

· 药理 ·

温肾益髓生血方对 RA 大鼠肝脏 BMP/Smad 信号通路的影响

张紫嫣, 张新雪, 杨美娟, 黄雅薇, 王婷, 宋璐霞, 赵宗江*
(北京中医药大学 中医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨温肾益髓生血方对 RA 大鼠贫血的改善作用及其骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)/Smad 信号通路的影响。方法:42 只雄性 SPF 级 Wister 大鼠,根据体质量分层随机分组 2 次,即正常组、假手术组、模型组、尿毒清(2.33 g·kg⁻¹)组、温肾益髓生血(3.5 g·kg⁻¹)组。模型组和治疗组上午 180 mg·kg⁻¹·d⁻¹腺嘌呤灌胃,下午治疗组给予相应的治疗药物,正常组、假手术组和模型组给予等体积的去离子水灌胃,每周称量大鼠体质量,治疗 12 周后,各组大鼠麻醉后取血,分离血清,检测肌酐(Scr),尿素氮(BUN),尿酸(UA);全血测红细胞(RBC),血红蛋白(HGB);取材固定肾组织、肝脏组织,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肾脏病理,免疫组化及原位杂交技术检测大鼠肝脏 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, 铁调素(hepcidin)mRNA 及蛋白表达水平。结果:与正常组及假手术组比较,模型组体质量明显降低($P < 0.01$),血清 BUN, Scr 水平明显升高($P < 0.01$),肾脏病理损害明显;与模型组比较,温肾益髓生血组大鼠一般状态明显改善,血 RBC, HGB 水平升高($P < 0.01$),与正常组和假手术组比较,模型组大鼠肝脏高表达 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, hepcidin ($P < 0.01$);与模型组比较,温肾益髓生血组 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, hepcidin 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。结论:温肾益髓生血方对 RA 大鼠贫血具有一定的改善作用,可能是通过干预肝脏 BMP/Smad 信号通路实现的。

[关键词] 温肾益髓生血方; 肾性贫血; 大鼠; 骨形成蛋白(BMP)/Smad 信号通路; 铁调素

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5; R99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0088-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181620

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180524.1001.002.html>

[网络出版时间] 2018-05-24 16:29

Effect of Wenshen Yisui Shengxue Prescription on BMP/Smad Signaling Pathway in Liver of RA Rats

ZHANG Zi-yan, ZHANG Xin-xue, YANG Mei-juan, HUANG Ya-wei,
WANG Ting, SONG Lu-xia, ZHAO Zong-jiang*

(School of Chinese Medical, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on anemia in RA rats and bone morphogenetic protein (BMP)/Smad signaling pathway in liver. **Method:** A total of 42 male SPF grade Wister rats were randomly divided into groups twice according to the body mass stratification: normal group, sham operation group, model group, uremia (2.33 g·kg⁻¹) group and Wenshen Yisui Shengxue (3.5 g·kg⁻¹) group. In the model group and the treatment group, 180 mg·kg⁻¹·d⁻¹ adenine was given by gavage in the morning, and the treatment group was treated with the corresponding medicine in the afternoon. The normal group, the sham operation group and the model group were given the equal volume of deionized water. After 12 weeks of treatment, blood and serum were collected after the rats were anesthesia. Scr and urea nitrogen (BUN), uric acid (UA), whole blood test red cell (RBC), hemoglobin (HGB) were detected; kidney tissue and liver tissue were fixed; hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe kidney pathology; immunohistochemistry and in situ

[收稿日期] 20180410(002)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB530406)

[第一作者] 张紫嫣,在读硕士,从事中医药防治障碍性贫血机制的研究, E-mail:18809877230@qq.com

[通信作者] *赵宗江,博士,教授,主任医师,从事中医药防治障碍性贫血机制的研究, Tel:010-64286926, E-mail:zongjiangz@sina.com

hybridization technique were used to detect bone morphogenetic protein 6 (BMP6), Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, hepcidin (hepcidin) mRNA and protein expressions in rat liver. **Result:** Compared with normal group and sham operation group, the body mass of the model group decreased obviously ($P < 0.01$), the levels of serum BUN and SCr increased obviously ($P < 0.01$), and the pathological damage of kidney was obvious. Compared with model group, the general state of the Wenshen Yisui Shengxue group was obviously improved, and the levels of blood RBC and HGB were increased ($P < 0.01$); compared with the normal group and the sham operation group, the model group showed high expressions of BMP6, Smad4, Smad1/5/8 and hepcidin in liver ($P < 0.01$). Compared with the model group, BMP6, Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8 and hepcidin protein expressions in the Wenshen Yisui Shengxue group were significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion:** Wenshen Yisui Shengxue prescription has a certain effect in alleviating anemia in RA rats, which may be realized by intervening BMP/Smad signaling pathway in liver.

