

熊琳,朱婷婷,张丽玲,等. 慢性肾病大鼠血管钙化与骨代谢标志物的相关性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 87-94.

Xiong L, Zhu TT, Zhang LL, et al. Correlation between vascular calcification and bone metabolism markers in rats with chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 87-94.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.013

慢性肾病大鼠血管钙化与骨代谢标志物的相关性研究

熊琳^{1,2}, 朱婷婷^{1,2}, 张丽玲^{1,2}, 陈跃³, 杨建波³, 欧三桃^{1,2*}

(1.西南医科大学附属医院肾病内科,四川 泸州 646000; 2.四川省肾脏疾病临床医学研究中心,四川 泸州 646000; 3.西南医科大学附属医院核医学科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 研究慢性肾病(CKD)大鼠血管钙化与血清骨代谢标志物的相关性。**方法** 将 36 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组(18 只)和 CKD 血管钙化组(18 只)。钙化组予以腺嘌呤联合高磷饲料,对照组予以生理盐水和普通饲料。实验第 2、4、6 周末处死大鼠,留取主动脉行 Von Kossa 染色和钙含量检测钙化程度,留取血、尿检测尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)和骨代谢标志物:钙(Ca)、磷(P)、1,25-二羟基维生素 D₃(1,25(OH)₂D₃)、甲状旁腺素(PTH)、骨源性碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(OC)、总 I 型前胶原氨基末端肽(tPINP)、β-I 型胶原交联羧基末端肽(β-CTX)、抗酒石酸性磷酸酶-5b(TRACP-5b)及 24 h 尿蛋白定量(24 h-Upro)。**结果** 对照组各时间点主动脉 Von Kossa 染色均未见黑色物质沉积,CKD 血管钙化组随时间进展黑色物质沉积逐渐增多。与对照组相比,CKD 血管钙化组 BUN、Scr、24 h-Upro、主动脉钙含量升高($P<0.05$);Ca、1,25(OH)₂D₃、PTH、tPINP、β-CTX、TRACP-5b 降低($P<0.05$),P、Ca*P 升高($P<0.05$),BALP、OC 升高($P>0.05$);经二元 logistic 回归发现血清 Ca*P 升高、PTH 和 TRACP-5b 降低是血管钙化的独立危险因素。根据主动脉钙化程度,将 CKD 血管钙化组进一步分为轻中度钙化(2 W 和 4 W)和重度钙化(6 W)两个亚组。与轻中度钙化组相比,重度钙化组 BUN、Scr、主动脉钙含量升高($P<0.05$),24 h-Upro 升高($P>0.05$);Ca、P、1,25(OH)₂D₃、tPINP、TRACP-5b 升高($P>0.05$),Ca*P、PTH、BALP、β-CTX 升高($P<0.05$),OC 降低($P<0.05$);进行血管钙化严重程度的危险因素分析发现血清 Ca*P 升高和 OC 降低是血管钙化严重程度的独立危险因素。相关性分析显示血清 Ca*P、PTH、BALP、β-CTX 水平与血管钙化程度呈正相关,OC 与血管钙化程度呈负相关。**结论** CKD 大鼠血管钙化与骨代谢密切相关,检测血清骨代谢标志物有助于评估血管钙化的发生和判断血管钙化的严重程度及进展。

【关键词】 慢性肾病;血管钙化;骨代谢标志物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0087-08

Correlation between vascular calcification and bone metabolism markers in rats with chronic kidney disease

XIONG Lin^{1,2}, ZHU Tingting^{1,2}, ZHANG Liling^{1,2}, CHEN Yue³, YANG Jianbo³, OU Santao^{1,2*}

(1. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. SiChuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000.

3. Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

[作者简介]熊琳(1994—),女,硕士研究生,研究方向:慢性肾病血管钙化。E-mail: 582591080@qq.com

[通信作者]欧三桃(1976—),女,主任医师,医学博士,研究方向:慢性肾病血管病变。E-mail: ousantao@163.com

【Abstract】 Objective To study the correlation between vascular calcification and serum bone metabolism markers in rats with chronic kidney disease. **Methods** Thirty six male SD rats were randomly divided into a control group (18 rats) and CKD vascular calcification group (18 rats). The calcification group was administered adenine combined with high phosphorus feed and the control group was administered normal saline and common feed. The rats were sacrificed after 2, 4, and 6 weeks and the aorta was collected for Von Kossa staining and calcium content analysis to detect the degree of calcification. Blood and urine were collected to detect urea nitrogen (BUN), blood creatinine (Scr), and bone metabolism markers calcium (Ca), phosphorus (P), 1,25-dihydroxy vitamin D3 [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$], parathyroid hormone (PTH), bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC), total type I procollagen amino terminal peptide (tPINP), β -carboxy-terminal peptide of type I collagen (β -CTX), tartrate-resistant acid phosphatase-5b (TRACP-5b), and 24-hour urinary protein (24 h-Upro). **Results** Aortic Von Kossa staining showed no black matter deposition at each time point in the control group, whereas black matter deposition in the CKD vascular calcification group was increased gradually over time. Compared with the control group, the contents of BUN, Scr, 24 h-upro, and aortic calcium were increased in the CKD vascular calcification group ($P<0.05$). Ca, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PTH, tPINP, β -CTX, and TRACP-5b were decreased ($P<0.05$), P and Ca * P were increased ($P<0.05$), and BALP and OC were also increased ($P>0.05$). Binary logistic regression showed that increased serum Ca * P and decreased PTH and TRACP-5b were independent risk factors for vascular calcification. In accordance with the degree of aortic calcification, the CKD vascular calcification group was further divided into two subgroups: mild-moderate calcification (2 and 4 weeks) and severe calcification (6 weeks). Compared with the mild-moderate calcification group, the contents of BUN, Scr and, aorta calcium were increased in the severe calcification group, ($P<0.05$), while 24 h-upro was increased ($P>0.05$). Ca, P, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, tPINP, and TRACP-5b were also increased ($P>0.05$), while Ca * P, PTH, BALP, and β -CTX were increased ($P<0.05$), and OC was decreased ($P<0.05$). Analysis of risk factors for the severity of vascular calcification revealed that increased serum Ca * P and decreased OC were independent risk factors for the severity of vascular calcification. Correlation analysis showed that serum Ca * P, PTH, BALP, and β -CTX levels were positively correlated with vascular calcification, and OC was negatively correlated with vascular calcification. **Conclusions** Vascular calcification in CKD rats is closely related to bone metabolism. Detection of serum markers of bone metabolism is helpful to assess the occurrence of vascular calcification and judge the severity and progression of vascular calcification.

【Keywords】 chronic kidney disease; vascular calcification; bone metabolism markers

慢性肾病矿物质骨异常 (chronic kidney disease-mineral and bone disorder, CKD-MBD) 是 CKD 患者的常见并发症, 与其心血管事件及死亡率密切相关^[1]。肾性骨病特指 CKD-MBD 的骨异常, 骨活检是其诊断的金标准^[2], 但由于操作有创、费用昂贵、技术难度高、可重复性差等, 临床上骨活检的实施受到很大限制, 而检测骨代谢标志物成为临床实践中诊断肾性骨病的重要手段。血管钙化 (vascular calcification, VC) 作为 CKD-MBD 的另一重要组成部分, 也是导致 CKD 患者发生心血管事件及死亡率增加的重要危险因素^[3-4]。近年来, “骨-血管轴” 理论的提出表明肾性骨病和 VC 之间可能有着密切的联系^[5]。目前关于二者的关系的研究较少, 因此本研究旨在探讨 CKD 大鼠血管钙化及其严重程度与血清骨代谢标志物变化之间的关系, 为临床上制定和改善 CKD-MBD 的诊疗方案提供理论依据, 进而有效降低 CKD 患者心血管疾病的发生率及死亡率。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只, 体重 180~260 g, 6~8 周龄, 购自西南医科大学实验动物中心 [SCXK (川) 2018-17], 在西南医科大学城北校区动物房饲养 [SYXK (川) 2018-065], 相对湿度 60%~70%, 室温 24℃~26℃, 12 h 交替照明, 每笼 3 只, 遵循“3R”原则给予人道的关怀。经由西南医科大学实验动物伦理委员会审批通过 (201904158)。

1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤 (Sigma 公司, 美国); 1.8% 高磷饲料 (北京科澳协力饲料有限公司, 中国); Von Kossa 染色试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司, 中国); 钙含量测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 中国); 大鼠 1,25-二羟基维生素 D3 ($1,25\text{-dihydroxy vitamin D}_3, 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ELISA 试剂盒、大鼠甲状旁腺素 (parathyroid hormone, PTH) ELISA 试剂盒、

大鼠骨源性碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, BALP) ELISA 试剂盒、大鼠骨钙素 (osteocalcin, OC) ELISA 试剂盒、大鼠总 I 型前胶原氨基末端肽 (type I procollagen amino-terminal peptide, tPINP) ELISA 试剂盒、大鼠 β -I 型胶原交联羧基末端肽 (β -carboxy-terminal peptide of type I collagen, β -CTX) ELISA 试剂盒、大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (tartrate-resistant acid phosphatase 5b, TRACP-5b) ELISA 试剂盒 (上海泛柯实业有限公司, 中国); 全自动生化分析仪 (西门子, 德国); 标准酶标仪 (Bio-rad 公司, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组和模型制备

