

补肾健骨方对血管钙化大鼠主动脉 BMP-7 表达的影响

于思明 郭丹丹 代丽娟 裴春鹏 董柏涵

黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040

〔摘要〕目的 观察补肾健骨方对血管钙化模型大鼠主动脉 BMP-7 表达的影响。方法 选取雄性 Wistar 大鼠, 随机分为正常对照组, 模型对照组, 骨化三醇组和补肾健骨方高、中、低剂量组, 每组 10 只, 高磷饲养联合腺嘌呤悬浮液灌胃造模。造模同时对对照组以骨化三醇 $0.025\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{d}^1$ 灌胃, 补肾健骨方低、中、高剂量组分别灌胃给予补肾健骨方 ($1.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $2.4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $4.8\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 模型对照组灌胃等体积生理盐水。连续给药 8 周, 腹主动脉取血, 试剂盒测定血钙 (Ca^{2+})、血磷 (P^{3-})、血肌酐 (Scr)、血尿素氮 (BUN)、血清全段甲状旁腺激素 (iPTH) 水平, VonKossa 染色观察主动脉钙化情况, Western blot 法检测主动脉骨形态发生蛋白 -7 (BMP-7) 的表达。结果 与正常对照组比较, 各组大鼠血清 Ca 降低, 血清 P、PTH、BUN、Scr 升高 ($P<0.05$), 与模型组比较, 各组大鼠血清 Ca 升高, 血清 P、PTH、BUN、Sc 降低 ($P<0.05$); 对照组在升高 Ca、降低 PTH 方面优于补肾健骨方各剂量组 ($P<0.05$), 补肾健骨方中剂量组、高剂量组在降低血 P、BUN、Scr 方面优于对照组 ($P<0.05$)。补肾健骨方高剂量组、中剂量组较模型组血管结构破坏程度轻, 中膜钙化程度减轻。与模型组比较, 补肾健骨方中剂量组、高剂量组 BMP-7 表达下降 ($P<0.05$), 并低于对照组 ($P<0.05$)。结论 补肾健骨方具有改善肾脏纤维化, 减轻腺嘌呤联合高磷饮食诱导大鼠血管钙化的作用。其机制可能与降低血磷, 下调 BMP-7 表达有关。

〔关键词〕 补肾健骨方; 血管钙化; 骨形态发生蛋白 -7

〔中图分类号〕 R972 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 2095-7165 (2021) 04-002-02

〔基金项目〕 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2019H112)

血管钙化不仅是强有力的心血管死亡和总死亡风险的预测因素, 更是 CVD 十分重要的独立危险因素^[1, 2]。补肾健骨方由盐杜仲、补骨脂、淫羊藿、酒大黄、土鳖虫、生牡蛎组成, 原方用于治疗肾性骨病。基于该复方在前期临床与实验研究中降低血磷、提高骨密度方面的作用^[5, 6], 本研究拟在前期研究基础上, 观察补肾健骨方对主动脉致骨化因子骨形态发生蛋白 -7 (bone morphogenetic protein-7, BMP-7) 的影响, 以便探讨其可能的作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 (200 ~ 250) g, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (辽) 2020-0001。

1.2 试剂与仪器

补肾健骨方由盐杜仲、补骨脂、淫羊藿、酒大黄各 15 g, 生牡蛎 30g, 土鳖虫 10g 组成, 进行两次煎煮, 每次 30min, 混合 2 次水煎液, 过滤, 浓缩成生药量为 $10\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的汤剂, 冰箱贮存备用; 腺嘌呤 (上海源聚生物科技有限公司, 纯度 $\geq 99\%$, 批号: 071226); 骨化三醇 (上海罗氏制药有限公司, 批号: 20180811); 生化检测试剂盒, 南京建成公司。羊抗兔 IgG-HRP、BMP-7 抗体购自 wanleibio 公司。NANO 2000 紫外分光光度计, 美国 Thermo 公司; DYY-7C 电泳仪, 北京六一公司; ELX-800 酶标仪, 美国 BIOTEK 公司。

1.3 分组与模型制备方法

大鼠适应性饲养 1 周后进行实验, 随机分为正常对照组, 模型对照组, 骨化三醇组和补肾健骨方高、中、低剂量组, 每组 10 只, 造模方法如下: 除正常对照组外, 其余组大鼠第 1-4 周用含 1.8% 高磷饲料喂养, 以 $250\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{d}^1$ 腺嘌呤悬浮液灌胃。第 5-8 周腺嘌呤悬浮液改为 $125\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{d}^1$ 隔日灌胃, 继续以含 1.8% 高磷饲料喂养。造模同时对对照组以骨化

