

肾衰营养胶囊对肾性骨病模型大鼠肾功能和骨代谢的改善作用 及其对BMP-7/Smads信号通路的影响

陈杰彬¹, 胡蓉², 吕佩佳¹, 李成杰¹, 魏连波³

(1. 南方医科大学中西医结合医院肾病科, 广东 广州 510315; 2. 南方医科大学中医药学院中医内科, 广东 广州 510515; 3. 南方医科大学深圳医院中医科, 广东 深圳 518000)

[摘要] **目的:** 探讨肾衰营养胶囊对肾性骨病模型大鼠的改善作用及其对骨形态发生蛋白(BMP)-7/Smads信号通路的影响, 阐明肾性骨病模型大鼠肾功能和骨代谢与肾性骨病的关系。**方法:** 选取50只SPF级SD大鼠, 随机选取10只大鼠作为对照组, 另外40只大鼠建立肾性骨病模型。将30只造模成功大鼠分为模型组、阳性对照组和肾衰营养胶囊组, 每组各10只。对照组和模型组大鼠采用生理盐水灌胃, 阳性对照组大鼠给予0.01 mg·kg⁻¹骨化三醇灌服, 肾衰营养胶囊组大鼠给予1.2 g·kg⁻¹肾衰营养胶囊灌服, 均灌胃12周。采用HE染色观察各组大鼠股骨组织病理形态表现, 全自动生化分析仪和化学发光法检测各组大鼠血清中肾功能和钙磷代谢指标, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组大鼠股骨组织中BMP-7和Smad1/5/8 mRNA表达水平, Western blotting法检测各组大鼠股骨组织中BMP-7、磷酸化BMP-7(p-BMP-7)、Smad1/5/8和磷酸化Smad1/5/8(p-Smad1/5/8)蛋白表达水平。**结果:** HE染色, 对照组大鼠骨小梁排列正常, 成骨细胞和类骨质面积未发生改变; 模型组大鼠骨小梁宽度和平均类骨质面积增加, 成骨细胞数量减少; 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠骨小梁宽度及平均类骨质面积减小, 成骨细胞数量增加。与对照组比较, 模型组大鼠血尿素氮(BUN)和血肌酐(Scr)水平均升高($P<0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠BUN及Scr水平均降低($P<0.05$); 与阳性对照组比较, 肾衰营养胶囊组大鼠BUN和Scr水平均降低($P<0.05$)。与对照组比较, 模型组大鼠血清中钙离子(Ca²⁺)水平降低($P<0.05$), 磷离子(P³⁻)、甲状旁腺激素(PTH)和碱性磷酸酶(ALP)水平均升高($P<0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠血清中Ca²⁺水平升高($P<0.05$), P³⁻、PTH和ALP水平均降低($P<0.05$); 与阳性对照组比较, 肾衰营养胶囊组大鼠血清中Ca²⁺水平升高($P<0.05$), P³⁻、PTH和ALP水平均降低($P<0.05$)。RT-qPCR法, 与对照组比较, 模型组大鼠股骨组织中BMP-7和Smad1/5/8 mRNA表达水平降低($P<0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠股骨组织中BMP-7及Smad1/5/8 mRNA表达水平升高($P<0.05$); 与阳性对照组比较, 肾衰营养胶囊组大鼠股骨组织中BMP-7和Smad1/5/8 mRNA表达水平升高($P<0.05$)。Western blotting法, 与对照组比较, 模型组大鼠股骨组织中BMP-7、p-BMP-7、Smad1/5/8和p-Smad1/5/8蛋白表达水平均降低($P<0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠股骨组织中BMP-7、p-BMP-7、Smad1/5/8和p-Smad1/5/8蛋白表达水平均升高($P<0.05$); 与阳性对照组比较, 肾衰营养胶囊组大鼠股骨组织中BMP-7、p-BMP-7、Smad1/5/8和p-Smad1/5/8蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。**结论:** 肾衰营养胶囊可改善肾性骨病模型大鼠的肾功能和钙磷代谢紊乱, 促进骨髓基质细胞增殖, 改善骨代谢情况, 其机制可能与激活BMP-7/Smads信号通路有关。

[关键词] 肾性骨病; 肾衰营养胶囊; 骨形态发生蛋白7; Smad同源物重组蛋白; 骨密度

[中图分类号] R692; R681 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82104795)

[作者简介] 陈杰彬(1979—), 男, 广东省潮州市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事中医药治疗肾脏疾病机制方面的研究。

