

加味四君子汤对阿霉素肾病大鼠骨代谢的影响

郑 京¹ 刘加林² 林敏芳¹ 王振飞¹ 刘慈赞³ 吴心虹³
林华阳¹ 陈彩凤³ 郑雪敏³ 陈小英³

摘要 目的 探讨加味四君子汤对泼尼松干预的阿霉素肾病大鼠骨代谢的影响。**方法** 制作大鼠阿霉素肾病模型,将 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组,即模型组、激素组、中药组、中药加激素组及正常组。各组于造模后 7、21、35 天收集 24 h 尿标本,以双缩脲比色法测定大鼠 24 h 尿蛋白,以 ELISA 法测定各组血清骨保护素(osteoprotegerin,OPG)、核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator for NF- κ B ligand, RANKL)、骨钙素(osteocalcin,BGP)以及抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP)水平,采用实时定量 PCR 和 Western blot 检测胫骨组织中 OPG、RANKL 的表达。**结果** (1)与正常组比较,模型组第 7、21、35 天 24 h 尿蛋白均有不同程度增高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组同期比较,激素组及中药加激素组 24 h 尿蛋白均有不同程度下降,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);并随着治疗时间的延长,降低更明显($P < 0.05$, $P < 0.01$);中药组治疗 35 天,与模型组比较,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。(2)与本组 21 天比较,激素组 TRACP、RANKL 均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,第 21、35 天,激素组 TRACP、RANKL 均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),OPG、BGP 均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与中药组同期比较,激素组、中药加激素组 OPG 均降低, RANKL 均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);且激素组 TRACP 升高, BGP 降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与激素组同期比较,中药加激素组 OPG、BGP 升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), RANKL 降低($P < 0.01$);第 35 天, TRACP 降低($P < 0.01$)。(3)与正常组比较,模型组第 21 天 OPG、RANKL mRNA 升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),第 35 天 OPG、RANKL mRNA 降低($P < 0.01$)。与中药组同期比较,激素组 OPG mRNA 降低($P < 0.01$), RANKL mRNA 升高($P < 0.05$);中药加激素组 OPG mRNA 降低($P < 0.05$)。(4)与本组 21 天比较,激素组 OPG 降低($P < 0.05$), RANKL 升高($P < 0.05$),中药加激素组 RANKL 降低($P < 0.05$)。与模型组同期比较,激素组 OPG 降低($P < 0.01$), RANKL 升高($P < 0.01$)。与中药组同期比较,激素组、中药加激素组 OPG 均降低($P < 0.01$), RANKL 均升高($P < 0.01$);与激素组同期比较,中药加激素组 OPG 均升高($P < 0.01$), RANKL 均降低($P < 0.01$)。**结论** 泼尼松能通过 OPG/RANKL/RANK 通路诱导骨质疏松。加味四君子汤在降蛋白尿的同时,可通过上述通路促进成骨细胞分化,抑制破骨细胞生成,从而减缓泼尼松诱导的骨质疏松的形成。

关键词 阿霉素肾病;骨质疏松;加味四君子汤;骨保护素;核因子 κ B 受体活化因子配体

Effect of Modified Sijunzi Decoction on the Bone Metabolism of Adriamycin Induced Nephropathy Rats ZHENG Jing¹, LIU Jia-lin², LIN Min-fang¹, WANG Zhen-fei¹, LIU Ci-yun³, WU Xin-hong³, LIN Hua-yang¹, CHEN Cai-feng³, ZHENG Xue-min³, and CHEN Xiao-ying³ 1 Department of Nephropathy, Fujian Provincial People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350004), China; 2 Department of Nephropathy, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang (550000), China; 3 Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350100), China

ABSTRACT Objective To explore the effect of Modified Sijunzi Decoction (MSD) on the bone metabolism of prednisone intervened adriamycin-induced nephropathy rats. **Methods** The adriamycin-induced nephropathy rat model was prepared. Totally 50 SD rats were randomly divide into five groups, i.e.,