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只, 适应性喂养 2 周后, 随机分为正常对照组 ($n=18$ 只) 和 CKD 血管钙化组 ($n=18$ 只)。CKD 血管钙化组给予 1.8% 高磷饲料喂养, 第 1~4 周每日给予 2.5% 腺嘌呤混悬液 250 mg/kg 灌胃 1 次, 第 5~6 周隔日灌胃 1 次。正常对照组给予普通饲料喂养, 生理盐水 10 mL/kg 灌胃。所有大鼠自由进食及饮水。

1.3.2 组织取材和指标检测

实验第 2、4、6 周末, 分别于两组中随机选取大鼠 6 只, 收集 24 h 尿液测定 24 h 尿蛋白定量 (24 hour urine protein, 24 h-Upro)。腹主动脉采血测定尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐 (serum creatinine, Scr) 及血钙 (calcium, Ca)、血磷 (phosphorus, P)、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、BALP、OC、tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 含量。留取腹主动脉行 Von Kossa 染色及钙含量测定。

(1) 血、尿相关指标检测

全自动生化分析仪测定血 BUN、Scr、24 h-Upro 及 Ca、P。酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定血清 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、BALP、OC、tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 含量。所有试剂盒均购自上海泛柯实业有限公司, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

(2) 全段主动脉 Von Kossa 染色

主动脉置于细胞培养板中, GENMED 清理液清洗主动脉, 吸去清理液; 加入 GENMED 固定液, 室温下孵育 1 h, 吸去固定液; 再次用 GENMED 清理液清洗主动脉 2 次; 加入 GENMED 染色液, 60 W 灯下直射室温孵育 1 h, 吸去染色液; GENMED 清理液清洗主动脉; 加入 GENMED 平衡液, 室温下孵育 5 min, 吸去平衡液; GENMED 清理液清洗主动脉; 观察染色情况。

(3) 主动脉钙含量测定

取各组主动脉进行匀浆, 留取上清液备用, 按照试剂盒说明书进行相关操作步骤。主动脉钙含量 (mmol/gprot) = (测定 OD 值 - 空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值) $\times$ 标准品浓度 (1 mmol/L) $\div$ 待测样本蛋白浓度 (mmol/gprot)。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。正态分布的计量资料用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用两独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 法; 非正态分布的计量资料用中位数 (四分位数间距) 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。点二列相关分析血清骨代谢标志物和钙化程度的相关性。二元 logistic 回归分析血管钙化及钙化程度的独立危险因素, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组和 CKD 血管钙化组肾功能和主动脉钙含量的比较

与对照组比较, 钙化组各时间点 BUN、Scr、24 h-Upro 及主动脉钙含量均明显升高 ($P < 0.05$); 钙化组中, 6 周组大鼠主动脉钙含量较 2 周、4 周组明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 全段主动脉 Von Kossa 染色和肾形态

对照组各时间点全段主动脉 Von Kossa 染色未见黑色物质沉积; 钙化组各时间点全段主动脉 Von Kossa 染色均可见黑色物质沉积, 随时间进展黑色物质沉积逐渐增多。对照组各时间点肾大小正常, 颜色暗红。CKD 血管钙化组各时间点肾体积增大, 颜色灰白, 呈“大白肾”样改变。见图 1。

2.3 两组大鼠骨代谢标志物

与对照组相比, 血管钙化组 Ca、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH 明显降低 ($P < 0.05$); P、Ca $\times$ P 明显升高 ($P < 0.05$); BALP、OC 升高但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 血管钙化的危险因素分析

将 VC 单因素分析显示骨代谢标志物差异有统计学意义的指标纳入二元 logistic 回归模型, 以是否发生 VC 为因变量, 以 Ca、P、Ca $\times$ P、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 为自变量, 结果显示 Ca $\times$ P 升高、PTH 和 TRACP-5b 降低是 VC 的独立危险因素。见表 3。

表 1 两组大鼠肾功能、尿蛋白和主动脉钙含量比较($n=6$)

Table 1 Comparison of renal function, urinary protein and aortic calcium content between two groups of rats

分组 Groups	2 周 2 Weeks		4 周 4 Weeks		6 周 6 Weeks	
	对照组 Control group	钙化组 Calcification group	对照组 Control group	钙化组 Calcification group	对照组 Control group	钙化组 Calcification group
尿素氮 (mmol/L) Blood urea nitrogen	5.19±0.42	24.89±4.84 *	5.88±0.95	31.89±4.91 * [△]	5.66±0.77	39.01±5.91 * ^{△□}
血肌酐 (μmol/L) Serum creatinine	31.73±2.51	97.12±21.31 *	34.07±1.73	129.32±7.72 * [△]	32.90±2.41	178.18±31.97 * ^{△□}
24 h 尿蛋白定量 (g/24 h) 24 hour urine protein	0.006±0.004	0.022±0.013 *	0.008±0.002	0.024±0.005 *	0.007±0.002	0.025±0.005 *
主动脉钙含量 (mmol/gprot) Aortic calcium content	0.021±0.096	0.231±0.039 *	0.029±0.011	0.252±0.133 *	0.0305±0.0122	0.478±0.197 * ^{△□}

注:与对照组相比,对照组 * $P<0.05$;与 2 周钙化组相比,[△] $P<0.05$;与 4 周钙化组相比,[□] $P<0.05$ 。

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with 2 weeks calcification group, [△] $P<0.05$. Compared with 4 weeks calcification group, [□] $P<0.05$.

