

· 药理 ·

基于Klotho-FGF23轴探讨加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠骨保护作用的机制

郭华慧¹, 李美丹², 黄仁发^{1*}, 梁群卿³, 李贺生¹, 刘雪频¹, 王若琳¹, 沈思亨¹

(1. 广州中医药大学深圳医院(福田), 广东深圳 518034; 2. 肇庆市中医院, 广东肇庆 525000;
3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530011)

[摘要] 目的: 观察加味六味地黄汤对高磷联合腺嘌呤大鼠血清成纤维细胞生长因子23(FGF23), 全段甲状旁腺激素(iPTH)和1,25-二羟维生素D₃[1,25(OH)₂D₃]水平及肾骨组织Klotho和FGF23蛋白表达的影响, 探讨加味六味地黄汤调控Klotho-FGF23对治疗肾性骨病的作用机制。方法: 健康成年SD大鼠130只, 随机分为正常组(n=10), 高磷组(n=30), 模型组(n=30), 加味六味地黄汤组(n=30)和骨化三醇组(n=30)5组, 各组组内分8, 10, 12周3个时间点。正常组大鼠普通饮食饲养, 高磷组高磷饮食饲养, 其他组大鼠腺嘌呤及高磷饮食饲养建立肾性骨病大鼠模型, 正常组、高磷组、模型组大鼠均予以蒸馏水(10 mL·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃; 加味六味地黄汤组予加味六味地黄汤药液(2.556 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃; 骨化三醇组予骨化三醇(0.09 μg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃。结果: 与正常组和高磷组8, 10, 12周比较, 模型组大鼠血尿素氮(BUN), 血肌酐(Scr), 血磷, iPTH, FGF23, 肾间质纤维化评分, 肾骨组织FGF23蛋白均显著增高, 血清钙水平, 1,25(OH)₂D₃和肾、骨组织Klotho蛋白表达均降低(P<0.05, P<0.01); 与模型组8, 10, 12周比较, 加味六味地黄汤组和骨化三醇组大鼠BUN, Scr, 血磷, iPTH, FGF23, 小管间质半定量评分, 肾骨组织FGF23蛋白表达均显著降低, 血清钙水平, 1,25(OH)₂D₃和肾、骨组织Klotho蛋白增高(P<0.05, P<0.01); 而加味六味地黄汤组和骨化三醇组两组间BUN, Scr, 血磷, iPTH, FGF23, 肾间质纤维化评分, 肾、骨组织FGF23蛋白表达差异无统计学意义。结论: Klotho-FGF23轴调控钙磷代谢可能参与了肾性骨病过程; 加味六味地黄汤能有效改善肾功能、肾脏和骨组织病理, 调节钙磷代谢紊乱, 其骨保护作用机制与调控Klotho-FGF23轴有关。

[关键词] 加味六味地黄汤; 肾性骨病; 成纤维细胞生长因子23; Klotho蛋白

[中图分类号] R22; R242; R285.5; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0061-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212496

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211027.2021.008.html>

[网络出版日期] 2021-10-28 10:30

Mechanism of Modified Liuwei Dihuangtang in Bone Protection of CKD-MBD Model Rats: An Exploration Based on Klotho-FGF23 Axis

GUO Hua-hui¹, LI Mei-dan², HUANG Ren-fa^{1*}, LIANG Qun-qing³, LI He-sheng¹, LIU Xue-pin¹,
WANG Ruo-lin¹, SHEN Si-heng¹

(1. Shenzhen Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Futian), Shenzhen 518034, China;
2. Zhaoqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhaoqing 525000, China;
3. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of modified Liuwei Dihuangtang on serum fibroblast

[收稿日期] 20210511(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760805, 81460682); 广东省自然科学基金项目(2020A151501572); 深圳市科技创新委员会课题项目(JCYJ20190809102413156)

[第一作者] 郭华慧, 硕士, 从事急性慢性肾衰竭的中西医结合防治研究, E-mail: 995114424@qq.com

[通信作者] * 黄仁发, 博士, 主任医师, 教授, 从事急性慢性肾衰竭的中西医结合防治研究, Tel: 0755-23537100, E-mail: huangrenfa1972@163.com

growth factor 23 (FGF23), full-length intact parathyroid hormone (iPTH), and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ [1, 25(OH)₂D₃] levels and Klotho and FGF23 protein expression in renal and bone tissues of rats exposed to high phosphorus combined with adenine, so as to explore the mechanism of modified Liuwei Dihuangtang against renal osteopathy. **Method:** One hundred and thirty healthy adult SD rats were randomly divided into five groups, namely normal group ($n=10$), high phosphorus group ($n=30$), model group ($n=30$), modified Liuwei Dihuangtang group ($n=30$), and calcitriol group ($n=30$), and rats in each group were further classified based on three time points, namely 8, 10, and 12 weeks. Rats in the normal group were fed with normal diet, the ones in the high phosphorus group with high phosphorus diet, and those in the other groups with adenine and high phosphorus diet for inducing renal osteopathy. Rats in the normal group, high phosphorus group, and model group were intragastrically administered with distilled water ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the ones in the modified Liuwei Dihuangtang group with modified Liuwei Dihuangtang ($2.556 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and those in the calcitriol group with calcitriol ($0.09 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). **Result:** Compared with the normal group and high phosphorus group at the weeks of 8, 10 and 12, the model group displayed significantly elevated blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), serum phosphorus, iPTH, FGF23, renal interstitial fibrosis score, and FGF23 expression in renal and bone tissues, but lowered serum calcium and 1, 25(OH)₂D₃ and Klotho protein expression in renal and bone tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group at the weeks of 8, 10 and 12, the modified Liuwei Dihuangtang and calcitriol both significantly decreased the serum BUN, SCr, serum phosphorus, iPTH, FGF23, tubulointerstitial semi-quantitative score, and FGF23 expression in renal and bone tissues, while increased the serum calcium, 1, 25(OH)₂D₃, and Klotho protein expression in renal and bone tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). There was no significant difference in the above-mentioned indexes between the modified Liuwei Dihuangtang group and the calcitriol group at the same time point. **Conclusion:** Klotho-FGF23 axis is probably involved in renal osteopathy. The modified Liuwei Dihuangtang effectively improves renal function, alleviates pathological changes in renal and bone tissues, and regulates calcium and phosphorus metabolism to protect the bone, which is related to its regulation of Klotho-FGF23 axis.

