 个月开始, 小鼠血清 CREA 和 BUN 水平就出现明显升高, 差异有统计学意义(P<0.01); 在手术第 2 个月和 3 个月时, 血清 CREA 和 BUN 仍维持在显著高于假手术组的水平, 差异有统计学意义(图 1a-b, P<0.01)。与此一致的是, 5/6 肾切除术后第 1 个月开始, 模型组小鼠腰椎 BV/TV 显著降低, 并维持至手术 3 个月, 差异有统计学意义(P<0.01, 图 1c-d)。这些结果表明, 5/6 肾切除 1 个月后, 小鼠已经出现无法自行恢复的肾功能降低和骨量减少。骨小梁形态分析显示, Tb. N 在术后 1 个月出现显著降低, 差异有统计学意义(P<0.01), 变化早于 Tb. Th 和 Tb. Sp, 后两者从术后 2 个月时出现显著降低, 这与文献报道的肾功能不全首先出现骨形成降低相吻合(图 1e-f)。

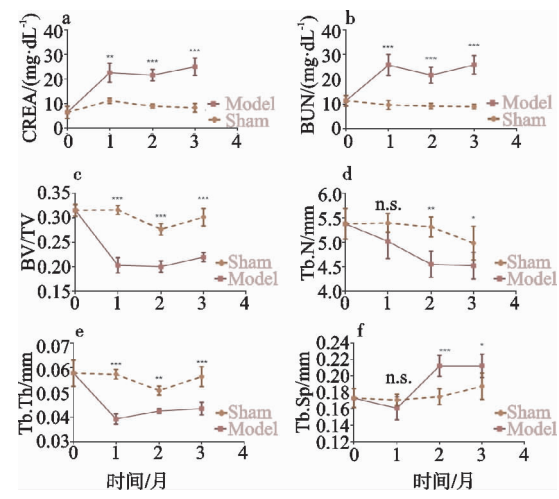


图 1 给与两阶段 5/6 肾脏切除后, 假手术组和模型组小鼠肾脏功能及骨代谢指标变化 (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001)

2.2 肾性骨病方早期干预改善 5/6 肾切除小鼠肾功能

和模型组相比, 肾性骨病方早期干预后, 5/6 肾切除小鼠血清 CREA 和 BUN 水平均明显降低, 差异有统计学意义(P<0.05); 而肾性骨病方晚期干预小鼠血清 CREA 和 BUN 水平没有明显变化。罗盖全无论

早期干预或晚期干预,小鼠血清 CREA 和 BUN 均未见明显改善(见图 2)。

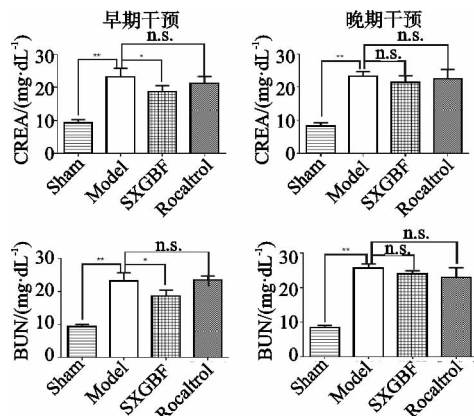


图 2 早晚期应用肾性骨病方后,不同组小鼠肾脏功能(CREA/BUN)变化(* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$)

2.3 肾性骨病方早期干预改善 5/6 肾切除小鼠骨质疏松

与模型组相比,肾性骨病方和罗盖全早期干预后,5/6 肾切除小鼠 L_5 椎体 BV/TV 均显著增加(见图 3a),与肾性骨病方组比,差异有统计学意义($P<0.05$),与罗盖全组比,差异有统计学意义($P<0.01$)。其中肾性骨病方可以显著提高小鼠 L_5 腰椎 Tb. N,差异有统计学意义($P<0.01$)(见图 3b),降低 Tb. Sp,差异有统计学意义($P<0.01$)(见图 3d);罗盖全可以显著提高 Tb. N 和 Tb. Th,降低 Tb. Sp,差异有统计学意义($P<0.01$)(见图 3b-d)。肾性骨病方晚期干预则对 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 和 Tb. Sp 均无显著作用,罗盖全晚期干预可以提高 5/6 肾切除小鼠 L_5 椎体 BV/TV,差异有统计学意义($P<0.01$),增加 Tb. Th,差异有统计学意义($P<0.01$),肾性骨病方对 Tb. N 和 Tb. Sp 亦没有显著作用(见图 3e-h)。