[**Key words**] kidney marrow; renal anemia; rats; bone morphogenetic protein (BMP) /Smad; hepcidin

肾性贫血 (renal anemia, RA) 是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 患者的主要并发症之一, 关系着肾脏疾病的进展及预后^[1]。有流行病学资料显示, CKD3 ~ 5 期普遍存在贫血, 多表现为正细胞正色素性贫血, 肾功能恶化程度与发病率呈正相关, 尤其在 CKD5 期, 达到约 95%, 以中度贫血为主, 明显高于欧美 CKD 同期患者^[2-3]。接受肾脏替代治疗的患者中贫血发病率为 70% ~ 90%^[4], 即使在 CKD1 期, 贫血率已达 19.23%^[5]。临床上重组人促红细胞生成素 (rhu-EPO) 治疗肾性贫血取得了较好的效果, 但达标率仍然不理想, 主要由于 CKD 贫血患者常存在一定程度的铁缺乏^[6]。研究证明, 充分纠正体内的铁代谢异常, 既可以显著提高 rhu-EPO 的治疗效果, 又可以明显减少其用药剂量^[7]。铁调素 (hepcidin) 是维持机体铁稳态的重要调节因子, 肾性贫血机体铁缺乏与铁调素高表达密切相关, 骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) / Smad 信号通路是调控铁调素表达的主要分子机制。探求高效而安全的治疗肾性贫血的新途径, 目前已成为该领域研究的重点, 而中医药治疗 RA 方面, 取得了一定的进展, 并具有独特的优势, 前期研究证明了益髓生血方、温肾益髓生血方、滋肾益髓生血方对再生障碍性贫血有较好的疗效, 而 RA 中医病机本虚证以脾肾阳虚多见^[8-11], 故本研究建立 RA 大鼠模型, 首次从铁缺乏角度出发, 探讨温肾益髓生血方对 RA 的作用机制, 为该方治疗肾性贫血提供实验依据。

1 材料

1.1 动物及药物 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 42 只, 体质量 150 ~ 170 g, 购于北京维通利华技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2012-0001; 饲养环境为

室温 23 ~ 25 °C, 相对湿度 50% ~ 60%, 适应性喂养 1 周, 自由进食、饮水。动物实验的开展取得了北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会的同意。

腺嘌呤 (Amresco 公司, 批号 A0183); 温肾益髓生血方 (由淫羊藿、补骨脂、熟地黄、党参、山茱萸、制何首乌、炙黄芪、当归、鳖甲、阿胶、鸡血藤、砂仁组成, 为中国中医科学院广安门医院制剂, 批号京药制字 Z2006002, 250 g/瓶, 每 1 g 相当于原药材 2 ~ 5 g, 生产批号 20160523); 尿毒清颗粒 (康臣药业有限责任公司, 国药准字 Z20073256, 批号 20150835)。

1.2 试剂 BMP6, Smad4, Smad1/5/8 一抗, 山羊抗兔抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab155963, ab40759, ab66737, ab6721); hepcidin (英国 Biorbyt 公司, 批号 orb315547); p-Smad1/5/8 (德国 Merck Millipore 公司, 批号 AB3848-I); 肌酐 (SCr), 尿素氮 (BUN), 尿酸 (UA) 试剂盒 (中生北控股份有限公司, 批号分别为 20160618, 20160701, 20160713); 原位杂交试剂盒 BMP6, Smad4, Smad1, Smad5, Smad8, hepcidin (武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 MK3777-r, MK1212-h. m. r, MK1314, MK3781-r, MK3782-r, MK10415-r); 探针序列由武汉博士德生物工程有限公司合成, hepcidin: 5'-CCTATCTCCG GCAACAGACGAGACAGACTACGGCT-3'; Smad4: 5'-ATACACCAACAAGTAATGATGCCTGTCTGA-3'; BMP6: 5'-ACGGTCTCCAGCAGCCTCAATCCCCCGTCTCCCG-3'; Smad1: 5'-CCCTGTTTCCACCCAAGAAGTCTCTT CACA-3'; Smad5: 5'-TGGACACAAGCAACAACATG ATTCTCAGATCATG-3'; Smad8: 5'-CTCCTGGCCAAG TTCCGAAGTGCCTCGCTGCACAG-3', 探针长度分别为 35, 30, 35, 30, 35, 35 个碱基。

1.3 仪器 SKP-01 型 37 ~ 56 °C 电热恒温箱 (湖北

黄石市医疗器械厂);L340099型普通光学显微镜(日本Olympus公司);mikr002r型低温高速离心机(德国Hettich公司);rm2245型半轮转式组织切片机(德国Leica公司);vortex-5型涡旋振荡器(北京东南仪诚实验室设备有限公司);7160型全自动生化仪(日本日立公司);MS205DU型精密电子天平(瑞士Mettler公司);NIS Elements-BR型图像分析仪器(日本Nikon公司)。

2 方法

2.1 动物模型的制备与分组 健康雄性Wistar大鼠42只,适应性喂养1周,自由进食普通鼠饲料,自由饮水,按体质量随机分层分为正常组8只,假手术组8只及造模组26只,第2周将假手术组大鼠单侧肾脏包膜分离后,不切除肾脏,纳回缝合,造模组大鼠进行单侧肾切除术,造模组大鼠再按体质量分层分为模型组、尿毒清组和温肾益髓生血组,造模组每天上午进行腺嘌呤灌胃,剂量 $180\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,正常组、假手术组大鼠用等体积去离子水灌胃,当大鼠体质量、肾功能指标、肾脏病理结果等符合慢性肾衰竭模型特点,且大鼠血红蛋白、红细胞等提示出现贫血,即模型成功^[12],造模第3周开始,每天下午给予相应药物治疗,根据《药理学实验方法》^[13],大鼠用药剂量为人类临床用药计量的7倍,尿毒清组($2.33\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃),温肾益髓生血组($3.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃),正常组、假手术组、模型组给予相同剂量的去离子水灌胃,共治疗12周。

