

肾安颗粒对 5/6 肾切除模型大鼠骨代谢的影响

邹新蓉*, 王小琴, 周全
(湖北省中医院, 武汉 430061)

[摘要] **目的:**探讨肾安颗粒对 5/6 肾切除模型大鼠骨代谢的影响。**方法:**应用 5/6 肾切除建立大鼠肾性骨病(ROD)模型,随机分为正常组,假手术组,模型组,阳性药骨化三醇组($1.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),肾安颗粒低、高剂量组($2.25, 4.5 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),给予相应药物 *ig* 8 周,给药前、后检测大鼠血尿素氮(BUN),血肌酐(SCr),血红蛋白(HGB),钙(Ca),磷(P),碱性磷酸酶(ALP),化学发光法测全段甲状旁腺素(iPTH),双能 X 射线测骨密度。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血 BUN,SCr 水平明显升高($P < 0.05$),HGB,血 Ca,骨密度明显降低($P < 0.05$),血 P,ALP,全段 iPTH 明显升高($P < 0.05$)。治疗后与模型组比较,肾安颗粒 $2.25, 4.5 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组大鼠血 BUN,SCr 水平明显降低($P < 0.05$),HGB,血 Ca,骨密度明显升高($P < 0.05$),血 P,ALP,全段 iPTH 明显降低($P < 0.05$)。**结论:**肾安颗粒能明显改善 5/6 肾切除模型大鼠肾功能和骨代谢指标,延缓肾功能进展和减轻并发症。

[关键词] 肾安颗粒; 5/6 肾切除; 骨代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0106-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040106

Effect of Shen'an Granule on Bone Metabolism in 5/6 Nephrectomy Model Rats

ZOU Xin-rong*, WANG Xiao-qin, ZHOU Quan

(Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shen'an granule on bone metabolism in 5/6 nephrectomy model rats. **Method:** Renal osteodystrophy (ROD) rat models were established using 5/6 nephrectomy. The rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, positive drug calcitriol group ($1.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Shen'an granules low dose group and high dose group ($2.25, 4.5 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Corresponding drugs were given by gavage for 8 weeks. Before and after treatment, blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), hemoglobin (HGB), calcium (Ca), phosphor (P), and alkaline phosphatase (ALP) were detected; intact parathyroid hormone (iPTH) was detected with chemiluminescence method, and bone density was measured with dual energy X ray. **Result:** Compared with the normal group, BUN and SCr levels of ROD model rats were significantly increased ($P < 0.05$), HGB, serum Ca and bone density levels were significantly decreased ($P < 0.05$), serum P, ALP and whole iPTH levels were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, BUN and SCr levels in Shen'an granule $2.25, 4.5 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$), HGB, serum Ca and bone density levels were significantly increased ($P < 0.05$), serum P, ALP and whole iPTH levels were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shen'an granule can significantly improve the renal function and bone metabolism indexes in 5/6 nephrectomy model rats, and delay progression of renal function and reduce the complications.

[Key words] Shen'an granule; 5/6 nephrectomy; bone metabolism

[收稿日期] 20150523(002)

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目(财社[2011]172号);湖北省自然科学基金重点项目(2010CDA033)

[通讯作者] * 邹新蓉, 博士, 副主任医师, 从事中医药防治肾病的研究, Tel:13564785241, E-mail: zouxinrong133494@163.com