[Keywords] modified Liuwei Dihuangtang; renal osteopathy; fibroblast growth factor 23 (FGF23); Klotho protein

慢性肾脏病矿物质和骨代谢异常(CKD-MBD)是慢性肾脏病(CKD)的主要并发症之一,不仅会引起骨痛、骨骼畸形、骨折等,还会导致血管及其他软组织钙化,引起心血管事件发生,严重影响CKD患者生活质量及预后^[1]。因而预防和治疗CKD-MBD,预防骨质流失,延缓CKD-MBD进展,提高患者生活质量,降低终末期肾病(ESRD)的死亡率,是目前亟需解决的问题。

成纤维细胞生长因子23(FGF23)是骨源性多肽激素中FGF19亚家族里的重要一员^[2],在高磷血症和1,25-二羟维生素D₃[1,25(OH)₂D₃]水平升高的刺激下成骨细胞和骨细胞分泌合成,具有调节磷代谢平衡作用,还可抑制1,25(OH)₂D₃产生,促进甲状旁腺激素(PTH)的合成分泌^[3-4]。Klotho是一种单程跨膜蛋白,最初被鉴定为抗衰老蛋白,主要来源于肾脏,在肾脏及甲状旁腺等组织显著表达^[5],Klotho是FGF23的共受体,Klotho可活化FGF23因

子,相互作用并参与维持骨骼矿物质稳态^[6]。近年来有研究显示,Klotho和FGF23在调节矿物质和骨代谢中具有重要作用^[7]。在CKD和ESRD患者中,可溶性Klotho明显降低,而FGF23增加,因此被认为是CKD和ESRD的特异性生物标志物^[8]。通过调节Klotho-FGF23平衡可以改善CKD-MBD大鼠骨代谢紊乱,提示Klotho-FGF23轴可能成为治疗CKD-MBD的一个靶点。

在CKD-MBD的发生发展过程中,其本虚标实的病机特点已为大多数医家所认可,以肾虚为本,“瘀、毒、湿、浊、痰”为标,内虚致瘀,湿毒互结,瘀毒交结,虚实夹杂为肾性骨病的病机特点^[9]。加味六味地黄汤在经典方剂六味地黄汤基础上,加大黄、丹参、桂枝、黄芪、淫羊藿;取大黄祛瘀攻逐解毒,丹参活血祛瘀,桂枝温阳利水,黄芪健脾益气利水,以及淫羊藿补肾阳、强筋骨等功效,全方以补肾利水、祛瘀排毒及强筋骨之功。课题组依据CKD-MBD

本虚标实、虚实夹杂的病理特点,取该方补肾利水、祛瘀排毒之功。课题组前期研究表明,加味六味地黄汤可改善单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾小管间质病变及肾功能,通过下调肾小管转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达,上调E-钙黏附蛋白(E-cadherin)的表达,从而发挥抗纤维化作用。进一步研究发现,加味六味地黄汤还可抑制大鼠肾脏FGF23蛋白表达,通过下调肾脏FGF23蛋白表达发挥肾保护作用^[10-13]。此外,更新的研究发现,通过降低db/db小鼠FGF23水平,能明显增加肾脏Klotho和FGF受体1(FGFR1)的表达,使体内FGF23-Klotho轴恢复,而小鼠的钙磷代谢也得到明显改善,从而对骨骼起到保护作用^[14]。基于此,本研究通过观察加味六味地黄汤调控Klotho-FGF23轴对CKD-MBD大鼠肾脏与骨骼的影响,进一步探讨加味六味地黄汤对CKD-MBD的机制及靶点。

1 材料与方

1.1 动物 健康清洁级SD大鼠,体质量(250±20)g,共130只,购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2019-0014,在广西中医药大学附属第一临床医学院分子生物实验室动物实验部,分笼饲养于室温18~25℃,相对湿度50%~60%,人工12h昼/夜循环照明环境中。隔日更换垫料、清洗笼舍,大鼠能自由摄食及饮水。本研究所有动物实验操作均符合广西中医药大学动物福利伦理委员会的规范要求(伦理批准号DW20190304-017)。

1.2 仪器 SpectraMax Plus 384型全波长酶标仪(美国Molecular Devices公司);TDZ4-WS型低速自动平衡离心机(湖南湘仪国际贸易有限公司);Milli-Q Direct 8型纯水仪(法国Milipore公司);C501型Cobas全自动生化仪(罗氏诊断产品有限公司);RM2235型轮转式切片机(德国Leica公司);TEC2500型病理组织漂烘仪(常州市郝思琳仪器设备有限公司);BX43型光学显微镜(日本Olympus Corporation公司);PYX-DHS500BS-II型隔水式恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);Mini-Proten Tetra System电泳系统,ChemiDoc XRS型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

1.3 药品与试剂 骨化三醇软胶囊(海尔正大制药有限公司,批号1902111,规格0.25 μ g/粒);苏木精,丽春红,苯胺蓝,Goldner三色染色液(美国Sigma公司,批号分别为SLBN3249V,041M1341V,

MKBJ7803V,20190823);Klotho, β -肌动蛋白(β -actin),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为GR3257558-1,71A36861071,71A36703071);FGF23多克隆抗体(博奥森公司,批号AD02212358);辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG),山羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G(联科生物公司,批号分别为HR2321456,HR6874267);血清钙,磷,血尿素氮(BUN)测试盒(南京建成生物科技有限公司,批号分别为20190405,20190305,20190424);全段甲状旁腺激素(iPTH)酶联免疫吸附测定法(ELISA),血肌酐(SCr)检测试剂盒,1,25(OH)₂D₃ ELISA试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为Feb2019,Mar2019,May2019);FGF23 ELISA试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司,批号190201);甲醇(成都市科龙化工试剂厂,批号20180318);聚偏二氟乙烯(PDVF)膜(Millipore公司,批号K5JA5013L);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯化水。

