

肾病综合征鼠骨代谢变化特点及芪归合剂对其的作用

蒋小云¹, 陈述枚¹, 黄绍良², 莫 樱¹, 赖 峰¹, 朱志红¹

(中山大学 1. 附属第一医院儿科, 广东 广州 510080; 2. 附属第二医院儿科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】探讨肾病综合征(NS)鼠骨代谢的变化特点及芪归合剂对其的作用。【方法】制备大鼠阿霉素 NS 模型, 设模型组、激素治疗组、芪归治疗组、激素芪归治疗组及正常对照组, 每组 8 只, 用药时间为 3 周。测量各组尿蛋白、生化指标和右股骨长度; 用 Hologic QDR-2000+DEXA 行股骨全段骨密度(BMD)测定; 以放射免疫法测定血清骨钙素(OC)、I 型前胶原氨基端伸展肽(PINP)、I 型胶原羧基端关联肽原(ICTP)水平。【结果】模型组股骨长度(3.35±0.09)cm, 低于正常组(3.53±0.11)cm (P<0.05); 芪归治疗组(3.46±0.09)cm, 高于模型组(P<0.05); 激素芪归组(3.28±0.07)cm, 高于激素治疗组(3.16±0.11)cm (P<0.01); 激素治疗组低于模型组(P<0.05)。模型组股骨全段 BMD(0.1357±0.0137) g/cm², 低于正常组(0.1599±0.0101) g/cm² (P<0.01); 激素治疗组(0.1208±0.0123) g/cm², 低于模型组(P<0.05)。模型组血 OC(16.31±3.87) μg/L 和 PINP(2.02±0.51) μg/L 水平, 低于正常组, 分别(31.49±4.16) μg/L、(3.58±0.46) μg/L (P<0.01); 芪归治疗组血 OC(25.90±8.26) μg/L 和 PINP(3.42±1.07) μg/L 水平, 高于模型组(分别 P<0.05 和 P<0.01); 激素芪归组血 OC(12.01±1.97) μg/L 和 PINP(2.47±0.88) μg/L 水平, 高于激素治疗组, 分别(6.12±3.26) μg/L、(1.63±0.74) μg/L (P<0.05); 激素治疗组低于模型组(P<0.05)。激素治疗组的 ICTP(10.15±3.77) μg/L 高于模型组(8.71±3.29) μg/L (P<0.05)。【结论】NS 鼠存在骨代谢的异常, 激素治疗使骨代谢异常进一步加剧, 而芪归合剂治疗对其有改善作用。

关键词: 肾病综合征; 骨代谢; 黄芪; 当归

中图分类号: R692

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0067-05

Change of Bone Metabolism in Rats with Nephrotic Syndrome and the Role of Astragalus and Angelica Mixture

JIANG Xiao-yun¹, CHEN Shu-mei¹, HUANG Shao-liang², MO Ying¹, LAI Feng¹, ZHU Zhi-hong¹

(1. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate the change of bone metabolism in rats with nephrotic syndrome (NS) and the role of Astragalus and Angelica mixture (A&A).【Methods】Forty male SD rats (six weeks old) were randomly divided into five groups: control group, NS model group, NS group treated with A&A, NS group treated with dexamethasone (Dex), NS group treated with A&A and Dex. Urine protein, serum biochemical levels and the femur length were measured. The bone mineral density (BMD) of whole part of femur was measured by Hologic ODR-2000+DEXA. Serum osteocalcin (OC), aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) and carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) levels were assayed by radioimmunoassay technique.【Results】The length of femur of NS group treated with A&A and NS group treated with A&A and Dex were higher than those in NS model group and NS group treated with Dex, respectively (P<0.05 and P<0.05). The length of femur of NS group treated with Dex was lower than that of NS model group (P<0.05). The length of femur of NS model group was lower than that of control group (P<0.05). The BMD of femur in NS model group was lower than that of control group (P<0.01). The serum levels of OC and PINP in NS model group were lower than those in control group (P<0.01). The serum levels of OC and PINP in NS group treated with A&A and NS group treated with A&A and Dex were higher than those in NS model group and NS group treated with Dex, respectively (P<0.05 and P<0.01,