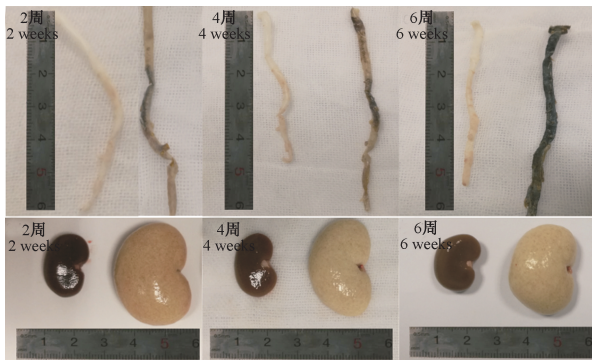


图 1 各时间点全段主动脉 Von Kossa 染色和肾形态

Figure 1 Von Kossa staining of the entire aorta and kidney morphology at each time point

2.5 不同程度血管钙化组相关指标的比较

根据主动脉 Von Kossa 染色及钙含量的检测结果,将其进一步分为轻中度钙化组(即 2 周和 4 周 CKD 钙化组)和重度钙化组(即 6 周钙化组)。与轻中度钙化组相比,重度钙化组 BUN、Scr 及主动脉钙含量明显升高($P<0.05$),24 h-Upro 升高但差异无统计学意义($P>0.05$)。骨代谢标志物:与轻中度钙化组相比,重度钙化组 $\text{Ca} \times \text{P}$ 、PTH、BALP、 $\beta\text{-CTX}$ 明显升高($P<0.05$),OC 明显降低($P<0.05$), Ca 、 P 、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、tPINP、TRACP-5b 升高但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

2.6 血管钙化严重程度的危险因素分析

将 VC 严重程度单因素分析显示骨代谢标志物差异有统计学意义的指标纳入二元 logistic 回归模型,以是否发生严重钙化为因变量,以 $\text{Ca} \times \text{P}$ 、PTH、BALP、 $\beta\text{-CTX}$ 、OC 为自变量,结果显示 $\text{Ca} \times \text{P}$ 升高

和 OC 降低是 VC 严重程度的独立危险因素。见表 5。

2.7 骨代谢标志物和血管钙化程度的相关性分析

$\text{Ca} \times \text{P}$ 、PTH、BALP、 $\beta\text{-CTX}$ 与钙化程度正相关,OC 与钙化程度负相关。见表 6。

3 讨论

目前,常用于建立 CKD 大鼠模型的方法包括肾大部分切除法(约 5/6)、肾动脉部分分支结扎法、冷冻加切除法、阿霉素诱导法、腺嘌呤灌胃法等,上述方法各存在优缺点^[6]。其中,腺嘌呤灌胃法诱导 CKD 大鼠模型历史悠久,进入体内后的腺嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下形成难溶于水的 2,8-二羟基腺嘌呤,该物质经肾小球滤过后沉积在肾小管导致肾小管上皮细胞受损,同时可堵塞肾小管引起梗阻性肾病使肾单位大量丧失,导致急性肾损伤并进一步发展慢性肾衰竭^[6]。本课题组的前期研究表明,在腺嘌呤灌胃的基础上联合高磷饮食能建立可靠的 CKD 大鼠血管钙化模型^[7]。本研究继续沿用该方法复制 CKD 大鼠血管钙化模型,结果显示与对照组相比,各时间点 CKD 血管钙化组 BUN、Scr、24 h-Upro 明显升高,肾形态呈现“大白肾”样改变,提示肾功能严重受损。此外,各时间点 CKD 血管钙化组主动脉钙含量均明显高于对照组,全段主动脉 Von Kossa 染色可见不同程度的黑色物质沉积。Von Kossa 染色作为检测 VC 的方法之一,康婷等^[8]研究证实 Von Kossa 染色呈黑色时表明血管中膜大量钙化结节形成。因此,本研究的上述结果提示,

表 2 两组大鼠骨代谢标志物的比较 ($n=18$)