1.4 药品制备 加味六味地黄汤药物组成为熟地黄10g,山茱萸10g,干山药15g,泽泻10g,茯苓12g,丹皮10g,大黄10g,桂枝10g,丹参15g,黄芪30g,淫羊藿10g;以上药物共142g,均购自广西中医药大学附属瑞康医院中药房,由专人质检,鉴定符合2015年版《中华人民共和国药典》相关要求。将药材用相当于药材5倍自来水浸泡2h,武火煮沸后文火继续煎煮30min,过滤收集煎液,原药渣加少量水继续煎煮,得二煎液;两煎液混合,浓缩至浓度生药含量为1g·mL⁻¹。骨化三醇稀释参照文献方法进行配制^[15],将骨化三醇软胶囊按0.1mg·L⁻¹比例溶于食用花生油中,充分混匀。参照《药理实验方法学》^[16]中人与动物体表面积(S)比值剂量表,人鼠换算公式S大鼠/200g=0.018×S人/70kg,得加味六味地黄汤的灌胃剂量为2.556g·kg⁻¹,骨化三醇药品灌胃剂量为0.09 μ g·kg⁻¹。

1.5 肾性骨病大鼠模型的建立 大鼠适应性饲养1周后,正常组继续喂以普通饲料饮食,高磷组予以高磷饮食(磷含量1.03%)饲养;模型组大鼠喂以腺嘌呤及高磷饮食(腺嘌呤含量0.75%,磷含量1.03%),1~4周喂以腺嘌呤饮食,第5~6周喂以高磷饮食。正式实验前进行的预实验结果显示,按照上述模型组方案饲养6周后,大鼠血清检测出现BUN和SCr可见明显升高,出现低钙和高磷血症,病理形态学检测可见肾小管萎缩,肾间质纤维化,股骨密

度检测可见骨量减少,检测结果符合相关文献检测结果^[17],提示肾性骨病大鼠模型建立成功,方可进入正式实验。

1.6 分组及给药 130只SD雄性大鼠系统随机分为正常组($n=10$),高磷组($n=30$),模型组($n=30$),加味六味地黄汤组($n=30$)和骨化三醇组($n=30$)。正常组在实验完成时一次性处死取材,其余各组组内随机分为造模开始后第8,10,12周3个时间点,每个时间点处死10只大鼠。正常组大鼠普通饮食饲养,灌胃蒸馏水;高磷组高磷饮食饲养,灌胃蒸馏水;模型组大鼠腺嘌呤及高磷饮食饲养,灌胃蒸馏水;加味六味地黄汤组大鼠在造模后给予正常饲料饲养,灌胃加味六味地黄汤药液;骨化三醇组大鼠在造模后给予正常饲料饲养,灌胃骨化三醇悬浊液(溶剂为花生油),在造模第6周后,大鼠按体质量予100 g灌胃1 mL蒸馏水或药液,每日1次,至动物取材,共42 d。

1.7 检测指标

1.7.1 检测各组大鼠肾功能、血磷、血钙 各组各时间点大鼠末次给药24 h后处死,收集血液标本,静置1 h后以 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径13.5 cm,下同),取上清液,按照试剂盒说明书进行操作,自动化生化仪检测各组大鼠肾功能(BUN和SCr),血磷,血钙。

1.7.2 ELISA 检测 各组大鼠血清 iPTH 及 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 FGF23 水平 各组各时间点大鼠末次给药24 h后处死,收集血液标本离心,静置1 h后以 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清液,按照ELISA试剂盒步骤检测血清 iPTH 及 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 FGF23 水平。

1.7.3 各组大鼠肾脏及骨骼病理检测 各组各时间点大鼠采血后解剖,取左侧1/2肾脏和股骨置于4%多聚甲醛组织固定液中固定,固定后予骨组织脱钙处理后,骨组织、肾脏标本按顺序脱水、透明、石蜡包埋,4 μm 厚度切片;骨组织 Goldner's 三色染色法观察股骨的病理形态;肾脏行 Masson 染色;于光学显微镜下观察肾间质病理形态学改变并摄像。按以下方法进行评估^[18],肾间质纤维化程度进行半定量评估,分值为0~4分,0分为正常;1分为肾间质纤维化面积不超过视野25%;2分为25%~49%;3分为50%~75%;4分为超过75%。计算30个肾皮质高倍视野($\times 400$),求和、取平均数,得该标本肾间质纤维化分值。

1.7.4 免疫组织化学法检测 各组大鼠肾、骨组织

FGF23 蛋白的表达 各组各时间点大鼠肾组织和骨组织经常规4 μm 切片、脱蜡复水后,3% H_2O_2 37 $^\circ\text{C}$ 阻断、灭活内源性过氧化物酶,于 $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中修复抗原,加入 FGF23 抗体(1:100)于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)充分洗涤后加入即用型二抗37 $^\circ\text{C}$ 孵育30 min, DAB 显色,显微镜下观察反应进度,自来水充分冲洗,苏木素复染后,再次自来水冲洗,切片脱水、透明、封片、镜检、拍照。蛋白阳性表达呈棕黄色染色,不着色者为阴性。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件,定量分析蛋白表达的积分吸光度 IA, 最终结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

1.7.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 各组大鼠肾、骨组织 Klotho 蛋白的表达 取-80 $^\circ\text{C}$ 保存的肾、骨组织约20 mg 分别在冰上将其研磨成碎片,加入蛋白裂解液提取组织总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度后,按 Western blot 步骤进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭后,加入 Klotho 一抗(1:3 000)4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 充分漂洗,二抗(1:1 000)室温孵育30 min,再次 TBST 充分漂洗。肾组织以 GAPDH (1:3 000)为内参,骨组织以 β -actin(1:3 000)为内参, ECL 试剂盒显影成像,采用 Image J 软件测定条带灰度值,通过计算目的蛋白与内参的灰度值比值来分析 Klotho 蛋白相对表达水平。