三醇组 $0.025\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{d}^1$ 灌胃; 补肾健骨方低、中、高剂量组分别灌胃给予补肾健骨方 ($1.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $2.4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $4.8\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$); 模型对照组灌胃等体积生理盐水。连续给药处理 8 周。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 生化指标检测

腹主动脉取血, 按试剂盒说明测定血钙 (Ca^{2+})、血磷 (P^{3-})、血肌酐 (Scr)、血尿素氮 (BUN)、血清全段甲状旁腺激素 (iPTH) 水平。

1.4.2 主动脉钙化检测

剥离大鼠胸主动脉, 包埋切片, 切片脱蜡至水, Von Kossa 染色, 苏木素复染, 自来水反蓝, 于显微镜下观察主动脉钙化情况。

1.4.3 Western blot 检测各组大鼠主动脉 BMP-7 蛋白的表达
称取主动脉组织 50mg, 加入 $500\mu\text{L}$ 裂解液中, $13000\text{r}/\text{min}$ 匀浆 3 次, 每次 10s。冰上孵育 5min, 12000rpm , 4°C , 离心 10min, 分离上清为所得的蛋白质抽提物, 分装待检测。蛋白质定量, SDS-PAGE, 转印、封闭, 用 5% (M/V) 脱脂奶粉稀释抗体, 孵育一抗, BMP-7 (1:500), 4°C 孵育过夜。孵育二抗, 滴加羊抗兔 IgG-HRP (1:5000), 37°C 孵育 45 分钟。取出 PVDF 膜, 浸入 TBST, 摇床摇动 5min, 重复 6 次, 滤纸吸干, 洒 ECL 发光液, 静置反应 5min, 暗室曝光, 将胶片进行扫描, 用凝胶图象处理系统 (Gel-Pro-Analyzer 软件) 分析目标条带的光密度值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 方差齐性时, 两个样本均数的比较采用 t 检验。计数资料以例数和百分比表示, 组间比较采用 χ^2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠生化指标比较

与正常对照组比较, 各组大鼠血清 Ca 降低, 血清 P、PTH、BUN、Scr 升高 (P<0.05), 与模型组比较, 各组大鼠血清 Ca 升高, 血清 P、PTH、BUN、Sc 降低 (P<0.05); 对照组

在升高 Ca、降低 PTH 方面优于补肾健骨方各剂量组 (P<0.05), 补肾健骨方中剂量组、高剂量组在降低血 P、BUN、Scr 方面优于对照组。见表 1。

表 1 各组大鼠生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	PTH (pg/mL)	BUN (mmol/L)	Scr (μ mol/L)
正常对照组	10	2.46±0.04	2.20±0.07	240.12±55.07	7.01±0.98	38.75±4.80
模型组	10	1.98±0.05 ^a	6.55±0.24 ^a	2865.30±102.85 ^a	28.51±2.10 ^a	163.55±15.72 ^a
对照组	10	2.45±0.08 ^{ab}	4.81±0.23 ^{ab}	1031.33±120.88 ^{ab}	20.44±1.17 ^{ab}	121.55±8.33 ^{ab}
补肾低剂量组	10	2.03±0.07 ^{ac}	5.56±0.25 ^{ab}	2825.10±214.07 ^{abc}	21.85±1.06 ^a	141.21±6.58 ^{ab}
补肾中剂量组	10	2.16±0.06 ^{abc}	4.25±0.52 ^{abc}	1978.11±443.11 ^{abc}	15.80±1.33 ^{abc}	87.46±7.24 ^{abc}
补肾高剂量组	10	2.27±0.08 ^{abc}	3.77±0.38 ^{abc}	1630.57±220.36 ^{abc}	13.11±0.80 ^{abc}	70.33±5.91 ^{abc}

注: 与正常对照组比较, ^aP<0.05; 与模型组比较, ^bP<0.05; 与对照组比较, ^cP<0.05。

2.2 主动脉 Von Kossa 染色结果

正常组胸主动脉血管结构正常, 模型组血管结构破坏, 可见钙化结节呈线性或节段性分布于血管内膜、中膜。对照组血管结构破坏较模型组轻, 血管中膜钙化程度较轻。补肾健骨方高剂量组、中剂量组较模型组血管结构破坏程度轻, 中膜钙化程度较轻。

2.3 各组大鼠主动脉 BMP-7 蛋白表达

与正常组比较, 模型组 BMP-7 表达升高 (P<0.05), 与模型组比较, 补肾健骨方中剂量组、高剂量组 BMP-7 表达下降 (P<0.05), 与对照组比较, 补肾健骨方中剂量组、高剂量组 BMP-7 表达下降 (P<0.05)。见图 3。

