

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.12.005
文章编号: 1005-8982 (2022) 12-0025-08

实验研究·论著

益气活血化痰汤对慢性肾衰竭大鼠钙磷代谢紊乱及血管钙化的影响及其机制研究*

张旭, 赵芳园

(黑龙江中医药大学附属第一医院 中医内科, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 探究益气活血化痰汤对慢性肾衰竭(CRF)大鼠钙磷代谢紊乱及血管钙化的影响及其相关机制。**方法** 将50只大鼠随机分为5组: 假手术组、肾衰组、低剂量组、高剂量组和骨化三醇组, 每组10只。采用5/6肾切除法复制CRF大鼠, 假手术组不切除肾脏。模型复制成功2周后开始灌胃益气活血化痰汤: 低剂量组8.8 g/kg, 高剂量组35.2 g/kg; 骨化三醇组灌胃骨化三醇25 ng/kg; 假手术组灌胃等体积生理盐水, 1次/d, 连续8周。肾衰组未做任何处理。给药结束后, 代谢笼收集大鼠24 h尿液, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测尿蛋白(UP)、甲状旁腺激素(PTH)、血清肌酐(Scr)、成纤维细胞生长因子23(FGF-23)与25-羟维生素D₃ 25(OH)D₃; 全自动生化仪检测血钙、血磷; 化学显色法检测血尿素氮(BUN)。采用茜素红对大鼠主动脉进行大体染色和切片染色, 观察血管钙化结节。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和Western blotting检测结肠腺瘤样息肉蛋白(APC)、T细胞因子4(TCF4)、 β -catenin mRNA和蛋白相对表达量。**结果** 与肾衰组比较, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组血钙、25(OH)D₃升高($P < 0.05$); 高剂量组和骨化三醇组血钙、25(OH)D₃高于低剂量组($P < 0.05$); 骨化三醇组血钙、25(OH)D₃高于高剂量组($P < 0.05$); 与肾衰组比较, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组血磷、PTH、BUN、Scr、24 h UP、FGF-23降低($P < 0.05$); 高剂量组和骨化三醇组血磷、PTH、BUN、Scr、24 h UP、FGF-23低于低剂量组($P < 0.05$); 骨化三醇组血磷、PTH、BUN、Scr、24 h UP、FGF-23低于高剂量组($P < 0.05$)。假手术组均未见红色钙化结节; 肾衰组可见大面积红色钙化结节, 呈弥散式分布; 相比于肾衰组, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组的钙化出现不同程度减轻。与肾衰组比较, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组APC mRNA和蛋白相对表达量升高($P < 0.05$); 高剂量组和骨化三醇组APC mRNA和蛋白相对表达量高于低剂量组($P < 0.05$); 骨化三醇组APC mRNA和蛋白相对表达量高于高剂量组($P < 0.05$); 与肾衰组比较, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组TCF4、 β -catenin mRNA和蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)。高剂量组和骨化三醇组TCF4、 β -catenin mRNA和蛋白相对表达量低于低剂量组($P < 0.05$); 骨化三醇组TCF4、 β -catenin mRNA和蛋白相对表达量低于高剂量组($P < 0.05$)。**结论** 益气活血化痰汤可以改善CRF模型大鼠的钙磷代谢紊乱, 缓解血管钙化程度, 这可能与调节Wnt/ β -catenin通路有关。

关键词: 慢性肾衰竭; 血管钙化; 钙磷代谢; 血钙; 血磷

中图分类号: R692.5

文献标识码: A

Effect and mechanism of Yiqi Huoxue Huayu Decoction on the disorder of calcium and phosphorus metabolism and vascular calcification in rats with chronic renal failure*

Xu Zhang, Fang-yuan Zhao

(Department of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

收稿日期: 2022-01-07

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(No: LH2019H050)