1.8 统计学方法 数据分析采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组内均数用配对 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析;组间均数两两比较采用 q 检验,并对检测指标进行相关性分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对肾功能、血清钙、磷水平的影响 研究结果显示,与正常组比较,高磷组大鼠各时间点血清 BUN, SCr, 钙, 磷水平差异无统计学意义。与高磷组相应时间点比较,模型组大鼠血清 BUN, SCr, 磷水平均显著升高,钙水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点血清中 BUN, SCr, 磷水平均明显降低,钙含量均有所升高($P<0.05$, $P<0.01$),而加味六味地黄汤组和骨化三醇组各相应时间点上上述指标差异均无统计学意义。见表1。

2.2 对血清 iPTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 FGF23 水平的影响 与正常组比较,高磷组大鼠血清中 iPTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 FGF23 含量差异无统计学意义。与高磷组比较,模型组大鼠在造模后血清 iPTH 和

表1 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠各时间点血BUN,SCr,血钙和血磷的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of modified Liuwei Dihuangtang on serum contents of BUN, SCr, calcium and phosphorus in CKD-MBD model rats at various time ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	时间	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/ μ mol·L ⁻¹	钙/mmol·L ⁻¹	磷/mmol·L ⁻¹
正常		饲养12周	5.36±1.35	15.47±1.39	2.83±0.18	2.29±0.16
高磷		造模8周	5.33±0.57	14.18±1.22	2.85±0.06	2.30±0.31
		造模10周	5.38±0.34	14.23±0.38	2.77±0.18	2.28±0.18
		造模12周	5.39±0.29	14.26±0.57	2.79±0.17	2.30±0.18
模型		造模8周	16.88±2.31 ¹⁾	24.16±1.39 ¹⁾	1.89±0.06 ¹⁾	3.54±0.26 ¹⁾
		造模10周	17.44±3.79 ¹⁾	25.45±1.49 ²⁾	1.83±0.12 ¹⁾	3.74±0.22 ¹⁾
		造模12周	18.73±4.32 ¹⁾	29.98±1.05 ¹⁾	1.69±0.13 ¹⁾	3.91±0.15 ¹⁾
加味六味地黄汤	2.556	造模8周	14.70±1.18 ²⁾	21.48±1.56 ²⁾	2.12±0.07 ³⁾	2.98±0.12 ³⁾
		造模10周	13.43±1.99 ²⁾	20.57±1.56 ²⁾	2.23±0.24 ³⁾	2.91±0.08 ³⁾
		造模12周	12.06±1.86 ³⁾	19.33±1.05 ³⁾	2.49±0.18 ³⁾	2.80±0.18 ³⁾
骨化三醇	0.9×10 ⁻⁷	造模8周	13.62±2.23 ²⁾	22.41±0.35 ²⁾	2.19±0.23 ²⁾	2.92±0.04 ³⁾
		造模10周	12.41±2.43 ²⁾	20.97±1.12 ³⁾	2.42±0.35 ³⁾	2.86±0.10 ³⁾
		造模12周	11.48±1.87 ³⁾	18.05±1.73 ³⁾	2.63±0.31 ³⁾	2.72±0.22 ³⁾

注:与相应时间点高磷组比较¹⁾P<0.01;与相应时间点模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表2,3同)。

FGF23含量升高,1,25(OH)₂D₃下调(P<0.05, P<0.01)。与模型组比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点大鼠血清FGF23,iPTH含量下调,1,25(OH)₂D₃水平上调(P<0.05, 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差异均无统计学意义。见表2。

表2 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠各时间点iPTH,1,25(OH)₂D₃和FGF23水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of modified Liuwei Dihuangtang on serum contents of iPTH, 1,25(OH)₂D₃ and FGF23 in CKD-MBD model rats at various time ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	时间	iPTH/ng·L ⁻¹	1,25(OH) ₂ D ₃ / μ g·L ⁻¹	FGF23/ng·L ⁻¹
正常		饲养12周	39.47±0.87	193.13±14.01	122.92±25.85
高磷		造模8周	40.33±1.62	192.26±6.26	125.06±22.23
		造模10周	40.99±1.10	190.86±9.58	127.36±17.66
		造模12周	41.57±1.28	192.37±9.85	132.42±17.35
模型		造模8周	80.19±0.96 ¹⁾	96.45±4.82 ¹⁾	222.97±31.10 ¹⁾
		造模10周	84.26±2.22 ¹⁾	86.83±4.00 ¹⁾	242.55±25.54 ¹⁾
		造模12周	97.89±8.94 ¹⁾	83.78±3.77 ¹⁾	263.25±23.71 ¹⁾
加味六味地黄汤	2.556	造模8周	77.26±1.29 ³⁾	103.65±6.37 ²⁾	202.74±23.91 ³⁾
		造模10周	71.81±1.91 ³⁾	114.51±6.21 ³⁾	192.98±25.88 ³⁾
		造模12周	59.82±3.22 ³⁾	123.94±10.12 ³⁾	182.89±25.26 ³⁾
骨化三醇	0.9×10 ⁻⁷	造模8周	77.43±2.92 ³⁾	101.54±4.05 ²⁾	196.39±25.42 ³⁾
		造模10周	72.25±2.23 ³⁾	115.53±9.03 ³⁾	184.89±24.87 ³⁾
		造模12周	63.71±2.90 ³⁾	127.09±5.15 ³⁾	174.55±25.99 ³⁾

2.3 对肾脏病理的影响 与正常组比较,高磷组大鼠肾组织各时间点肾间质形态学无明显改变;与高磷组比较,模型组大鼠造模后可见明显纤维结缔组织增生,并随着时间延长逐渐加重(P<0.01)。与模型组比较,加味六味地黄汤组与骨化三醇组各时间

