

本文引用: 蒋佳豪, 彭兴宁, 吴官保, 谭婉俊, 冯帅华. 基于 Klotho、PI3K、Akt 蛋白表达水平探讨补肾活血汤对绝经后骨质疏松大鼠骨骼、血管及肾脏功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(1): 9-15.

基于 Klotho、PI3K、Akt 蛋白表达水平探讨补肾活血汤对绝经后骨质疏松大鼠骨骼、血管及肾脏功能的影响

蒋佳豪¹, 彭兴宁^{2,3}, 吴官保², 谭婉俊^{2,3}, 冯帅华^{2*}

1. 昆山市第一人民医院, 江苏 苏州 215300; 2. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006;

3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 通过观察补肾活血汤对去势大鼠股骨近端、主动脉外膜及肾小管中可罗索(Klotho)蛋白, 大鼠股骨近端磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)蛋白及蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)表达水平的影响, 探讨补肾活血汤治疗绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)的作用机制。**方法** 选取 6 月龄 SD 雌性大鼠 31 只, 第 1 次随机分为空白组 8 只、假手术组 5 只、手术组 18 只, 手术造模 8 周后随机处死空白组和手术组大鼠各 3 只, 评估造模成功后, 手术组按随机数字表法第 2 次分组: 模型组 5 只、补肾活血汤组 5 只、戊酸雌二醇组 5 只。然后分组给药: 空白组、假手术组及模型组予以蒸馏水灌胃, 补肾活血汤组予补肾活血汤 3.32 mg/kg 灌胃, 戊酸雌二醇组予戊酸雌二醇 0.1 mg/kg 灌胃, 连续给药 8 周。观察大鼠的一般情况; 分光光度法测定血清钙含量; 偶联反应法测定血清磷含量; 骨密度扫描仪测量股骨近端的骨密度; 电镜观察股骨近端的骨细胞; HE 染色观察大鼠股骨近端的病理变化; ELISA 法检测大鼠股骨近端、主动脉外膜及肾小管中 Klotho 蛋白的水平; Western blot 检测大鼠股骨近端中 Klotho、PI3K 及 Akt 蛋白的相对表达水平。**结果** 与模型组比较, 补肾活血汤组和戊酸雌二醇组大鼠的平均体质量较重、活力较好, 饮食及毛发情况未见明显差异。与模型组比较, 补肾活血汤组和戊酸雌二醇组大鼠股骨近端细胞、骨小管形态数量均有不同程度恢复, 股骨近端骨组织骨质疏松病变均得到不同程度的修复。与空白组、假手术组比较, 模型组、补肾活血汤组血清钙含量降低($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组比较, 戊酸雌二醇组血清钙含量增加($P<0.05$)。与空白组、假手术组比较, 模型组骨密度明显降低($P<0.01$); 股骨近端、主动脉外膜及肾小管中 Klotho 蛋白含量明显减少($P<0.01$); 骨组织中 Klotho 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$), PI3K、Akt 蛋白表达水平显著增加($P<0.01$)。与模型组比较, 补肾活血汤组、戊酸雌二醇组股骨近端、主动脉外膜及肾小管中 Klotho 蛋白含量明显增加($P<0.01$); 骨组织中 Klotho 蛋白表达水平显著增加($P<0.01$), PI3K、Akt 蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与补肾活血汤组比较, 戊酸雌二醇组股骨近端及肾小管中 Klotho 蛋白含量增加($P<0.05$, $P<0.01$), 骨组织中 PI3K、Akt 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。各组大鼠血清磷含量比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 补肾活血汤可通过提高股骨近端、主动脉外膜及肾小管中 Klotho 蛋白的表达, 抑制股骨近端中 PI3K 蛋白、Akt 蛋白的表达, 一定程度上缓解去势大鼠的骨质疏松样病变, 其作用机制可能与抑制骨细胞凋亡、改善肾脏功能及循环系统功能相关。

[关键词] 补肾活血汤; 绝经后骨质疏松症; 可罗索蛋白; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B

[中图分类号] R274

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.01.002

Effects of Bushen Huoxue Decoction on skeletal, vascular, and renal functions in postmenopausal osteoporosis rats based on protein expressions of Klotho, PI3K, and Akt

JIANG Jiahao¹, PENG Xingning^{2,3}, WU Guanbao², TAN Wanjun^{2,3}, FENG Shuaihua^{2*}

1. The First People's Hospital of Kunshan, Suzhou, Jiangsu 215300, China; 2. The Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[收稿日期] 2023-06-20

