

· 基础研究 ·

不同剂量氢化可的松诱发小鼠药源性
脾肾虚证的评价研究

潘志强 钱宏梁 王晓敏 卢涛 李亚 方肇勤

摘要 **目的** 评价氢化可的松诱发小鼠药源性脾肾虚证模型,并探索其物质基础。**方法** 80 只 ICR 小鼠按随机分为对照组、极低、低、中、高剂量组,每组 16 只,分别采用灭菌水、0.33、0.66、3.3、12.5 mg/(kg·d) 氢化可的松灌胃。每日动态观测小鼠体重,并分别在给药第 7 天和第 14 天,检测小鼠抓力、旷场活动度、躯体不同部位红外温度等表征信息。分别于给药第 8 天和第 15 天各处死小鼠 8 只,取脾脏、胸腺、心脏和肾脏称重并计算脏器指数;ELISA 检测血清皮质酮(CORT)和促肾上腺皮质激素(ACTH)含量;实时荧光定量 PCR 检测肾上腺 StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1、Cyp11b2 mRNA 表达;Western Blot 检测肾上腺 LDLR、SRBI、StAR 蛋白表达。**结果** 与对照组同期比较,低、中剂量组 4~14 天体重下降($P < 0.05$),极低剂量组 7 天尾部最低温度、StAR、Cyp21a1 mRNA 表达,14 天头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度以及 ACTH 含量、LDLR、StAR 蛋白表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),14 天抓力上升($P < 0.05$);低、中、高剂量组 7、14 天头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度、胸腺重量和指数下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);低剂量组 7、14 天 StAR mRNA、LDLR、StAR 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),14 天 CORT 含量、ACTH、Cyp11a1、Cyp11b1 mRNA 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);中、高剂量组 7、14 天脾脏重量和指数、CORT 含量、ACTH、StAR、Cyp21a1、Cyp11b1 mRNA、LDLR、SRBI、StAR 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),14 天 Cyp11a1、Cyp11b2 mRNA 下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);高剂量组 14 天体重、旷场活动度下降($P < 0.05$)。**结论** 采用 0.66 及 3.3 mg/(kg·d) 氢化可的松持续给药 14 天可建立稳定的药源性脾肾虚证小鼠模型,可能与其降低肾上腺皮质激素合成酶表达和垂体-肾上腺皮质轴功能有关。

关键词 氢化可的松;肾上腺皮质;证候;药源性证候;虚证;动物模型

Study on Drug-induced Pi and Shen Deficiency Syndrome of Mice Induced by Different Doses of Hydrocortisone PAN Zhi-qiang, QIAN Hong-liang, WANG Xiao-min, LU Tao, LI Ya, and FANG Zhao-qin Basic Medical School of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203)

ABSTRACT **Objective** To evaluate Pi and Shen deficiency syndrome of mice induced by different doses of hydrocortisone, and explore the material basis. **Methods** Totally 80 ICR mice were randomly divided into the normal group, extremely low dose group, low dose group, medium dose group, high dose group, 16 in each group, they were respectively administrated with sterile water, 0.33, 0.66, 3.3 and 12.5 mg/kg⁻¹·d⁻¹ hydrocortisone by gastrogavage. The weight of mice was dynamically observed every day, and the characteristic information such as holding power, activity of open field and infrared temperature of different parts of the body were detected on at the 7th and 14th day. 8 mice were sacrificed on 8th and 15th day respectively, whose spleen, thymus, heart and kidney were weighed and the organ index was calculated. Serum corticosterone (CORT) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) were measured by ELISA. The mRNA expressions of StAR, Cyp11a1, Cyp21a1,

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81473562, No. 81873212)

作者单位:上海中医药大学基础医学院(上海 201203)

通讯作者:潘志强, Tel: 021-51322116, E-mail: pzzq527@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20190307. 156