收稿日期: 2005-06-20

基金项目: 广东省卫生厅科研基金资助项目(A2003168); 广东省自然科学基金博士启动基金资助项目(04300346)

作者简介: 蒋小云(1966-), 女, 安徽霍丘人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事小儿肾脏病临床和实验研究. E-mail: xyjiang-

3208@163.com

respectively). The serum levels of OC and PINP in NS group treated with Dex were lower than those in NS model group ($P < 0.05$). The serum levels of ICTP in NS group treated with Dex were higher than that of NS model group ($P < 0.05$).【Conclusion】The abnormality of bone metabolism exists in nephrotic rats. Dexamethasone treatment can aggravate this abnormality, which can be improved by Astragalus and Angelica mixture.

Key words: nephrotic syndrome; bone metabolism; astragalus; angelica

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):67-71]

肾病综合征(NS)时由于其病理生理改变、钙、维生素D代谢异常及糖皮质激素(glucocorticoid, GC)治疗可致骨代谢紊乱,表现为骨生长障碍、骨密度降低、骨质疏松症等。本研究通过检测NS鼠股骨长度、骨密度(bone mineral density, BMD)、代表骨形成的骨生化标志骨钙素(osteocalcin, OC)和I型前胶原氨基端伸展肽(aminoterminal propeptide of type I procollagen, PINP)及代表骨吸收的骨生化标志I型胶原羧基端关联肽原(carboxyterminal telopeptide of type I collagen, ICTP),观察了NS鼠骨代谢改变的特点,并发现中药芪归合剂对NS鼠骨代谢改变起改善作用,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

盐酸阿霉素(ADR)为深圳万乐药业有限公司制造(日本美露香株式会社监制)批号:922001。黄芪、当归:购自广州市药材公司中药饮片厂。OC试剂盒购自中国原子能科学研究院(北京)。PINP和ICTP试剂盒:购自芬兰Orion公司。6周龄雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体质量160~180 g,两次尿蛋白定性试验(试纸条法)阴性,由中山大学中山医学院实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 芪归合剂的制备 将生药黄芪、当归碾碎,浸水1 h,煮沸再用文火煎40 min,过滤后的药渣再次加文火煎,重复3次,合并煎煮液,在水浴中浓缩,使终浓度相当于每3 mL各含生药2 g^[1,2]。

1.2.2 NS模型的制备和分组 雄性6周龄SD大鼠40只,体质量160~180 g,随机分为正常对照组、NS模型组、NS芪归治疗组、NS激素治疗组、NS激素芪归5个组,每组均为8只鼠。在整个实验过程中,所有大鼠均被饲养在白天12 h、黑夜12 h、温度21~22℃、湿度50%~70%的标准环境中,均自由食用我院实验动物中心自产的全价颗粒饲料和自来水。经适应性饲养3 d后,正常对

照组尾静脉1次注射相等容量的生理盐水,其余4组尾静脉1次注射ADR 7 mg/kg。在预实验中通过尿蛋白定性、定量检查,血生化指标白蛋白(Alb)、胆固醇(Chd)、肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)和肾组织光镜、电镜检查,证实此阿霉素NS模型制备成功^[3]。

1.2.3 给药方法及标本留取 注ADR后第2周,鼠尿蛋白定性阳性时开始灌服用药,剂量为3 mL/只,每天1次,共3周(21 d)。正常组和模型组灌服蒸馏水;激素治疗组灌服溶有地塞米松(Dex)的蒸馏水,Dex用量为每鼠0.9 mg·kg⁻¹·d⁻¹;芪归治疗组灌服芪归合剂;激素芪归治疗组,灌服溶有Dex的芪归合剂,Dex用量同激素治疗组。于实验初和各周末将鼠置代谢笼留取24 h尿量,行尿蛋白检查。实验第4周末在10%(100 g/L)苯巴比妥钠50 mg/kg麻醉下腹主动脉取血,分离血清,行骨生化标志检查。完整取出右侧股骨,剥离肌肉和软组织,量长及测定BMD。