[基金项目] 湖南中医药大学中医学双一流课题(2021ZYX07); 湖南省科技创新计划项目(2021SK51008); 湖南省中医药科研计划项目(B2023100)。

[通信作者] * 冯帅华, 男, 硕士, 副主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: yhywgb@126.com。

[Abstract] Objective To observe the effects of Bushen Huoxue Decoction (BSHXD) on the protein expression level of Klotho in the proximal femur, adventitia of aorta, and renal tubules as well as those of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt) in the proximal femur of ovariectomized rats, so as to explore the mechanism of action of BSHXD in treating postmenopausal osteoporosis (PMOP). **Methods** Thirty-one 6-month-old female SD rats were randomly divided into blank group ($n=8$), sham-operated group ($n=5$), and surgery group ($n=18$). After eight weeks of surgical modeling, three rats from blank group and another three from surgery group were randomly selected and sacrificed. After successful modeling, the remaining rats in the surgery group were subdivided into model group ($n=5$), BSHXD group ($n=5$), and estradiol valerate group ($n=5$) according to the random number table method. Then, blank, sham-operated, and model groups were given distilled water, BSHXD group was given BSHXD 3.32 mg/kg, and estradiol valerate group was given estradiol valerate 0.1 mg/kg. All groups were treated by gavage continuously for eight weeks. The general condition of rats was observed; the serum calcium content was measured by spectrophotometry; the serum phosphorus content was determined by coupled reaction method; bone mineral density of the proximal femur was measured by bone density scanner, and the bone cells were examined by electron microscopy. In addition, the pathological changes in the proximal femur were observed by HE staining; Klotho protein level in the proximal femur, aortic adventitia, and renal tubules was measured by ELISA; the relative expression levels of Klotho, PI3K, and Akt proteins in the proximal femur were checked by Western blot. **Results** Compared with model group, the rats in BSHXD and estradiol valerate groups showed higher average body weight and better vitality, and there was no significant difference in the condition of diet and hair; the number and form of bone cells and bone tubules in the proximal femur were restored to varying degrees, and the osteoporotic lesions were also repaired to different extent. Compared with blank and sham-operated groups, the serum calcium content of rats in model and BSHXD groups was lower ($P<0.01$, $P<0.05$); compared with model group, the serum calcium content of rats in estradiol valerate group was higher ($P<0.05$). Compared with blank and sham-operated groups, rats in model group showed a significant decrease in the bone mineral density ($P<0.01$), as well as in the Klotho protein content in the proximal femur, aortic adventitia, and renal tubules ($P<0.01$); the Klotho protein expression in the bone tissue was significantly reduced ($P<0.01$), while the protein expressions of PI3K and Akt were significantly elevated ($P<0.01$). Compared with model group, the Klotho protein content in the proximal femur, aortic adventitia, and renal tubules of rats in BSHXD and estradiol valerate groups increased ($P<0.01$); the Klotho protein expression in the bone tissue was significantly higher ($P<0.01$), while the protein expressions of PI3K and Akt were significantly lower ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with BSHXD group, the Klotho protein content in the proximal femur and renal tubules of rats in estradiol valerate group increased ($P<0.05$), while the protein expressions of PI3K and Akt in the bone tissue decreased ($P<0.05$). Moreover, there was no statistical difference in serum phosphorus content among the groups ($P>0.05$). **Conclusion** BSHXD can alleviate the osteoporosis-like lesions of ovariectomized rats to a certain extent by elevating the Klotho protein expression in the proximal femur, aortic adventitia, and renal tubules and inhibiting the protein expressions of PI3K and Akt in the proximal femur. And its mechanism of action may be related to inhibiting osteocyte apoptosis and improving renal function and circulatory system function.

[Keywords] Bushen Huoxue Decoction; postmenopausal osteoporosis; Klotho protein; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)的主要发病机制是围绝经期女性雌激素水平降低,导致破骨细胞吸收、骨丢失和骨折^[1]。PMOP是骨质疏松症(osteoporosis, OP)中占比最高的类型,全球老年人 OP 的患病率已高达 21.7%^[2]。由于骨质不断流失,OP 最严重的并发症骨质疏松性骨折发病率不断攀升^[2]。年龄增长作为骨质疏松最主要的危险因素,往往伴随各器官功能的衰退^[3]。因此,PMOP 的病程进展与器官功能的衰退密切相关。目前,治疗 OP 的药物有骨钙化剂、骨吸收抑制剂、骨形成促进剂等。靶向性药物可有效提高骨密度,但没有证据表明这些药物能够改善机体器官功能,且长期服用存在一定的副作用^[4]。中医学对 OP 具有独特的认识,针对 OP 的发病特点,形成了以补肾活血法为代表的