Table 2 Comparison of bone metabolism markers between two groups of rats

分组 Groups	对照组 Control group	血管钙化组 Calcification group	t/Z 值 Value of t/Z	P 值 P Value
钙 (mmol/L) Ca	2.06±0.18	1.38±0.28	8.427 ^a	0.000
磷 (mmol/L) P	3.13±0.66	6.39±0.90	-12.344 ^a	0.000
钙磷乘积 Ca * P	6.50±1.65	8.76±1.94	-3.767 ^a	0.001
1,25-二羟基维生素 D3 (ng/mL) 1,25(OH) ₂ D ₃	38.33±1.80	25.45±3.93	12.661 ^a	0.000
甲状旁腺素 (pg/mL) PTH	40.53±7.02	26.56 (14.40)	-3.402 ^b	0.001
骨源性碱性磷酸酶 (pg/mL) BALP	591.23±117.31	748.07 (628.47)	-1.471 ^b	0.141
骨钙素 (ng/mL) OC	6.15±0.52	6.31±0.95	-0.631 ^a	0.533
总 I 型前胶原氨基末端肽 (ng/mL) tPINP	17.70±1.31	15.91±3.35	2.113 ^a	0.046
β-I 型胶原交联羧基末端肽 (pg/mL) β-CTX	1215.85±165.60	769.68±175.79	7.838 ^a	0.000
抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (pg/mL) TRACP-5b	46.62±8.81	36.43±2.72	4.682 ^a	0.000

注: a: t 值; b: Z 值。

Note. a, t value. b, Z value.

表 3 血管钙化的危险因素分析

Table 3 Analysis of risk factors for vascular calcification

指标 Indices	B	Wald	P	OR (95% CI)
钙磷乘积 Ca * P	0.761	7.609	0.006	2.140 (1.246, 3.673)
甲状旁腺素 PTH	-0.197	9.266	0.002	0.821 (0.724, 0.932)
抗酒石酸酸性磷酸酶 5b TRACP-5b	-0.225	9.471	0.002	0.799 (0.692, 0.922)

表 4 轻中度和重度血管钙化组相关指标的比较

Table 4 Comparison of related indexes in mild to moderate and severe vascular calcification groups

分组 Groups	轻中度钙化组 ($n=12$) Mild to moderate calcification group	重度钙化组 ($n=6$) Severe calcification group	t/Z 值 t/Z value	P 值 P value
尿素氮 (mmol/L) Blood urea nitrogen	28.39±5.92	39.01±5.91	-3.589 ^a	0.002
血肌酐 (μmol/L) Serum creatinine	113.62±22.41	178.18±31.97	-5.008 ^a	0.000
24 h 尿蛋白定量 (g/24 h) 24 hour urine protein	0.023±0.010	0.025±0.005	-0.371 ^a	0.715
主动脉钙含量 Aortic calcium content (mmol/g prot)	0.241±0.028	0.478±0.197	-3.059 ^a	0.027
钙 (mmol/L) Ca	1.31±0.29	1.54±0.19	-1.734 ^a	0.102
磷 (mmol/L) P	6.15±0.78	6.87±1.00	-1.671 ^a	0.114
钙磷乘积 Ca * P	7.87±1.45	10.53±1.01	-3.534 ^a	0.003
1,25-二羟基维生素 D3 (ng/mL) 1,25(OH) ₂ D ₃	24.26±3.77	27.84±3.30	-1.976 ^a	0.066
甲状旁腺素 (pg/mL) PTH	23.72±2.80	39.37±2.78	-11.229 ^a	0.000
骨源性碱性磷酸酶 BALP (pg/mL)	565.78 (419.56)	1021.83±40.11	-3.372 ^b	0.001
骨钙素 (ng/mL) OC	6.73±0.86	5.49±0.48	3.239 ^a	0.005
总 I 型前胶原氨基末端肽 (ng/mL) tPINP	14.86±3.48	18.02±1.86	-2.067 ^a	0.055
β-I 型胶原交联羧基末端肽 (pg/mL) β-CTX	665.88±110.33	977.30±26.56	-9.256 ^a	0.000
抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (pg/mL) TRACP-5b	35.82±2.63	37.67±2.69	-1.399 ^a	0.181

注: a: t 值; b: Z 值。

Note. a, t value. b, Z value.

表 5 血管钙化严重程度的危险因素分析

Table 5 Analysis of risk factors for the severity of vascular calcification

变量 Variables	B	Wald	P	OR(95% CI)
钙磷乘积 $Ca \times P$	1.088	5.026	0.025	2.968(1.147,7.682)
骨钙素 OC	-2.816	4.251	0.039	0.060(0.004,0.870)

表 6 骨代谢标志物和钙化严重程度的相关性

Table 6 Correlation between bone metabolism markers and calcification severity

变量 Variables	点二列相关系数 Point two column correlation coefficient	P 值 P value
钙磷乘积 $Ca \times P$	0.662	0.003
甲状旁腺素 PTH	0.942	0.000
骨源性碱性磷酸酶 BALP	0.787	0.000
骨钙素 OC	-0.629	0.005
抗酒石酸酸性磷酸酶 5b β -CTX	0.859	0.000