1.2.4 检测指标和方法 尿蛋白定性用试纸条法;24 h尿蛋白定量用磺基水杨酸比浊法;血清生化指标用多功能全生化分析仪测定;测量股骨长度由同一人、用同一测量工具测量;BMD测定用Hologic QDR-2000+DEXA行股骨全段的BMD检测;血清OC浓度测定用放射免疫法,实验操作:编号总计数(T)、非特异结合管(NSB)、各标准、各样品试管;加200 μL温育液于NBS管中,100 μL温育液于零标准管中,100 μL OC标准于其余各标准管中,加100 μL样品于相应试管中;所有试管中加入100 μL¹²⁵I-OC;除T管和NBS管外,向其余各试管中加入100 μL OC抗体,充分摇匀,室温放置15 min,除T管外,向各管加入500 μL分离剂,3 000 r/min($r=15.5$ cm)离心15 min,倒出上清液,并在吸水纸上吸干管口残液,在计数器上计数1 min,使用微机RIA处理程序计算结果,批内变异系数CV% 5.0%;血清PINP浓度测定放射免疫法,实验操作同血OC测定,批内CV% 10%;血清ICTP浓度测定放射免疫法,

实验操作同血 OC 测定, 批内 CV% 6%。

1.2.5 统计学分析 所有数据均应用 SPSS FOR Window 10.0 软件在计算机上运算。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组均数比较采用 One-Way ANOVA 分析, 两组均数的比较采用 LSD 法, 相关分析用 Spearman 法。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血生化结果和 24 h 尿蛋白定量

实验末模型组 Alb、Chol、尿蛋白定量均低于正常组 (P < 0.01); 激素治疗和激素芪归组的尿蛋白定量低于模型组 (P < 0.01); 芪归治疗、激素治

表 1 各组血生化结果和 24 h 尿蛋白定量

Table 1 The serum biochemical levels and quantitative analysis of 24 h urine protein among different groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Alb(g/L)	Chd(mmol/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μ mol/L)	24 h urine protein (mg/24 h)
Control	8	33.2 \pm 2.3	1.5 \pm 0.2	8.6 \pm 0.7	36.8 \pm 7.3	7.5 \pm 5.9
NS model	8	20.4 \pm 4.6 ¹⁾	7.1 \pm 3.9 ¹⁾	8.4 \pm 0.2	38.8 \pm 7.8	236.6 \pm 19.8 ¹⁾
NS group treated with Dex	8	27.6 \pm 3.6 ²⁾	2.7 \pm 2.1 ³⁾	8.3 \pm 1.5	33.2 \pm 2.8	41.2 \pm 15.1 ^{1), 3)}
NS group treated with A&A	8	26.6 \pm 2.3 ²⁾	2.6 \pm 1.4 ³⁾	8.7 \pm 0.7	35.2 \pm 3.2	209.6 \pm 9.5 ¹⁾
NS group treated with A&A and Dex	8	30.8 \pm 4.2 ^{2), 4)}	2.6 \pm 2.6 ³⁾	9.1 \pm 0.8	38.0 \pm 2.1	32.1 \pm 9.5 ^{1), 3)}
F		12.33	3.85	0.94	0.99	343.40
P		0.00	0.04	0.49	0.46	0.00

Alb: albumin; BUN: blood Urea nitrogen; Chd: cholesterin; Cr: creatinine. 1) Compared with the control group, P < 0.01; Compared with the NS model group, 2) P < 0.05, 3) P < 0.01; 4) Compared with the NS group treated with Dex, P < 0.05