点肾间质纤维增生评分均明显降低(P<0.05, P<0.01),而加味六味地黄汤组与骨化三醇组各时间点肾组织形态改变差异均无统计学意义,见表3,图1。

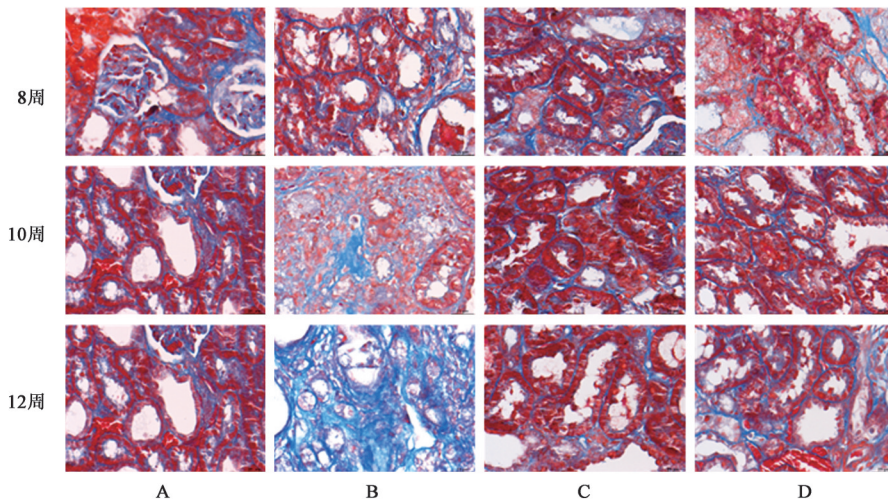
2.4 对骨组织病理的影响 研究结果显示,与正常

表3 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠肾间质纤维化分值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of modified Liuwei Dihuangtang on scores of renal interstitial fibrosis in CKD-MBD model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$) 分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模8周	造模10周	造模12周
高磷		0.17±0.37	0.23±0.42	0.17±0.37
模型		1.77±0.76 ¹⁾	2.03±0.66 ¹⁾	2.83±0.93 ¹⁾
加味六味地黄汤	2.556	1.40±0.49 ²⁾	0.87±0.72 ³⁾	0.40±0.55 ³⁾
骨化三醇	0.9×10 ⁻⁷	1.47±0.56 ²⁾	1.00±0.68 ³⁾	0.50±0.50 ³⁾

组比较,高磷组各时间点内骨小梁、成骨细胞及类骨质面积等无明显改变。与高磷组比较,模型组大鼠可见骨组织出现骨小梁宽度、平均类骨质面积增加,成骨细胞减少,并随着时间延长不断加重;与模型组比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点大鼠骨小梁宽度和平均类骨质面积均明显减少,成骨细胞数量增多;而加味六味地黄汤组和骨化三醇组的各时间点形态学比较均差异无统计学意义。见图2。



A. 高磷组;B. 模型组;C. 加味六味地黄汤组;D. 骨化三醇组(图2~4同)

图1 加味六味地黄汤对CKD-MBD大鼠肾组织病理的影响 (Masson, ×400)

Fig. 1 Effect of modified Liuwei Dihuangtang on tpathology of kidney tissue in CKD-MBD rats (Masson, ×400)

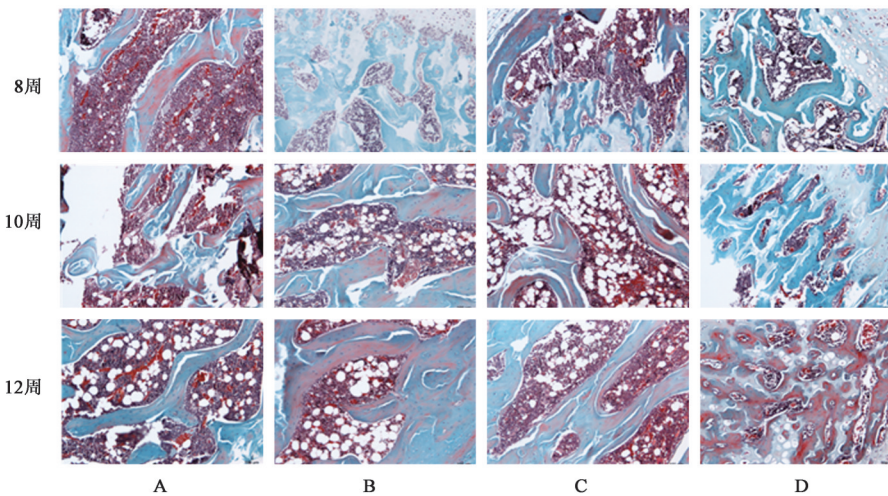


图2 加味六味地黄汤对CKD-MBD大鼠骨组织病理的影响 (Goldner's三色, ×100)

Fig. 2 Effect of modified Liuwei Dihuangtang on pathology of bone tissue in CKD-MBD rats (Goldner's trichrome, ×100)

2.5 对肾脏、骨骼FGF23表达的影响 与正常组比较,高磷组各时间点骨组织镜下观察无明显变化。与高磷组比较,模型组大鼠可见骨小梁、成骨细胞的胞浆及细胞与细胞连接处有明显棕褐色物质堆积,且随着时间延长棕褐色物质堆积不断加深

($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,加味六味地黄汤组和骨化三醇组骨小梁、成骨细胞及骨细胞周围棕褐色物质均有所减少,且随着时间延长表达量不断下降($P<0.05, P<0.01$),而加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点差异无统计学意义。见图3,表4。