Cyp11b1 and Cyp11b2 in the adrenal were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The proteins expressions of LDLR, SRBI and StAR were detected by Western Blot. Results Compared with the control group in the same time, the weight decreased in low and medium dose groups from 4th to 14th day ($P < 0.05$). Tail minimum temperature, StAR, Cyp21a1 mRNA expression at 7th day decreased and head maximum temperature, trunk mean temperature, tail minimum temperature, the levels of ACTH, LDLR, StAR at 14th day decreased in extremely low dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while holding power at 14th day increased ($P < 0.05$); head maximum temperature, trunk mean temperature, tail minimum temperature, thymus weight and index at 7th and 14th day decreased in low, medium and high dose groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the expressions of StAR, LDLR, StAR at 7th and 14th day and corticosterone, ACTH, Cyp11a1 and Cyp11b1 mRNA expression at 14th day decreased in the low dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and corticosterone, ACTH, Cyp11a1 and Cyp11b1 at 14 days decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); spleen weight and index, corticosterone, ACTH, StAR, Cyp21a1, Cyp11b1 mRNA and LDLR, SRBI, StAR at 7th and 14th day decreased in the middle and high dose groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the expressions of Cyp11a1 and Cyp11b2 mRNA at 14th day decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The body weight and activity of open field decreased in the high dose group on 14th day ($P < 0.05$). Conclusion A stable mice model of Pi and Shen deficiency syndrome can be established by continuous administration of hydrocortisone at $0.66 - 3.3 \text{ mg/kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 14 days, it might be related to decreasing the expression of adrenocortical synthase molecules and weakening the hypofunction of the pituitary-adrenal axis.

KEYWORDS hydrocortisone; adrenal cortex; syndromes; drug-induced syndromes; deficiency syndromes; animal model

证候动物模型及其物质基础研究一直是中医基础理论学科探索的主要领域,而研发简易、稳定、可信的证候动物模型是中药复方及其药效作用机制研究的首要前提。随着大量难治病、慢性病依赖糖皮质激素治疗,临床凸显新的学术问题,即“药源性证候”^[1]。对此,笔者认为这可作为证候研究的另一重要切入点。既往国内学术界曾以氢化可的松药物复制出不同的证候动物模型,涉及肾阴虚证或肾阳虚证,并认为虚证尤其是肾虚证的发生与神经内分泌免疫网络功能密切相关^[2,3],而从西医疾病模型分析,糖皮质激素药物也可作为典型的免疫抑制模型^[4]。

本研究拟采用氢化可的松灌胃小鼠,采用本课题组创建的小鼠辨证论证实验方法学^[5-7]对小鼠证候进行动态评估,探索证候发生的物质基础。以建立标准化的氢化可的松药源性虚证模型及其评价指标,为中药及其复方的“方-证-效”药理学研究提供可信的模式生物。

材料与方法

1 实验动物 5 周龄雄性鼠龄 ICR 小鼠,SPF 级,80 只,体重(18~20)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房。动物许可证号:SCXK(沪)2013-0016;动物合格证号:2008001684911。本实验经上海中医药大学实验

动物伦理委员会批准: No. SZY201803012。

2 试剂仪器 氢化可的松,白色结晶粉末,分子量 362.46,购自国药集团化学试剂有限公司产品(批号 66003632)。RNAiso Plus(货号 9109)、PrimeScript RT reagent Kit(货号 RR036A)、SYBR Premix Ex Taq(TliRNaseH Plus)II(货号 RR820A)均购自日本 TaKaRa 公司;小鼠皮质酮(corticosterone, CORT)ELISA 试剂盒(货号 501320)购自美国 Cayman 公司;促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)ELISA 试剂盒(货号 M046006)购自美国 mdb 公司;低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)抗体(货号 ab52818)、SR-BI 抗体(货号 ab52629)、类固醇激素合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory, StAR)抗体(货号 ab96637)均购自美国 Abcam 公司; β -actin 抗体(货号 A5441)购自 Sigma-Aldrich 公司。

YLS-13A 型小鼠抓力测定仪(山东省医学科学院设备站);NIKON 4500 数码相机(日本 NIKON 公司);ThermaCAM P30 型红外热像仪器(美国 FLIR 公司);QuantStudioTM 3 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Elx800 型酶标仪(美国 Biotek 公司);Eppendorf 台式离心机 5417R 型(德国 Eppendorf 公司);Alpha 化学发光

凝胶成像系统(Protein-Simple 公司)。

3 分组与造模 小鼠适应性饲养,当小鼠体重稳定至 30 g 左右,采用随机数字表法随机分为对照组、极低剂量[0.33 mg/(kg·d)]组、低剂量[0.66 mg/(kg·d)]组、中剂量[3.3 mg/(kg·d)]组、高剂量[12.5 mg/(kg·d)]组,每组 16 只。氢化可的松按照相应的药物浓度灌胃,每天 1 次。对照组灌胃等体积的灭菌水。给药第 8 和第 15 天,每组摘眼球法各处死小鼠 8 只,先称取体重,摘眼球取血,分离血清;获取脾脏、胸腺、心脏、肾脏;取肾上腺组织。