随着时间进展,肾功能不断下降,主动脉钙含量进一步升高,血管钙化更加明显,并出现 CKD 典型的低钙高磷血症,表明 CKD 大鼠血管钙化模型建立成功。

骨骼是一个活跃的组织,在破骨细胞去除旧骨和成骨细胞产生骨基质并通过基质矿化形成新骨的骨重塑过程中,释放出破骨细胞和成骨细胞分泌的酶和激素,以及骨基质的胶原蛋白代谢产物或非胶原蛋白,这些物质被称为骨代谢标志物,可及时反映骨代谢状态,包括一般骨代谢指标和骨转换标志物两类。前者包含 Ca 、 P 、PTH、 $1,25(OH)_2D_3$ 等,后者可进一步分为骨形成标志物和骨吸收标志物,如反映骨形成的 BALP、tPINP、OC 等,反映骨吸收的 β -CTX、TRACP-5b 等^[9]。

既往认为 VC 是细胞和组织间钙磷结晶被动沉积于血管壁的过程,钙化血管壁的主要成分为羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA),近年来大量研究表明 VC 是血管平滑肌细(vascular smooth muscle cell, VSMC)向成骨细胞转分化的复杂生物学过程,钙化过程与骨骼形成类似^[10],矿物质骨异常有助于 VC 的发生^[11]。本研究发现,在一般的骨代谢指标中,与对照组相比,CKD 血管钙化组 Ca 、 $1,25(OH)_2D_3$ 和 PTH 明显降低, P 和 $Ca \times P$ 升高,血清 PTH 降低和 $Ca \times P$ 升高是 VC 的独立危险因素。肾功能衰竭后,肾小球滤过率下降,故尿磷排出减少,血磷逐渐升高。PTH 具有升钙降磷的生理作用,血清 PTH 降低势必导致血钙降低,血磷进一步升高。高磷血症可抑制合成 $1,25(OH)_2D_3$ 所必须的 1α -羟化酶的活性,导致 $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏合成受阻。此外,肾小管受损本身可直接导致 1α -羟化酶缺乏,进一步加重 $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏,导致血钙进一步降低。因

此,CKD 典型的矿物质代谢紊乱表现为低血钙、高血磷和 $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏。大量研究表明,高磷血症和 $Ca \times P$ 升高是促进 VC 发生和进展的主要原因,推测与高血磷上调成骨细胞转录因子 Runx2 和 osterix 从而刺激 VSMC 向成骨细胞转分化,并促进 VSMC 基体矿化和 VSMC 凋亡细胞等相关^[11-13]。维生素 D 对骨骼矿化有重要作用,骨矿化受损与缺乏 $1,25(OH)_2D_3$ 有关。目前, $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏促进 VC 的确切机制尚不清楚,推测与骨矿化受阻致血清无机磷升高、促进成骨细胞分化因子 MSX2、BMP2 和 Runx2 的表达、诱导炎症和氧化应激致内皮间质转化等相关^[13-15]。

由于 $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏致骨形成和矿化过程受损,缺氧诱导因子-1 α 和抗氧化剂 Nrf2 减少致骨髓细胞表达血管内皮生长因子-A 降低^[16],尿毒症毒素硫酸吡啶抑制成骨细胞转录因子 osterix,OC 和 BMP2 的 mRNA 表达进而抑制骨形成,同时抑制 RANKL 的表达进而抑制 RANKL 依赖的破骨细胞分化和成熟等^[17],CKD 骨转换异常可表现为低骨转换^[18-19]。本研究发现,与对照组相比,CKD 血管钙化组 tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 明显降低,低 PTH 和 TRACP-5b 是 VC 的独立危险因素。tPINP 和 β -CTX 分别是反映骨形成和骨吸收的骨代谢标志物^[9],而 TRACP-5b 主要来源于破骨细胞,是 CKD 患者良好的骨吸收标志物。此外,PTH 被认为是评估 CKD 患者骨转换最有价值的骨代谢标志物^[20-21],低 PTH 预示着低骨转换的可能性较大。因此,本研究结果表明 CKD 血管钙化大鼠呈低骨转换,且与 VC 密切相关,这是由于低骨转换使骨骼缓冲细胞外钙和磷酸盐的能力降低,循环中升高的钙和无机磷难以进入骨骼,进而促进 VC 的发生^[19]。

本研究还发现,低 TRACP-5b 是 VC 的独立危险因素。磷酸化的骨桥蛋白(OPN)可抑制 HA 的形成和生长,TRACP 能使 OPN 去磷酸化从而消除 OPN 对 HA 的抑制作用^[22],提示 TRACP-5b 降低导致 VC 的发生可能与促进 HA 沉积于血管平滑肌相关。目前,TRACP-5b 导致 VC 发生的机制研究甚少,未来需要进一步研究。