2.2 一般情况及大鼠体质量观察 每日观察动物的精神状态、皮毛光泽度、活动、饮食饮水等情况;每周称量各组大鼠体质量。

2.3 肾脏外观及病理学观察 无菌摘取肾脏,固定、石蜡包埋、切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察肾组织病理形态学改变。

2.4 外周血象及血液生化指标检测 灌胃用药12周后,大鼠腹腔注射4%水合氯醛进行麻醉,采用股动脉取血,一部分血常规检测红细胞(RBC),血红蛋白(HGB)水平。另一部分全血 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置2 h, $2\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,吸取上层血清,检测血清SCr,BUN,UA含量。

2.5 免疫组化检测相关蛋白表达 取 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的肝组织石蜡切片,逐级脱蜡至水,0.01% triton, $\text{H}_2\text{O}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ 10 min,采用微波修复的方式进行抗原修复,20%蛋清 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,10%山羊血清 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育1 h,一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,二抗 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,DAB显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。

2.6 原位杂交检测相关基因表达 取 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的肝组织石蜡切片,逐级脱蜡至水,0.01% triton, $\text{H}_2\text{O}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ 10 min,胃蛋白酶消化8 min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预杂交3 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交4 h,SSC逐级冲洗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭液封闭1 h,生物素大鼠抗地高辛 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ SABC孵育45 min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生物素化过氧化物酶孵育30 min,DAB显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。

2.7 图像分析 每组随机选取6个视野,应用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件,棕黄色颗粒为阳性表达,测定其积分吸光度IA。

2.8 统计学方法 使用SPSS 22.0统计软件对数据进行统计分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较, $P<0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 温肾益髓生血方对肾性贫血大鼠一般情况的影响 正常组和假手术组大鼠活动正常,皮毛有光泽,体质量明显增加,饮食饮水及二便未见异常;模型组大鼠腺嘌呤灌胃10 d左右,开始出现少动喜卧、身体呈蜷缩状,皮毛失去光泽,逐渐消瘦,喜眯眼,耳廓、爪发白,后期见到部分大鼠有肉眼可见血尿;与模型组比较,治疗组大鼠活动及精神状态均有改善,未见蜷缩、拱背及血尿现象。实验过程中模型组死亡3只,治疗组各死亡1只,予以剔除。

3.2 温肾益髓生血方对肾性贫血大鼠体质量的影响 开始治疗时各组大鼠体质量无明显差异,随着实验的进行,正常组及假手术组大鼠体质量明显增加,与正常组、假手术组比较,模型组大鼠体质量呈下降趋势($P<0.01$),与模型组比较,各治疗组体质量均显著增加($P<0.01$)。见表1。

3.3 肾脏外观及肾脏病理学观察 从外观上看,正常组及假手术组肾脏呈暗红色,有光泽,质地坚实,包膜不易剥离;模型组大鼠肾脏外观肿胀,质地松软,表面缺乏光泽,肾包膜易于剥脱,呈灰白色,为“大白肾”,纵切面可以看到肾皮质髓质界限不清晰;药物治疗组肾脏略肿大,表面深红与灰白相间,被膜较难剥脱。

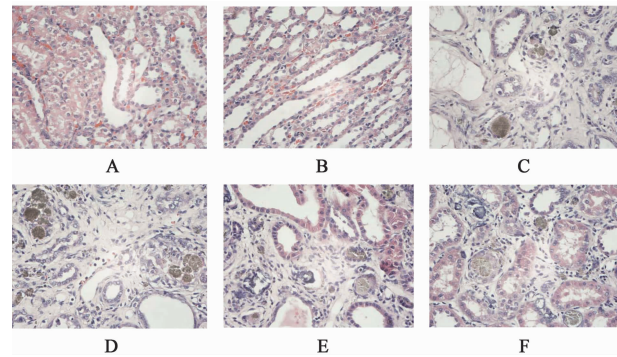
HE染色镜下可见到,正常组及假手术组肾脏大体结构正常;模型组肾小球球囊腔及肾小管腔均呈扩张状态,肾小管上皮细胞坏死脱落,管内可明显见到大量黄色腺嘌呤代谢产物结晶,存在重度肾间质纤维化,及大量炎细胞浸润;药物治疗组少量肾小管上皮细胞脱落,有少量黄色腺嘌呤代谢产物结晶,肾间质纤维化程度较模型组有所减轻。见图1。

表 1 温肾益髓生血方对肾性贫血大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on body mass of RA rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	治疗 0 周	治疗 3 周	治疗 6 周	治疗 9 周	治疗 12 周
正常	-	8	341.25 ± 2.381	354.81 ± 1.292	374.12 ± 3.205	398.25 ± 2.967	424.06 ± 2.120
假手术	-	8	341.00 ± 1.739	354.68 ± 1.264	374.69 ± 2.556	398.12 ± 2.193	426.26 ± 1.602
模型	-	7	343.21 ± 3.422	333.50 ± 5.867	321.36 ± 3.694 ^{2,4)}	306.64 ± 3.232 ^{2,4)}	300.07 ± 2.419 ^{1,4)}
尿毒清	2.33	7	341.28 ± 1.401	346.18 ± 3.102	357.28 ± 3.731 ⁶⁾	360.57 ± 2.216 ^{1,3,6)}	369.93 ± 4.462 ^{1,3,6)}
温肾益髓生血	3.50	7	340.57 ± 0.751	341.14 ± 2.560	342.00 ± 4.003 ⁶⁾	352.35 ± 1.949 ^{1,3,6)}	356.57 ± 2.806 ^{1,3,6)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与假手术组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与模型组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2~7 同)。