[通信作者] 赵芳园, E-mail: xxualei@163.com; Tel: 15904504957

Abstract: Objective To explore the effect and related mechanism of Yiqi Huoxue Huayu Decoction on the disorder of calcium and phosphorus metabolism and vascular calcification in rats with chronic renal failure. **Methods** Fifty rats were randomly divided into sham operation group, renal failure group, low-dose group, high-dose group and calcitriol group. The rat models of chronic renal failure were established via 5/6 nephrectomy, while the rats in the sham operation group were not nephrectomized. Two weeks after the model establishment, the rats were given Yiqi Huoxue Huayu Decoction by gavage at a dose of 8.8 g/kg for the low-dose group and 35.2 g/kg for the high-dose group. The rats in the calcitriol group were given calcitriol at a dose of 25 ng/kg by gavage, while those in the sham operation group were administered with an equal volume of normal saline, once a day for consecutive eight weeks. The rats in the renal failure group were left untreated. After the administration, the 24-hour urine of rats was collected and the levels of urine protein (UP), parathyroid hormone (PTH), serum creatine (Scr), fibroblast growth factor-23 (FGF-23) and 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃) were measured via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The blood calcium and phosphorus were measured via automatic biochemical analyzer. The content of blood urea nitrogen (BUN) was detected via the chromogenic method. The aorta of rats was stained by alizarin red, and the calcified nodules within the aorta were observed. The mRNA and protein expressions of adenomatous polyposis coli (APC), T-cell factor 4 (TCF4) and β -catenin were detected via quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting (WB), respectively. **Results** Compared with renal failure group, the concentrations of blood calcium and 25(OH)D₃ were increased in low-dose group, high-dose group and calcitriol group ($P < 0.05$). The concentrations of blood calcium and 25(OH)D₃ were higher in the high-dose group and calcitriol group compared with those in the low-dose group ($P < 0.05$), while those in the calcitriol group were even higher than those in the high-dose group ($P < 0.05$). Compared with renal failure group, the concentrations of blood phosphorus, PTH, BUN, Scr, 24-hour UP and FGF-23 were decreased in the low-dose group, high-dose group and calcitriol group ($P < 0.05$). The concentrations of blood phosphorus, PTH, BUN, Scr, 24-hour UP and FGF-23 in the high-dose group and the calcitriol group were lower than those in the low-dose group ($P < 0.05$), while those in the calcitriol group were even lower than those in the high-dose group ($P < 0.05$). No calcified nodules were found in the sham operation group, whereas a large area of calcified nodules were seen and diffusely distributed in renal failure group. Compared with renal failure group, the calcification in low-dose group, high-dose group and calcitriol group decreased by varying degrees. The mRNA and protein expressions of APC in low-dose group, high-dose group and calcitriol group were increased compared with those in the renal failure group ($P < 0.05$), and they were higher in the high-dose group and calcitriol group relative to those in the low-dose group ($P < 0.05$). Besides, the mRNA and protein expressions of APC were even higher in the calcitriol group than those in the high-dose group ($P < 0.05$). Compared with the renal failure group, the mRNA and protein expressions of TCF4 and β -catenin were lower in the low-dose group, high-dose group and calcitriol group ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of TCF4 and β -catenin were lower in the high-dose group and the calcitriol group ($P < 0.05$), while they were even lower in the calcitriol group relative to those in the high-dose group ($P < 0.05$). **Conclusions** Yiqi Huoxue Huayu Decoction can improve the disorder of calcium and phosphorus metabolism and alleviate the degree of vascular calcification in rats with chronic renal failure, which may be related to the regulation of Wnt/ β -catenin pathway.

Keywords: chronic renal failure; vascular calcification; calcium and phosphorus metabolism; blood calcium; blood phosphorus

慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)是指在慢性肾病基础上,肾脏持续性损伤导致体内代谢产物大量滞留,电解质与酸碱失衡,机体内环境平衡被破坏并产生临床症状的过程。CRF有多种并发症,以钙磷代谢紊乱为主,随着病程进展,还会引起动脉血管钙化、肾性骨病等,严重危害人体健康^[1-2]。临床上常采用磷结合剂、钙受体激动剂和血液透析等方法治疗CRF,但由于均是单因素靶向治疗,所以

常引起高磷血症,且磷结合剂价格较昂贵,患者难以接受^[3-4]。中医认为肾络淤堵,脾虚风动是CRF的主要病机,患者体内常有淤血、痰浊与湿浊滞留^[5],因此本研究根据CRF病机,结合《五十二病方》中活血化瘀方剂进行调整,将黄芪、茯苓、党参、忍冬藤、白术、泽泻、当归、红花、陈皮、黄柏、丹参配伍成益气活血化瘀汤,用于治疗CRF模型大鼠,探究其对钙磷代谢紊乱和血管钙化的影响及机制,为中医临

床治疗 CRF 提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄健康雄性 SD 大鼠 50 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,正常饲养,适应性饲养 1 周。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0011,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2017-0033。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 试剂 黄芪、茯苓、党参、忍冬藤、白术、泽泻、当归、红花、陈皮、黄柏、丹参(北京同仁堂大药房),骨化三醇胶丸(罗盖全,0.25 μg /粒,国药准字 J20050021,德国罗氏制药有限公司),血钙浓度检测试剂盒、血磷浓度检测试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司),血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)试剂盒、血甲状旁腺激素(甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)检测试剂盒、成纤维细胞生长因子 23(fibroblast growth factor-23, FGF-23)检测试剂盒与 25-羟维生素 D_3 25(OH) D_3 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),尿蛋白(urinary protein, UP)检测试剂盒、血清肌酐(serum creatinine, Scr)检测试剂盒(上海纪宁实业有限公司),兔抗大鼠 Wnt、 β -catenin 和 β -actin 一抗、HRP 标记羊抗兔二抗(北京康为试剂有限公司),MolPure[®] TRleasy Plus Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒、Hifair[®] III One Step qRT-PCR SYBR Green Kit(一步法反转定量)试剂盒(上海翌圣生物科技有限公司),PCR 引物(北京擎科生物有限公司),Minute(TM)动物组织总蛋白提取试剂盒(上海西宝生物科技股份有限公司)。