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(No. 2012J01378)

作者单位:1.福建中医药大学附属人民医院肾内科(福州 350004);2.贵州省人民医院肾内科(贵阳 550000);3.福建中医药大学(福州 350100)

通讯作者:刘加林, Tel:18985582255, E-mail: ljl@medmail.com.cn

DOI: 10. 7661/CJIM. 2013. 10. 1376

the model group, the hormone group, the Chinese medicine (CM) group, the CM + hormone group, and the normal control group. The 24-h urine samples were collected on the 7th, 21st, and 35th day after modeling. The 24-h urine protein was measured by biuret colorimetry. Serum levels of osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), osteocalcin (BGP), and tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) were determined by ELISA. Expressions of OPG and RANKL in the tibia tissue were detected using real-time quantitative PCR and Western blot. Results (1) Compared with the normal control group, the 24-h urine protein increased in each group on the 7th, 21st, and 35th day ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the 24-h urinary protein decreased in the hormone group and the CM + hormone group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The decrement was more obvious along with the treatment time went by ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was statistical difference in the reduction of urine protein on the 35th day between the CM group and the model group ($P < 0.05$). (2) Compared with the 21st-day of the same group, the serum levels of TRACP and RANKL increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the serum levels of the TRACP and RANKL increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), OPG and BGP decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the hormone group. Compared with the CM group at the same period, serum OPG level decreased and the RANKL level increased in the hormone group and the CM + hormone group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Besides, the serum level of TRACP increased and BGP decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the hormone group at the same period, OPG and BGP increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), RANKL decreased ($P < 0.01$) in the CM + hormone group. On the 35th day TRACP decreased ($P < 0.01$). (3) Compared with the normal group, mRNA expressions of OPG and RANKL on the 21st day increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), mRNA expressions of OPG and RANKL on the 35th day decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the CM group at the same period, OPG mRNA expression decreased ($P < 0.01$) and RANKL mRNA expression increased in the hormone group ($P < 0.05$). OPG mRNA expression decreased in the CM + hormone group ($P < 0.05$). (4) Compared with the hormone group on the 21st day, the OPG level decreased and the RANKL protein increased (both $P < 0.05$). RANKL decreased in the CM + hormone group ($P < 0.05$). Compared with the model group at the same period, OPG decreased and RANKL increased in the hormone group ($P < 0.01$). Compared with the CM group at the same period, OPG decreased ($P < 0.01$), RANKL increased ($P < 0.01$) in the hormone group and the CM + hormone group. Compared with the hormone group at the same period, OPG increased and RANKL decreased in the CM + hormone group (both $P < 0.01$). Conclusions Prednisone could induce osteoporosis through the OPG/RANKL/RANK pathway. MSZ could slow down the formation of prednisone-induced osteoporosis through promoting osteoblast differentiation, and inhibiting osteoclastogenesis.

KEYWORDS adriamycin-induced nephropathy; osteoporosis; Modified Sijunzi Decoction; osteoprotegerin; receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)

糖皮质激素是目前临床上治疗肾病综合征的主要药物,但糖皮质激素长期或大量应用会导致骨质疏松症。骨质疏松症属中医学“骨痹”、“骨痿”、“腰背痛”等范畴,《医精经义》曰“肾藏精,精生髓,髓生骨,故骨者肾之所主也”,从理论上说明了肾和骨之间的密切联系。中医学将其发病机制概括为肾虚、脾亏、血瘀等,治疗多采用益肾健脾、活血化瘀的方法^[1]。加味四君子汤是根据李学铭先生所拟“加味四君子汤”加减而来,本方能降低患者尿蛋白,改善患者生活质量^[2],常用于治疗脾肾气虚型肾病。笔者在长期临床实践中发现加味四君子汤单用及配合激素应用临床效