4 小鼠一般信息采集 分别在实验第 7 天、第 14 天,运用本课题组创建的小鼠辨证论治实验方法学^[5-7]采集小鼠四诊信息,包括小鼠一般外观表现、体重、躯体不同部位红外温度、旷场实验小鼠活动度(计算方法:在网格中活动 60 s 的跨格数以及前肢离地次数的总和)、小鼠四肢抓力等表征信息,然后进行计量化辨证。取脏器称重后计算脏器指数,脏器指数=脏器重量(mg)/体重(g)。

5 实时荧光定量 PCR 检测 StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1、Cyp11b2 mRNA 表达 按照 RNAiso Plus 试剂盒说明书抽提肾上腺总 RNA;逆转录反应体系 20 μL,反应条件为 37 ℃×15 min,85 ℃×5 s,4 ℃;PCR 扩增反应体系为 20 μL,反应程序为 95 ℃×3 min,95 ℃×5 s,60 ℃×30 s,40 个循环。基因相对表达量分析方法:采用 2^{-ΔΔCt}法分析,以正常组作为对照,以 β-actin 基因 Ct 均值作为内参组。ΔCt=Ct 目的基因-Ct 内参基因(其中,Ct 值为扩增 n 个循环基因的荧光数值),ΔΔCt=ΔCt 实验组-ΔCt 对照组,目的基因相对表达量=2^{-ΔΔCt}。上下游引物序列采用 Primer3(v.0.4.0)在线软件合成,委托 Life Technologies 公司上海合成部完成,具体见表 1。

表 1 小鼠肾上腺皮质功能相关基因引物序列

基因名称	基因库号	引物序列	产物长度(bp)
β-actin	NM_007393	上游:5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	165
		下游:5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA-3'	
Cyp11a1	NM_019779	上游:5'-ACTTCCGGTACTTGGGCTTT-3'	201
		下游:5'-GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG-3'	
Cyp11b1	NM_001033229	上游:5'-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3'	140
		下游:5'-GGGTTGATGTCGTGTCAGTG-3'	
Cyp11b2	NM_009991	上游:5'-CTGAACGCTATATGCCTCAGC-3'	160
		下游:5'-AGTGTCTCCACCTGGAAGGTT-3'	
Cyp21a1	NM_009995	上游:5'-CTCCGGCTATGACATCCCTA-3'	151
		下游:5'-ACAGCCAAAGGATGGTGTTCT-3'	
StAR	NM_011485	上游:5'-TTGGGCATACTCAACAACCA-3'	103
		下游:5'-GAAACACCTTGCCACATCT-3'	

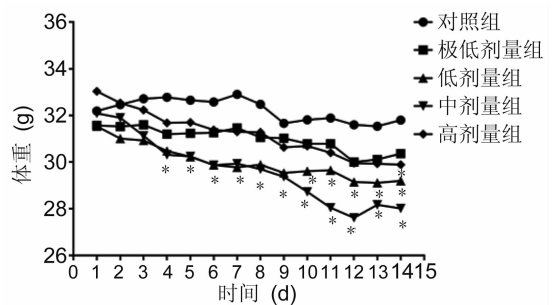
6 ELISA 检测血清 CORT 及 ACTH 含量 依据 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测血液 CORT 以及 ACTH 含量。

7 Western Blot 检测 LDLR、SRBI 和 StAR 蛋白表达 采用 RIPA 裂解液处理组织,收集蛋白质样品并予以定量,通过变性处理,分别执行聚丙烯酰胺电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗涤、二抗孵育、再洗涤、显影等实验流程,其中,一抗浓度内参 β-actin 以 1:20 000 稀释,LDLR 抗体以 1:5 000 稀释,SRBI、StAR 抗体均以 1:2 000 稀释。以 β-actin 为内参对照,分析蛋白相对表达量。

8 统计学方法 采用 GraphPad Prism 7.0 专业软件进行作图及统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 One-way ANOVA 方差分析,多组间两两比较,采用 SNK(S) 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠体重比较(图 1) 对照组小鼠体重稳定在 31~33 g。与对照组同期比较,低、中剂量组 4~14 天体重下降($P < 0.05$);高剂量组 14 天体重下降($P < 0.05$)。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;下图同

图 1 各组小鼠体重比较

2 各组小鼠四诊指标比较(表 2) 与对照组同期比较,极低剂量组 14 天抓力上升($P < 0.05$),7 天尾部最低温度下降($P < 0.05$);低、中、高剂量组 7 天以及各剂量组 14 天头部最高温度、躯干平均温度和尾部最低温度下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);高剂量组 14 天旷场活动度下降($P < 0.05$)。