疗和激素芪归组的 Alb 高于模型组 (P < 0.05), Chol 和低于模型组 (P < 0.01); 激素芪归组的 Alb 高于激素组 (P < 0.05) (表 1)。

2.2 股骨长度和股骨全段 BMD

模型组股骨长度低于正常组 (P < 0.05), 芪归治疗组高于模型组 (P < 0.05), 激素芪归组高于激

素治疗组 (P < 0.01), 激素治疗组低于模型组 (P < 0.05)。模型组股骨全段 BMD 低于正常组 (P < 0.01); 激素治疗组低于模型组 (P < 0.05); 芪归治疗组虽高于模型组, 激素芪归组虽高于激素组, 但差别无统计学意义 (P > 0.05) (表 2)。

表 2 各组股骨长度和股骨全段骨密度

Table 2 The length and Bone mineral density of femur among different groups ($\bar{x} \pm s$)

	n	Length of femur (cm)	BMD(g/cm ²)
Control group	8	3.53 \pm 0.11	0.1599 \pm 0.0101
NS model group	8	3.35 \pm 0.09 ¹⁾	0.135 \pm 0.0137 ²⁾
NS group treated with Dex group	8	3.16 \pm 0.11 ³⁾	0.1208 \pm 0.0123 ³⁾
NS group treated with A&A group	8	3.46 \pm 0.09 ³⁾	0.1430 \pm 0.0114
NS group treated with A&A and Dex group	8	3.28 \pm 0.07 ⁴⁾	0.1345 \pm 0.0073
F		11.26	7.32
P		0.00	0.00

Compared with the control group, 1) P < 0.05, 2) P < 0.01; 3) Compared with the NS model group, P < 0.05; 4) Compared with the NS group treated with Dex, P < 0.01

2.3 血清骨生化标志 OC、PINP、ICTP 水平

模型组血 OC 和 PINP 水平低于正常组 (P < 0.01); 芪归治疗组高于模型组 (分别 P < 0.05 和 P < 0.01); 激素芪归组高于激素组 (P < 0.05); 激素

组低于模型组 (P < 0.05)。正常组血 ICTP 水平与模型组比较、模型组与芪归治疗组比较、激素组与激素芪归组比较, 差别无统计学意义 (P > 0.05); 激素治疗组的 ICTP 水平高于模型组 (P < 0.05) (表 3)。

2.4 相关分析

0.553, $P < 0.05$ 。B 组股骨长度与血 PINP 水平正相关, $r =$

表 3 各组血清 OC、PINP、ICTP 水平

Table 3 The serum levels of OC, PINP, and ICTP among different groups

($\bar{x} \pm s$)

	n	OC($\mu\text{g/L}$)	PINP($\mu\text{g/L}$)	ICTP($\mu\text{g/L}$)
Control group	8	31.49 \pm 4.16	3.58 \pm 0.46	8.97 \pm 3.22
NS model group	8	16.31 \pm 3.87 ¹⁾	2.02 \pm 0.51 ¹⁾	8.71 \pm 3.29
NS group treated with Dex group	8	6.12 \pm 3.26 ²⁾	1.63 \pm 0.74 ²⁾	10.15 \pm 3.77 ²⁾
NS group treated with A&A group	8	25.90 \pm 8.26 ²⁾	3.42 \pm 1.07 ³⁾	8.04 \pm 2.30
NS group treated with A&A and Dex group	8	12.01 \pm 1.97 ⁴⁾	2.47 \pm 0.88 ⁴⁾	10.24 \pm 3.87
F		7.34	6.50	0.57
P		0.00	0.00	0.73

OC: osteocalcin; PINP: aminoterminal propeptide of type I procollagen; ICTP: carboxyterminal telopeptide of type I collagen. Compared with the control group, 1) $P < 0.01$; Compared with the NS model group, 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$; Compared with the NS group treated with Dex, 4) $P < 0.05$