[通信作者] 魏连波, 主任医师, 博士研究生导师(E-mail: weilianbo@163.com)

Improvement effect of Shenshuai Yingyang Capsule on renal function and bone metabolism in renal osteodystrophy model rats and its effect on BMP-7/Smads signaling pathway

CHEN Jiebin¹, HU Rong², LYU Peijia¹, LI Chengjie¹, WEI Lianbo³

(1. Department of Nephrology, Hospital of integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510315, China; 2. Department of Traditional Chinese Internal Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the improvement effect of Shenshuai Yingyang Capsule in the renal osteodystrophy model rats and its effect on the bone morphogenetic protein (BMP) -7/Smads signaling pathway, and to clarify the relationship between renal function and bone metabolism in the renal osteodystrophy model rats. **Methods:** Fifty SPF SD rats were selected, and 10 of which were randomly chosen as control group, and the remaining 40 rats were used to establish the renal osteodystrophy model. Thirty successful modeling rats were divided into model group, positive control group, and Shenshuai Yingyang Capsule group, and there were 10 rats in various groups. The rats in control and model groups were given saline, the rats in positive control group were given $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ calcitriol, and the rats in Shenshuai Yingyang Capsule group were given $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Shenshuai Yingyang Capsule, all the rats were treated for 12 weeks. HE staining was used to observe the pathomorphology of femur tissue of the rats in various groups; automatic biochemical analyzer and chemiluminescence were used to detect the kidney function and calcium-phosphorus metabolism indicators in serum of the rats in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of BMP-7 and Smad1/5/8 mRNA in femur tissue of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of BMP-7, phosphorylated BMP-7 (p-BMP-7), Smad1/5/8, and phosphorylated-Smad1/5/8 (p-Smad1/5/8) proteins in femur tissue of the rats in various groups. **Results:** The HE staining results showed that there was normal trabecular arrangement in control group with unchanged osteoblasts and osteoid area. In model group, the trabecular width and average osteoid area were increased, while the number of osteoblasts was decreased. In positive control and Shenshuai Yingyang Capsule groups, the trabecular width and average osteoid area were decreased, and the number of osteoblasts was increased. Compared with control group, the levels of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) of the rats in model group were increased ($P < 0.05$); compared with model group, the levels of BUN and Scr of the rats in positive control and Shenshuai Yingyang Capsule groups were decreased ($P < 0.05$); compared with positive control group, the levels of BUN and Scr of the rats in Shenshuai Yingyang Capsule group were decreased ($P < 0.05$). Compared with control group, the level of calcium ion (Ca^{2+}) in serum of the rats in model group was decreased ($P < 0.05$), and the levels of phosphorus ion (P^{3-}), parathyroid hormone (PTH), and alkaline phosphatase (ALP) were increased ($P < 0.05$); compared with model group, the levels of Ca^{2+} in serum of the rats in positive control and Shenshuai Yingyang Capsule groups were increased ($P < 0.05$), and the levels of P^{3-} , PTH, and ALP were decreased ($P < 0.05$); compared with positive control group, the level of Ca^{2+} in serum of the rats in Shenshuai Yingyang Capsule group was increased, and the levels of P^{3-} , PTH, and ALP were decreased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression levels of

BMP-7 and Smad1/5/8 mRNA in femur tissue of the rats in model group were decreased ($P<0.05$); compared with model group, the expression levels of BMP-7 and Smad1/5/8 mRNA of the rats in positive control drug group and Shenshuai Yingyang Capsule group were increased ($P<0.05$); compared with positive control group, the expression levels of BMP-7 and Smad1/5/8 mRNA in femur tissue of the rats in Shenshuai Yingyang Capsule group were increased ($P<0.05$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of BMP-7, p-BMP-7, Smad1/5/8, and p-Smad1/5/8 proteins in femur tissue of the rats in model group were decreased ($P<0.05$); compared with model group, the expression levels of BMP-7, p-BMP-7, Smad1/5/8, and p-Smad1/5/8 proteins in femur tissue of the rats in positive control group and Shenshuai Yingyang Capsule group were increased ($P<0.05$); compared with positive control group, the expression levels of BMP-7, p-BMP-7, Smad1/5/8, and p-Smad1/5/8 proteins in femur tissue of the rats in Shenshuai Yingyang Capsule group were increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Shenshuai Yingyang Capsule can improve the kidney function and calcium-phosphorus metabolism disorders in the renal osteodystrophy model rats, promote the proliferation of the bone marrow stromal cells, and enhances the bone metabolism; its mechanism may be related to the activation of BMP-7/Smads signaling pathway.