治疗方法和理论体系。补肾活血汤防治 PMOP 已广泛运用于临床,取得了较好的疗效^[5]。因此,本研究团队从补肾活血汤对可罗索(Klotho)蛋白、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)蛋白及蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)蛋白表达水平的影响方面研究其作用机制,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物选取 6 月龄 SD 雌性大鼠 31 只,由湖南省中医药研究院动物实验室提供,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。大鼠一般情况均良好,称重得体重(220±20) g。动物的饲养和试验方案遵守中国试验动物管理条例(卫生部第 55 号文件)和湖南中医药

大学动物实验伦理要求,伦理审批编号:ZYFY2023 0209-03。

1.2 实验药品制备

1.2.1 补肾活血汤中药溶液 参考《伤科大成·应用诸方篇》中记载的补肾活血汤组成^[6],按照现代临床常用剂量:熟地黄 15 g,杜仲 10 g,枸杞子 10 g,补骨脂 15 g,菟丝子 10 g,当归尾 10 g,没药 10 g,山茱萸 10 g,肉苁蓉 10 g,独活 10 g,红花 6 g。方中药材由湖南省中医药研究院附属医院药剂科提供,生产批号分别为:21070016、21040340、21040149、21050160、21035144、21070012、21075321、21050205、21040318、21050063、21060344。通过浸泡、煎煮、去渣,浓缩至 0.58 g/mL 的补肾活血汤中药溶液(临床等效剂量),封瓶备用。

1.2.2 戊酸雌二醇溶液 戊酸雌二醇(法国 DELPHARM Lille S.A.S公司,批号:H20160679)由湖南省中医药研究院附属医院药剂科提供,溶解于 50 ℃ 的纯净水中制成药物浓度 0.018 mg/mL 的戊酸雌二醇溶液(临床等效剂量),封瓶备用。

1.3 主要试剂及仪器

DDSA、NMA、DMP30(北京中镜科仪技术有限公司,批号:GS02827、GS02828、GS02823);Klotho(武汉华美生物工程有限公司,批号:CSB-E14958r);BCA 蛋白定量试剂盒(中国 Abiowell 公司,批号:AWB0104);TEMED(中国 Abiowell 公司,批号:AWB0068)。

透射电子显微镜(日本电子 JEOL,型号:JEM1400);切片仪(德国莱卡公司,型号:leica UC-7);电泳仪、转膜仪(中国北京六一公司,型号分别为:DYY-6C、DYCZ-40D);精密 pH 计(中国雷磁公司,型号:PHS-3C);生物样品均质仪(中国杭州奥盛公司,型号:BioPrep-24);显微镜(Motic 公司,型号:BA210T);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R)。

2 实验方法

2.1 动物分组

31 只 6 月龄 SD 雌性大鼠适应性喂养 3 d 后,称重排号按随机数字表第一次分组:空白组 8 只、假手术组 5 只、手术组 18 只,造模后第 8 周随机处死空白组和手术组大鼠各 3 只,评估造模成功后,手术组按随机数字表第二次分组:模型组 5 只、补肾活血

汤组 5 只、戊酸雌二醇组 5 只。

2.2 造模方法

参照陈沙的造模方法^[7],以卵巢切除术去势方法造模。具体操作:将约 1 mL 的 2%利多卡因注射液注入大鼠腹腔进行麻醉,取侧卧位固定头和四肢。术前严格消毒、备皮,术中全程注意无菌,在脊柱旁开约 1 cm 背部肋骨下缘作纵行切口,剥离肌肉夹起卵巢,用可吸收线结扎后摘除,术口采用皮内缝合,假手术组采用相同方法在卵巢周围剥除相同重量的脂肪组织。术后腹腔内连续注射 3 d 的青霉素 1 U,禁食不禁水 1 d。手术组大鼠造模当天大鼠均苏醒,3 d 后查看一般情况良好,切口均对位、愈合良好,喂养第 8 周随机处死空白组和手术组大鼠各 3 只,运用骨形态学方法,根据 HE 染色对比观察股骨近端骨组织形态,评估模型。与空白组比较,手术组大鼠 HE 染色显示股骨内骨小梁细短,间隙较大,可见结构断裂,连续性差且不完整,提示造模成功^[8]。详见图 1。