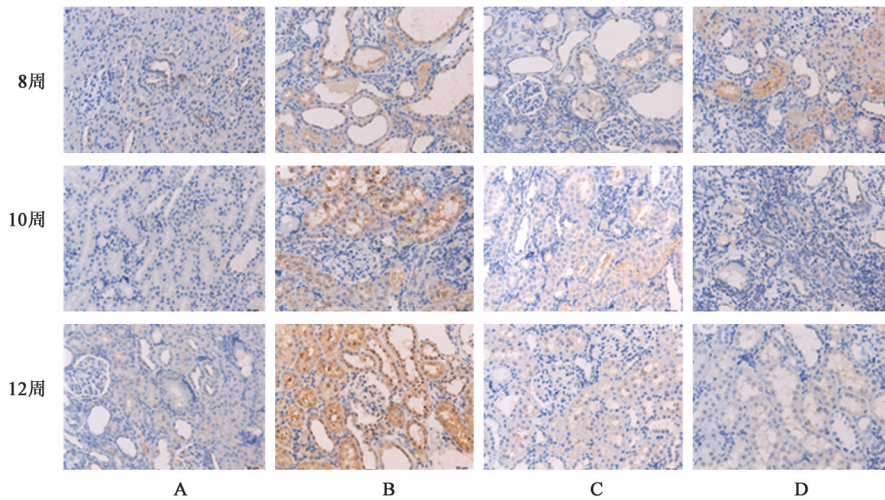


图3 加味六味地黄汤对CKD-MBD大鼠肾组织FGF23蛋白的影响(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of modified Liuwei Dihuangtang on FGF23 protein in kidney tissue of CKD-MBD rats (IHC,×200)

表4 加味六味地黄汤对CKD-MBD大鼠肾组织、骨组织各时间FGF23蛋白IA的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of modified Liuwei Dihuangtang on IA of FGF23 protein in kidney tissue and bone tissue of CKD-MBD rats at various time ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	时间	肾组织	骨组织
正常		饲养12周	0.65±0.02	0.04±0.01
高磷		造模8周	0.65±0.01	0.04±0.01
		造模10周	0.73±0.06	0.05±0.01
		造模12周	0.84±0.15	0.05±0.01
模型		造模8周	2.10±0.08 ¹⁾	1.65±0.34 ¹⁾
		造模10周	3.15±0.18 ²⁾	3.70±0.33 ²⁾
		造模12周	6.65±0.17 ²⁾	6.23±0.42 ²⁾
加味六味地黄汤	2.556	造模8周	3.22±0.12 ³⁾	1.37±0.17 ³⁾
		造模10周	2.21±0.09 ⁴⁾	1.07±0.14 ⁴⁾
		造模12周	0.82±0.12 ⁴⁾	0.05±0.00 ⁴⁾
骨化三醇	0.9×10 ⁻⁷	造模8周	3.12±0.10 ³⁾	1.32±0.27 ³⁾
		造模10周	2.15±0.09 ⁴⁾	1.06±0.12 ⁴⁾
		造模12周	0.77±0.05 ⁴⁾	0.05±0.01 ⁴⁾

注:与相应时间点高磷组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与相应时间点模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表5同)。

与正常组比较,高磷组各时间点肾组织中未见或极少量阳性表达于肾小管细胞与细胞连接处,差异无统计学意义。与高磷组比较,模型组肾小管与上皮细胞间连接处可见明显棕褐色物质堆积,并随着时间延长阳性表达呈不断增加趋势($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,加味六味地黄汤组及骨化三醇组肾小管处棕褐色物质明显减少,且随着时间延长表达量呈不断下降趋势($P<0.05, P<0.01$),而加味六味地黄汤组与骨化三醇组阳性表达量差异无

统计学意义。见表4,图4。

2.6 对肾脏、骨骼Klotho表达的影响 与正常组比较,高磷组肾脏各时间点Klotho蛋白表达量差异无统计学意义。与高磷组各时间点比较,模型组大鼠各时间点可见Klotho蛋白含量明显下降($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,加味六味地黄汤组及骨化三醇组各时间点Klotho蛋白表达量均有所增加($P<0.05, P<0.01$),而加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点Klotho阳性表达差异均无统计学意义。见表5,图5。

与正常组比较,高磷组骨组织各时间点Klotho蛋白表达量差异无统计学意义。与高磷组各时间点比较,模型组大鼠各时间点可见Klotho蛋白含量明显下降($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,加味六味地黄汤组及骨化三醇组各时间点Klotho蛋白表达量均有所增加($P<0.05, P<0.01$),而加味六味地黄汤组和骨化三醇组各时间点Klotho阳性表达差异均无统计学意义。见表5,图6。

3 讨论

CKD-MBD是一种复杂的全身性疾病,主要特征包括血清钙、磷,iPTH和1,25(OH)₂D₃的生化异常;骨骼周转率、矿化度和体积异常,或线性增长和强度下降;以及骨骼外钙化三个部分。在CKD早期即可出现血清生化异常,iPTH和FGF23升高,以及1,25(OH)₂D₃水平的下降等表现^[19]。FGF23是钙磷代谢的主要调节因子之一,其在高磷血症和1,25(OH)₂D₃水平升高的刺激下,由骨细胞分泌合成^[20]。Klotho主要在肾小管上皮细胞表达,具有抗衰老、抗氧化应激、抗炎、抗纤维化等多种生物学效应^[21]。

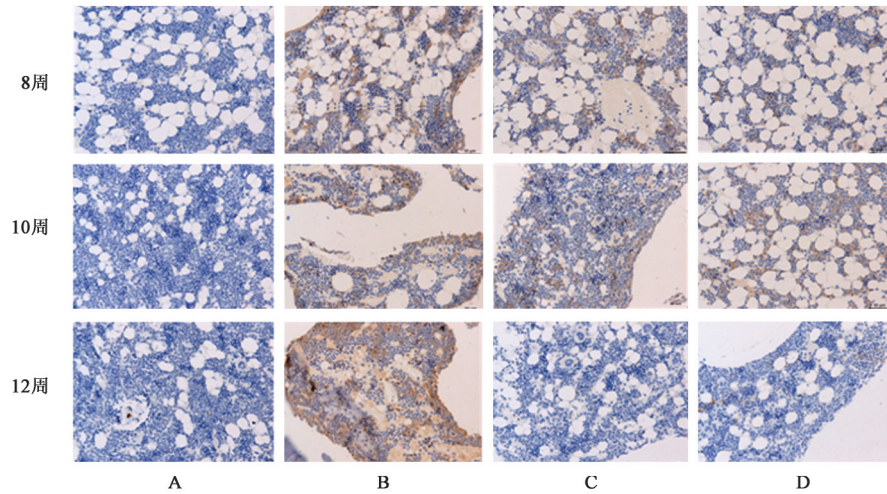


图4 加味六味地黄汤对CKD-MBD大鼠骨组织FGF23蛋白的影响(免疫组化,×200)