本研究进一步探讨了骨代谢标志物与钙化严重程度的相关性,发现与轻中度钙化组相比,重度钙化组血清 $\text{Ca} \times \text{P}$ 、PTH、BALP、 β -CTX 明显升高并与钙化程度正相关,而 OC 明显降低并与钙化程度负相关,IPINP 和 TRACP-5b 随钙化程度的增加呈上升趋势,血清 $\text{Ca} \times \text{P}$ 升高和 OC 降低是钙化严重程度的独立危险因素。BALP 由成骨细胞分泌,可通过去磷酸化使 OPN 失活,从而抑制 OPN 对体外矿化的抑制作用,在很大程度上促进 VC 的发生^[22]。此外,BALP 可通过降解 VC 的重要抑制剂焦磷酸盐,促进血管中羟基磷灰石沉积导致 VC^[23],血清 BALP 升高与主动脉钙化正相关^[24-25]。OC 是骨矿化基质中最丰富的非胶原蛋白,主要由成熟的成骨细胞分泌。完全羧化的 OC 对 HA 的亲合力高,血管壁 OC 表达上调可促进血管中膜钙化^[26]。与之相反,未完全羧化的 OC 与 HA 的亲合力低,更容易被释放到血液循环中,并通过调节血管内皮功能和糖脂代谢及减轻炎症等途径对血管起保护作用^[27-28],故血清 OC 降低可能通过破坏血管内皮功能和糖脂代谢平衡间接导致血管钙化。在亚洲进行的研究中,有 37% 的报告表明血清 OC 与 VC 或动脉粥样硬化负相关^[28],低血清 OC 会增加心血管疾病发生的风险^[29-30]。另外,尽管 BALP 和 OC 均为反映骨形成的指标,但本次研究发现随着肾功能下降,血清 BALP 升高而 OC 降低,这可能是由于首先,BALP 合成与骨基质矿化密切相关,当骨骼矿化受阻时成骨细胞分泌大量的 BALP,使血清 BALP 明显升高^[9]。其次,VSMC 转分化为成骨样细胞后可分泌 BALP^[23],故循环中 BALP 水平的增加可能部分来自钙化的动脉^[31]。最后,OC 是在骨基质矿化之后才能表达^[9],故骨骼矿化受阻时血清 BALP 升高而 OC 降低。由此可见,本研究发现尽管 CKD 血管钙化大鼠处于低骨转换状态,但随着低钙血症、高磷血症、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 缺乏和骨骼对 PTH 抵抗的发生,骨代谢的关键调节因子 PTH 分泌逐渐增多。升高的血清 PTH 直接作用于成骨细胞和骨细

胞促进骨形成,间接作用于破骨细胞促进骨吸收,加速骨重塑和骨转换。在这种情况下,成骨细胞和破骨细胞的活性增加,大量的钙和磷酸盐从骨骼中释放出来。此外,由于快速的骨重塑阻止了新形成骨的充分矿化,循环中钙和无机磷的水平进一步增加,从而促进血管钙化的发生和进展^[5,19]。因此,本研究的上述结果表明,随着血清 PTH、BALP 和 β -CTX 的升高和 OC 降低,血管钙化程度增加,表明骨转换速率加快和骨骼矿化受损均可加剧血管钙化,这与骨代谢加快致骨骼释放钙和磷增加以及骨骼矿化受阻共同导致血清钙磷水平升高有关,同时这也是 $\text{Ca} \times \text{P}$ 升高作为血管钙化严重程度独立危险因素的原因之一。

综上所述,本次研究表明 CKD 大鼠血管钙化与矿物质骨代谢紊乱紧密相关,钙磷乘积升高和骨转换异常会促进血管钙化的发生及进展。CKD 大鼠血管钙化与血清骨代谢标志物的关系密切,通过检测血清骨代谢标志物,有利于评估血管钙化的发生、判断其严重程度并预测其进展,对临床上制定和改善 CKD-MBD 的诊疗方案有重要意义,进而有助于降低 CKD 患者心血管疾病的发生率及死亡率,未来有必要进行更多的研究以进一步探讨相关骨代谢标志物导致血管钙化的具体机制。

参考文献:

- [1] Hruska KA, Sugatani T, Agapova O. The chronic kidney disease-Mineral bone disorder (CKD-MBD): Advances in pathophysiology [J]. Bone, 2017, 100: 80-86.
- [2] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Chronic Kidney Disease Mineral and Bone Disorder Working Group. KDIGO 2017 clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) [J]. Kidney Int Suppl (2011), 2017, 7(1): 1-59.
- [3] Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update [J]. Nephrol Dial Transplant, 2016, 31(1): 31-39.
- [4] Chen J, Budoff MJ, Reilly MP, et al. Coronary artery calcification and risk of cardiovascular disease and death among patients with chronic kidney disease [J]. JAMA Cardiol, 2017, 2(6): 635-643.
- [5] Evenepoel P, Opdebeeck B, David K. Bone-vascular axis in chronic kidney disease [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2019, 26(6): 472-483.
- [6] 李佳璐,刘俊亭,袁慧雅.大鼠肾衰模型造模方法及比较研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 108-113.
- [7] 蒲江,魏晓,龚财判,等.腺嘌呤加高磷饮食快速建立慢性