果确切。根据中医学“同病异治”理论,本实验以泼尼松或加味四君子汤分别对阿霉素肾病大鼠模型干预治疗,同时观察对蛋白尿及骨代谢的影响,选择了核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)、骨保护素(OPG)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)和骨钙素(BGP)4个骨代谢中的重要标志物,分别在血清、骨组织中进行检测,从而验证其具体影响程度。

材料与方法

1 动物 SD大鼠,体重180~220 g,50只,清洁级,由广东省医学实验动物中心提供(合格证号:

70092411),医学实验动物环境设施为福建中医学院动物实验中心鼠类实验室,清洁级。动物使用符合福建省医学实验动物管理委员会管理条例。

2 药物 加味四君子汤(组成:黄芪 30 g 党参 10 g 丹参 15 g 山萸肉 12 g 山药 30 g 茯苓 12 g 薏苡仁 30 g 当归 15 g 莲肉 30 g 金樱子 15 g 桑寄生 15 g 白术 12 g),生药制成 40% 的浓缩汤剂,按 0.4 mL/20 g,每日上午 8:00~9:00 点灌胃 1 次。中药制法:(1)称取生药 226 g,用水浸泡 30 min,电炉加热至沸腾后,再煎 30 min,过滤;(2)得滤渣、加水,加热(二煎)至沸腾后,再煎 20 min,再过滤;(3)2 次滤液混合,加热浓缩至体积为 226 mL,相当于原材料 1.0 g/mL(原药材由福建省药材公司提供,由本院制剂科加工)。

3 试剂及仪器 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa 公司,Code:DRR820A);RNAiso Plus,(TaKaRa 公司,Code:D9108A);ExScript™ RT Reagent Kit 试剂盒(TaKaRa 公司,Code:DRR037A);Rat_Gapdh_primer(TaKaRa 公司,Code:D379212);盐酸阿霉素(浙江海正药业股份有限公司)。7500Fast 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);EL-311S 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司);Western-blot(美国 Bio-RAD);凝胶图像分析仪(英国 SYNGENE 公司)。

4 方法

4.1 动物的造模、分组及给药方法 以随机数字表将大鼠随机分为正常组、模型组、激素组、中药组、中药加激素组,每组 10 只,除正常组外,各组大鼠经尾静脉一次性注射盐酸阿霉素 6.5 mg/kg^[3],正常组经尾静脉一次性注射等量生理盐水。造模 7 天后,对大鼠进行 24 h 尿蛋白定性,在 ++ 以上,提示造模成功^[4]。正常、模型组以每日生理盐水灌胃;激素组以泼尼松 10 mg/(kg·d)灌胃;中药治疗组以中药 20 mL/(kg·d)灌胃;中药加激素组以中药 20 mL/(kg·d)灌胃,同时每日泼尼松 10 mg/(kg·d)灌胃。于第 21、35 天各组分批处死大鼠采血、取材。在预实验中,大鼠造模 7 天后开始出现尿蛋白,第 21、35 天模型组尿蛋白明显升高($P<0.05$)。

4.2 观察项目及检测方法

4.2.1 24 h 尿蛋白定量 以代谢笼收集 24 h 尿液,以双缩脲比色法测 24 h 尿蛋白。

4.2.2 骨代谢生化指标测定 各组于第 21、35 天经腹主动脉采血 3 mL,离心保留血清,以 ELISA 法测定各组 OPG、RANKL、BGP 以及 TRACP 水平。