Fig. 4 Effect of modified Liuwei Dihuangtang on FGF23 protein in bone tissue of CKD-MBD rats (IHC, ×200)

表5 加味六味地黄汤对CKD-MBD大鼠各时间点肾组织、骨组织Klotho蛋白表达影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of modified Liuwei Dihuangtang on Klotho protein in kidney tissue and bone tissue of CKD-MBD rats at various time ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	时间	肾脏 Klotho /GAPDH	骨骼 Klotho /β-actin
正常		饲养 12周	0.78±0.043	1.32±0.01
高磷		造模 8周	0.79±0.51	1.34±0.02
		造模 10周	0.76±0.64	1.34±0.04
		造模 12周	0.75±0.45	1.33±0.05
模型		造模 8周	0.79±0.05 ¹⁾	0.752±0.01 ¹⁾
		造模 10周	0.43±0.16 ¹⁾	0.69±0.06 ¹⁾
		造模 12周	0.37±0.06 ²⁾	0.51±0.05 ²⁾
加味六味地黄汤	2.556	造模 8周	0.63±0.08 ³⁾	0.91±0.02 ³⁾
		造模 10周	0.70±0.14 ³⁾	1.26±0.05 ⁴⁾
		造模 12周	0.89±0.08 ⁴⁾	1.26±0.05 ⁴⁾
骨化三醇	0.9×10 ⁻⁷	造模 8周	0.58±0.03 ³⁾	0.91±0.01 ³⁾
		造模 10周	0.82±0.06 ³⁾	1.10±0.01 ⁴⁾
		造模 12周	1.01±0.11 ⁴⁾	1.20±0.02 ⁴⁾

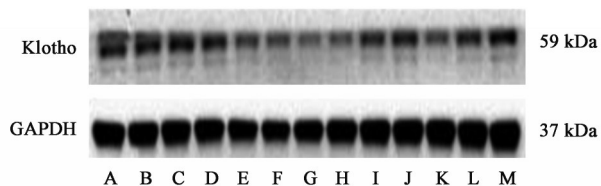


图5 CKD-MBD大鼠肾组织Klotho蛋白电泳
A. 正常组; B~D. 高磷组 8, 10, 12周; E~G. 模型组 8, 10, 12周; H~J. 加味六味地黄汤组 8, 10, 12周; K~M. 骨化三醇组 8, 10, 12周(图6同)

图5 CKD-MBD大鼠肾组织Klotho蛋白电泳

Fig. 5 Electrophoresis of Klotho protein in kidney tissue of CKD-MBD rats

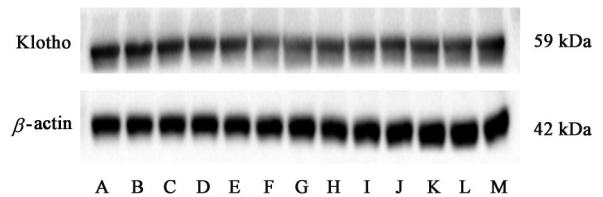


图6 CKD-MBD大鼠骨组织Klotho蛋白电泳

Fig. 6 Electrophoresis of Klotho protein in bone tissue of CKD-MBD rats

研究发现, FGF23在肾脏中的FGFR1-Klotho复合物结合, 可抑制1, 25(OH)₂D₃的合成^[22]。因而认为, Klotho-FGF23能够协调钙磷等矿质动态平衡, 参与调控CKD病理过程。

本研究结果显示, CKD-MBD大鼠出现BUN, SCr和FGF23水平的升高, 钙磷代谢紊乱, 肾间质出现纤维化等形态学改变, 随着造模时间的延长肾功能逐渐下降, 肾间质纤维化病理逐渐加重, 血清钙, 1, 25(OH)₂D₃水平下降, 磷, FGF23, iPTH升高等水平升高, 继而出现继发性甲状旁腺功能亢进症等; 而随着肾功能进展, 股骨头骨密度降低, 骨质疏松加重, 肾功能受损后FGF23, iPTH水平升高, 1, 25(OH)₂D₃下降, 本研究结果与CKD-MBD的病理特性相符^[23-24]。进一步研究发现, 模型组大鼠肾脏与骨骼中FGF23蛋白水平上调, 而Klotho蛋白下调, 并随着时间延长不断加剧, 与血清磷, FGF23, iPTH等水平升高表现为正反馈趋势, 而Klotho的表达呈负反馈趋势; 结合前期研究, UUO大鼠肾组织FGF23表达水平显著上调等表现^[10-13], 因此推测, CKD时骨骼FGF23和Klotho的表达可能受到肾脏Klotho-FGF23水平影响, FGF23水平上升, Klotho下调, 甚至未出现Klotho的情况。这提示CKD-MBD

的发生发展可能与肾脏 Klotho-FGF23 轴失衡影响了 Klotho-FGF23 轴在骨骼中的作用,进而影响成骨细胞和破骨细胞的代谢平衡。而经加味六味地黄汤治疗后,骨骼 FGF23 水平明显下降, Klotho 水平上升,并随着治疗时间延长改变越显著。这提示加味六味地黄汤可抑制 FGF23 分泌,促使内源性 Klotho 分泌增加,同时影响骨组织 FGF23 和 Klotho 的水平以调控成骨细胞及破骨细胞中相关蛋白的分泌,从而影响骨的形成与吸收,表明加味六味地黄汤可能可以通过调节 Klotho-FGF23 轴的动态平衡,对 CKD-MBD 的骨矿物质代谢紊乱起到一定保护作用,进而延缓 CKD-MBD 进展。