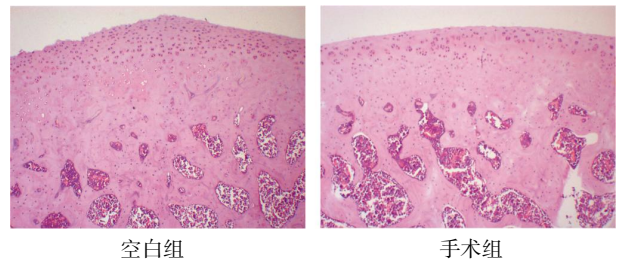


图 1 空白组及手术组大鼠股骨组织病理形态(HE, ×400)

2.3 给药方法

第 8 周起逐日给大鼠灌胃,共计 8 周。给药剂量按照人体和 SD 雌性大鼠体表面积比换算^[9]:补肾活血汤组予补肾活血汤 3.32 mg/kg 灌胃,戊酸雌二醇组予戊酸雌二醇 0.1 mg/kg 灌胃,空白组、假手术组、模型组予以等量蒸馏水灌胃。

2.4 观察指标

2.4.1 观察大鼠的一般情况 观察大鼠存活情况、活力、饮食、体质量及毛发。

2.4.2 测定血清中钙、磷含量 采用尾尖采血的方法取大鼠血液。分光光度法测定血清钙,邻-甲酚酞络合酮和偶氮砷Ⅲ作为染色剂,利用碱性溶液将样本中与蛋白质结合钙和复合钙释放出钙离子后与染色剂结合反应后测定。偶联反应法测定血清磷,参与反应的酶有糖原磷酸化酶、葡萄糖磷酸变位酶及葡萄

糖 6-磷酸脱氢酶,反应中使烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸还原成还原型辅酶 II,形成还原型辅酶 II 在 340 nm 波长下测定其吸光度。

2.4.3 骨密度扫描仪测量股骨近端的骨密度 腹腔注入 2%的利多卡因注射液麻醉后颈椎脱臼法处死大鼠,立即摘取右侧股骨,分离股骨近端骨组织,按相同方向排列在骨密度扫描仪探头下进行扫描。

2.4.4 电镜观察大鼠股骨近端的骨细胞 取大鼠股骨近端骨细胞置于孔径 2 nm 的载样铜网上,室温下静置 3 min,用滤纸从滤网侧边吸干液体,滴加 3% 磷钨酸溶液 30 μ L,室温环境下负染 5 min,在室温下干燥,于透射电镜下观察细胞结构形态并拍摄。

2.4.5 HE 染色检测大鼠股骨近端的形态病变 60 $^{\circ}$ C 烤片 12 h;切片脱蜡至水:先将切片置于二甲苯中 20 min,3 次。然后依次置于 100%、100%、95%、85% 和 75%乙醇中,每级放置 5 min。再用蒸馏水浸洗 5 min;苏木精染色 1~10 min,蒸馏水冲洗,PBS 返蓝;伊红染色 1~5 min,蒸馏水冲洗;梯度乙醇脱水,每级 5 min。取出后置于二甲苯 10 min,2 次,中性树胶封片,显微镜观察股骨近端的形态变化。

2.4.6 ELISA 检测大鼠股骨近端、主动脉外膜及肾小管中 Klotho 蛋白的水平 稀释 BSA 标准品;配制 BCA 工作液;定量检测:将稀释好的 BSA 标准品和待测蛋白样品各 25 μ L 分别加到做好标记的 96 孔板微孔中。每孔加入 200 μ L BCA 工作液,充分混匀,盖上 96 孔板盖,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,冷却至室温,须在 3~5 min 内完成检测。用酶标仪在 540~590 nm 范围内,测定每个样品及 BSA 标准品的吸光值,同时做好记录。绘制标准曲线,计算样品中的蛋白浓度。

2.4.7 Western blot 检测大鼠股骨近端中 Klotho 蛋白、PI3K 蛋白及 Akt 蛋白的表达水平 取股骨近端骨细胞按细胞蛋白提取试剂盒说明进行细胞蛋白提取,冰上孵育 20 min 后 12 000 r/min 离心 20 min(离心半径 6 cm),收集上清液,采用 BCA 法计算蛋白含量。将制备好的蛋白样品加入 10%的凝胶中电泳,转膜,封闭液中封闭后,用蒸馏水将一步法试剂盒中的 10 \times 洗液稀释为 1 \times 洗液;将二抗 HRP 放入离心管,使一抗与二抗充分混匀,于室温条件下孵育 5 min,加入一抗(1:500),4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜,加入二抗(1:5 000)孵育,倾去抗体混合液,用洗液漂洗 3 次。在反应盒内加入高灵敏度化学发光检测试剂盒 A 液及 B 液各 1 mL,混匀,放入 PVDF 膜,ECL 化学