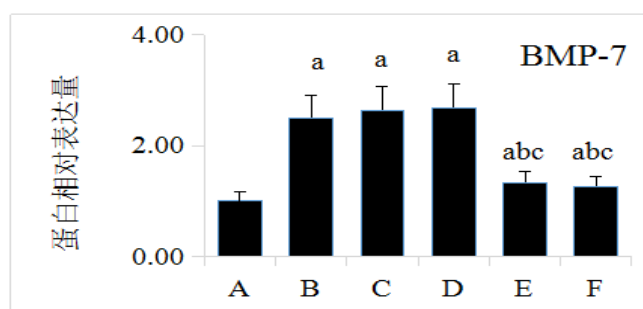


图 3 各组大鼠 BMP-7 表达比较

注: A. 正常对照组; B. 对照组; C. 模型组; D. 补肾健骨方低剂量组; E. 补肾健骨方中剂量组; F. 补肾健骨方高剂量组。

3 讨论

血管钙化包括内膜钙化、中膜钙化、钙化防御和心脏瓣膜钙化, 四种钙化常交错重叠^[2]。CKD 患者的血管钙化是多重机制共同作用的结果。为更好地模拟 CKD 患者的血管钙化, 本研究选取腺嘌呤联合高磷饮食造模。结果显示, 正常组大

鼠血管中膜、内膜均未见明显钙化表现, 而在造模后, 各组大鼠血管内膜与中膜均出现不同程度的钙化, 与临床实际比较接近。补肾健骨方降低血磷与 PTH 的作用更为明显, 提示其可能具有独立于升高血钙之外的降磷作用。补肾健骨方中、高剂量组有效减轻了血管中膜的钙化。BMP-7 是促进骨形成和诱导成骨细胞分化重要的细胞外信号分子。高磷可通过升高 BMP-7 的水平, 促进细胞外基质重构, 从而加速血管钙化进展。

本研究通过对中老年大鼠的 CKD 血管钙化模型研究发现, 补肾健骨方可能通过降低血磷, 从而下调 BMP-7 的蛋白表达, 起到防治血管钙化的作用。因 CKD 血管钙化机制复杂, 影响因素众多, 是否还可通过其他机制对血管平滑肌细胞的转分化起到调节作用, 有待于在后续研究中探索。

[参考文献]

- [1] 陈佩玲, 龚德华. 焦磷酸盐与慢性肾脏病血管钙化 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2019, 28(4):369-373.
- [2] 黄辉. 血管钙化的基础和转化研究的探索 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2017, 38(2): 184-188+214.
- [3] 王中群, 孙振. 防治血管钙化, 依然任重道远 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(12):1189-1193.
- [4] 师红红, 张凌, 王利华. 慢性肾脏病患者心血管钙化的影响因素分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(7):1021-1026.
- [5] 于思明, 裴春鹏, 代丽娟, 等. 补肾健骨方改善肾性骨病患者钙磷代谢紊乱及生存质量的临床观察 [J]. 湖北中医杂志, 2016, 38(1):1-4.
- [6] 于思明, 裴春鹏, 代丽娟, 等. 补肾健骨方对肾性骨病模型大鼠钙磷代谢紊乱及股骨密度的影响 [J]. 中国临床保健杂志, 2016, 19(1):78-81.

(上接第 1 页)

净属于 SGLT2 的抑制剂, 可降低已经过滤葡萄糖的再吸收, 并可降低肾糖阈, 使葡萄糖从尿液中排出增多。作为一种新型的降糖药物, 是非依赖胰岛素起降糖作用的。需要注意开始治疗时可能会出现症状性低血压, 这是因为其可导致血管内容积收缩引起的, 所以还需要注意防范这种情况发生。另外如果与胰岛素或是胰岛素促分泌素共用时, 可能会出现低血糖风险, 所以还需要注意控制剂量。用药期间还需注意控制好饮食, 并做适当的体育锻炼等。

综上所述, 达格列净治疗早期糖尿病肾病, 治疗效果及安全性均优于二甲双胍。

[参考文献]

- [1] 达格列净对 2 型糖尿病早期糖尿病肾病患者尿外泌体微 RNA 的影响 [J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(1):73-79.
- [2] 付强, 刘丽秋, 杨沿浪, 杨鹏鹏. 达格列净对早期 2 型糖尿病肾病患者足细胞损伤及氧化应激的影响 [J]. 实用药物与临床, 2021, 24(2):146-149.
- [3] 关清华, 程岚, 旷劲松. 糖尿病肾病患者应用达格列净的临床疗效 [J]. 中国现代医生, 2021, 59(2):4-7.
- [4] 连明珠, 赵莹, 康静, 陈琰. 达格列净对早期 2 型糖尿病肾病患者肾小球和肾小管功能的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(2):13-18.
- [5] 达格列净治疗糖尿病肾病患者临床研究 [J]. 糖尿病新世界, 2021, 24(5):179-181.