4.2.3 各组 OPG、RANKL、BGP 及 TRACP 的 mRNA 定量 Real time-PCR:处死动物,立即取出一侧胫骨,去除软组织和骨髓,-80℃保存。采用 Trizole 一步法提取组织总 RNA。在紫外分光光度仪上测算出 RNA 浓度,采用 ExScript™ RT Reagent Kit 试剂盒将其逆转录为 cDNA,使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒以 7500 Software v2.0.5 进行荧光扩增。采用 SYBR Green I 嵌合荧光法,引物设计根据 Genebank 序列,由宝生物(大连)工程有限公司合成,检测基因的上、下游引物序列见表 1。反应条件:95℃预变性 10 min,95℃变性 30 s,60℃延伸 1 min,40 个循环,GAPDH 作为内参照。以正常组 mRNA 的表达量作为“1”,再根据校正值计算出其他各组 mRNA 相对含量,进行组间相对量的比较。

表 1 检测基因的引物序列和产物长度		
基因	引物序列	长度(bp)
OPG	上游 5'-CTCATCAGTTGGTGGGAATGAAGA-3'	107
	下游 5'-ACCTGGCAGCTTTCACAAATTA-3'	
RANKL	上游 5'-GCAGCATCGCTCTGTTCCTGTA-3'	164
	下游 5'-GCATGAGTCAGGTAGTGCTTCTGTG-3'	

4.2.4 各组 OPG、RANKL、BGP 及 TRACP 的蛋白测定 Western blot:夹取胫骨组织 200 mg,在液氮中研成粉末,加入 400 μL 细胞裂解液迅速混匀,抽取到 1.5 mL EP 管内,在冰上裂解 30 min。4℃,12 000 r/min,离心 1 h,取出上清液置 EP 管内备用。BAC 法进行蛋白质定量。使蛋白变性以便于保存。80 V 124 min 进行电泳分离,切胶,在电压 100 V 下合适时间内转膜,丽春红染色观察转移效果。5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入 1:1 000 一抗,4℃摇床过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 5~10 min。然后加入 1:1 000 辣根过氧化物酶标记的二抗,室温 1 h,TBST 洗膜 3 次。显影、定影后凝胶图像分析系统对胶片扫描,以正常组的面积灰度值为 100% 与干预组进行比较分析。

4.3 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组数据进行正态性和方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量水平比较(表 2) 与正常组比较,模型组第 7、21、35 天 24 h 尿蛋白均有不同程度增高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组同期

比较,激素组及中药加激素组 24 h 尿蛋白均有不同程度下降,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);并随着治疗时间的延长,降低更明显($P < 0.05$, $P < 0.01$);中药组治疗 35 天,与模型组比较,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组 24 h 尿蛋白定量水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	24 h 尿蛋白(mg/24 h)		
		7 天	21 天	35 天
正常	10	3.19 $\pm$ 1.88	5.59 $\pm$ 1.67	4.58 $\pm$ 2.22
模型	10	10.94 $\pm$ 6.91 *	40.98 $\pm$ 15.37 **	61.04 $\pm$ 10.55 **▲
激素	10	18.27 $\pm$ 16.65	19.96 $\pm$ 5.32 Δ	12.49 $\pm$ 7.35 $\Delta\Delta\Delta$
中药	10	14.82 $\pm$ 4.15	25.24 $\pm$ 18.93	22.12 $\pm$ 14.68 Δ
中药加激素	10	11.70 $\pm$ 6.29	25.21 $\pm$ 19.24 Δ	18.27 $\pm$ 4.67 $\Delta\Delta\Delta$

注:与正常组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与本组 21 天比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

2 各组血清 TRACP、OPG、RANKL 及 BGP 表达比较(表 3) 与本组 21 天比较,激素组 TRACP、RANKL 均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,第 21、35 天,激素组 TRACP、RANKL 均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), OPG、BGP 均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与中药组同期比较,激素组、中药加激素组 OPG 均降低, RANKL 均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);且激素组 TRACP 升高,BGP 降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与激素组同期比较,中药加激素组 OPG、BGP 升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),RANKL 降低($P < 0.01$);第 35 天,TRACP 降低($P < 0.01$)。