A. 正常组; B. 假手术组; C, D. 模型组; E. 尿毒清组; F. 温肾益髓生血组

图 1 温肾益髓生血方对各组大鼠肾组织病理形态学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on pathological morphology of renal tissue of rats(HE, ×400)

3.4 温肾益髓生血方对肾性贫血大鼠外周血象的影响 与正常组及假手术组相比,模型组大鼠外周血 RBC,HGB 显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,

表 3 温肾益髓生血方对肾性贫血大鼠 SCr,BUN,UA 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on SCr, BUN, UA in serum of RA rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	UA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	8	52.630 ± 2.986	6.454 ± 0.594	87.385 ± 6.415
假手术	-	8	52.346 ± 4.574	6.916 ± 0.546	84.073 ± 5.646
模型	-	7	213.977 ± 13.077 ^{2,4)}	42.251 ± 2.253 ^{2,4)}	187.690 ± 13.333 ^{2,4)}
尿毒清	2.33	7	136.943 ± 23.776 ^{2,4,6)}	21.050 ± 3.214 ^{2,4,6)}	89.270 ± 16.274 ⁶⁾
温肾益髓生血	3.50	7	143.216 ± 19.473 ^{2,4,6)}	25.784 ± 4.015 ^{2,4,6)}	104.261 ± 25.685 ⁶⁾

3.6 温肾益髓生血方对肝组织 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, hepcidin mRNA 表达的影响 与正常组及假手术组比较,模型组大鼠肝组织 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, hepcidin mRNA 表达显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,温肾益髓生血组 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, hepcidin mRNA 表达显著减少($P < 0.01$)。见表 4,5,图 2。

尿毒清组和温肾益髓生血组大鼠外周血 RBC,HGB 显著升高($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 温肾益髓生血方对肾性贫血大鼠外周血象的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on peripheral blood cells of RA rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	RBC / ×10 ¹² 个	HGB /g·L ⁻¹
正常	-	8	8.607 ± 0.159	156.250 ± 2.202
假手术	-	8	8.930 ± 0.157	159.875 ± 2.748
模型	-	7	4.871 ± 0.362 ^{2,4)}	89.286 ± 6.528 ^{2,4)}
尿毒清	2.33	7	5.617 ± 0.317 ^{1,4,6)}	107.429 ± 6.305 ^{1,4,6)}
温肾益髓生血	3.50	7	5.168 ± 0.225 ^{2,4,6)}	102.000 ± 5.014 ^{2,4,6)}

3.5 温肾益髓生血方对肾性贫血大鼠血清 SCr, BUN,UA 的影响 与正常组及假手术组比较,模型组大鼠血清 SCr, BUN,UA 均显著升高($P < 0.01$),与模型组比较,各治疗组大鼠血清 SCr, BUN,UA 水平显著降低($P < 0.01$)。见表 3。

3.7 温肾益髓生血方对肝组织 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, hepcidin 蛋白表达的影响 与正常组及假手术比较,模型组大鼠肝组织 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, hepcidin 蛋白表达显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,温肾益髓生血组 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, hepcidin 蛋白表达显著减少($P < 0.01$)。见表 6,7,图 3。

表 4 温肾益髓生血方对肝组织 BMP6, Smad1, Smad5 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on BMP6, Smad1, Smad5 mRNA expressions in liver tissue ($\bar{x} \pm s, n = 6$) IA

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMP6	Smad1	Smad5
正常	-	0.126 ± 0.001	0.114 ± 0.001	0.125 ± 0.001
假手术	-	0.125 ± 0.001	0.113 ± 0.001	0.127 ± 0.001
模型	-	0.245 ± 0.001 ^{2,4)}	0.266 ± 0.001 ^{2,4)}	0.254 ± 0.001 ^{2,4)}
尿毒清	2.33	0.174 ± 0.001 ^{2,6)}	0.142 ± 0.001 ^{2,6)}	0.154 ± 0.001 ^{2,6)}
温肾益髓生血	3.50	0.206 ± 0.003 ^{2,4,6)}	0.176 ± 0.001 ^{2,4,6)}	0.195 ± 0.001 ^{2,4,6)}

表 5 温肾益髓生血方对肝组织 Smad8, Smad4, hepcidin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on Smad8, Smad4, hepcidin mRNA expressions in liver tissue ($\bar{x} \pm s, n = 6$) IA

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Smad8	Smad4	hepcidin
正常	-	0.137 ± 0.001	0.132 ± 0.001	0.135 ± 0.001
假手术	-	0.136 ± 0.001	0.133 ± 0.001	0.135 ± 0.001
模型	-	0.283 ± 0.001 ^{2,4)}	0.263 ± 0.001 ^{2,4)}	0.264 ± 0.001 ^{2,4)}
尿毒清	2.33	0.175 ± 0.001 ^{2,6)}	0.155 ± 0.001 ^{2,6)}	0.142 ± 0.001 ^{2,6)}
温肾益髓生血	3.50	0.195 ± 0.001 ^{2,4,6)}	0.184 ± 0.001 ^{2,4,6)}	0.197 ± 0.001 ^{2,4,6)}

表 6 温肾益髓生血方对肝组织 BMP6, Smad4, Smad1/5/8 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on BMP6, Smad4 and Smad1/5/8 protein expressions in liver tissue ($\bar{x} \pm s, n = 6$) IA