1.2.2 仪器 SD1 全自动生化分析仪(成都斯马特科技有限公司),UV759CRT 型扫描型紫外可见分光光度计(青岛聚创环保集团有限公司),JC-MB36 酶标仪(青岛聚创嘉恒分析仪器有限公司),HOG-24 组织均质器(上海辅光精密仪器有限公司),NanoDrop 2000 超微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 益气活血化瘀汤 准确称取黄芪、茯苓、党参、忍冬藤、白术各 12 g,泽泻、当归、红花各 8 g,陈皮、黄柏各、丹参各 5 g,浸泡 1 h 后加水煎煮 2 次,

过滤后将 2 次滤液混合均匀,浓缩至生药含量为 62.4 g/mL 的浓缩液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3.2 肾衰竭模型的复制 采用 5/6 肾切除法复制 CRF 大鼠^[6]。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,固定于手术台上,使大鼠背部左肾区朝上,距左脊肋肋约 1.5 cm 处做斜向外方切口,打开腹腔暴露肾脏,切除 2/3 肾组织并用明胶海绵压迫止血 30 s,滴加纤维蛋白原和凝血酶溶液,等待 60 s 后观察切面无活动性出血后将左肾复位、缝合。大鼠恢复 1 周后,打开腹腔,切除整个右肾,2 次手术共切除约 80% 肾脏。假手术组打开腹腔,切除肾脏周围部分脂肪组织,然后缝合伤口。

1.3.3 分组与给药 50 只大鼠随机分为假手术组、肾衰组、低剂量组、高剂量组、骨化三醇组,每组 10 只。模型复制成功后 2 周后开始给药,按照人与大鼠体表面积换算出给药剂量作为最低给药剂量。高、低剂量组大鼠分别按 35.2 g/kg、8.8 g/kg 灌胃益气活血化瘀汤;骨化三醇组将骨化三醇在温水中捣碎溶成悬液,按 25 ng/kg 灌胃;假手术组灌胃等体积温水,均 1 次/d,连续 8 周。肾衰组模型复制成功后未做任何处理。给药结束后,用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 待测。实验前 12 h 禁水、禁食。治疗期间,观察大鼠体重、精神状态、行为、中毒及死亡情况。

1.3.4 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血液矿物质与生化指标 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液,麻醉后固定于手术台上,切开腹腔,腹主动脉采血 5 mL,4 000 r/min 离心 20 min,分离上清液,采用全自动生化分析仪检测大鼠血清钙和磷;ELISA 测定大鼠血清 PTH、FGF-23、25(OH) D_3 。酶标仪测定各个血标本在 450 nm 波长处的光密度(optical density, OD)值,以试剂盒中标准品为横坐标(X),对应 OD 值为纵坐标(Y)绘制标准曲线,根据血标本的 OD 值计算相应浓度。

1.3.5 肾脏功能指标检测 取离心后血清,采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清 Scr 含量。在氯化高铁一磷酸中加入含有 BUN 的血清、二乙酰一肟和硫胺脲,加热生成红色的二嗪化合物,颜色深浅与血 BUN 呈正比,取加热煮沸的混合液,待其冷却后利用分光光度计测量 540 nm 处的 OD 值。取离心后尿

液上清,采用 ELISA 试剂盒检测大鼠尿液 UP 含量,按照说明书进行操作,浓度计算方法同方法 1.3.4。

1.3.6 主动脉茜素红法钙盐染色 参照 ZHANG 等^[7]的方法,腹主动脉采血后,剪开胸腔,剥离出胸主动脉,剪取长约 5 cm 动脉,用含肝素钠的生理盐水冲洗动脉,将动脉外部和管腔中的血液完全冲除干净,浸泡于 PBS 缓冲液中。①血管大体染色:随机取出 5 只大鼠的主动脉,用吸水纸吸干水分,浸泡于 95% 乙醇 12 h 脱水处理,用茜素红染料(0.004% 茜素红+1% 氢氧化钾)室温下染色 12 h,取出动脉血管,2% 氢氧化钾冲洗干净(时间不宜过长),4% 多聚甲醛固定,拍照观察染色情况。②血管切片染色:将剩余 5 只大鼠的主动脉取出,每根剪取 1 cm,吸干水分,用 4% 多聚甲醛在常温下固定 24 h,不同浓度乙醇梯度脱水,加入二甲苯透明处理 10 min,石蜡包埋,切片厚约 5 μm ,放于载玻片上,60℃ 烘烤,二甲苯脱蜡,水中浸泡 2 min,0.2% 茜素红染液染色 6 min,用水洗去多余染液并加入二甲苯脱水,中性树脂胶封片,置于显微镜下观察血管钙化情况。