小鼠 L_5 椎体重建(见图 4a)及阿尔辛兰/橙黄 G 染色(见图 4b)表明:肾性骨病方、罗盖全早期干预及罗盖全晚期干预,5/6 肾切除小鼠 L_5 椎体骨量及骨小梁微结构较模型组均有所提高。

2.4 肾性骨病方早期干预缓解 5/6 肾切除小鼠的骨形成下降,抑制破骨细胞数量

笔者进一步检测了小鼠 L_5 椎体中成骨特异性指标 Osterix、破骨细胞数量和特异性指标 Cathpesin K 的表达。

免疫组织化学染色显示,与假手术组相比,5/6 肾切除小鼠 L_5 椎体中 Osterix 表达显著降低,肾性骨病方及罗盖全早期干预后,Osterix 表达明显升高。肾性骨病方晚期干预对 Osterix 蛋白表达无明显作用,而罗盖全晚期干预则仍可以提高 Osterix 的表达水平,差异有统计学意义(见图 5, $P<0.01$)。

与之一致的是,肾性骨病方及罗盖全早期干预可

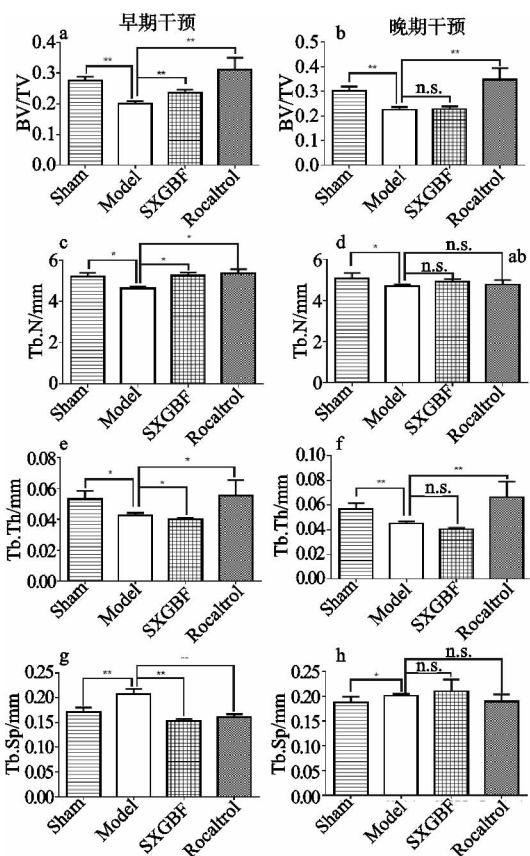


图 3 早晚期用药后,各组小鼠骨代谢指标(Micro-CT)结果(* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$)

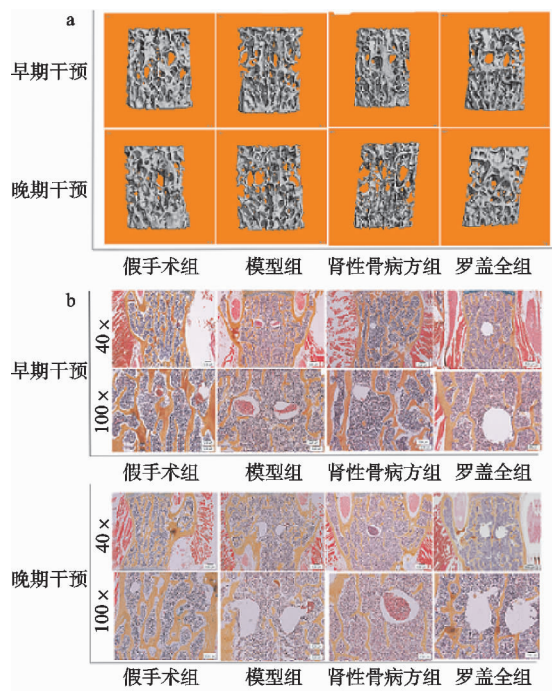


图 4 晚期用药后,不同组小鼠 L_5 椎体 Micro-CT 重建结果及阿尔辛兰/橙黄 G 染色结果

以显著降低 5/6 肾切除小鼠 L_5 椎体 Cathpesin K 表达。肾性骨病方晚期干预对 Cathpesin K 蛋白表达无明显作用,而罗盖全晚期干预则仍可以抑制 Cathpesin K 的表达,差异有统计学意义(见图 5, $P<0.01$)。