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BMP6	Smad4	Smad1/5/8
正常	-	0.128 ± 0.003	0.114 ± 0.001	0.124 ± 0.001
假手术	-	0.129 ± 0.002	0.111 ± 0.001	0.123 ± 0.001
模型	-	0.227 ± 0.009 ^{2,4)}	0.237 ± 0.001 ^{2,4)}	0.285 ± 0.002 ^{2,4)}
尿毒清	2.33	0.130 ± 0.002 ^{2,6)}	0.137 ± 0.001 ^{2,6)}	0.185 ± 0.001 ^{2,6)}
温肾益髓生血	3.50	0.157 ± 0.001 ^{2,4,6)}	0.175 ± 0.001 ^{2,4,6)}	0.215 ± 0.004 ^{2,4,6)}

表 7 温肾益髓生血方对肝组织 p-Smad1/5/8, hepcidin, Smad1/5/8/p-Smad1/5/8 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

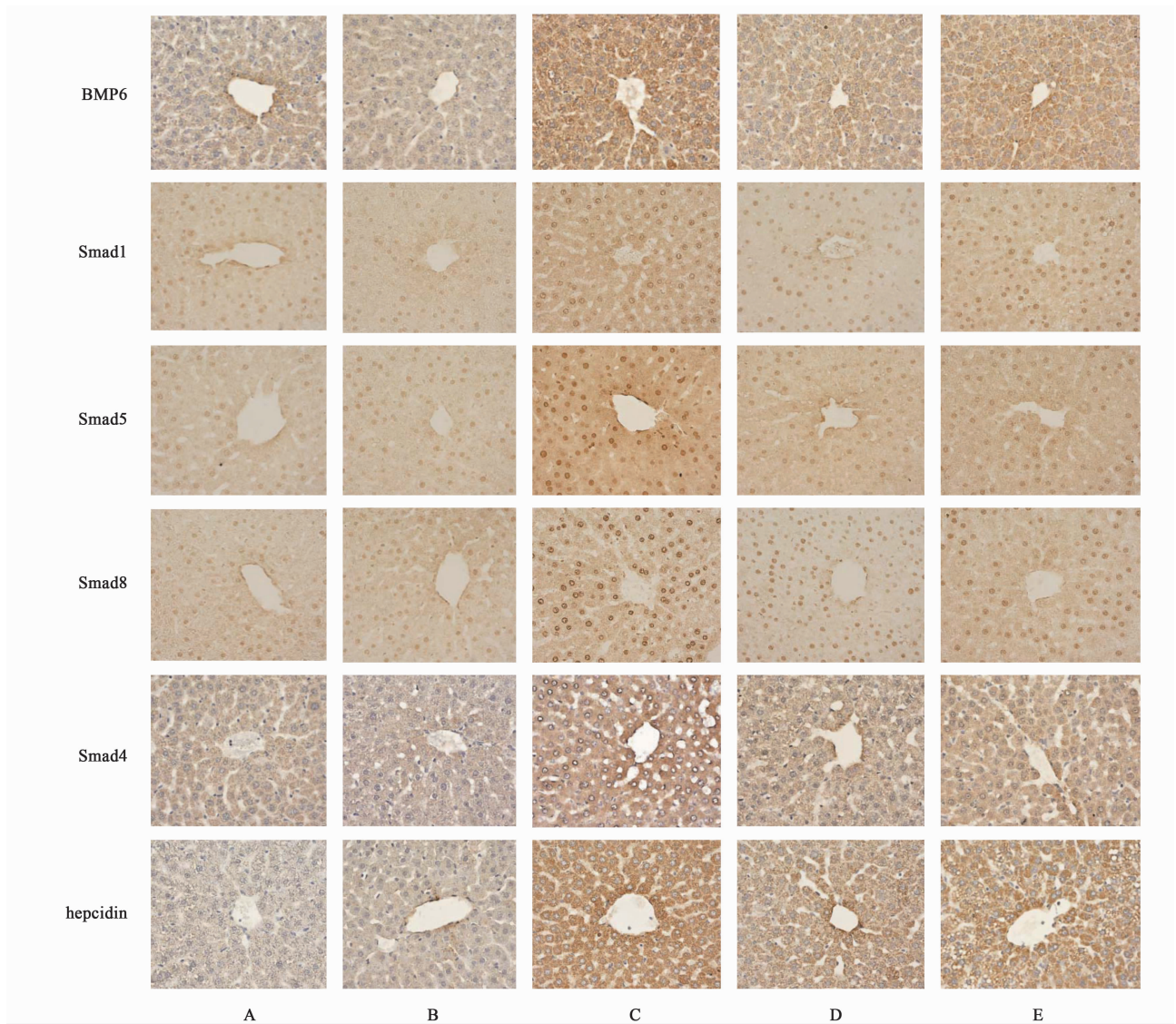
Table 7 Effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on p-Smad1/5/8, hepcidin, Smad1/5/8/p-Smad1/5/8 protein expressions in liver tissue ($\bar{x} \pm s, n = 6$) IA

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-Smad1/5/8	hepcidin	Smad1/5/8/p-Smad1/5/8
正常	-	0.124 ± 0.001	0.117 ± 0.003	1.006 ± 0.001
假手术	-	0.125 ± 0.001	0.116 ± 0.001	0.987 ± 0.001
模型	-	0.285 ± 0.002 ^{2,4)}	0.212 ± 0.001 ^{2,4)}	1.002 ± 0.001
尿毒清	2.33	0.175 ± 0.001 ^{2,6)}	0.115 ± 0.001 ^{2,6)}	1.056 ± 0.001
温肾益髓生血	3.50	0.215 ± 0.001 ^{2,6)}	0.148 ± 0.001 ^{2,4,6)}	1.001 ± 0.001