发光试剂显色曝光,凝胶成像系统分析结果。目的蛋白相对表达量=目的蛋白表达量/同一样本内参表达量。

2.5 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用卡方检验、*t* 检验和析因设计资料的方差分析。单因素方差分析检验先进行 *Levene* 方差齐性检验,整体比较时方差齐者用 *F* 检验,方差不齐者用近似 *F* 检验 *Welch* 法,多重比较时方差齐者采用 *LSD* 法,方差不齐者采用 *Dunnett' T3* 法。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况比较

干预结束后,空白组与假手术组大鼠的饮食、毛发、体质量及活力情况未见明显差异;模型组大鼠饮食明显减少,毛发粗糙无光泽,体重明显减轻,活力显著下降;与模型组比较,补肾活血汤组和戊酸雌二醇组大鼠的平均体质量较重、活力较好,饮食及毛发情况未见明显差异。

3.2 各组大鼠血清中钙、磷含量比较

与空白组、假手术组比较,模型组、补肾活血汤组血清钙含量降低($P<0.01$, $P<0.05$);与模型组比较,戊酸雌二醇组血清钙含量增加($P<0.05$)。各组大鼠血清磷含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 1。

表 1 血清中钙、磷含量比较($\bar{x}\pm s$, $n=5$,mmol/L)

组别	钙含量	磷含量
空白组	1.47 \pm 0.14	1.47 \pm 0.26
假手术组	1.46 \pm 0.18	1.49 \pm 0.29
模型组	1.15 \pm 0.02 ^{***}	1.21 \pm 0.22
补肾活血汤组	1.24 \pm 0.06 ^{**}	1.31 \pm 0.18
戊酸雌二醇组	1.36 \pm 0.12 ^Δ	1.39 \pm 0.25

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与假手术组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^Δ $P<0.05$ 。

3.3 各组大鼠股骨近端骨密度水平比较

与空白组、假手术组比较,模型组骨密度明显降低($P<0.01$)。详见表 2。

3.4 各组大鼠电镜下骨细胞形态比较

空白组和假手术组大鼠股骨近端骨细胞形态较为规则,骨小管较多且细长,呈辐射状,细胞核尚饱

表2 股骨近端骨密度比较($\bar{x}\pm s, n=5, g/cm^2$)

组别	BMD
空白组	0.398±0.040
假手术组	0.406±0.053
模型组	0.220±0.056** ^{##}
补肾活血汤组	0.266±0.056
戊酸雌二醇组	0.276±0.039

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与假手术组比较,^{##} $P<0.01$ 。

满,未见明显病理改变;模型组细胞形状不规则且结构紊乱,分布较少的骨小管,且骨小管较短小,胞核出现明显破裂皱缩;补肾活血汤组和戊酸雌二醇组大鼠股骨近端细胞及骨小管形态数量均有不同程度恢复。详见图2。

3.5 各组大鼠骨组织 HE 染色比较

空白组和假手术组大鼠股骨结构连续完整,骨小梁较厚,间距较小,数目较多,结构致密。模型组大鼠股骨近端见股骨骺端松质骨密度较低,骨小梁稀疏,连接减少,出现断裂、变形等;松质骨内红骨髓转化为黄骨髓,脂肪堆积增加。而补肾活血汤组和戊酸雌二醇组大鼠股骨近端骨组织骨质疏松病变

均得到不同程度的修复。详见图3。

3.6 各组大鼠股骨近端、主动脉及肾小管中 Klotho 蛋白含量比较

与空白组、假手术组比较,模型组股骨近端、主动脉外膜及肾小管中 Klotho 蛋白含量明显减少($P<0.01$);与模型组比较,补肾活血汤组、戊酸雌二醇组股骨近端、主动脉外膜及肾小管中 Klotho 蛋白含量明显增加($P<0.01$);与补肾活血汤组比较,戊酸雌二醇组股骨近端及肾小管中 Klotho 蛋白含量增加($P<0.05, P<0.01$)。详见表3。

3.7 各组大鼠骨组织中 Klotho、PI3K 及 Akt 蛋白表达水平比较

与空白组、假手术组比较,模型组骨组织中 Klotho 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),PI3K、Akt 蛋白表达水平显著增加($P<0.01$);与模型组比较,补肾活血汤组和戊酸雌二醇组骨组织中 Klotho 蛋白表达水平显著增加($P<0.01$),PI3K、Akt 蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$);与补肾活血汤组比较,戊酸雌二醇组骨组织中PI3K、Akt 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。详见图4、表4。