1.3.7 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 Wnt/ β -catenin 通路 mRNA 的表达 大鼠腹主动脉采血后,取出肾脏,生理盐水冲洗干净。加入适量生理盐水,用组织匀浆器研磨肾脏组织,采用 TRIzol 法提取 RNA(总 RNA 提取试剂盒),用 Nano Drop 测量浓度。采用 Primer 5 软件设计 qRT-PCR 扩增引物(见表 1)。取 0.1 μg RNA,使用 Hifair[®] III One Step qRT-PCR SYBR Green Kit(一步法反转定量)试剂盒进行逆转录和定量,40℃、10 min 将 RNA 逆转录为 cDNA。在 ABI PRISM 7500 实时 PCR 系统(ABI)中进行反应,qRT-PCR 反应条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 30 s,共 38 个循环。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Wnt/ β -catenin 通路[结肠腺瘤样息肉蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)、T 细胞因子 4(T-cell factor, TCF4)、 β -catenin] mRNA 相对表达量,实验重复 3 次获得平均值。

1.3.8 Western blotting 检测 Wnt/ β -catenin 通路蛋白的表达 取研磨好的肾脏组织匀浆液,提取总蛋白,利用 BCA 试剂盒测定浓度。添加缓冲液,将蛋白质样本在 95℃ 条件下加热 10 min,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电压 80 V 用于浓缩,120 V 用于分离。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
Wnt	正向: 5'-GGACCTTGACGAACGTA-3'	432
	反向: 5'-TTACGATAACAGTCATG-3'	
β -catenin	正向: 5'-CCGAACGTTACAGCCTGAAC-3'	641
	反向: 5'-TTGGCATAGCATAGCACTAC-3'	
β -actin	正向: 5'-GGCGAACTACAHTACA-3'	409
	反向: 5'-GGTTCAGTACATAGAC-3'	

恒压 100 mV 条件下湿转移 120 min,将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。室温下将 PVDF 膜置于 5% 牛血清白蛋白中封闭 1 h,与一抗(兔抗大鼠 Wnt、 β -catenin 和 β -actin 一抗,均 1:1 000 稀释)在 4℃ 条件下孵育一晚。TBST 冲洗膜 3 次,5 min/次,加入二抗孵育 1 h, TBST 再洗膜 3 次,5 min/次。使用发光液 ECL 底物对每个条带进行可视化处理,以 β -actin 为内参计算 APC、TCF4、 β -catenin 灰度值作为蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

治疗期间,大鼠精神状态良好,饮食与行为正常,毛色正常,未出现中毒与死亡情况。

2.2 各组大鼠血液矿物质与生化指标比较

假手术组、肾衰组、低剂量组、高剂量组、骨化三醇组大鼠血钙、血磷、PTH、FGF-23、25(OH) D_3 比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较结果:肾衰组血钙、25(OH) D_3 低于假手术组($P < 0.05$);与肾衰组比较,低剂量组、高剂量组和骨化三醇组血钙、25(OH) D_3 升高($P < 0.05$);高剂量组和骨化三醇组血钙、25(OH) D_3 高于低剂量组($P < 0.05$);骨化三醇组血钙、25(OH) D_3 高于高剂量组($P < 0.05$);肾衰组血磷、PTH、FGF-23 高于假手术组($P < 0.05$);与肾衰组比较,低剂量组、高剂量组和骨化三醇组血磷、PTH、FGF-23 降低($P < 0.05$);高剂

表 2 各组大鼠血钙、血磷、PTH、FGF-23、25(OH)D₃比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	血钙/(mmol/L)	血磷/(mmol/L)	PTH/(pg/mL)	FGF-23/(pg/L)	25(OH)D ₃ /(ng/mL)
假手术组	2.97 ± 0.69	2.01 ± 0.41	0.71 ± 0.17	0.48 ± 0.11	13.85 ± 2.73
肾衰组	1.87 ± 0.41 ^①	4.17 ± 1.01 ^①	19.32 ± 4.18 ^①	1.17 ± 0.26 ^①	6.27 ± 1.12 ^①
低剂量组	2.18 ± 0.27 ^②	3.92 ± 0.87 ^②	14.31 ± 3.27 ^②	0.92 ± 0.18 ^②	9.54 ± 1.61 ^②
高剂量组	2.67 ± 0.74 ^{②③}	2.93 ± 0.51 ^{②③}	12.79 ± 2.88 ^{②③}	0.62 ± 0.12 ^{②③}	12.76 ± 2.01 ^{②③}
骨化三醇组	2.84 ± 0.68 ^{②③④}	2.51 ± 0.52 ^{②③④}	9.17 ± 1.53 ^{②③④}	0.54 ± 0.11 ^{②③④}	14.17 ± 2.32 ^{②③④}
F 值	6.257	35.315	61.898	38.189	27.307
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与肾衰组比较, $P < 0.05$; ③与低剂量组比较, $P < 0.05$; ④与高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