3 讨论

3.1 NS 骨代谢变化的特点

骨代谢变化即指反映骨细胞、成骨细胞和破骨细胞的活性变化及骨基质、骨矿物质的代谢变化,在临床上常用的指标为骨长、骨密度和骨生化标志。早在 1954 年 Emerson 和 Bechman 就提出,NS 发病一个月可见到骨脱钙改变,相继有人报告 40%~60% NS 患儿或 NS 鼠 BMD 低于正常对照组,且与病程有关^[4,5]。本文也观察到 NS 鼠股骨全段 BMD 低于正常鼠,支持上述观点。骨生化标志是与骨胶原纤维特异代谢有关的物质,在骨转换过程中释放入血和/或从尿中排出,可反映骨形成或骨吸收。目前反映骨形成常用的新指标有 OC 和 PINP,反映骨吸收常用的新指标有 ICTP。而在 NS 时,国内外有关 PINP、ICTP 变化的报道甚少。本文观察到 NS 鼠血 OC、PINP 水平低于正常鼠,提示 NS 鼠存在骨形成减少。因 NS 鼠股骨长与 PINP 成正相关,提示 PINP 反映骨形成可能较 OC 敏感。NS 鼠血 ICTP 与正常鼠相似,提示 NS 鼠本身不存在骨吸收的改变,这与国内报告以尿脱氧吡啶啉及羟脯氨酸改变来观察 NS 患儿骨吸收功能状况所得的结果一致^[6]。

3.2 GC 治疗对 NS 鼠骨代谢的影响

80%~90% GC 治疗的 NS 患者有不同程度的骨矿物质丢失,30%~50% 发生骨质疏松,且在激素治疗 1 个月就有骨矿化障碍及骨吸收增加的表

现,尤以儿童更为突出^[7]。本文也观察到 GC 治疗的 NS 鼠股骨 BMD 和血 OC 和 PINP 进一步降低,而 ICTP 升高,提示 GC 可明显抑制骨形成,促进骨吸收,使骨密度减少。已证实,在成骨细胞表面存在 GC 受体,GC 可与其特异结合而抑制成骨细胞的功能,减少新骨形成,同时,GC 还能直接作用于骨基质,使 I 型骨胶原和骨钙素基因表达减少,蛋白质合成受抑制^[8]。GC 亦可影响破骨细胞的功能,导致骨吸收增加。

3.3 芪归合剂对 NS 鼠骨代谢的影响

为减轻 GC 对骨代谢的副作用,临床上多采取缩短激素疗程、减少用量、采用隔日晨顿服等方法。但这些方法常使 NS 患儿易于复发和/或不易缓解。骨吸收抑制剂如雌激素、降钙素等,骨形成促进剂如氟、酮化类激素等和新的骨代谢促进因子如生长激素(GH)、促甲状旁腺素(PTH)等,均因远期疗效、毒副作用等使其在儿科的应用受到限制。目前国内外尚缺乏适合儿童应用的、能改善 NS 骨代谢的理想药物。本研究用芪归合剂治疗的 NS 鼠股骨长、血 OC、PINP 水平较 NS 鼠增加,而二者的 ICTP 水平相似,提示芪归合剂可改善 NS 鼠的生长障碍,促进骨形成而对骨吸收无影响。激素芪归合剂治疗的 NS 鼠股骨长、血 OC、PINP 浓度明显较激素治疗组增加,提示芪归合剂可部分代偿 GC 对骨生长和骨形成抑制的副作用。芪归合剂之所以有这样的效果,我们推测与其能上调 NS 鼠肝 IGF-1、IGFBP-3 mRNA 表达,使血中 IGF-1、IGFBP-3 水平升高有关^[1]。因 IGF-1 与骨的