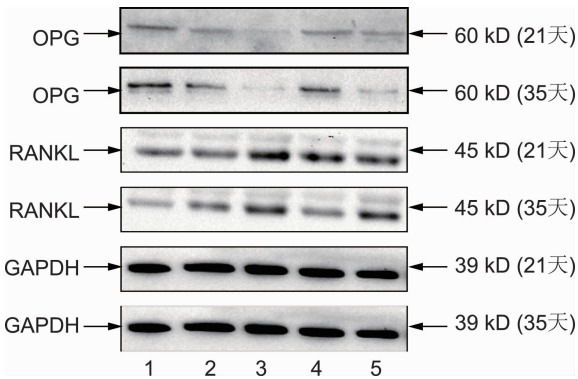
3 各组骨组织 OPG、RANKL mRNA 表达比较(表 4) 与正常组比较,模型组第 21 天 OPG、RANKL mRNA 升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),第 35 天 OPG、RANKL mRNA 降低($P < 0.01$)。与中药组同期比较,激素组 OPG mRNA 降低($P < 0.01$),RANKL mRNA

升高($P < 0.05$);中药加激素组 OPG mRNA 降低($P < 0.05$)。

4 各组骨组织 OPG、RANKL 蛋白的相对表达比较(图 1~3) 与本组 21 天比较,激素组 OPG 降低($P < 0.05$),RANKL 升高($P < 0.05$),中药加激素

表 4 各组骨组织 OPG、RANKL mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	时间	OPG mRNA	RANKL mRNA
正常	10	21 天	1.00	1.00
		35 天	1.00	1.00
模型	10	21 天	1.02 $\pm$ 0.26 *	1.03 $\pm$ 0.03 **
		35 天	0.97 $\pm$ 0.26 **	0.95 $\pm$ 0.13 **
中药	10	21 天	1.18 $\pm$ 0.24	0.79 $\pm$ 0.22
		35 天	1.14 $\pm$ 0.23	0.81 $\pm$ 0.13
激素	10	21 天	0.60 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta$	1.29 $\pm$ 0.22 Δ
		35 天	0.35 $\pm$ 0.23 $\Delta\Delta$	1.35 $\pm$ 0.15 Δ
中药加激素	10	21 天	0.79 $\pm$ 0.24 Δ	1.06 $\pm$ 0.17
		35 天	0.82 $\pm$ 0.22 Δ	1.12 $\pm$ 0.11

注:与正常组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与中药组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