量组和骨化三醇组血磷、PTH、FGF-23 低于低剂量组 ($P < 0.05$); 骨化三醇组血磷、PTH、FGF-23 低于高剂量组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各组大鼠肾功能指标比较

假手术组、肾衰组、低剂量组、高剂量组和骨化三醇组大鼠 BUN、Scr、24 h UP 比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 假手术组 BUN、Scr、24 h UP 低于其余 4 组 ($P < 0.05$); 与肾衰组比较, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组 BUN、Scr、24 h UP 降低 ($P < 0.05$); 高剂量组和骨化三醇组 BUN、Scr、24 h UP 低于低剂量组 ($P < 0.05$); 骨化三醇组 BUN、Scr、24 h UP 低于高剂量组 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 各组大鼠主动脉血管钙化情况

血管整体茜素红染色可见假手术组主动脉呈白色, 无红色钙化点; 肾衰组主动脉则钙化严重, 呈红色; 低剂量组主动脉呈浅红色, 钙化程度略轻; 高剂量组主动脉红色更淡, 钙化程度缓解; 骨化三醇组主

表 3 各组大鼠血清 BUN、Scr、24 h UP 比较

(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	BUN/(mmol/L)	Scr/(μ mol/L)	24 h UP/(mg/d)
假手术组	7.58 ± 2.04	36.52 ± 9.32	0.41 ± 0.11
肾衰组	18.96 ± 4.27 ^①	95.74 ± 21.71 ^①	13.21 ± 3.46 ^①
低剂量组	16.87 ± 3.17 ^{①②}	75.31 ± 18.14 ^{①②}	11.02 ± 2.98 ^{①②}
高剂量组	13.77 ± 3.02 ^{①②③}	61.27 ± 18.01 ^{①②③}	10.77 ± 2.35 ^{①②③}
骨化三醇组	11.48 ± 2.36 ^{①②③④}	56.33 ± 12.87 ^{①②③④}	9.14 ± 1.57 ^{①②③④}
F 值	21.243	17.711	42.764
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与肾衰组比较, $P < 0.05$; ③与低剂量组比较, $P < 0.05$; ④与高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

动脉部分呈白色, 部分呈浅红色, 钙化程度减轻。

茜素红切片染色中, 假手术组切片未观察到钙化点; 肾衰组切片观察到大面积红色钙化点, 呈弥散性分布; 与肾衰组比较, 可见低剂量组红色钙化点减少, 高剂量组红色钙化点明显减少; 骨化三醇组红色钙化点也明显减少。见图 1。

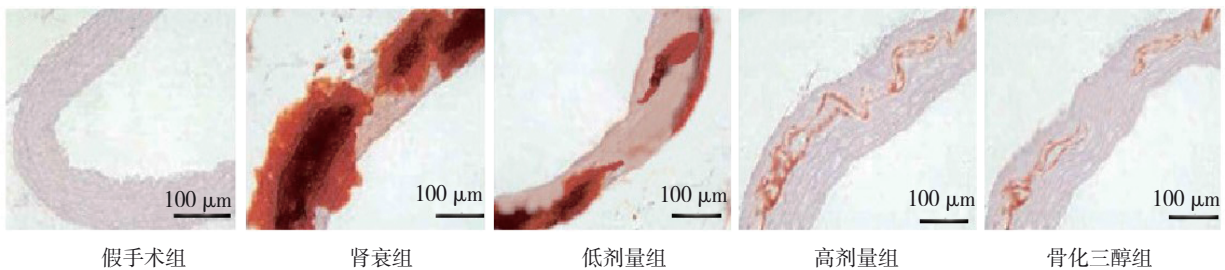


图 1 大鼠主动脉截面切片 (茜素红染色 × 50)

2.5 各组大鼠肾脏 APC、TCF4、 β -catenin mRNA 相对表达量比较

假手术组、肾衰组、低剂量组、高剂量组和骨化三醇组大鼠 APC、TCF4、 β -catenin mRNA 相对表达

量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 肾衰组 APC mRNA 相对表达量低于假手术组 ($P < 0.05$); 与肾衰组比较, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组 APC mRNA 相对表达量