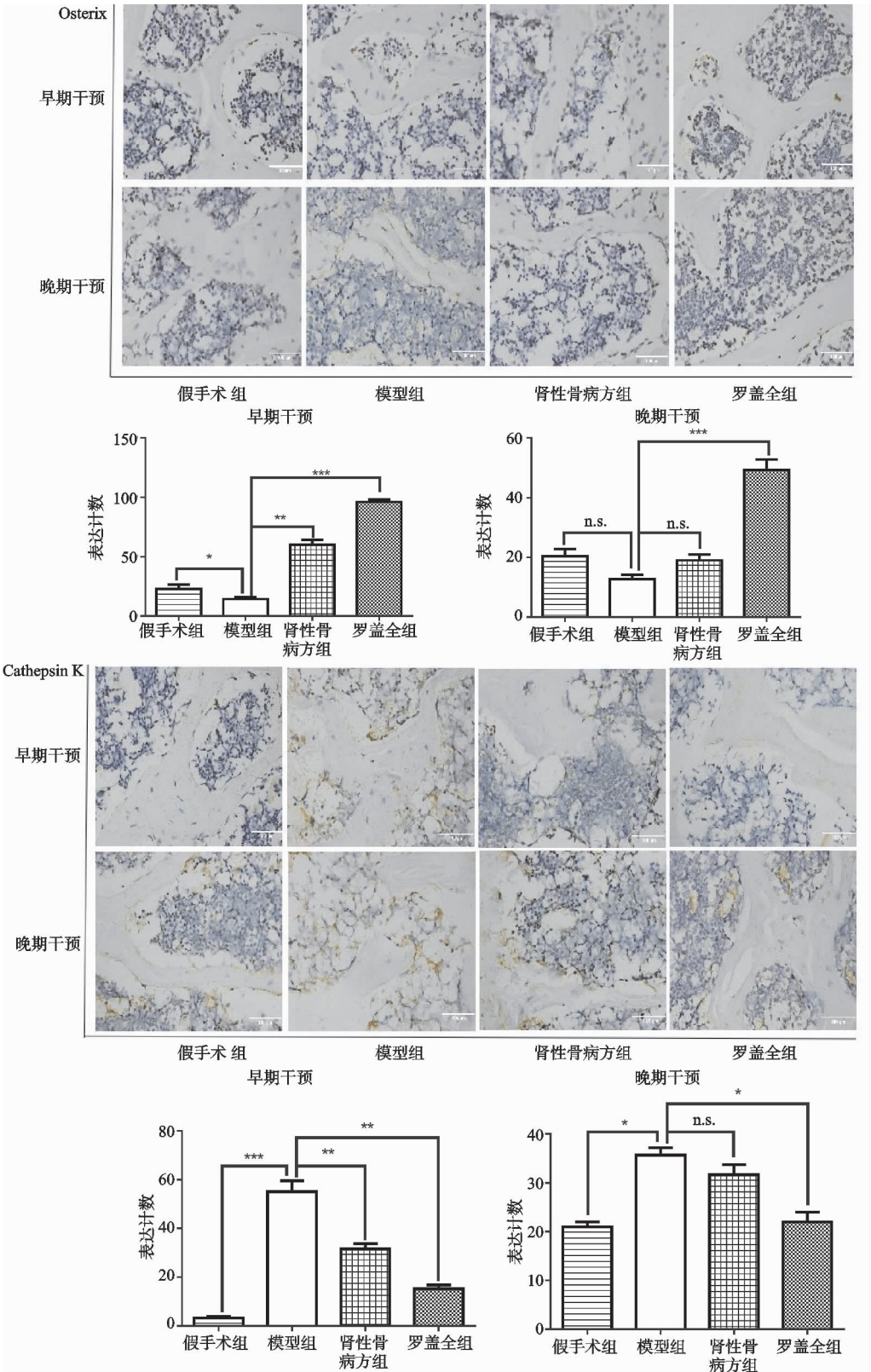


图 5 早晚期用药后,不同组小鼠 L₅ 椎体免疫组化蛋白表达-成骨相关蛋白 Osterix/破骨相关蛋白表达 Cathepsin K (* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$)