KEYWORDS Renal osteodystrophy; Shenshuai Yingyang Capsule; Bone morphogenetic protein-7; Recombinant mothers against decapentaplegic homolog; Bone density

肾性骨病为慢性肾脏病的并发症, 又称为肾性骨营养不良, 临床主要表现为钙磷代谢障碍、维生素D代谢异常和酸碱平衡失调, 可损害患者骨骼, 使其出现骨质疏松、骨软化、硬化和转移性钙化, 对患者生活质量和生存时间造成较大影响^[1-2]。肾性骨病的发生主要由于肾精亏虚, 且与淤浊、淤血和水湿有关, 较难祛除, 临床主要采用控制血清中磷酸盐和甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)水平的方法进行治疗, 但该治疗方式效果较差, 患者死亡率较高^[3]。肾衰营养胶囊为治疗慢性肾衰竭导致营养不良的常用药物, 可改善患者营养不良状态, 减轻临床症状^[4]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)为转化生长因子 β 家族成员, BMP-7为抗肾间质纤维化因子, 可激活下游Smad1/5/8受体, 进而发挥抗血管重塑功能^[5]。关于肾衰营养胶囊调控BMP-7/Smads信号通路对肾性骨病的影响尚未完全阐明。本研究探讨肾衰营养胶囊通过调控BMP-7/Smads信号通路对肾性骨病模型大鼠的干预效果, 阐明肾衰营养胶囊与肾性骨病之间的关系, 为肾性骨病的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、药物、主要试剂和仪器 选取50只SPF级SD大鼠, 均为8周龄, 体质量(212.52±8.36)g, 购自广东渔跃生物技术有限公司, 动物使用许可证号: SYXK(粤)2021-0250。所有大

鼠于20℃~25℃环境中饲养, 每日光照12h, 饲养期间自由饮水。本次实验操作均严格参照南方医科大学中西医结合医院伦理委员会动物实验伦理要求相关规定进行, 实验动物生产许可证号: SCXK(粤)-2021-0122。肾衰营养胶囊药物组成: 党参25g、黄芪25g、茯苓15g、杜仲15g、白术10g、当归10g、春砂仁10g、大黄10g和甘草5g, 购自广东药材医药有限公司; 骨化三醇购自上海罗氏制药有限公司。小鼠抗大鼠BMP-7(货号: XGK1038)购自上海西格生物科技有限公司, 小鼠抗大鼠Smad1/5/8抗体(货号: ATA25899)购自武汉益普生物科技有限公司。全自动生化分析仪(型号: BK-600)购自济南泰医生物技术有限公司, 显微镜(型号: SS62-XTL-220)购自北京中西华大科技有限公司, 显微CT(micro computed tomography, Micro-CT)(型号: ZKKS-MCT-Sharp-V)购自广州中科恺盛医疗科技有限公司, 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)仪(型号: HM-p16)购自山东恒美电子科技有限公司。

1.2 动物分组、造模和处理 随机选取10只大鼠作为对照组, 另外40只大鼠按照郭华慧等^[6]的方法建立肾性骨病大鼠模型。对照组行假手术处理, 其余大鼠腹腔注射3%戊巴比妥钠, 麻醉大鼠后, 使大鼠处于俯卧位, 暴露其左侧肾脏组织, 将肾包膜剥离, 切除左肾上下极各1/3, 进行止血, 无出

血后缝合大鼠腹腔, 术后采用含磷量 1.03% 和含腺嘌呤 0.75% 的饲料喂养, 连续喂养 1 个月, 大鼠血清中血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和肌酐 (serum creatinine, Scr) 水平明显升高且肾小管萎缩即为造模成功。共有 30 只大鼠造模成功, 将 30 只大鼠随机分为模型组、阳性对照组和肾衰营养胶囊组, 每组各 10 只。术后 1 个月对各组造模成功的大鼠进行给药处理, 对照组和模型组大鼠采用生理盐水灌胃, 阳性对照组大鼠给予 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 骨化三醇灌服, 肾衰营养胶囊组大鼠给予 $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肾衰营养胶囊灌服, 均灌胃 12 周。