升高 ($P < 0.05$); 高剂量组和骨化三醇组 APC mRNA 相对表达量高于低剂量组 ($P < 0.05$); 骨化三醇组 APC mRNA 相对表达量高于高剂量组 ($P < 0.05$); 肾衰组 TCF4、 β -catenin mRNA 相对表达量高于假手术组 ($P < 0.05$); 与肾衰组比较, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组 TCF4、 β -catenin mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$); 高剂量组和骨化三醇组 TCF4、 β -catenin mRNA 相对表达量低于低剂量组 ($P < 0.05$); 骨化三醇组 TCF4、 β -catenin mRNA 相对表达量低于高剂量组 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠肾脏 APC、TCF4、 β -catenin mRNA 相对表达量比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	APC mRNA	TCF4 mRNA	β -catenin mRNA
假手术组	0.98 ± 0.12	1.10 ± 0.31	0.87 ± 0.13
肾衰组	0.37 ± 0.08 ^①	2.07 ± 0.48 ^①	1.95 ± 0.32 ^①
低剂量组	0.58 ± 0.10 ^②	1.87 ± 0.51 ^②	1.51 ± 0.35 ^②
高剂量组	0.61 ± 0.11 ^{②③}	1.29 ± 0.33 ^{②③}	1.21 ± 0.31 ^{②③}
骨化三醇组	0.65 ± 0.10 ^{②③④}	1.03 ± 0.21 ^{②③④}	1.07 ± 0.27 ^{②③④}
F 值	22.812	7.461	10.803
P 值	0.000	0.001	0.000

注: ①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与肾衰组比较, $P < 0.05$; ③与低剂量组比较, $P < 0.05$; ④与高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

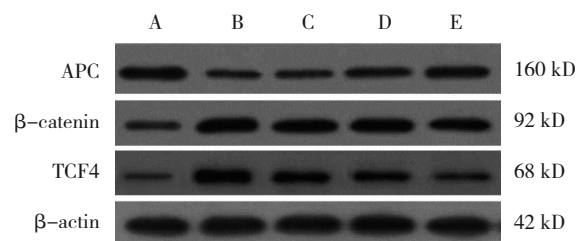
2.6 各组大鼠肾脏 APC、TCF4、 β -catenin 蛋白相对表达量比较

假手术组、肾衰组、低剂量组、高剂量组和骨化三醇组大鼠 APC、TCF4、 β -catenin 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 肾衰组 APC 蛋白相对表达量低于假手术组 ($P < 0.05$); 与肾衰组比较, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组 APC 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$); 高剂量组和骨化三醇组 APC 蛋白相对表达量高于低剂量组 ($P < 0.05$); 骨化三醇组 APC 蛋白相对表达量高于高剂量组 ($P < 0.05$); 肾衰组 TCF4、 β -catenin 蛋白相对表达量高于假手术组 ($P < 0.05$); 与肾衰组比较, 低剂量组、高剂量组和骨化三醇组 TCF4、 β -catenin 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); 高剂量组和骨化三醇组 TCF4、 β -catenin 蛋白相对表达量低于低剂量组 ($P < 0.05$); 骨化三醇组 TCF4、 β -catenin 蛋白相对表达量低于高剂量组 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 2。

表 5 各组大鼠肾脏 APC、TCF4、 β -catenin 蛋白相对表达量比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	APC	TCF4	β -catenin
假手术组	1.13 ± 0.25	0.28 ± 0.05	0.36 ± 0.09
肾衰组	0.35 ± 0.09 ^①	1.07 ± 0.30 ^①	1.12 ± 0.29 ^①
低剂量组	0.48 ± 0.11 ^②	0.82 ± 0.15 ^②	0.98 ± 0.21 ^②
高剂量组	0.67 ± 0.13 ^{②③}	0.58 ± 0.10 ^{②③}	0.56 ± 0.11 ^{②③}
骨化三醇组	0.78 ± 0.15 ^{②③④}	0.36 ± 0.08 ^{②③④}	0.38 ± 0.08 ^{②③④}
F 值	18.503	20.323	18.068
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与肾衰组比较, $P < 0.05$; ③与低剂量组比较, $P < 0.05$; ④与高剂量组比较, $P < 0.05$ 。