2.5 TRAP 染色显示

TRAP 染色结果显示,与模型组相比,肾性骨病方和罗盖全早期干预后,5/6 肾切除小鼠 L₅ 椎体破骨细胞数量明显下降,其中早期给予罗盖全处理的小鼠椎体破骨细胞数量最少;晚期组中,罗盖全组较模型组

有破骨细胞数量明显下降,其他各组均未见明显改变,差异有统计学意义(见图 6, $P<0.01$)。

3 讨论

3.1 肾性骨病发病特点

慢性肾脏疾病(CKD)已成为当今全球范围的流

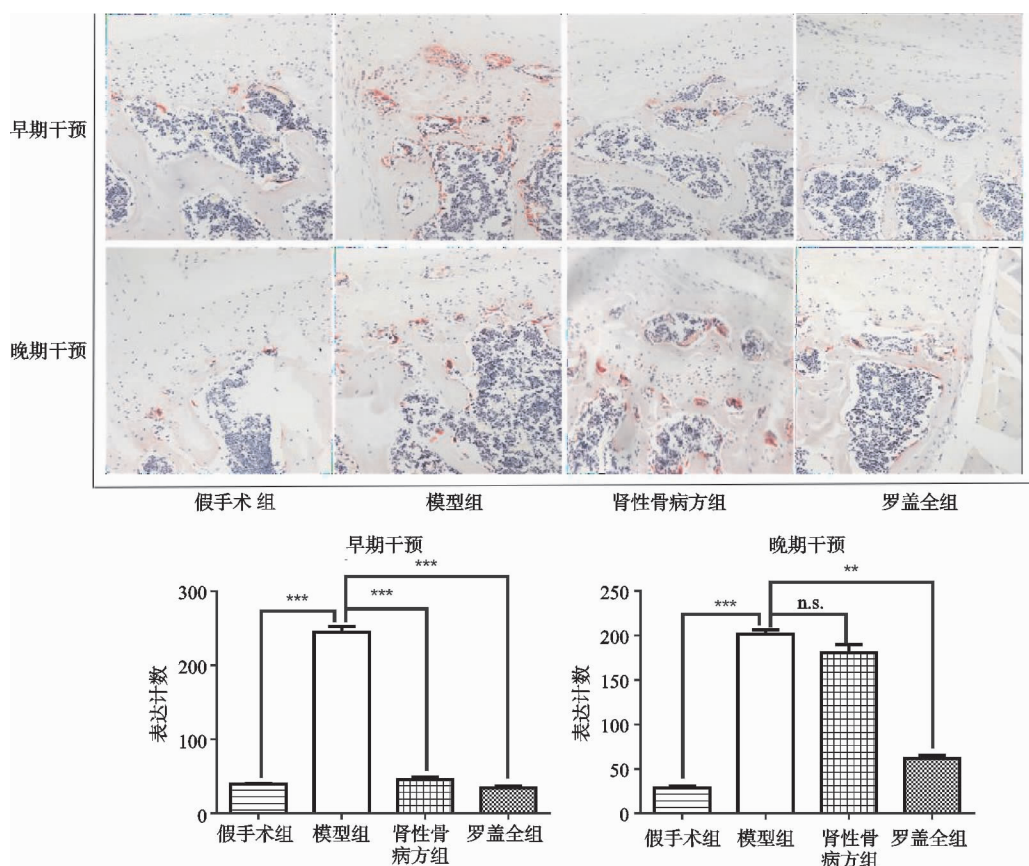


图6 早晚期用药后,不同组小鼠L₅椎体TRAP染色结果(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

行病,是非传染性疾病的一部分,严重影响着世界各国卫生保健和经济发展。研究指出在肾脏疾病的每个阶段即使是早期,CKD患者的骨折风险较正常患者也明显升高,这表明了CKD和骨质疏松以及骨质疏松性骨折之间的关系。其中,CKD-MBD合并有心血管疾病的患者临床死亡率极高^[4-5]。然而,对于肾性骨病的研究多集中于肾功能不全晚期尿毒症阶段,而对于肾功能不全早期骨代谢的研究相对很少。实际上,肾功能不全早期就已经出现了骨代谢的异常,以骨形成减低为主,因此在肾功能不全早期开始防治肾性骨病可能会收到更好的疗效。

3.2 中医病因病机及治疗方法

肾性骨病可归于中医“骨痿”“虚劳”“骨范畴痹”等。一般认为肾性骨病的病机是各种先后天的病理因素致使肾气衰弱,造成慢性肾功能不全,精不生髓,骨失所养,即肾精衰退致骨骼退变^[6]。