4 讨论

RA 的发生不仅会使机体各组织器官缺氧,加重多系统器官的损伤^[14],甚至导致其他代谢性紊乱、认知能力下降及免疫功能下降等,直接影响了患者的生活质量,肾功能衰竭引发贫血,而贫血又会加重肾功能恶化,两者相互影响^[15]。RA 的发生主要是由于肾功能衰竭导致促红细胞生成素产生相对或绝对不足,相关研究显示有一定数量的慢性肾衰竭患者即使补充足量的外源性 EPO 贫血状况也不能得到改善,主要原因是存在铁缺乏,目前大量文献及数据表明铁缺乏是 CKD 患者中贫血的常见原因之一,铁是红细胞合成的主要原料,铁缺乏及代谢紊乱

可加重 CKD 患者贫血的发生^[16]。hepcidin 是人类和其他哺乳动物机体铁代谢的主要调节因子^[17-18],主要的产生部位在肝脏。具有调节铁代谢功能的 hepcidin 主要以 hepcidin-25 的形式存在^[19]。hepcidin 对铁代谢的调控作用主要通过膜铁转运蛋白 1 (FPN1) 实现的^[20],主要作用是抑制肠道铁吸收和抑制单核巨噬细胞系统铁释放。炎症、缺氧等因素可以影响铁调素表达,慢性肾功能衰竭时,铁调素在体内不断累积^[21],使红细胞合成原料缺乏,导致肾性贫血的发生,也有研究证实,即使没有炎症,血清铁调素浓度也随肾功能恶化逐步升高^[22],所以,无论是肾功能损害还是机体所处的炎症状态,都可



A. 正常组;B. 假手术组;C. 模型组;D. 尿毒清组;E. 温肾益髓生血组(图 3 同)

图 2 温肾益髓生血方对肝组织 BMP6, Smad1, Smad5, Smad8, Smad4, hepcidin mRNA 表达的影响 (FISH, ×400)

Fig. 2 Effect of Wenren Yisui Shengxue prescription on BMP6, Smad1, Smad5, Smad8, Smad4, hepcidin mRNA expressions in liver tissue (FISH, ×400)

能使 RA 患者体内 hepcidin 水平升高,导致铁吸收及利用障碍,最终引发加重贫血。

调控 hepcidin 表达的分子信号通路有多条,而 BMP/Smad 信号通路是关键之一^[23],BMP 是转化生长因子-β(TGF-β)超家族中的一员,包括 BMP6 在内的 BMPs 已经被证实能够影响 hepcidin 的生成,而 BMP6 在铁调素的表达中最重要^[24],在肝脏中,BMP6 与相关受体 HJV-BMP 相结合,形成具有高亲和力的异四聚体,该四聚体被激活后进一步使 Smad1/5/8 磷酸化,p-Smad1/5/8 与 Smad4 结合形成复合体,最后,进入细胞核刺激 hepcidin 基因的表达。

中医将 RA 归属于“虚劳”、“血虚”等范畴,其

总病机以虚为主,由虚致实,虚实夹杂,多数医家以及文献报道表明 RA 的形成与脾肾两脏密切相关,对 130 例 CKD3 ~ 5 期患者进行中医证候研究发现,本虚证中,脾肾阳虚证占 23.8%,仅次于 CKD5 期时的阴阳两虚证(30.1%)^[9]。肾为先天之本,主藏精,精能生髓化血,为调节机体代谢及生长发育的重要器官,若肾精亏虚,则不能化生精血而致贫血,肾阳是血液生化的原动力,若肾阳不足,不能温煦脾阳而无以运化水谷精微,导致贫血的发生,杜雨茂教授同样认为中医治疗 RA,关键应从脾肾论治^[25]。本课题的温肾生血方是在补肾益髓生血法下组方的,其以“肾藏精、生髓化血”为理论指导,在补肾益髓生血方的基础上加入淫羊藿,即为温肾益髓生血方,