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是临床常见病和多发病,各种原发或继发性肾脏疾病持续进展,肾脏结构和功能破坏最终导致终末期肾病。CKD 骨矿物质代谢紊乱(chronic kidney disease-mineral and bone disorder, CKD-MBD)是 CKD 引起的矿物质代谢紊乱,甲状旁腺激素(PTH)或维生素 D 代谢异常,血管和软组织钙化,骨重建和修复异常,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死致残的重要原因。研究表明,肾脏结构和功能的破坏导致肾脏羟化酶系活性降低,1,25-二羟维生素 D₃[1,25-(OH)₂-Vit D₃]的生成相对或绝对不足(PTH)的合成与释放失控,是 CKD-MBD 中骨代谢异常发生的核心环节。肾安颗粒是湖北省中医院常用补肾泄浊的协定处方,由淫羊藿苷,黄芪甲苷,大黄蒽醌等有效成分组成。前期研究表明,肾安颗粒提取物可延缓糖尿病肾病的发生发展,机制可能与抑制转化生长因子-β₁(TGF-β₁)和相对分子质量为 38 kDa 的丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)的表达有关^[1]。肾安颗粒剂可明显改善慢性肾衰竭的临床症状及实验指标,其作用可能与该药抑制致肾衰恶化因子有关^[2]。本实验旨在观察肾安颗粒对 5/6 肾切除模型大鼠钙磷及骨代谢的影响,为其进一步的开发和应用提供依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 中药复方肾安颗粒由淫羊藿、黄芪、大黄(含量比 2:2:1)组成,由湖北省中医院制剂室制备,医院制剂号 20130526,含量标示以淫羊藿苷计算不低于 1.56 mg·g⁻¹,临用配制质量浓度分别为 0.225, 0.45 g·mL⁻¹液体。骨化三醇胶丸(海尔药业,批号 20141214,规格 0.25 μg/粒),用蒸馏水配制质量浓度为 0.15 μg·mL⁻¹的悬浊液。全段甲状旁腺素(iPTH)化学发光法免疫检测试剂盒(美国 Bechman Coulter,批号 20140552)。尿素氮(BUN),血肌酐(SCr),血红蛋白(HGB),血清碱性磷酸酶(ALP),血钙(Ca),血磷(P)试剂盒[研域生物技术(上海)有限公司,批号 20140771]。

1.2 动物 健康雄性 8 周龄 Wistar 大鼠 48 只,体重(130 ± 20) g,由湖北省实验动物中心提供,合格证号 SCXK(鄂)2009-0092。实验动物观察为开放式,温度,照明,噪音,换气等条件控制在规定范围内,每天定时饲养和观察动物。

1.3 仪器 CELL-DYN 1800 型血液分析仪(美国 Abbott 公司),Toshiba120 型全自动生化分析仪(日

本东芝公司),Immulite 1 000 型免疫分析仪(美国西门子公司),GE DPX-NT 型双能 X 射线骨密度床机(美国通用电气公司)。

2 方法

2.1 5/6 肾切除建立残肾大鼠模型^[3] 大鼠 ip 乌拉坦溶液麻醉后,打开背部,暴露左侧肾脏,剥离肾包膜,然后结扎左肾上下极并切除,观察无出血后关闭背部。术后第 2 天,给予大鼠高磷饮水。1 周以后,再次打开大鼠背部,夹住右侧肾动脉和右侧输尿管并结扎,切除右肾并关闭背部。

2.2 分组及给药 48 只大鼠随机分为正常组,假手术组,模型组,骨化三醇组 1.5 μg·kg⁻¹,肾安颗粒 2.25, 4.5 g·kg⁻¹组,每组 8 只。正常组不实施任何手术;假手术组仅打开背部后关闭,不切除肾脏;模型组和给药组大鼠按 2.1 项下方法行 5/6 肾切除术。术后 1 个月开始 ig 给药(10 mL·kg⁻¹),给药组大鼠分别给予相应药物,正常组,假手术组,模型组大鼠均 ig 给予等容量生理盐水。持续给药 8 周。

2.3 一般状况 每天观察动物的一般状况,包括外形,精神状态,饮食等。

2.4 标本采集 大鼠给药前,后眼球后血管丛分别取血,测定血清 BUN, SCr, HGB, ALP, 血 Ca, 血 P, iPTH。给药结束处死大鼠,取完整左侧股骨,剥离肌肉,干燥后测定股骨头部的骨密度(BMD)。