1.3 各组大鼠血清标本采集 采集大鼠腹主动脉血 3 mL, 设置离心半径 5 cm, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 将上层血清分离, 保存于 -80°C 环境中。

1.4 HE 染色观察各组大鼠股骨组织病理形态表现 将大鼠断颈处死, 取大鼠左侧股骨组织, 留取 0.5 g, 储存于 -80°C 环境中。将大鼠骨组织浸泡于 10% 甲醛中 24 h, 置于脱钙剂中, 每日更换新鲜培养液至组织软化, 流水冲洗 24 h, 后于 4% 多聚甲醛固定 4 h, 脱水, 制作厚度为 $5 \mu\text{m}$ 切片, 再次脱蜡和脱水, 采用 HE 染色试剂盒染色, 光学显微镜下观察各组大鼠股骨组织病理形态表现。

1.5 全自动生化分析仪和化学发光法检测各组大鼠血清中肾功能及钙磷代谢指标 取各组大鼠血清, 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠 BUN、Scr、钙离子 (calciumion, Ca^{2+})、磷离子 (phosphorusion, P^{3-}) 和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 水平, 采用化学发光法检测各组大鼠血清中 PTH 水平。

1.6 Micro-CT 检测各组大鼠股骨密度 (bone mineral density, BMD) 并计算骨体积分数 取各组大鼠左侧股骨, 收集全长股骨, 使用 Micro-CT 扫描各组大鼠股骨显微结构, 后将 CT 图片导入 Amira 软件, 计算各组大鼠股骨 BMD, 并计算各组大鼠骨体积分数。骨体积分数 = 骨体积 (bone volume, BV) / 总骨量 (total bone volume, TV) $\times 100\%$ 。

1.7 RT-qPCR 法检测各组大鼠股骨组织中 BMP-7 和 Smad1/5/8 mRNA 表达水平 取各组大鼠股骨组织, 提取总 RNA, 将其逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 采用 Primer 5.0 软件设计引物序列, BMP-7 上游引物 5'-CTGAGGAG-GGCTGGTTGGTATT-3', 下游引物 5'-TGTT-

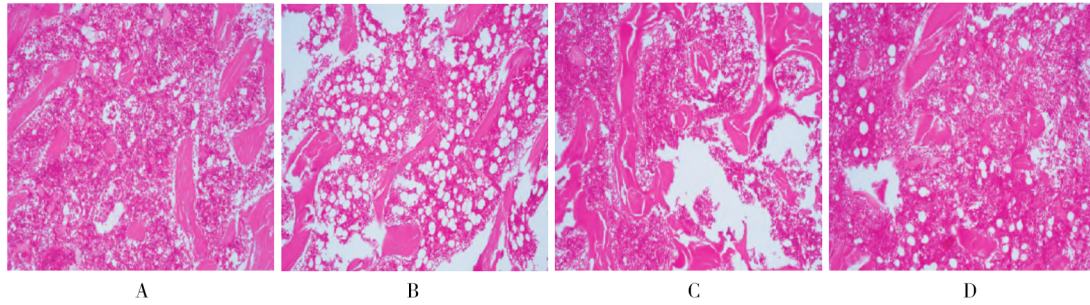
GGCGTTCATGTAGGAGTT-3'; Smad1/5/8 上游引物 5'-CAGCAGCTACCCCAACTCTC-3', 下游引物 5'-TTCACACCACTTTTCTTCTCCT-3'; GAPDH 上游引物 5'-TCTCTGCTCCTCCCT-GTTC-3', 下游引物 5'-ACACCGACCTTCACCATCT-3'。反应体系: 模板 DNA $1 \mu\text{L}$ 、 $0.5 \mu\text{L}$ 上下游引物和 $20 \mu\text{L}$ 蒸馏水。反应条件: 95°C 、15 min, 95°C 、2 min, 50°C 、2 min, 60°C 、30 s, 共 45 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法计算股骨组织中 BMP-7 和 Smad1/5/8 mRNA 表达水平。