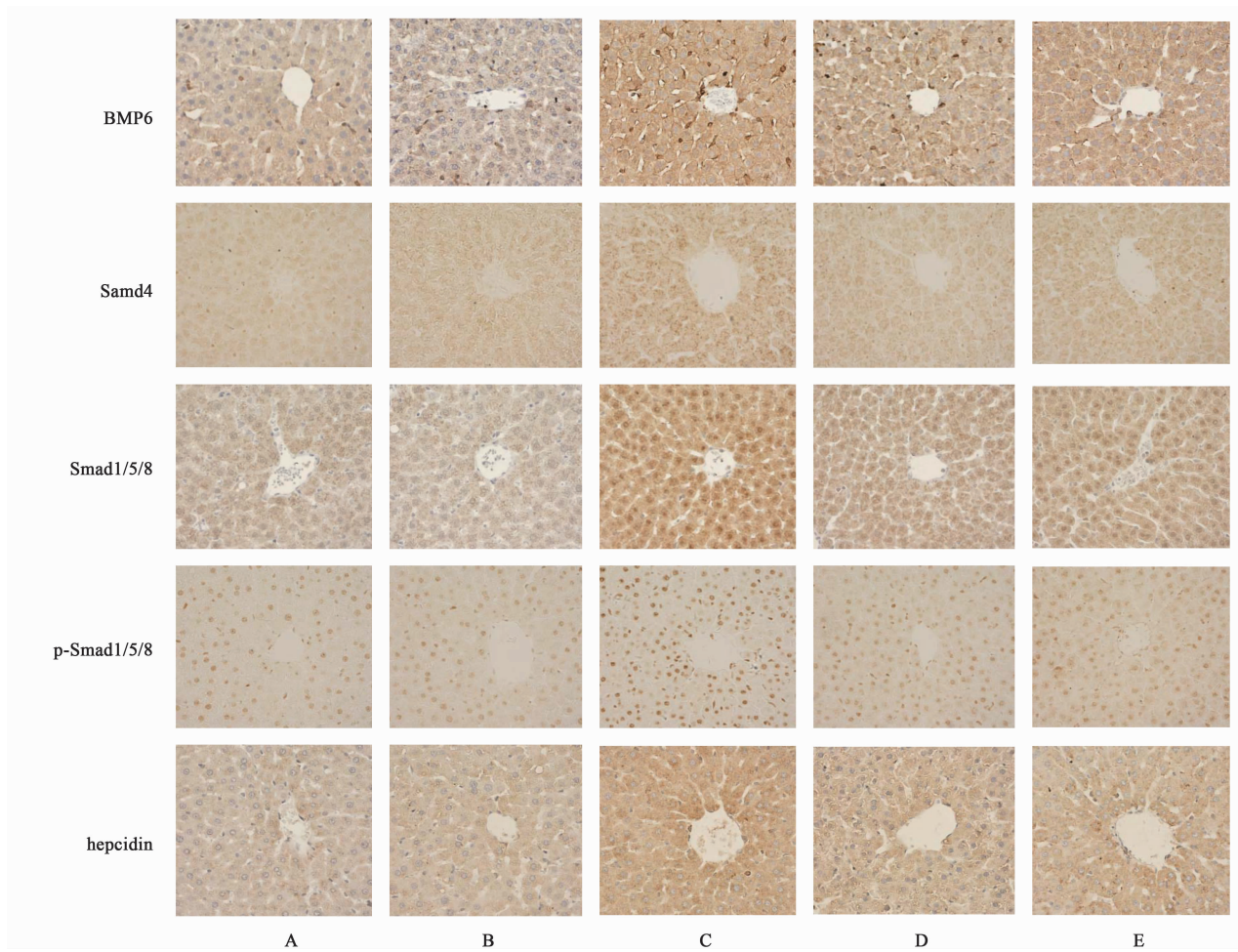


图 3 温肾益髓生血方对肝组织 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, hepcidin 蛋白表达的影响 (IHC, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Wenshen Yisui Shengxue prescription on BMP6, Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, hepcidin protein expressions in liver tissue (IHC, $\times 400$)

温肾益髓生血方以山茱萸、何首乌滋阴补肾为君药，补骨脂、熟地黄以助君生精化血，炙黄芪、党参健脾益气，臣药以阿胶、当归养血补血，鸡血藤、鳖甲共为佐药活血化瘀，砂仁为使药，淫羊藿性温、味辛、甘，主要归肝、肾经，具有温补肾阳等作用，使全方发挥温肾健脾，益髓生血的功效，根据 RA 临床以脾肾阳虚多见，选用温肾益髓生血方对其进行疗效及作用机制的研究更加符合 RA 的中医症候特点。

本研究采用动物造模方法是先切除大鼠单侧肾脏，残留肾的代偿功能逐渐减弱，再给予腺嘌呤灌胃，腺嘌呤在大鼠体内代谢生成 2,8-二羟基腺嘌呤，最终形成尿酸，析出尿酸盐结晶，主要沉积于肾小管和肾间质部位。有研究显示，还会发生肾脏微血管系统的进行性损伤，导致肾单位大量丧失^[26]，由此 EPO 生成急剧减少，另外，慢性肾衰竭大鼠肾间质有大量炎细胞浸润，导致大鼠肝脏 hepcidin 合成增多，再加上肾功能的下降导致 hepcidin 排泄减

少，阻碍了可利用铁的转运和吸收，造成红细胞合成原料不足，诱发贫血^[27]。该造模方法由本课题组经过不断摸索而成，对大鼠肾脏的损伤的是个循序渐进的过程，容易控制肾衰竭及贫血的程度，期间可以通过调整腺嘌呤剂量的大小和灌胃时间长短来控制疾病的轻重。

实验中的模型组大鼠肾脏可见到重度的肾间质纤维化，大量黄色腺嘌呤代谢产物结晶，疾病状态下导致大鼠体质量随着实验的进行呈下降趋势，肾功能明显下降，同时，血常规结果显示 RBC 及 HGB 水平显著降低，出现贫血，表明本实验所制备的动物模型比较符合 RA 的病理特点。应用温肾益髓生血方后，肾性贫血大鼠的一般状态得到明显改善，其蜷缩、喜眯眼、眼睑浮肿等类似于人类肾阳虚的表现明显减少，RA 大鼠的肾脏病理改变减轻，大鼠血清中 BUN, SCr, UA 含量显著下降，该方能够升高血 RBC, HGB 水平，改善贫血，作用显著。

实验结果表明, RA 大鼠肝组织中 BMP6, Smad4, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, hepcidin 蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高, 给药治疗后, 这些蛋白及 mRNA 水平降低, 总的 Smad1/5/8 与 p-Smad1/5/8 比值各组间无明显差异, 说明治疗药物降低铁调素水平通过降低 Smad1/5/8 表达来实现的, 而不是抑制其磷酸化过程。由实验结果可知, 温肾生血方可能通过抑制 BMP/Smad 信号转导通路的相关蛋白及基因表达, 进而纠正肾性贫血, 而 RA 的诱发因素有很多, 如 EPO 受体异常等^[28], 该研究只涉及了一个方面, 根据中医药治疗的多靶点性, 是否还存在其他作用途径, 值得进一步探索研究。

[参考文献]

[1] Portolés J, Gorri J L, Rubio E, et al. The development of anemia is associated to poor prognosis in NKF/KDOQI stage 3 chronic kidney disease [J]. BMC Nephrol, 2013, 14(4): 2.