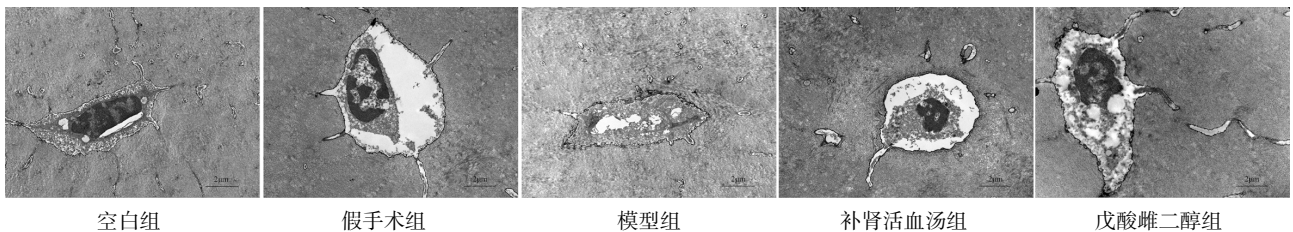


图2 各组大鼠骨细胞形态观察(透射电镜,×500)



图3 各组大鼠股骨近端骨组织病理形态情况(HE,×400)

表3 股骨近端、主动脉外膜、肾小管中 Klotho 含量比较($\bar{x}\pm s, n=5, pg/mL$)

组别	股骨近端	主动脉外膜	肾小管
空白组	643.896±32.226	839.682±38.500	8520.768±391.389
假手术组	629.324±40.352	819.548±60.906	8610.155±540.290
模型组	384.410±40.256** ^{##}	600.165±22.152** ^{##}	6058.319±489.164** ^{##}
补肾活血汤组	462.397±25.949 ^{△△}	687.279±57.211 ^{△△}	6702.162±330.558 ^{△△}
戊酸雌二醇组	538.201±44.637 ^{△△△▲}	735.956±47.272 ^{△△}	7329.626±469.115 ^{△△▲}

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{△△} $P<0.01$;与补肾活血汤组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$ 。

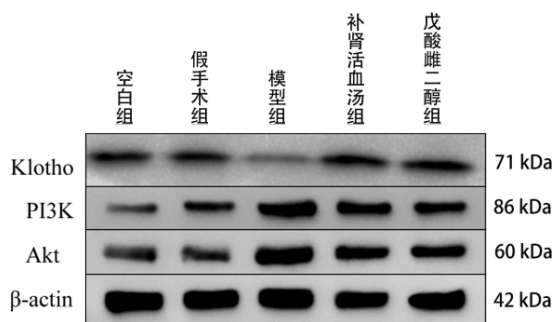


图4 各组大鼠骨组织中相关蛋白电泳条带图

表4 骨组织中 Klotho、PI3K 及 Akt 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	Klotho/ β -actin	PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin
空白组	0.266±0.054	0.312±0.036	0.328±0.030
假手术组	0.274±0.049	0.340±0.028	0.332±0.026
模型组	0.128±0.030***	0.586±0.060***	0.642±0.049***
补肾活血汤组	0.352±0.040 $\Delta\Delta$	0.522±0.077 Δ	0.564±0.082 Δ
戊酸雌二醇组	0.336±0.055 $\Delta\Delta$	0.448±0.056 $\Delta\Delta\Delta$	0.490±0.056 $\Delta\Delta\Delta$

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与假手术组比较,*** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与补肾活血汤组比较, $\Delta P<0.05$ 。

4 讨论

Klotho 蛋白在调控钙、磷代谢中发挥着重要的作用^[10]。Klotho 蛋白能与成纤维细胞生长因子受体 1 (fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1) 结合,增加 FGF23 分泌,同时抑制 1,25-二羟维生素 D₃ 的合成,从而降低血磷^[11]。另外 Klotho 蛋白通过刺激肾小管上皮细胞的钙通道来促进骨吸收释放血磷,从而维持血磷的稳定^[11]。Klotho 蛋白调控血钙平衡主要是刺激破骨细胞进行骨重吸收,通过瞬态受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道促进骨钙的释放,同时 TRP 能刺激肾脏远曲小管重吸收钙以维持血钙平衡^[12]。在本研究中,我们发现 Klotho 蛋白的调控失衡是 PMOP 大鼠钙、磷代谢异常的原因之一。补肾活血汤能增加 Klotho 蛋白的表达,但对于钙、磷代谢的调节作用不显著,有待进一步研究。