1.8 Western blotting 法检测各组大鼠股骨组织中 BMP-7、磷酸化 BMP-7 (phosphorylated BMP-7, p-BMP-7)、Smad1/5/8 和磷酸化 Smad1/5/8 (phosphorylated Smad1/5/8, p-Smad1/5/8) 蛋白表达水平 取各组大鼠冷冻股骨组织, 冰上溶解 25 min, 制作组织匀浆, 进行离心处理, 采用 RIPA 裂解液提取各组大鼠股骨组织总蛋白, 冰上溶解 25 min, 制作组织匀浆, 进行离心处理, 使用 BCA 试剂盒对 BMP-7 和 Smad1/5/8 蛋白进行蛋白定量。取 $40 \mu\text{g}$ 总蛋白, 采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 湿转至 PVDF 膜上, 采用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。加入一抗, 4°C 下孵育过夜, 漂洗 3 次, 每次 15 min, 加二抗, 孵育 2 h, 漂洗 3 次, 每次 15 min, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。采用 Kolmogorov-Smirnov 法检验数据是否符合正态分布, 各组大鼠血清中 BUN、Scr、 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、PTH 和 ALP 水平、股骨 BMD 和骨体积分数、股骨组织中 BMP-7 和 Smad1/5/8 mRNA 及蛋白表达水平以及 p-BMP-7 和 p-Smad1/5/8 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠股骨组织病理形态表现 对照组大鼠骨小梁排列正常, 成骨细胞和类骨质面积未发生改变; 模型组大鼠骨小梁宽度和平均类骨质面积增加, 成骨细胞数量减少; 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠骨小梁宽度及平均类骨质面积减小, 成骨细胞数量增加。见图 1。



A: Control group; B: Model group; C: Positive control group; D: Shenshuai Yingyang Capsule group.

图1 各组大鼠股骨组织病理形态表现(HE, X400)

Fig. 1 Pathomorphology of femur tissue of rats in various groups (HE, X400)

2.2 各组大鼠血清中BUN和Scr水平 与对照组比较, 模型组大鼠BUN和Scr水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠BUN及Scr水平降低 ($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, 肾衰营养胶囊组大鼠BUN和Scr水平降低 ($P < 0.05$)。见表1。

2.3 各组大鼠血清中Ca²⁺、P³⁻、PTH和ALP水平 与对照组比较, 模型组大鼠血清中Ca²⁺水平降低 ($P < 0.05$), P³⁻、PTH和ALP水平均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照药组和肾衰营养胶囊组大鼠血清中Ca²⁺水平升高 ($P < 0.05$), P³⁻、PTH和ALP水平均降低 ($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, 肾衰营养胶囊组大鼠血清中Ca²⁺水

表1 各组大鼠血清中BUN和Scr水平

Tab. 1 Levels of BUN and Scr in serum of rats in various groups ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	BUN [$c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$]	Scr [$c_B / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$]
Control	5.36 ± 0.64	27.95 ± 3.88
Model	17.28 ± 2.53*	171.25 ± 25.03*
Positive control	14.32 ± 2.34 [△]	123.18 ± 21.14 [△]
Shenshuai Yingyang Capsule	11.36 ± 2.10 ^{△#}	68.36 ± 7.54 ^{△#}

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs positive control group.

平升高 ($P < 0.05$), P³⁻、PTH和ALP水平均降低 ($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠血清中Ca²⁺、P³⁻、PTH和ALP水平

Tab. 2 Levels of Ca²⁺, P³⁻, PTH, and ALP in serum of rats in various groups ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Ca ²⁺ [$c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$]	P ³⁻ [$c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$]	PTH [$\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]	ALP [$\lambda_B / (\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$]
Control	2.35 ± 0.35	1.15 ± 0.20	1.42 ± 0.23	36.52 ± 4.33
Model	1.78 ± 0.25*	3.18 ± 0.41*	3.52 ± 0.45*	79.55 ± 8.74*
Positive control	1.94 ± 0.29 [△]	2.61 ± 0.34 [△]	2.44 ± 0.34 [△]	61.02 ± 7.18 [△]
Shenshuai Yingyang Capsule	2.28 ± 0.33 ^{△#}	2.25 ± 0.31 ^{△#}	1.85 ± 0.32 ^{△#}	48.39 ± 5.47 ^{△#}

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs positive control group.

2.4 各组大鼠股骨BMD和骨体积分数 与对照组比较, 模型组大鼠股骨BMD和骨体积分数降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠股骨BMD及骨体积分数升高 ($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, 肾衰营养胶囊组大鼠股骨BMD和骨体积分数升高 ($P < 0.05$)。见表3。

2.5 各组大鼠股骨组织中BMP-7和Smad1/5/8 mRNA表达水平 与对照组比较, 模型组大鼠股骨组织中BMP-7和Smad1/5/8 mRNA表达水平降

表3 各组大鼠股骨BMD和骨体积分数

Tab. 3 BMD and bone volume fractions of femur of rats in various groups ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	BMD ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Bone volume fraction ($\eta / \%$)
Control	0.18 ± 0.04	0.57 ± 0.06
Model	0.11 ± 0.01*	0.31 ± 0.03*
Positive control	0.13 ± 0.02 [△]	0.39 ± 0.04 [△]
Shenshuai Yingyang Capsule	0.16 ± 0.03 ^{△#}	0.48 ± 0.05 ^{△#}

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs positive control group.