A: 假手术组; B: 肾衰组; C: 低剂量组; D: 高剂量组; E: 骨化三醇组。

图 2 各组大鼠肾脏 APC、TCF4、 β -catenin 蛋白的表达

3 讨论

钙磷代谢紊乱是 CRF 的主要并发症之一, 贯穿于肾功能损坏的全过程^[8]。长期钙磷代谢紊乱会导致各种组织器官发生继发性损坏, 主要表现为主动脉钙化、软组织钙化和肾性骨病等, 增加患心血管疾病的风险。既往研究显示, CRF 患者血钙、血磷、PTH 异常, 诱发高磷血症, 加快血管钙化的进展^[9]。临床上主要以控制患者饮食或使用磷结合剂来降低血磷和恢复血钙浓度, 目前已经研制出碳酸司维拉姆、盐酸司维拉姆等新型磷结合剂, 但价格昂贵, 患者接受度低^[10-11]。在现代中医学中, CRF 属本虚标实证, 认为肾乃“先天之本”, 肾气虚弱, 则阴阳失调, 导致淤血、痰积、浊毒、风邪等实证。肾络淤堵, 浊毒痰瘀滞留, 导致钙磷代谢紊乱; 痰瘀于血脉, 致血管钙化, 故应以补肾健脾, 泄浊通腑法缓解病症。汤水福教授^[12]也在其研究中阐述治疗 CRF 应以通络、活血、化痰、益气为主。

本研究中主动脉茜素红染色结果表明, 肾衰组大鼠主动脉完全变成暗红色, 说明血管钙化严重,

而相比于肾衰组,低剂量组、高剂量组和骨化三醇组的主动脉红色依次减弱,说明益气活血化癥汤可以有效缓解钙磷代谢紊乱,减少血管中钙磷沉积,减轻血管钙化程度。本研究结果显示,与假手术组比较,肾衰组大鼠血钙、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 降低,血磷、PTH、FGF-23升高。与肾衰组相比,各治疗组大鼠血钙、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 升高,血磷、PTH、FGF-23降低,并且高剂量组各指标的变化程度高于低剂量组,提示高剂量的益气活血化癥汤可以更好地改善CRF大鼠钙磷代谢紊乱。FGF-23是调磷素之一,是调节血磷与维生素D的主要物质。 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 是固醇类激素,与PTH、血钙、血磷的调节有关,可以间接反映机体钙磷紊乱程度。血钙、血磷、PTH可以直接反映机体钙磷代谢紊乱程度。现代药理学研究表明,黄芪可以减缓CRF大鼠肾损伤,调节钙磷代谢紊乱^[13]。Scr、BUN是机体代谢产物,由肾脏排除,可以间接反映肾功能。本研究结果显示,肾衰组大鼠Scr、BUN高于假手术组;而与肾衰组相比,各治疗组Scr、BUN均出现不同程度的下降。黄芪为补气的良药,补气升阳充盈脉络之气,补肾健脾化脾肾之虚,常配伍党参,达到益气固元之功效。同时有研究发现,黄芪的水提取物可以调节CRF大鼠体内Scr、BUN水平,对CRF症状有缓解作用^[14]。崔龙海等^[15]发现党参总碱苷治疗肾损伤大鼠后,肾坏死灶减小,炎症浸润降低,对肾损伤具有保护作用。丹参具有解毒通络,活血化癥的作用^[16],忍冬藤和红花具有活血通络的作用。中医角度认为Scr、BUN属于机体的“淤浊”,而本研究中,CRF大鼠经益气活血化癥汤治疗后,“淤浊”降低,提示益气活血化癥汤具有排浊化癥的功效。正常情况下,由于肾小球的滤过作用,尿液中的蛋白质不会随尿液排出体外,而在本研究中收集肾衰组大鼠处死前24h尿液发现其中含有大量UP,说明肾功能受损,经治疗后,各组尿液中UP含量出现不同程度降低。因此推测,益气活血化癥汤具有修复受损肾脏、排浊化癥的作用,提高治疗剂量则效果更佳。

本研究结果表明,肾衰组TCF4、 β -catenin mRNA和蛋白相对表达量高于假手术组;各治疗组大鼠肾脏TCF4、 β -catenin mRNA和蛋白相对表达量低于肾衰组。与假手术组比较,肾衰组大鼠肾脏APC mRNA和蛋白相对表达量下调;与肾衰组相比,

各治疗组大鼠肾脏APC mRNA和蛋白相对表达量上调。说明益气活血化癥汤可以通过调节Wnt/ β -catenin信号通路来抑制肾脏损伤,保护肾脏组织。既往研究显示,Wnt/ β -catenin信号通路在慢性肾病中发挥重要作用,其中 β -catenin是该通路的重要蛋白^[17]。正常情况下, β -catenin在细胞膜上与其他蛋白质一同维持细胞膜的完整性,当细胞受到刺激时,Wnt激活 β -catenin进入细胞核,调节下游肾纤维化基因的表达。APC则可以降解 β -catenin蛋白复合体,使细胞核内 β -catenin转移至细胞质,一部分APC可以与 β -catenin结合,阻止其激活下游基因,抑制肾脏损伤的发生。 β -catenin进入细胞核后,无法直接作用于遗传物质,作为核内转录因子家族的TCF4可以帮助 β -catenin进入细胞核,并与其结合进一步激活下游基因,引起肾脏损伤^[18]。