Klotho 蛋白主要由肾脏产生,是重要的抗衰老因子^[10]。研究表明,与衰老相关的许多疾病都与 Klotho 蛋白的表达下降有关^[13-14]。在本实验中,我们发现模型组骨密度与体内 Klotho 蛋白均降低,证明 PMOP 发病可能与 Klotho 蛋白的表达下降有关。因为 Klotho 蛋白能够调控骨形成和骨吸收^[15]。研究表明,Klotho 蛋白能调节骨特异性转录因子 Runx2,促进骨组织的形成和修复;并抑制 Runx2 的基质金属蛋白酶-

13,从而减缓破骨细胞的移行和骨基质的吸收^[16]。因此,Klotho 蛋白高表达时,PMOP 大鼠的骨小梁数目和骨形态结构均明显改善。在本研究中,补肾活血汤组大鼠的骨密度未见显著改善,但骨质疏松样病理损伤明显缓解,与前人研究结果基本一致。疾病研究发现,Klotho 蛋白的低表达会导致慢性肾病患者发生血管钙化和骨质疏松^[17]。肾脏分泌的 Klotho 蛋白能有效逆转或改善血管钙化及骨质疏松^[18-19]。因为 Klotho 蛋白具有修复器官衰老的作用^[20]。而 Klotho 蛋白的分泌在与衰老无关的疾病中通常没有显著差异,例如肾性高血压患者的 Klotho 水平没有改变^[21]。因此,可以推断 Klotho 蛋白的表达能特异性反映器官功能。在本实验模型中,Klotho 蛋白在 PMOP 大鼠的骨组织、主动脉及肾组织中均呈现低表达,反映了大鼠骨骼、血管及肾脏功能的减退。表明 PMOP 的发生和发展与多器官功能相关,而非单一骨骼改变。在本研究中,补肾活血汤干预后有效提高了大鼠股骨近端、主动脉外膜和肾小管中 Klotho 蛋白的表达,结果表明补肾活血汤治疗 PMOP 的机制可能与改善脏器功能有关。

Klotho 蛋白能调控 PI3K/Akt 通路,通过对线粒体凋亡的调控影响细胞的凋亡、增殖和分化^[22]。PI3K/Akt 通路的调节机制和生物学功能对骨骼、血管、肾脏等组织均有重要意义^[23-24]。本实验数据表明补肾活血汤减缓骨细胞凋亡可能通过提高 Klotho 蛋白,抑制 PI3K、Akt 蛋白实现。研究发现,PI3K/Akt 通路作用于骨骼后,能修复骨细胞形态,增加骨小管数量,一定程度恢复骨小梁厚度,减少骨髓腔内脂肪细胞分布,修复骨组织的病理改变。本实验结果表明,补肾活血汤同样能提高脏器功能、延缓骨细胞凋亡,对 Klotho、PI3K、Akt 蛋白的调控作用接近戊酸雌二醇,且在骨组织和细胞的修复方面优于戊酸雌二醇。临床研究数据表明,补肾活血汤疗效明确,并能有效减少治疗时的不良反应,是治疗 PMOP 的可靠药物^[25]。

本研究结果提示,器官功能减退可能是 PMOP 发生的关键因素。已有研究者尝试通过靶向抑制细胞衰老改善骨小梁和皮质骨的骨量和骨微结构^[26]。中医药治疗 PMOP 等退行性疾病具有显著优势。中医学认为 PMOP 的发病机制是“肾虚为本,血瘀为标”。补肾活血汤是中医治疗肾虚血瘀型 PMOP 的

代表方剂,方中熟地黄、杜仲为君药,补肝益肾、填精壮骨;山茱萸、枸杞子、肉苁蓉、补骨脂、菟丝子为臣药,有温补元阳、使筋骨坚强、增强君药的治疗作用;当归尾、没药、红花为佐药,通经活络、行气活血,通则不痛;独活祛风除湿、宣痹止痛。本方组方严谨,以补益肝肾为主,从本质入手,扶正祛邪,佐以活血化瘀、祛风除湿的药物,疗效显著。

综上所述,补肾活血汤可通过提高股骨近端、主动脉外膜及肾小管中Klotho蛋白的表达,抑制股骨近端中PI3K蛋白、Akt蛋白的表达,一定程度上缓解去势大鼠的骨质疏松样病变,其作用机制可能与抑制骨细胞凋亡、改善肾脏功能及循环系统功能相关。