低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠股骨组织中 BMP-7 及 Smad1/5/8 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, 肾衰营养胶囊组大鼠股骨组织中 BMP-7 和 Smad1/5/8 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠股骨组织中 BMP-7 和 Smad1/5/8 mRNA 表达水平

Tab. 4 Expression levels of BMP-7 and Smad1/5/8 mRNA in femur tissue of rats in various groups ($n=10, \bar{x} \pm s$)

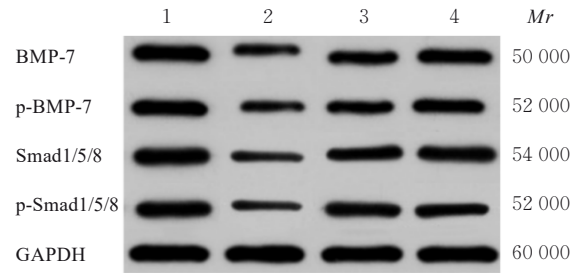
Group	BMP-7 mRNA	Smad1/5/8 mRNA
Control	1.00±0.01	1.00±0.01
Model	0.32±0.04*	0.33±0.04*
Positive control	0.51±0.06 [△]	0.68±0.07 [△]
Shenshuai Yingyang Capsule	0.84±0.09 ^{△#}	0.82±0.09 ^{△#}

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs positive control group.

2.6 各组大鼠股骨组织中 BMP-7、p-BMP-7、Smad1/5/8 和 p-Smad1/5/8 蛋白表达水平 与对照组比较, 模型组大鼠股骨组织中 BMP-7、p-BMP-7、Smad1/5/8 和 p-Smad1/5/8 蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和肾衰营养胶囊组大鼠股骨组织中 BMP-7、p-BMP-7、Smad1/5/8 及 p-Smad1/5/8 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, 肾衰营养胶囊组大鼠股骨组织中 BMP-7、p-BMP-7、Smad1/5/8 和 p-Smad1/5/8 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 5。

3 讨论

肾性骨病主要是由于慢性肾脏病进展过程中钙磷代谢失衡导致 PTH 分泌异常和骨代谢紊乱而引发^[7-8]。肾性骨病可导致终末期肾脏病患者死亡,



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: Positive control group; Lane 4: Shenshuai Yingyang Capsule group.

图 2 Western blotting 法检测各组大鼠股骨组织中 BMP-7、p-BMP-7、Smad1/5/8 和 p-Smad1/5/8 蛋白表达电泳图

Fig.2 Electrophoregram of expressions of BMP-7, p-BMP-7, Smad 1/5/8, and p-Smad 1/5/8 proteins in femur tissue of rats in various groups detected by Western blotting method

且肾性骨病的发生可加重人体内骨骼代谢紊乱, 增加骨折发生的风险^[9-10]。

中医学研究^[11]发现: 肾精亏虚可导致机体内骨骼脆弱无力, 易引发骨折, 且肾虚可伤及患者脾胃, 导致脾肾衰惫。临床上对于肾性骨病的治疗应以补肾健脾为主。肾衰营养胶囊中党参可补中益气、清肺, 黄芪具有补气健脾的作用, 茯苓可健脾、利水渗湿, 杜仲可补肝肾、强筋骨, 白术可燥湿利水、补气健脾, 当归补血、活血, 春砂仁和大黄可通腑泄浊, 甘草可对诸药进行调和, 进而缓解肾功能衰竭状态^[12]。本研究结果显示: 采用肾衰营养胶囊干预肾性骨病模型大鼠可延缓肾功能衰竭的发展, 抑制肾性骨病的发生, 使骨小梁宽度和平均类骨质面积缩小, 并增加成骨细胞数量。提示方中杜仲可诱导骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞, 促进骨髓基质细胞增殖, 使骨形成速度加快, 且大黄可排毒, 延缓慢性肾衰竭的发展, 使系膜细胞的增生受到抑制, 抑制肾小球的发展^[13]。