肾精亏虚是肾性骨病的重要病机,因此合理运用补肾填精壮骨方药对于改善肾性骨病有重要作用;由于肝肾同源、脾为后天之本,临床施治亦常采用健脾益肾、肝肾同治等法;此外肾性骨病是继发性骨病,在临床诊治时,需要兼顾患者原发病即慢性肾病的病理特点和肾功能状态,常综合运用补虚、化痰、祛浊、解毒等法。临床报道中,淫羊藿、补骨脂、女贞子、墨旱莲、蛇床子等中药最长被用于骨质疏松的治疗^[7-12]。这些

中药的活性成分主要有淫羊藿苷、补骨脂素、女贞苷、特女贞苷,多项研究表明,这些活性成分具有显著的抗骨质疏松的作用。

实验表明淫羊藿苷能增加BMSC来源的成骨细胞数量,促进前成骨细胞的成熟,同时抑制原代成骨细胞的脂肪细胞转分化。淫羊藿苷体外介导成骨多种信号转导通路包括:BMP(骨形态形成蛋白)、NO(一氧化氮)、MAPK(增殖蛋白激酶)和Wnt/ β -catenin途径^[13-16]。淫羊藿苷还可通过抑制活性氧生成而发挥成骨作用;淫羊藿苷在人成骨细胞hFob1.19和小鼠成骨细胞MC3T3-E1中均可激活BMP-2/Smad4信号转导通路^[17-18]。在MC3T3-E1细胞中,淫羊藿苷可以诱导ERK(细胞外信号调节激酶)和JNK(c-Jun-N末端激酶)的活化,但p38激酶活性不受影响^[14]。另外阻断雌激素介导的信号转导可减弱淫羊藿苷诱导骨形成的作用。淫羊藿苷也能通过提升 β -catenin mRNA表达,促进 β -catenin亚细胞再分配,提高鼠BMSC GSK-3 β (糖原合成酶激酶3)磷酸化水平^[14]。补骨脂素处理的CD4⁺T细胞可显著促进RANKL诱导的RAW264.7向破骨细胞分化,而补骨脂素处理CD4⁺T可显著抑制RANKL诱导的RAW264.7破骨细胞的分化和骨吸收^[19]。Li等^[20]用30只激素诱导骨质疏松模型的家兔,每天给予(6g)35mg/kg补骨脂素提取物连续灌胃给药8周,与模型组相比,实验组的

PPAR γ 明显减少,骨钙素的表达显著增加,实验证实补骨脂素能降低骨髓细胞的脂肪生成,促进钙沉积,预防骨质疏松。Dong 等^[21]发现,给予女贞子有效提取物女贞苷处理(700 mg/kg 灌胃)12 周可刺激卵巢切除术(OVX)大鼠肾脏 1-25-羟化酶和维生素 D 受体(VDR)表达,增加循环水平 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 水平,进而改善 OVX 大鼠骨质疏松情况。应用蛇床子中的主要有效组分蛇床子素腹腔注射,可以有效缓解 5/6 肾切除小鼠的骨量减少,其主要机制与抑制 5/6 肾切除导致的破骨细胞形成增加有关^[22]。而在体外研究中,NIU 等发现蛇床子素可以提高成骨细胞 BMP-2 表达进而促进成骨分化^[23];Zhao 等^[24]研究发现,淫羊藿苷通过诱导 Runx2 表达激活 BMP 信号通路,在 MC3T3-E1 细胞和小鼠原代成骨细胞中发挥了强大的成骨作用;Zhang 等^[28]给予雌性 OVX 大鼠墨旱莲提取物(1.4 g/kg 灌胃)12 周后,给药组大鼠 BMD 以及血清降钙素(CT)明显高于对照组,胫骨 mRANKL 表达明显降低,但是对甲状旁腺激素无明显影响,这是其对 OVX 大鼠骨保护作用的部分原因。

肾性骨病方以淫羊藿、补骨脂、女贞子、墨旱莲、蛇床子等补肾中药为基础方,佐以制大黄,知母、牛膝清热解毒,利湿去浊;熟地黄、菟丝子、海螵蛸补肾填精;鸡血藤、桃仁、三棱、莪术活血祛瘀,通经去浊。全方以补肾填精益髓为法则,佐以利湿去浊,通调水道之法。本方剂为上海中医药大学附属龙华医院施杞教授治疗骨质疏松慢性肾脏病患者的经验方,为临床治疗肾性骨病的经典方和有效方。