参考文献

- [1] 李立军, 倪东旭. 雌激素缺乏在PMO发病中的作用机制研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2022, 28(5): 560-562, 576.
- [2] SALARI N, GHASEMI H, MOHAMMADI L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: A comprehensive systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2021, 16(1): 609.
- [3] 刘天资, 郑启文, 杨鹏, 等. 骨质疏松症的遗传及表观遗传因素[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2021, 14(10): 856-860.
- [4] OLIVEIRA L G, CARNEIRO M L R G, SOUZA M P G, et al. Osteoporosis drug treatment update[J]. Revista Brasileira De Ortopedia, 2021, 56(5): 550-557.
- [5] 梁百慧, 谭小宁, 成金林, 等. 补肾中药复方治疗绝经后骨质疏松症作用机制的研究进展[J]. 中医药导报, 2021, 27(12): 119-122.
- [6] 王镇远, 冯帅华, 李泽湘, 等. 补肾活血汤对大鼠腰椎间盘退行性变模型Fas/FasL信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(3): 430-436.
- [7] 陈沙, 王桂云, 李荣慧, 等. 雌性大鼠手术去势骨质疏松症模型建立及评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(11): 1315-1319.
- [8] 李彦冉, 闫盼盼, 苗艳艳, 等. 骨质疏松动物模型构建进展与应用特点分析[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 928-934.
- [9] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [10] 蒋梦春, 胡洲映, 李双蕾, 等. 基于“肾藏精生髓主骨”理论探讨老年骨质疏松症与免疫系统的相关性[J]. 中医药学报, 2023, 51(8): 6-12.
- [11] 郭俊汝. 基于脾肾相关理论干预大鼠BMSCs成骨分化及BMP/Smad机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2022.
- [12] 李超, 张贤, 邵家豪. 骨代谢过程中钙离子通道TRPV5、TRPV6的作用[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(12): 1950-1955.
- [13] 毛琦, 邓梦杨, 李禄丰, 等. Klotho激活自噬对氧化低密度脂蛋白介导的人冠状动脉内皮细胞衰老的影响[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(6): 587-595.
- [14] 任颖洁, 田庆华, 姜亦欣, 等. Klotho与脑血管病的关系及其相关生物学机制[J]. 中风与神经疾病杂志, 2023, 40(8): 763-768.
- [15] 汪晓晨, 汤日宁, 刘必成. 慢性肾脏病患者骨质疏松及血管钙化共同发病机制的研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2021, 41(6): 554-557.
- [16] 薛纯纯, 刘爽, 陈林, 等. 从肾脏调控骨的物质基础阐释“肾主骨”的科学内涵[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(3): 1574-1578.
- [17] LIU Q F, YU L X, YIN X Y, et al. Correlation between soluble klotho and vascular calcification in chronic kidney disease: A meta-analysis and systematic review[J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 711904.
- [18] 高彦琳, 朱梦宇, 刘定红, 等. 血清成纤维细胞生长因子-23及可溶性 α -Klotho水平对冠状动脉病变预后相关性分析[J]. 心肺血管病杂志, 2023, 42(9): 904-909, 934.
- [19] 王森, 马厚勋, 李宝善. Klotho蛋白与Wnt信号通路在骨代谢中的研究进展[J]. 国际老年医学杂志, 2023, 44(3): 351-353.
- [20] LI W X, FENG W J, SU X Y, et al. SIRT6 protects vascular smooth muscle cells from osteogenic transdifferentiation via Runx2 in chronic kidney disease[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2022, 132(1): e150051.
- [21] YEGANEH-HAJAHMADI M, NAJAFIPOUR H, ROSTAMZADEH F, et al. SIRT1 and Klotho expression in the heart and kidneys of rats with acute and chronic renovascular hypertension[J]. Croatian Medical Journal, 2021, 62(5): 504-512.
- [22] 张立秋, 李成华, 姜丽, 等. 衰老假说与活性氧研究[J]. 生理科学进展, 2020, 51(5): 327-331.
- [23] 陈雪珍, 朱蓉, 杨满英, 等. 基于PI3K/Akt信号轴探究补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(2): 232-239.
- [24] 石威, 金鑫, 王金凤, 等. 淫羊藿苷介导PI3K/Akt信号通路干预大鼠早期激素性股骨头坏死的研究[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(12): 2680-2686.
- [25] 王权, 杜晨阳, 马博, 等. 补肾活血法联合椎体成形术治疗骨质疏松性椎体压缩骨折有效性与安全性的Meta分析[J]. 中医学报, 2022, 37(9): 2027-2034.
- [26] DONG J, XU X Q, ZHANG Q Y, et al. The PI3K/Akt pathway promotes fracture healing through its crosstalk with Wnt/ β -catenin[J]. Experimental Cell Research, 2020, 394(1): 112137.