表 5 各组大鼠股骨组织中 BMP-7、p-BMP-7、Smad1/5/8 和 p-Smad1/5/8 蛋白表达水平

Tab. 5 Expression levels of BMP-7, p-BMP-7, Smad1/5/8, and p-Smad1/5/8 proteins in femur tissue of rats in various groups ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	BMP-7 protein	p-BMP-7 protein	Smad1/5/8 protein	p-Smad1/5/8 protein
Control	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
Model	0.34±0.04*	0.21±0.03*	0.41±0.05*	0.34±0.05*
Positive control	0.55±0.06 [△]	0.45±0.05 [△]	0.63±0.07 [△]	0.65±0.07 [△]
Shenshuai Yingyang Capsule	0.79±0.08 ^{△#}	0.68±0.07 ^{△#}	0.85±0.09 ^{△#}	0.77±0.08 ^{△#}

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs positive control group.

BUN和Scr是评估机体内肾小球滤过功能的常用指标,可反映机体肾功能状态,判断肾脏损伤程度^[14]。研究^[15-16]显示:肾小球滤过功能下降,可减少肾脏对磷的排泄,使血磷水平升高,刺激PTH分泌。血钙水平降低可升高患者体内血磷水平,导致骨矿化障碍,促进肾性骨病的发展。BMD可对骨量减少情况和骨丢失率进行评价,检测BMD可用于诊断肾性骨病,且具有较高的灵敏度,可反映出骨骼矿物含量的变化情况,判断机体内骨代谢变化情况^[17]。肾性骨病可降低大鼠肾功能,引发钙磷代谢紊乱。本研究结果显示:采用肾衰营养胶囊干预肾衰大鼠,可使大鼠血清中BUN、Scr、 P^{3-} 、PTH和ALP水平降低, Ca^{2+} 水平和大鼠BMD及骨体积分数升高,提示采用肾衰营养胶囊治疗肾性骨病大鼠可发挥补中益气、健脾、强筋骨和通腑泄浊的作用,能够促进骨髓基质细胞的生成,缓解肾性骨病的发展,改善肾性骨病大鼠肾功能和骨代谢情况。

BMP-7为BMP超家族成员,可诱导成骨细胞分化,BMP-7在心脏、肾脏和中枢神经系统等多个组织器官中均有分布,且高表达于成骨部位,可诱导间充质细胞分化为软骨和成骨细胞,进而产生新成骨细胞,对软骨缺损进行修复^[18-19]。肾性骨病的发生使BMP-7表达水平降低,导致成骨细胞分化障碍,降低骨质重塑功能,使代偿引起的甲状旁腺功能亢进^[20]。BMP-7可对Smads进行调节,保持其生物学活性平衡。肾损伤的发生打破了BMP-7与Smads的平衡状态,下调BMP-7和Smads下游蛋白Smads1/5/8的表达,导致肾纤维化的发展^[21]。本研究结果显示:采用肾衰营养胶囊干预大鼠可激活BMP-7/Smads通路,使BMP-7和Smads1/5/8蛋白表达水平升高,改善肾性骨病状况。提示肾衰营养胶囊可促进骨髓基质细胞增殖,加快骨形成速度,进而促进机体内BMP-7蛋白表达,保持机体生物学活性平衡,抑制肾损伤。

综上所述,肾衰营养胶囊可改善肾性骨病模型大鼠的肾功能和钙磷代谢紊乱,促进骨髓基质细胞增殖,改善骨代谢情况,其机制可能与激活BMP-7/Smads信号通路有关。

利益冲突说明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献说明:

陈杰彬参与研究设计、数据收集、论文撰写和审校,

胡蓉参与数据收集和论文撰写,吕佩佳参与研究设计、数据整理和统计学分析,李成杰和魏连波参与研究指导及论文修改。

[参考文献]