3.3 肾性骨病方治疗肾性骨病的机制

肾性骨病早期骨代谢呈低转换特点,主要表现为血清骨代谢指标降低;随着疾病的发展,由于机体代偿机制,中期骨代谢出现缓慢恢复,但此时肾脏就已经出现了不可逆的损伤;到了疾病晚期,肾脏失代偿,血清骨代谢指标变化同时还出现骨密度的显著降低,此期的骨代谢特点为高转换型^[26-28]。因此笔者在小鼠慢性肾脏病早期就给予补肾填精益髓治疗,收到良好效果。结果证明在小鼠 5/6 肾脏切除术后早期应用肾性骨病方干预可有效降低小鼠血清肌酐及血清尿素氮(CREA\BUN)水平,而晚期应用肾性骨病方未观察到小鼠肾脏功能的明显变化。有趣的是笔者同时观察到早期应用肾性骨病方可以显著改善肾性骨病小鼠骨丢失情况。和模型组相比,早期用药后各组小鼠 L $_5$ 椎体 BV/TV、Tb. N 值均显著升高,Tb. Sp 下降,而晚期组只有罗盖全骨结构较模型组有明显改善。与之相一致的是:阿尔辛兰/橙黄 G 染色、L $_5$ 椎体的三维重建。除此之外,笔者还发现早期应用肾性骨病方还可以促进成骨相关蛋白 Osterix 表达,抑制破骨相关蛋白

Cathpesin K 表达,TRAP 破骨相关染色与之结果一致。

综上所述笔者得出结论,在早期应用肾性骨病方可以有效改善 5/6 肾脏切除后小鼠的肾脏功能,从而缓解因肾脏功能降低导致的继发性骨丢失。其对骨丢失的保护机制笔者推测:早期在肾脏功能尚具有代偿能力阶段给与肾性骨病方可以改善肾脏功能,延缓甚至改善继发性甲旁亢,调节体内钙磷平衡,促进肠道钙吸收,从而纠正骨丢失情况;其次肾性骨病方中大剂量的早期应用补肾中药可以直接作用于成骨/破骨细胞,抑制破骨细胞活性,降低破骨细胞数量并促进成骨细胞分化,从而改善肾性骨病继发骨丢失,相关进一步的机制,还有待于进一步研究。目前,临床对于肾性骨病往往收不到较满意的理临床疗效,本研究依据“肾主骨”理论,从肾论治,早期干预,在丰富“肾主骨”的科学理论内涵的基础上为肾性骨病的临床治疗提供更有效安全的中医治疗方法。

参考文献

- [1] ENE-IORDACHE B, PERICO N, BIKBOV B, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk in six regions of the world (ISN-KDDC): a cross-sectional study[J]. *Lancet Glob Health*, 2016, 4(5): e307-e319.
- [2] PAZIANAS M, MILLER P D. The CKD-MBD syndrome: hysteresis in PTH involvement and PTH administration for its management[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2020, 35(12): 2313-2317.
- [3] MOE S M, NICKOLAS T L. Chapter 60-Renal osteodystrophy and chronic kidney disease-mineral bone disorder[M]// *Principles of Bone Biology*. 4th Edition. Amsterdam: Elsevier, 2020: 1463-1487.
- [4] RROJI M, FIGUREK A, SPASOVSKI G. Should we consider the cardiovascular system while evaluating CKD-MBD? [J]. *Toxins*, 2020, 12(3): 140.
- [5] COVIC A, VERVLOET M, MASSY Z A. et al. Bone and mineral disorders in chronic kidney disease: implications for cardiovascular health and ageing in the general population[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018, 6(4): 319-331.
- [6] 钱学民. “肾藏精,主骨生髓”与肾性骨营养不良辨析[J]. *实用中医内科杂志*, 2010, 24(11): 72-73.
- [7] PHAM C V, PHAM T T, LAI T T, et al. Icariin reduces bone loss in a Rankl-induced transgenic medaka (*Oryzias latipes*) model for osteoporosis[J]. *Journal of Fish Biology*, 2021, 98(4): 1039-1048.
- [8] ZHOU L, POON C C W, WONG K Y, et al. Icariin ameliorates estrogen-deficiency induced bone loss by enhancing IGF-I signaling via its crosstalk with non-genomic ER α signaling[J]. *Phytomedicine*, 2021, 82: 153413.
- [9] ZHANG T, HAN W, ZHAO K, et al. Psoralen accelerates bone fracture healing by activating both osteoclasts and