2.5 HGB, ALP, 肾功能指标测定 用血液分析仪测定 HGB,按试剂盒说明及全自动生化分析仪检测 BUN, SCr 和 ALP。

2.6 iPTH 测定 按试剂盒说明及免疫分析仪化学发光法检测血 iPTH。

2.7 BMD 检测 大鼠麻醉后迅速取出左下肢股骨,仔细剔除软组织,湿盐水纱布包裹, -20 °C 冻藏,待全部标本收齐后取出,室温下放置,充分解冻,干纱布吸干标本表面的水分,用双能 X 射线 BMD 床机检测大鼠右侧股骨近端 BMD。

2.8 统计学处理 应用 SPSS 11.8 软件包进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 One-Way ANOVA 检验。P < 0.05 为差异有意义。

3 结果

3.1 肾安颗粒对大鼠一般状况的影响 造模后,大鼠精神状态萎靡,眼神无力,饮食状况不佳;给予低剂量肾安颗粒治疗后,大鼠精神状态有所恢复,进食尚可;给予高剂量肾安颗粒或骨化三醇治疗后,大鼠行动敏捷,精神状态好,饮食情况良好。

3.2 对 BUN, SCr 和 HGB 含量的影响 用药前与

正常组、假手术组 2 组比较,模型组,骨化三醇组,肾安颗粒低、高剂量组大鼠 BUN, SCr, HGB 明显降低 ($P < 0.05$)。用药后与模型组比较,肾安颗粒低、高剂量组大鼠 BUN, SCr 明显降低, HGB 明显升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.3 对大鼠血 Ca, P, ALP, iPTH 含量的影响 用药前与正常组,假手术组两组比较,模型组,骨化三醇

组,肾安颗粒低、高剂量组大鼠血 Ca 明显降低 ($P < 0.05$), 血 P, ALP, iPTH 明显升高 ($P < 0.05$); 用药后骨化三醇组,肾安颗粒低、高剂量组 3 组大鼠血 Ca 较用药前明显升高,血 P, ALP, iPTH 较用药前明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较,骨化三醇组,肾安颗粒低、高剂量组大鼠血 Ca 明显升高,血 P, ALP, iPTH 明显降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 1 肾安颗粒对肾性骨病模型大鼠用药前后 BUN, SCr 和 HGB 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Shen'an granule on BUN, SCr and HGB levels before and after treatment in renal osteodystrophy (ROD) model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹		SCr/μmol·L ⁻¹		HGB/g·L ⁻¹	
		用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后
正常	-	7.4 ± 0.8	7.3 ± 0.5	23.5 ± 5.8	33.8 ± 5.4	141.4 ± 4.5	155.2 ± 22.1
假手术	-	7.8 ± 0.8	7.0 ± 0.8	24.1 ± 3.2	33.7 ± 5.9	136.8 ± 4.8	131.1 ± 19.1
模型	-	17.0 ± 3.7 ¹⁾	20.2 ± 4.5 ¹⁾	73.5 ± 23.0 ¹⁾	100.1 ± 26.7 ¹⁾	112.4 ± 8.3 ¹⁾	89.2 ± 7.5 ¹⁾
骨化三醇	1.5 × 10 ⁻⁶	15.9 ± 2.6	12.7 ± 4.3	65.8 ± 10.7 ¹⁾	73.5 ± 19.6	121.3 ± 10.0	122.6 ± 13.1
肾安颗粒	2.25	15.6 ± 4.1	12.5 ± 2.5 ²⁾	72.3 ± 21.4	59.6 ± 9.3 ²⁾	124.6 ± 8.0	134.0 ± 14.0 ²⁾
	4.5	15.7 ± 3.8	13.7 ± 2.3 ²⁾	74.6 ± 16.5	60.8 ± 8.3 ²⁾	118.0 ± 9.3	123.2 ± 5.4 ²⁾