综上所述,益气活血化癥汤可以改善CRF大鼠钙磷代谢紊乱,缓解血管钙化程度,适当增加益气活血化癥汤的剂量疗效更好。其治疗作用可能是通过调节Wnt/ β -catenin信号通路来实现的。本研究为中医临床治疗CRF提供了新思路,但益气活血化癥汤对Wnt/ β -catenin信号通路的具体调节机制尚不明确,还需后续研究进一步阐明。

参 考 文 献 :

- [1] SELIGER S L. Hyperkalemia in patients with chronic renal failure [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2019, 34(Suppl 3): iii12-iii18.
- [2] VILAY A M. Antibiotic dosing in chronic kidney disease and end-stage renal disease: a focus on contemporary challenges[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2019, 26(1): 61-71.
- [3] SALLES J P. Hypophosphatasia: biological and clinical aspects, avenues for therapy[J]. *Clin Biochem Rev*, 2020, 41(1): 13-27.
- [4] MUREA M, GEARY R L, DAVIS R P, et al. Vascular access for hemodialysis: a perpetual challenge[J]. *Semin Dial*, 2019, 32(6): 527-534.
- [5] 施蕾,许琳洁,庞礴,等. "通法"治疗慢性肾衰竭[J]. *中医杂志*, 2020, 61(7): 635-637.
- [6] 朱晓婷,陈志强,张亚楠,等. 益气化湿通络方通过调节NF- κ B信号通路改善慢性肾功能衰竭大鼠炎性纤维化的实验研究[J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2193-2199.
- [7] ZHANG X L, LI Y N, YANG P Z, et al. Trimethylamine-N-oxide promotes vascular calcification through activation of NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3) inflammasome and NF- κ B (nuclear factor κ B) signals[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 751-765.

- [8] XIE Q Y, HU N, CHEN Y Q. Chronic kidney disease-associated pruritus significantly impacts on quality of life of patients on haemodialysis and associates with increased levels of serum calcium and phosphorus[J]. *Postgrad Med J*, 2021: postgradmedj-postgrad2020. Epub ahead of print. DOI: 10.1136/postgradmedj-2020-139688.
- [9] LIAO C T, ZHENG C M, LIN Y C, et al. Aberrant serum parathyroid hormone, calcium, and phosphorus as risk factors for peritonitis in peritoneal dialysis patients[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1171.
- [10] 贾凤玉, 刘志红. 慢性肾脏病患者应用磷结合剂的新认识[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2014, 23(2): 171-175.
- [11] 周楚, 朱春玲, 张路霞. 磷结合剂在透析前慢性肾脏病患者中的应用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2016, 32(7): 545-547.
- [12] 张玲, 陈曦霞, 李林, 等. 汤水福教授运用通络法治疗慢性肾衰竭经验[J]. *云南中医学院学报*, 2019, 42(2): 43-46.
- [13] 吴艺青. 中药黄芪对慢性肾脏病大鼠钙磷代谢及 FGF23-Klotho 轴的影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [14] 汪卫红, 许焯, 李志明, 等. 黄芪水提物对慢性肾功能衰竭模型大鼠的改善作用及其对 MAPK 信号通路的影响[J]. *中国药房*, 2019, 30(10): 1386-1392.
- [15] 崔龙海, 韩龙哲, 韩春姬. 轮叶党参总皂苷对肝脏缺血-再灌注大鼠肝肾损伤的保护作用[J]. *中药材*, 2019, 42(8): 1903-1906.
- [16] 于涵, 余海源, 牟爱敏. 丹参对糖尿病肾病保护机制的研究进展[J]. *世界中医药*, 2021, 16(7): 1161-1165.
- [17] SCHUNK S J, FLOEGE J, FLISER D, et al. WNT- β -catenin signalling - a versatile player in kidney injury and repair[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(3): 172-184.
- [18] ZHAO Y, WANG C, HONG X, et al. Wnt/ β -catenin signaling mediates both heart and kidney injury in type 2 cardiorenal syndrome[J]. *Kidney Int*, 2019, 95(4): 815-829.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 张旭, 赵芳园. 益气活血化痰汤对慢性肾衰竭大鼠钙磷代谢紊乱及血管钙化的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(12): 25-32.

Cite this article as: ZHANG X, ZHAO F Y. Effect and mechanism of Yiqi Huoxue Huayu Decoction on the disorder of calcium and phosphorus metabolism and vascular calcification in rats with chronic renal failure[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(12): 25-32.