中医学上并无“肾性骨病”一词,而根据肾性骨病的临床表现,该病属于中医“骨痹”“骨痿”范畴,病变在骨,其本在肾。现代医学研究发现,肾脏与骨在发育学上是同源的^[25]。现代医学研究发现,肾可以通过分泌 1- α 羟化酶,调控骨形态蛋白-7 (BMP-7)的产生,调节钙磷代谢和骨生长发育^[26]。课题组前期研究发现,加味六味地黄汤能抑制 FGF23 表达,通过下调肾组织 FGF23 的表达发挥肾保护作用^[10-13]。本实验进一步研究发现,随着时间推移,高磷联合腺嘌呤的 CKD-MBD 大鼠肾功能、骨矿物质代谢标志物和骨组织病理损伤有不断加重趋势,钙磷代谢紊乱, iPTH, FGF23, 骨骼 FGF23 表达量也有不断升高, Klotho 表达量不断下降的趋势。而加味六味地黄汤可改善 CKD-MBD 大鼠肾功能、钙磷代谢紊乱,增加股骨头骨密度、成骨细胞数量等,同时上调大鼠骨骼 Klotho 蛋白表达,下降 FGF23 表达量,这提示加味六味地黄汤可能通过调节 Klotho-FGF23 平衡,最终发挥骨保护作用。

综上所述, Klotho-FGF23 轴贯穿于肾脏与骨骼两个系统,这与中医“肾主骨”理论相合;肾藏精,精生髓,髓居骨中以养骨,骨骼的发育由肾精充养,由肾气推动与调控。通过对 Klotho-FGF23 轴的研究,有助于从分子生物学角度诠释“肾主骨”的中医学理论,为揭示中医“肾-精-髓-骨”理论的科学内涵提供有力的证据支撑,为 CKD-MBD 的治疗提供新的思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BURTON J O, GOLDSMITH D J, 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] RODELO-HAAD C, SANTAMARIA R, MUÑOZ-CASTAÑEDA J R, et al. FGF23, biomarker or target [J]. Toxins(Basel), 2019, 11(3):175.
- [3] BACCHETTA J, BARDET C, PRIÉ D. Physiology of FGF23 and overview of genetic diseases associated with renal phosphate wasting [J]. Metabolism, 2020, 103(120):153865.
- [4] RODRÍGUEZ M. FGF23: Is it another biomarker for phosphate-calcium metabolism? [J]. Adv Ther, 2020, 2020(37):73-79.
- [5] LU X, HU M C. Klotho/FGF23 axis in chronic kidney disease and cardiovascular disease [J]. Kidney Dis (Basel), 2017, 3(1):15-23.
- [6] BIAN A, XING C, HU M C. Alpha Klotho and phosphate homeostasis [J]. J Endocrinol Invest, 2014, 37(11):1121-1126.
- [7] SCHOLZE A, LIU Y, PEDERSEN L, et al. Soluble α -klotho and its relation to kidney function and fibroblast growth factor-23 [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(5):E855-861.
- [8] KOMABA H, LANSKE B. Role of Klotho in bone and implication for CKD [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2018, 27(4):298-304.
- [9] 田辉,肖燕芳. 强骨益肾颗粒治疗肾性骨病的疗效观察[J]. 大家健康:学术版, 2014, 8(2):45.
- [10] 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.
- [11] 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]. 中医基础医学杂志, 2014, 20(6):737-739.
- [12] 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, 3(11):1401-1403.
- [13] 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, 7(3):196-199.
- [14] 朱国双,王岚,邹新蓉,等. 基于 FGF23-Klotho 轴探讨肾元颗粒对 db/db 糖尿病肾病小鼠骨骼的保护作用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(1):77-83.
- [15] KIM G H. Gaps between global guidelines and local practices in CKD-MBD [J]. Electrolyte Blood Press, 2014, 12(2):35-40.

- [16] 魏伟,吴希美,李远见. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2010:71.
- [17] 陈珺,孟彦,钟雁,等. 大鼠肾性骨病模型皮质骨骨量及结构的变化[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2015,26(2):113-116.
- [18] SETHI S, D'AGATI V D, NAST C C, et al. A proposal for standardized grading of chronic changes in native kidney biopsy specimens[J]. *Kidney Int*, 2017, 91(4): 787-789.
- [19] MOE S M, RADCLIFFE J S, WHITE K E, et al. The pathophysiology of early-stage chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) and response to phosphate binders in the rat [J]. *Bone Miner Res*, 2011, 26(11):2672-2681.
- [20] 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):2202-2209.
- [21] XU Y, SUN Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging [J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(2): 174-193.
- [22] KOMABA H. CKD-MBD (chronic kidney disease-mineral and bone disorder). Role of FGF23-Klotho axis in CKD-MBD [J]. *Clin Calcium*, 2010, 20(7): 1028-3106.
- [23] ISAKOVA T, NICKOLAS T L, DENBURG M, et al. Treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD)[J]. *Am J Kidney Dis*, 2017, 70(6):737-751.
- [24] 赵玉,王文赞,王静. Pin1通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号参与 CKD-MBD 的发病[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 19(7):1118-1121.
- [25] KIECKER C, BATES T, BELL E. Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(5):923-947.
- [26] MANSON S R, AUSTIN P F, GUO Q, et al. BMP-7 signaling and its critical roles in kidney development, the responses to renal injury, and chronic kidney disease[J]. *Vitam Horm*, 2015, 8(99):91-144.
- [责任编辑 王鑫]

《家庭中医药》杂志更名为《基层中医药》

经国家新闻出版署批准,《家庭中医药》杂志自2022年起更名为《基层中医药》,办刊宗旨变更为:推广中医药临床经验和科研成果,搭建中医药学术交流和信息获取平台,提升基层中医药服务能力和水平,服务健康中国战略。

《基层中医药》杂志是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中药研究所主办的中医药专业期刊,国内外公开发行。中国知网(CNKI)全文收录。本刊为月刊,大16开本,国内统一刊号:CN10-1800/R,国际刊号:ISSN1005-3743,国内邮发代号:82-654,国外发行代号:M1309。

投稿须知:稿件应具备科学性、实用性,论点明确,资料可靠,数据准确,层次清楚,文字精练,用字规范。临床研究等论文一般不少于3000字。稿件请以word版附件形式发至本刊电子信箱:jczyzz@126.com。咨询电话:010-64052170。欢迎中医药人员踊跃投稿!