- [1] PAZIANAS M, MILLER P D. Osteoporosis and chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD): back to basics[J]. *Am J Kidney Dis*, 2021, 78(4): 582-589.
- [2] CANNATA-ANDA J B, MARTN-CARRO B, MARTN-VRGALA J, et al. Chronic kidney disease-mineral and bone disorders: pathogenesis and management[J]. *Calcif Tissue Int*, 2021, 108(4): 410-422.
- [3] GINSBERG C, IX J H. Diagnosis and management of osteoporosis in advanced kidney disease: a review[J]. *Am J Kidney Dis*, 2022, 79(3): 427-436.
- [4] 伍晓辉, 尤海岩, 胡蓉, 等. 肾衰营养胶囊对肾性骨病大鼠骨代谢及股骨组织BMP-2表达的影响[J]. *天津医药*, 2020, 48(2): 91-95.
- [5] 张晶晶, 武垣伶, 黄丹娜, 等. BMP-7/Smads通路参与EndoMT在大鼠HHPH中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(2): 316-322.
- [6] 郭华慧, 梁群卿, 李贺生, 等. 加味六味地黄汤对CKD-MBD模型大鼠肾/骨组织损伤的影响[J]. *中国药房*, 2021, 32(6): 690-696.
- [7] PEREIRA L, MAGALHÃES J, MENDONÇA L, et al. Evaluation of renal osteodystrophy and serum bone-related biomarkers in a peritoneal dialysis population[J]. *J Bone Miner Res*, 2022, 37(9): 1689-1699.
- [8] EVENEPOEL P, CUNNINGHAM J, FERRARI S, et al. European Consensus Statement on the diagnosis and management of osteoporosis in chronic kidney disease stages G4-G5D [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2021, 36(1): 42-59.
- [9] JØRGENSEN H S, BEHETS G, BAMMENS B, et al. Patterns of renal osteodystrophy 1 year after kidney transplantation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2021, 36(11): 2130-2139.
- [10] ABDALBARY M, SOBH M, ELNAGAR S, et al. Management of osteoporosis in patients with chronic kidney disease[J]. *Osteoporos Int*, 2022, 33(11): 2259-2274.
- [11] 郑华, 孙艺, 纪镇华. 肾衰营养胶囊改善CRF大鼠骨骼肌萎缩中Wnt7a/PCP信号通路的作用探析[J]. *航空航天医学杂志*, 2020, 31(11): 1324-1325.
- [12] 杨勇, 王霄一, 丁敏, 等. 肾衰宁胶囊对慢性肾功能衰竭患者营养状况及血液流变学的影响[J]. *中国基*

- 层医药, 2017, 24(10): 1450-1454.
- [13] 赵继荣, 杨涛, 赵宁, 等. 杜仲诱导骨髓间充质干细胞成骨分化防治骨质疏松症相关信号通路研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(12): 1868-1872.
- [14] SHATAGOPAM K, BAHLER C D, SUNDARAM C P. Renorrhaphy techniques and effect on renal function with robotic partial nephrectomy[J]. World J Urol, 2020, 38(5): 1109-1112.
- [15] SÁNCHEZ ARCO A M, SEGURA JIMÉNEZ I, PLATA ILLESCAS C, et al. Renal function in receptors with simultaneous liver-kidney transplant from the same donor[J]. Transplant Proc, 2022, 54(1): 45-47.
- [16] 张媛, 赵瑾, 朱小静. 血液透析方式的选择对肾性骨病患者骨代谢、血清生化指标及生活质量的影响[J]. 兰州大学学报(医学版), 2020, 46(4): 73-77.
- [17] 刘丽巧, 余建华, 米弘瑛, 等. 每天予1200 IU维生素D滴剂早产儿血清25-(OH)D水平、钙磷代谢及代谢性骨病发生情况观察[J]. 山东医药, 2022, 62(30): 50-53.
- [18] 陈勇, 黄乔木, 葛亮, 等. 十味芪黄益肾方对腺嘌呤所致肾纤维化大鼠模型TGF- β 1/Smads/BMP-7信号通路的影响[J]. 西部医学, 2019, 31(8): 1178-1184.
- [19] 傅亮, 李玉杰, 来媛媛, 等. 黄芪注射液联合葛根素注射液对HK-2细胞TGF- β 1/Smads及BMP-7/Smad5信号通路的影响[J]. 环球中医药, 2019, 12(3): 343-347.
- [20] 吴伟东, 方红槟, 吴大华, 等. 髋关节置换辅助维生素D治疗老年骨质疏松股骨颈骨折的远期疗效及对BMP-7/25-(OH)-D-3水平的影响[J]. 中华内分泌外科杂志, 2021, 15(6): 641-645.
- [21] 张舒, 李然, 徐先知, 等. BMP-7/Smad1/5/8信号通路在肾缺血后处理减轻大鼠肾缺血再灌注损伤中的作用[J]. 药学与临床研究, 2021, 29(1): 7-11.