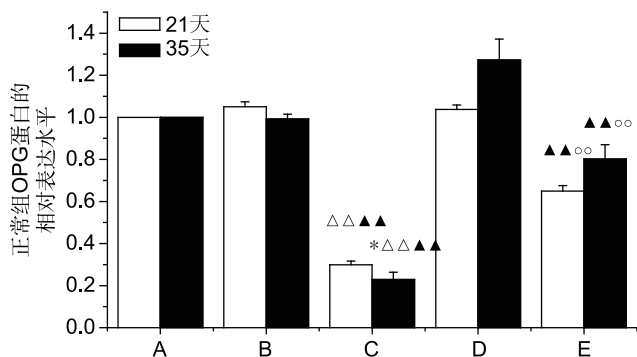


注:1 为正常组;2 为模型组;3 为激素组;4 为中药组;5 为中药加激素组

图 1 各组骨组织 21、35 天 OPG、RANKL 蛋白表达电泳图

表 3 各组血清 TRACP、OPG、RANKL 及 BGP 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)						
组别	n	时间	TRACP (pg/mL)	OPG (ng/mL)	RANKL (pg/mL)	BGP (ng/mL)
正常	10	21 天	3.00 $\pm$ 0.16	1.21 $\pm$ 0.43	19.22 $\pm$ 1.02	5.05 $\pm$ 0.27
		35 天	2.96 $\pm$ 0.19	1.33 $\pm$ 0.59	18.74 $\pm$ 3.03	4.67 $\pm$ 0.06
模型	10	21 天	2.93 $\pm$ 0.26	1.28 $\pm$ 0.45	21.27 $\pm$ 2.63	4.90 $\pm$ 0.19
		35 天	2.93 $\pm$ 0.16	1.24 $\pm$ 0.49	21.58 $\pm$ 2.18	4.80 $\pm$ 0.19
中药	10	21 天	2.98 $\pm$ 0.26	2.71 $\pm$ 0.80	19.15 $\pm$ 3.53	4.94 $\pm$ 0.34
		35 天	2.92 $\pm$ 0.22	2.88 $\pm$ 0.60	19.46 $\pm$ 3.72	5.11 $\pm$ 0.20
激素	10	21 天	3.79 $\pm$ 0.20 $\Delta\Delta$	0.71 $\pm$ 0.17 $\Delta\Delta\Delta$	52.65 $\pm$ 3.58 $\Delta\Delta\Delta$	4.02 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$
		35 天	4.57 $\pm$ 0.25 ** $\Delta\Delta\Delta$	0.65 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta\Delta$	66.90 $\pm$ 5.55 * $\Delta\Delta\Delta$	3.39 $\pm$ 0.20 $\Delta\Delta\Delta$
中药加激素	10	21 天	3.42 $\pm$ 0.55	1.60 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta\Delta$	41.53 $\pm$ 5.97 $\Delta\Delta\Delta$	4.68 $\pm$ 0.13 $\Delta\Delta$
		35 天	3.19 $\pm$ 0.35 $\Delta\Delta$	1.74 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta\Delta$	38.46 $\pm$ 5.05 $\Delta\Delta\Delta$	4.70 $\pm$ 0.35 $\Delta\Delta$

注:与本组 21 天比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与中药组同期比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与激素组同期比较,○ $P < 0.05$,○○ $P < 0.01$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为激素组;D 为中药组;E 为中药加激素组;与本组 21 天比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与中药组同期比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与激素组同期比较, $\circ P < 0.05$, $\circ\circ P < 0.01$;下图同

图2 各组骨组织 OPG 蛋白的相对表达水平比较

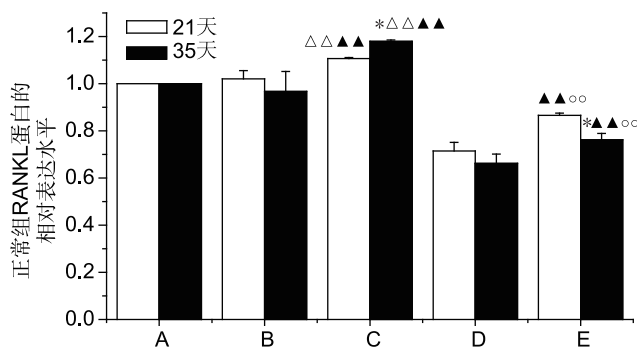


图3 各组骨组织 RANKL 蛋白的相对表达水平比较

组 RANKL 降低($P < 0.05$)。与模型组同期比较,激素组 OPG 降低($P < 0.01$),RANKL 升高($P < 0.01$)。与中药组同期比较,激素组、中药加激素组 OPG 均降低($P < 0.01$),RANKL 均升高($P < 0.01$);与激素组同期比较,中药加激素组 OPG 均升高($P < 0.01$),RANKL 均降低($P < 0.01$)。

讨 论

OPG/RANKL/RANK 系统是破骨细胞分化过程中的一个重要信号传导通路,RANKL 的受体有位于破骨细胞膜上的核激活因子受体(RANK)和其假性受体 OPG^[5]。OPG 和 RANKL 均由成骨细胞产生,RANKL 与 RANK 发生相互作用从而诱导破骨细胞祖细胞的破骨细胞分化^[6];OPG 是一个分泌型的肿瘤坏死因子受体家族受体,它能直接与成骨细胞/基质细胞表面的 RANKL 结合,竞争性抑制 RANKL 介导的破骨细胞分化^[5],OPG 的过表达促进前成骨细胞向成熟的成骨细胞分化^[7]。因此,OPG、RANK 和 RANKL 三者共同构成了成骨细胞和破骨细胞之间的