生长密切相关,是骨生成的强刺激因子,而IGFBP-3可加强IGF-1的作用。芪归合剂治疗的NS鼠和激素芪归合剂治疗的NS鼠的BMD均有升高,分别与NS鼠和激素治疗的NS鼠相比,虽未达统计学意义,考虑可能与治疗、观察时间短有关。有作者提出,用BMD测量的方法来确定某种药物是否有效,至少要用两年的时间,而检测血或尿中的一些骨生化标志,如果药物有效,在3-6个月内、甚至几周内这些指标就会发生变化^[9]。本试验用芪归合剂后血OC、PINP的变化比BMD的改变更明显,提示我们如果在临床上应用此合剂,可通过检测这些骨生化标志而早期了解药物的疗效并指导剂量的调整。

参考文献:

- [1] 蒋小云,陈述枚,林穗珍,等. 芪归合剂促进肾病综合征鼠肝IGF-1、IGFBP-3表达的研究[J]. 中华儿科杂志,2001,39(9):550-553.
- [2] 蒋小云,陈述枚,黄绍良,等. 芪归合剂对体外培养的大鼠成骨细胞生物学特性的影响[J]. 中山大学学报:医学科学版,2003,24(2):117-120,135.
- [3] BERTANI T, POGGI A, POZZONI R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rat:sequence

- of pathologic events[J]. Lab Invest,1982,46(1):16-23.
- [4] NISHIOKA T, KURAYAMA H, YASUDA T, et al. Nasal administration of salmon calcitonin for prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis in children with nephrosis[J]. J Pediatr,1991,118(5):703-707.
- [5] SIERRA R I, SPECKER B L, JIMENEZ F, et al. Biochemical bone markers,bone mineral content,and bone mineral density in rats with experimental nephrotic syndrome[J]. Ren Fail, 1997,19(3):409-424.
- [6] 窦志艳,张会丰,田秀巧,等. 用尿脱氧吡啶啉及羟脯氨酸排泄率评价肾病综合征患儿骨吸收功能状况[J]. 中华儿科杂志,2001,39(1):28-30.
- [7] LETTGEN B, JEKEN C, REINERS C. Influence of steroid medication on bone mineral density in children with nephrotic syndrome [J]. Pediatr Nephrol, 1994,8(6):667-670.
- [8] KIM C H, CHENG S L, KIM G S, et al. Effect of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoids-induced bone loss[J]. J Endocrinol,1999, 162(2):371-379.
- [9] 葛雪琳. 骨转换生化标志与骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志,1999,5(2):85-88.

(编辑 张恩健)

(上接第 66 页 from page 66)

参考文献:

- [1] AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI D. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997,3(8):917-921.
- [2] RATHMELL J C, THOMPSON C B. Pathway of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease [J]. Cell, 2002, 109, Suppl: S97-107.
- [3] TEMME A, DIESTELKOETTER-BACHERT P, SCHMITZ M, et al. Increased p21 (ras) activity in human fibroblasts transduced with survivin enhances cell proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(3):765-773.
- [4] MA X, WANG S, ZHOU J, et al. Induction of apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells by antisurvivin oligonucleotides[J]. Oncol Rep, 2005, 14(1):275-279.
- [5] STUCKI J W, SIMON H U. Mathematical modeling of

- the regulation of caspase-3 activation and degradation [J]. J Theor Biol, 2005, 234(1):123-131.
- [6] YANG D, WELM A, BISHOP J M. Cell division and cell survival in the absence of surviving[J]. PNAS, 2004, 101(42):15100-15105.
- [7] SONG J, SO T, CHENG M, et al. Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion[J]. Immunity, 2005, 22(5):621-631.
- [8] KANIA J, KONTUREK S J, MARLICZ K, et al. Expression of survivin and caspase 3 in gastric cancer [J]. Disge Dise and Sci, 2003, 48(2):266-271.
- [9] SALZ W, EISENBERG D, PLESCIA J, et al. A survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior [J]. Cancer Res, 2005, 65(9):3531-3534.

(编辑 黄小延)