注:用药前与正常组,假手术组两组比较¹⁾ $P < 0.05$; 用药后与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 肾安颗粒对肾性骨病大鼠用药前后血 Ca, P, ALP 和 iPTH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Shen'an granule on serum Ca, P, ALP and iPTH levels before and after treatment in renal osteodystrophy (ROD) model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Ca/mmol·L ⁻¹		P/mmol·L ⁻¹		ALP/U·L ⁻¹		iPTH/pg·L ⁻¹	
		用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后
正常	-	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.05	2.1 ± 0.3	1.8 ± 0.2	156.5 ± 23.2	122.4 ± 29.1	9.2 ± 2.0	9.7 ± 2.3
假手术	-	3.0 ± 0.08	3.1 ± 0.1	2.3 ± 0.4	2.4 ± 0.4	156.1 ± 28.0	128.7 ± 48.9	10.8 ± 2.9	9.2 ± 2.0
模型	-	1.9 ± 0.4 ¹⁾	1.8 ± 0.4 ¹⁾	3.8 ± 0.5 ¹⁾	4.1 ± 0.9 ¹⁾	181.5 ± 32.2 ¹⁾	197.0 ± 31.5 ¹⁾	13.0 ± 6.6 ¹⁾	14.0 ± 4.5 ¹⁾
骨化三醇	1.5 × 10 ⁻⁶	2.1 ± 0.8	2.9 ± 0.1 ²⁾	3.6 ± 0.7 ¹⁾	3.4 ± 0.7	167.3 ± 21.9	130.6 ± 22.9 ²⁾	12.1 ± 3.9	9.6 ± 1.5 ²⁾
肾安颗粒	2.25	2.0 ± 0.2	2.7 ± 0.1 ²⁾	3.4 ± 0.6 ¹⁾	2.5 ± 0.1 ²⁾	172.0 ± 38.2	135.1 ± 23.3 ²⁾	12.3 ± 2.1	8.7 ± 1.2 ²⁾
	4.5	2.0 ± 0.05	2.8 ± 0.08 ²⁾	3.7 ± 0.6 ¹⁾	2.7 ± 0.2 ²⁾	182.2 ± 20.6	133.6 ± 40.6 ²⁾	11.9 ± 3.4	9.3 ± 0.7 ²⁾

3.4 对大鼠股骨 BMD 的影响 与正常组比较,模型组大鼠 BMD 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较,骨化三醇组,肾安颗粒低、高剂量组大鼠 BMD 明显增高 ($P < 0.05$), 见表 3。

4 讨论

CKD-MBD 骨骼的主要病理变化包括 BMD 疏松,骨转化异常,骨质结构异常。在 CKD 进展中,由于饮食中维生素 D 和钙摄入不足,肾脏 1-α 羟化酶分泌减少,1,25-(OH)₂-Vit D₃ 生成障碍,肠道钙吸收减少,血钙水平降低,甲状旁腺细胞内的维生素 D 受体表达下调和钙感受体活化障碍,对甲状旁腺的抑制效应降低,使得 PTH 分泌增多^[4]。同时,随

表 3 肾安颗粒对各组大鼠肾性骨病 BMD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Shen'an granule on BMD levels of RDD model rats after drug administration ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BMD /g·cm ⁻²
正常	-	164.75 ± 41.60
假手术	-	168.36 ± 13.45
模型	-	120.15 ± 12.02 ¹⁾
骨化三醇	1.5 × 10 ⁻⁶	160.13 ± 4.86 ²⁾
肾安颗粒	2.25	165.73 ± 8.22 ²⁾
	4.5	158.63 ± 7.46 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

着肾小球滤过率(GFR)的下降,肾脏尿磷排泄减少,磷清除降低,血磷升高。高磷血症一方面直接刺激甲状旁腺组织增生分泌PTH;另一方面刺激FGF-23的生成增多,1- α 羟化酶活性受抑制,对甲状旁腺的负反馈抑制效应减弱,PTH分泌增多^[5];此外PTH作用肾和肠,使尿磷排泄减少,磷吸收增多,从而又加重高磷血症,钙磷乘积增高,作用于心脏和血管,加速了CKD进程。