联系,生理上保持着骨代谢平衡。BGP 由成骨细胞合成分泌,是骨组织中非胶原性蛋白的主要成分,是反映成骨细胞的活性特异性蛋白^[8]。TRACP 主要来源于破骨细胞,是监测破骨细胞活性的特异性指标^[9]。

本实验中,大鼠造模 7 天后开始出现尿蛋白,第 21、35 天模型组尿蛋白明显升高($P < 0.05$),激素组、中药组以及中药加激素组均较模型组低,其中激素组最为明显($P < 0.01$)。那么这些不同的治疗对骨代谢又起着怎样的影响呢?笔者在实验中同时也发现激素组血清 TRACP、RANKL 增多、OPG、BGP 减少,骨组织 OPG、OPG mRNA 减少,RANKL、RANKL mRNA 增多,OPG/RANKL 的降低,表明激素组破骨细胞分化占优势,起抑制成骨细胞分化和促进破骨细胞生成作用。而中药组和中药加激素组血清 OPG、BGP 表达均较激素组升高,TRACP、RANKL 减少,骨组织 OPG 蛋白及 mRNA 较激素组增多,RANKL 蛋白及 mRNA 的表达较激素组减少,OPG/RANKL 的增高,表明加味四君子汤能促进成骨细胞分化,从而加强成骨作用,抑制破骨细胞分化,在中药组和中药加激素组成骨细胞分化占优势。

中药组和中药加激素组血清 OPG、骨组织 OPG 蛋白及 mRNA 表达均高于激素组,血清 RANKL、骨组织 RANKL 蛋白及 mRNA 的表达均低于激素组,但中药加激素组在提高血清 OPG 方面低于中药组($P < 0.05$),在降低血清 RANKL 方面低于中药组($P < 0.01$)。在骨组织中,中药加激素组提高 OPG 蛋白及 mRNA、降低 RANKL 蛋白方面也都弱于中药组($P < 0.05$)。而激素组、中药组以及中药加激素组于第 35 天降蛋白尿无统计学意义。因此,单纯中药治疗需时较长,而中药加激素组在治疗蛋白尿和扭转泼尼松诱导的破骨作用方面可能具有更为重要的地位,这需要更进一步的研究。

四君子汤源自北宋《太平惠民和剂局方》,主治一切阳虚气弱,脾衰肺损。其在四君子汤基础上化裁出“加味四君子汤”,常用于治疗脾肾气虚型肾病^[2]。临床中我们发现脾肾气虚型肾病多伴有血瘀,故在方中加入活血化瘀药,全方以党参、白术、黄芪、山药补元气,实脾;山萸肉、金樱子、桑寄生补肾气、强筋骨;茯苓、薏苡仁、莲肉健脾渗湿;丹参、当归活血化瘀,补益与祛邪共用,以补为主,祛邪为辅,共收益肾健脾、活血化瘀之效,故对改善肾病有良好的效果。同时方中山药能增加小肠吸收功能,保证促进骨形成的营养物质充足;茯苓能“泻膀胱,益脾胃”,增强脾肾功能,加强对钙、锌等的吸收^[10];丹参作为能改善骨的脂质代谢和骨髓微循环的

药物,能够改善血清钙离子浓度、刺激大鼠成骨细胞分泌碱性磷酸酶,可对抗泼尼松对骨的生长抑制作用^[11]。且中医药在治疗骨质疏松上,不仅要补肾,同时亦要注重健脾,健脾药可间接促进肾脏对骨骼的作用^[12],且活血药可改善骨小梁内微循环,促进骨骼对营养物质的吸收,故本方对骨质疏松亦有治疗作用。