- osteoblasts (vol 33, pg 5399, 2019) [J]. *Faseb Journal*, 2020, 34(9):13069.
- [10] LI H, MENG D, ZHANG X, et al. Effect of psoralen on the expression of PPAR γ , osteocalcin, and trabecular bone area in rabbits with steroid-induced avascular necrosis of the femoral head [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1):11.
- [11] LI L, CHEN B, ZHU R, et al. Fructus ligustri lucidi preserves bone quality through the regulation of gut microbiota diversity, oxidative stress, TMAO and Sirt6 levels in aging mice [J]. *Aging (Albany N Y)*, 2019, 11(21):9348.
- [12] GUO Y, WANG L, MA R, et al. Effects of water extract from Fructus Ligustri Lucidi on bone structure and metabolism in ovariectomized rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47:1155-1162.
- [13] YAO X, JING X, GUO J, et al. Icaritin protects bone marrow mesenchymal stem cells against iron overload induced dysfunction through mitochondrial fusion and fission, PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10:163.
- [14] LI X, XUE C, WANG L, et al. Osteoprotective effects of osthole in a mouse model of 5/6 nephrectomy through inhibiting osteoclast formation [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4):3769-3776.
- [15] KANG E Y, KIM H K, JUNG J Y, et al. Combined extract of leonurus japonicus Houtt, Eclipta prostrata L., and pueraria lobata ohwi improved hot flashes and depression in an ovariectomized rat model of menopause [J]. *Foods*, 2021, 10(1):180.
- [16] HUANG X, WANG X, ZHANG Y, et al. Absorption and utilisation of epimedin C and icaritin from Epimedium herba, and the regulatory mechanism via the BMP2/Runx2 signalling pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118:109345.
- [17] SUN J, WANG Z, AN W. Protection of icaritin against hydrogen peroxide-induced MC3T3-E1 cell oxidative damage [J]. *Orthopaedic Surgery*, 2021, 13(2):632-640.
- [18] LIN J, ZHU J, WANG Y, et al. Chinese single herbs and active ingredients for postmenopausal osteoporosis: From preclinical evidence to action mechanism [J]. *Bioscience Trends*, 2017, 11(5):496-506.
- [19] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO 2017 clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) [J]. *Kidney Int Suppl*, 2017, 7(1):1-59.
- [20] LUO W, JIANG Y, YI Z, et al. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 promotes osteogenesis by down-regulating FGF23 in diabetic mice [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(8):4148-4156.
- [21] NOAUTHORS LISTED. Chapter 4. 1: Treatment of CKD-MBD targeted at lowering high serum phosphorus and maintaining serum calcium [J]. *Kidney Int*, 2009, 76113:S50-S99.
- [22] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO 2017 clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) [J]. *Kidney Int*, 2017(2):S1-S55.
- [23] WAQAS M, WANG Y, LI A, et al. Osthole, a coumarin derivative assuage thiram-induced tibial dyschondroplasia by regulating BMP-2 and RUNX-2 expressions in chickens [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(9):330.
- [24] MOLINA P, GÓRRIZ J L, MOLINA M D S, et al. What is the optimal level of vitamin D in non-dialysis chronic kidney disease population? [J]. *World J Nephrol*, 2016, 5(5):471-481.
- [25] ZHANG Z G, BAI D, JU D H, et al. Therapeutic effect of aqueous extract from ecliptae herbs on bone metabolism of ovariectomized rats [J]. *Menopause (New York)*, 2013, 20(2):232-240.
- [26] ELIAS R M, DALBONI M A, COELHO A C E, et al. CKD-MBD: from the pathogenesis to the identification and development of potential novel therapeutic targets [J]. *Current Osteoporosis Reports*, 2018, 16(6):693-702.
- [27] BOVER J, UREÑA-TORRES P, ALONSO A M L, et al. Osteoporosis, bone mineral density and CKD-MBD (ID): therapeutic implications [J]. *Nefrología (English Edition)*, 2019, 39(3):227-242.
- [28] HRUSKA K A, SUGATAN T, AGAPOVA O, et al. The chronic kidney disease-Mineral bone disorder (CKD-MBD): advances in pathophysiology [J]. *Bone*, 2017, 100(3):80-86.

(收稿日期:2021-04-07)