[2] 马春园, 何樟秀, 周阳, 等. 慢性肾脏病 3~5 D 期贫血状况的单中心横断面调查 [J]. 临床肾脏病杂志, 2017, 17(4): 205-210.

[3] 李堃瑛, 魏日胞, 李锋, 等. 慢性肾脏病患者肾性贫血相关因素及中医学研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(9): 770-772.

[4] KDIGO: Clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease [J]. Kid Inter Suppl, 2012, 2(4): 283-287.

[5] 王艳丽. 慢性肾脏病患者贫血现况的调查及其分析 [J]. 湖北中医杂志, 2016, 38(5): 16-18.

[6] 李静, 王晓阳, 赵占正. 慢性肾脏病 3~5 期末透析患者贫血情况调查及影响因素分析 [J]. 河南医学研究, 2016, 25(4): 629-630.

[7] 夏菊花, 王莉. 维持性血液透析患者铁剂的合理使用 [J]. 实用医院临床杂志, 2016, 13(2): 140-143.

[8] 张丰丰, 赵宗江, 张新雪, 等. 补肾益髓生血法对苯与环磷酰胺诱导 AA 大鼠 Th1/Th2 细胞分泌细胞因子影响的实验研究 [J]. 世界中医药, 2014, 9(6): 704-706, 712.

[9] 李堃瑛, 魏日胞, 李锋, 等. 慢性肾脏病患者肾性贫血相关因素及中医学研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(9): 770-772.

[10] 张蕾, 刘旭生. 195 例慢性肾脏病 3~5 期中证候分布规律探析 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(6): 980-983.

[11] 刘立文. 慢性肾脏病 3~5 期的证候分布规律研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2014.

[12] 赵宗江, 魏晨, 杨美娟, 等. 复方鳖甲软肝片防治大鼠腺嘌呤慢性肾衰竭作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6(12): 687-690.

[13] 高华, 魏敏杰, 蔡彤. 药理学实验方法 [M]. 北京: 中

国医药科技出版社, 2012: 76-77.

[14] Krishnan A R, Trinder D, Chua A C G, et al. Anaemia of chronic kidney disease: what we know now [J]. J Renal Hep Dis, 2017, 1(1): 11-19.

[15] 高焕, 袁捷, 程小红, 等. 当归补血汤联合促红细胞生成素治疗肾性贫血 34 例 [J]. 河南中医, 2014, 34(3): 549-550.

[16] Zadrazil J, Horak P. Pathophysiology of anemia in chronic kidney diseases: a review [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2015, 159(2): 197-202.

[17] Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation [J]. Blood, 2003, 102(3): 783-788.

[18] ZHAO N, ZHANG A S, Caroline A E. Iron regulation by hepcidin [J]. J Clin Invest, 2013, 123(6): 2337-2343.

[19] Nicolas G, Vaulont S, Kahn A. Heparin inhibitors for regulating iron homeostasis, US9234903 B2 [P]. 2016-01-12.

[20] Hentze M W, Muckenthaler M U, Galy B, et al. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism [J]. Cell, 2010, 142(1): 24-38.

[21] Lehmann C, Islam S, Jarosch S, et al. The utility of iron chelators in the management of inflammatory disorders [J]. Med Inflamm, 2015, 2015: 516740.

[22] Shoji S, Inaba M, Tomosugi N, et al. Greater potency of darbepoetin- α than erythropoietin in suppression of serum hepcidin-25 and utilization of iron for erythropoiesis in hemodialysis patients [J]. Eur J Haematol, 2013, 90(3): 237-244.

[23] Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, et al. Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling [J]. Blood, 2012, 120(2): 431-439.

[24] Enns C A, Ahmed R, WANG J, et al. Increased iron loading induces BMP6 expression in the non-parenchymal cells of the liver independent of the BMP-signaling pathway [J]. PLoS One, 2013, 8(4): 7811-7819.

[25] 张敏. 杜雨茂教授治疗慢性肾功能衰竭的经验总结 [J]. 陕西中医学院学报, 2013, 36(5): 24-26.

[26] 李秀花, 赵丽君, 李娜, 等. 腺嘌呤诱导幼鼠慢性肾功能衰竭模型建立的实验研究 [J]. 山西医科大学学报, 2016, 47(11): 978-981.

[27] Icardi A, Paoletti E, De Nicola L, et al. Cozzolino M. Renal anaemia and EPO hyporesponsiveness associated with vitamin D deficiency: the potential role of inflammation [J]. Nephrol Dialy Trans, 2013, 28(7): 1672-1679.

[28] 曹金如, 陈寿云, 吴丽丹, 等. 可溶性促红细胞生成素受体在肾性贫血中的临床意义 [J]. 检验医学, 2015, 30(4): 353-355.