本实验结果表明,加味四君子汤不仅能明显降低蛋白尿,并能通过降低 RANKL 的表达来抑制破骨细胞活性,这种趋势被检测的血清 TRACP、BGP 的表达所验证。泼尼松虽能治疗肾病,同时会使骨组织和血清中的 OPG、BGP 的表达下降,RANKL、TRACP 的表达升高,从而抑制成骨细胞分化和促进破骨细胞生成,最终通过 OPG/RANKL/RANK 通路诱导骨质疏松。加味四君子汤以补脾肾,活血作用为主,在降蛋白尿的同时,可通过上述通路促进成骨细胞分化,抑制破骨细胞生成,从能明显扭转这一趋势来减缓泼尼松诱导的骨质疏松的形成。

参 考 文 献

- [1] 黄满玉,冯峰,朱太咏. 从肾与骨代谢的关系探讨中医“肾主骨”现代理论内涵[J]. 中国临床康复, 2005, 9(46): 127-129.
- [2] 叶黎青,鲁科达,马红珍,李学铭加味四君子汤治疗肾病经验[J]. 中华中医药学刊, 2011, 8(29): 1727-1728.
- [3] 支勇,曹式丽. 阿霉素肾病动物模型的国外研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 10(9): 933-935.
- [4] 吴文先,陈团营,刘霞,等. 肾综颗粒抗阿霉素肾病大鼠脂质过氧化损伤的实验研究[J]. 广西中医药, 2008, 31(5): 59-61.

- [5] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro* [J]. Endocrinology, 1998, 139(3): 1329-1337.
- [6] Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, et al. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease [J]. Trends Molec Med, 2009, 15(5): 208-216.
- [7] Yu H, de Vos P, Ren Y. Over-expression of osteoprotegerin promotes preosteoblast differentiation to mature osteoblasts [J]. Angle Orthod, 2011, 81(1): 100-106.
- [8] Podenphant J, Christianse C, Catherwood BD. Serum bone gla protein and other biochemical estimates of bone turnover in early postmenopausal women during prophylactic treatment for osteoporosis [J]. Alta Med Scand, 1985, 218(3): 329-333.
- [9] Chu P, Chao TY, Liu YF, et al. Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis [J]. Am J Kidney Dis, 2003, 41(5): 1052-1059.
- [10] 刘海叶,刘泽,邓伟民,等. 中医药治疗老年性骨质疏松[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(4): 500-502.
- [11] 邹丽宜,吴铁,崔燎,等. 丹参抑制泼尼松大鼠骨质丢失[J]. 中成药, 2006, 28(4): 537.
- [12] 孟晓东. 补肾健脾养胃法治疗骨质疏松症的临床观察[J]. 吉林中医药, 2004, 24(11): 29.

(收稿:2012-12-04 修回:2013-06-18)

《中国中西医结合杂志》再获百种中国杰出学术期刊

科技论文和专利的产出情况是测度科学技术发展水平的重要指标,中国科学技术信息研究所自 1987 年以来坚持每年向社会公布中国科技论文统计结果,每年的宏观统计结果编入国家统计局和国家科学技术部编制的《中国科技统计年鉴》,统计结果被科技管理部门和学术界广泛应用。

2012 年 12 月 7 日,中国科学技术信息研究所在北京国际会议中心召开中国科技论文统计结果发布会,并评选出“2011 年百种中国杰出学术期刊”。根据 2011 年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD 2011)统计结果,《中国中西医结合杂志》荣获 2011 年“百种中国杰出学术期刊”称号。

《中国中西医结合杂志》自 2003 年荣获“2002 年百种中国杰出学术期刊”称号以来,连续 10 年(2002—2011)均获得此荣誉,充分表明了我刊的影响力。同时,对广大中医及中西医结合工作者给予我刊的支持深表感谢,并希望在未来的日子里,积极给本刊赐稿或组稿,积极参加本刊的审稿工作,共同推进杂志影响力和竞争力的进一步提升。