- 肾脏病血管钙化动物模型法 [J]. 西南军医, 2018, 20(4): 445-450.
- [8] 康婷, 陈波, 欧三桃. 慢性肾脏病血管钙化大鼠血清炎症因子抗体芯片检测及分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 9-15.
- [9] 张萌萌, 张秀珍, 邓伟民, 等. 骨代谢生化指标临床应用专家共识(2019) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(10): 1357-1372.
- [10] Chen NX, Moe SM. Pathophysiology of vascular calcification [J]. Curr Osteoporos Rep, 2015, 13(6): 372-380.
- [11] Ray M, Jovanovich A. Mineral bone abnormalities and vascular calcifications [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2019, 26(6): 409-416.
- [12] Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(11): 2857-2867.
- [13] Hou YC, Lu CL. Mineral bone disorders in chronic kidney disease [J]. Nephrology (Carlton), 2018, 23(4): 88-94.
- [14] Schmidt N, Brandsch C, Kühne H, et al. Vitamin D receptor deficiency and low vitamin D diet stimulate aortic calcification and osteogenic key factor expression in mice [J]. PloS One, 2012, 7(4): e35316.
- [15] Dalan R, Liew H, Tan WKA, et al. Vitamin D and the endothelium: basic, translational and clinical research updates [J]. Ije Metabolic & Endocrine, 2014, 4(C): 4-17.
- [16] Chen NX, O'Neill KD, Allen MR, et al. Low bone turnover in chronic kidney disease is associated with decreased VEGF-A expression and osteoblast differentiation [J]. Am J Nephrol, 2015, 41(6): 464-473.
- [17] Watanabe K, Tominari T, Hirata M, et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin in chronic kidney disease, suppresses both bone formation and bone resorption [J]. FEBS Open Bio, 2017, 7(8): 1178-1185.
- [18] Drüeke, Tilman B, Massy ZA. Changing bone patterns with progression of chronic kidney disease [J]. Kidney Int, 2016, 89(2): 289-302.
- [19] Lu KC, Wu CC, Yen JF, et al. Vascular calcification and renal bone disorders [J]. Scientific World Journal, 2014, 2014: 637065.
- [20] Evenepoel P, Cavalier E, D'Haese PC. Biomarkers predicting bone turnover in the setting of CKD [J]. Curr Osteoporos Rep, 2017, 15(3): 178-186.
- [21] Sprague SM, Bellorin-Font E, Jorgetti V, et al. Diagnostic accuracy of bone turnover markers and bone histology in patients with CKD treated by dialysis [J]. Am J Kidney Dis, 2016, 67(4): 559-566.
- [22] Halling Linder C, Ek-Rylander B, Krumpel M, et al. Bone Alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase: potential co-regulators of bone mineralization [J]. Calcif Tissue Int, 2017, 101(1): 92-101.
- [23] Nizet A, Cavalier E, Stenvinkel P, et al. Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease - mineral and bone disorder [J]. Clin Chim Acta, 2020, 501: 198-206.
- [24] Yan J, Li L, Zhang M, et al. Circulating bone-specific alkaline phosphatase and abdominal aortic calcification in maintenance hemodialysis patients [J]. Biomark Med, 2018, 12(11): 1231-1239.
- [25] Ishimura E, Okuno S, Okazaki H, et al. Significant association between bone-specific alkaline phosphatase and vascular calcification of the hand arteries in male hemodialysis patients [J]. Kidney Blood Press Res, 2014, 39(4): 299-307.
- [26] 刘菊菊, 李书国, 邓娟娟, 等. 高龄大鼠血管钙化及血管壁骨桥蛋白、骨钙素表达的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(9): 54-60, 68.
- [27] 邢晓林, 刘昊凌. 骨钙素对动脉粥样硬化作用的研究进展 [J]. 现代医学, 2018, 46(6): 732-735.
- [28] Millar SA, Patel H, Anderson SI, et al. Osteocalcin, vascular calcification, and atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 8: 183.
- [29] Csiky B, Sági B, Peti A, et al. The impact of osteocalcin, osteoprotegerin and osteopontin on arterial stiffness in chronic renal failure patients on hemodialysis [J]. Kidney Blood Press Res, 2017, 42(6): 1312-1321.
- [30] Magni P, Macchi C, Sirtori CR, et al. Osteocalcin as a potential risk biomarker for cardiovascular and metabolic diseases [J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(10): 1579-1587.
- [31] Haarhaus M, Brandenburg V, Kalantar-Zadeh K, et al. Alkaline phosphatase: a novel treatment target for cardiovascular disease in CKD [J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(7): 429-442.

[收稿日期] 2020-06-07