本研究以5/6肾切除合并高磷饮水方法制作CKD合并MBD大鼠模型,对模型大鼠给予肾安颗粒干预治疗,常规检测用药前后HGB,SCr,UN,ALP,iPTH,Ca,P及用药后BMD情况。结果显示,5/6肾切除术后1月,各造模组SCr,BUN与正常组和假手术组比较明显升高,HGB明显降低,血Ca,BMD降低,血ALP,P,iPTH升高,提示CKD-MBD模型制作成功。药物干预后,不同浓度肾安颗粒组SCr,BUN与模型组比较明显降低,HGB明显升高;肾安颗粒组与骨化三醇组比较HGB,SCr,BUN亦有明显改善。生化,免疫及BMD检查结果显示,骨化三醇组血Ca升高,iPTH,ALP降低,BMD增强,但血P变化不明显;而不同剂量肾安颗粒干预后,大鼠血Ca升高,血ALP,P,iPTH降低,BMD增强,但其作用不呈剂量依赖性。

CKD发病机制为气血不足,脾肾亏虚,水液代谢障碍,随病情进展加重又易产生湿热,湿浊,瘀毒等邪实之患。肾安颗粒由黄芪、淫羊藿、大黄组成,能补肾健脾,祛瘀泄浊。方中黄芪能补益肺脾,通过阻止Caspase-3活化,并通过MAPK信号通路减轻补体膜攻击复合物诱导的足细胞损伤,从而达到减轻小管间质的损伤,抑制肾纤维化^[6-7]。淫羊藿是临床常用补肾壮阳,益精健骨中药,淫羊藿苷具有抑制破骨细胞分化和成熟,改善骨代谢的作用,能够通过减少细胞S期比例,增加细胞G₀/M比例,阻止肾脏细胞凋亡,改善肾脏功能^[8]。大黄功能清湿热化瘀,祛浊排毒,能减少TGF- β_1 和 α -平滑肌肌动蛋白的表达,从而阻止肾纤维化^[9]。本研究显示,肾安颗粒不但能改善CKD-MBD模型大鼠肾功能,同时

能改善钙磷代谢,降低碱性磷酸酶活性,调节PTH水平,增强BMD,从而改善骨代谢,减轻CKD伴发的骨损伤,为中医药干预CKD及其并发症的治疗提供新思路和方法,但其作用机制还有待后期进一步研究。

[参考文献]

- [1] 向少伟,王小琴,唐庆. 肾安提取液对糖尿病小鼠肾脏TGF- β_1 和p38MAPK表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 2(5):314-316.
- [2] 王小琴,邵朝弟,谭大琦,等. 肾安颗粒治疗慢性肾衰竭的临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 7(4):393-395.
- [3] 沙朝晖,付平,周莉,等. 大鼠5/6肾切除慢性肾功能衰竭动物模型的实验研究[J]. 四川动物, 2006, 25(3):632-634.
- [4] Rodriguez M, Munoz-Castaneda J R, Almaden Y. Therapeutic use of calcitriol[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2014, 12(2):294-299.
- [5] 唐荣,唐德. 慢性肾脏病患者骨矿物质代谢紊乱的发病机制与治疗的研究进展[J]. 广东医学院学报, 2010, 28(2):202-204.
- [6] Xu W, Shao X, Tian L, et al. Astragaloside IV ameliorates renal fibrosis via the inhibition of mitogen-activated protein kinases and antiapoptosis *in vivo* and *in vitro*[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 350(3):552-562.
- [7] Zheng R, Deng Y, Chen Y, et al. Astragaloside IV attenuates complement membranous attack complex induced podocyte injury through the MAPK pathway[J]. Phytother Res, 2012, 26(6):892-898.
- [8] Liang S R, Bi J W, Guo Z L, et al. Protective effect of icariin on kidney in 5/6 nephrectomized rats and its mechanism [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(3):6466-6471.
- [9] He D, Lee L, Yang J, et al. Preventive effects and mechanisms of rhein on renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(8):1219-1226.

[责任编辑 聂淑琴]