3 各组小鼠脏器重量及脏器指数比较(表 3) 与对照组同期比较,低、中、高剂量组 7、14 天胸腺重量和指数下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);中、高剂量组 7、14 天脾脏重量和指数下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);心脏与肾脏重量及其指数差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 各组 CORT 及 ACTH 水平比较(表 4) 与对照组同期比较,极低剂量组 14 天 ACTH 降低($P < 0.01$);低、中、高剂量组 14 天 CORT 和 ACTH 下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);中、高剂量组 7 天 CORT 和 ACTH 下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

5 各组 StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1、Cyp11b2 mRNA 表达比较(表 5) 与对照组同期比较,极低剂量组 7 天 StAR、Cyp21a1 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);低剂量组 7、14 天 StAR 表达下降($P < 0.01$),14 天 Cyp11a1、Cyp11b1 表达下降

表 4 各组小鼠激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	时间	n	CORT	ACTH
对照	7 天	8	2360.6 $\pm$ 1225.7	72.7 $\pm$ 30.0
	14 天	8	2658.8 $\pm$ 995.7	112.7 $\pm$ 34.6
极低剂量	7 天	8	1233.2 $\pm$ 1091.2	42.1 $\pm$ 9.3
	14 天	8	1304.2 $\pm$ 350.0	58.8 $\pm$ 35.6**
低剂量	7 天	8	1243.2 $\pm$ 777.0	36.2 $\pm$ 21.8
	14 天	8	924.6 $\pm$ 580.6*	54.7 $\pm$ 28.9**
中剂量	7 天	8	450.1 $\pm$ 541.1**	23.9 $\pm$ 16.1*
	14 天	8	122.9 $\pm$ 50.7**	26.3 $\pm$ 3.8**
高剂量	7 天	8	170.6 $\pm$ 76.3**	12.6 $\pm$ 8.2**
	14 天	8	157.4 $\pm$ 31.1**	16.0 $\pm$ 6.7**

($P < 0.05$);中剂量组 7 天 StAR、Cyp21a1、Cyp11b1 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);高剂量组 7 天 StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1 表达下降($P < 0.01$);中、高剂量组 14 天 StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1、Cyp11b2 表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

6 各组 LDLR、SRBI 和 StAR 蛋白表达比较(图 2,表 6) 与对照组比较,给药 7 天后,低、中、高剂量组 LDLR、SRBI 和 StAR 蛋白表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。给药 14 天后,极低、低剂量组 LDLR、StAR 表达下降($P < 0.05$);中、高剂量组 LDLR、SRBI 和 StAR 蛋白表达下降($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠四诊指标比较 ($\bar{x} \pm s$)							
组别	时间	n	旷场活动度	抓力(g)	头部最高温度(℃)	躯干平均温度(℃)	尾部最低温度(℃)
对照	7 天	8	41.4 $\pm$ 5.9	216.5 $\pm$ 74.5	36.2 $\pm$ 0.5	31.9 $\pm$ 0.3	29.7 $\pm$ 0.5
	14 天	8	45.0 $\pm$ 6.2	139.6 $\pm$ 30.5	36.5 $\pm$ 0.8	31.6 $\pm$ 0.5	29.1 $\pm$ 0.6
极低剂量	7 天	8	44.5 $\pm$ 9.0	229.7 $\pm$ 61.8	36.1 $\pm$ 0.7	31.8 $\pm$ 0.4	29.0 $\pm$ 0.7*
	14 天	8	44.5 $\pm$ 15.3	222.4 $\pm$ 83.9*	35.7 $\pm$ 0.5**	30.7 $\pm$ 0.5**	27.5 $\pm$ 0.4**
低剂量	7 天	8	42.0 $\pm$ 8.6	254.0 $\pm$ 58.0	35.5 $\pm$ 0.4*	30.8 $\pm$ 0.4**	27.5 $\pm$ 0.6**
	14 天	8	36.1 $\pm$ 7.0	170.4 $\pm$ 17.5	35.4 $\pm$ 0.5**	29.9 $\pm$ 0.4**	26.7 $\pm$ 0.5**
中剂量	7 天	8	46.5 $\pm$ 8.7	197.6 $\pm$ 59.9	35.4 $\pm$ 0.4*	31.1 $\pm$ 0.4*	27.8 $\pm$ 0.7**
	14 天	8	38.6 $\pm$ 11.6	176.4 $\pm$ 29.5	35.4 $\pm$ 0.5**	30.6 $\pm$ 0.3**	27.9 $\pm$ 0.5**
高剂量	7 天	8	46.3 $\pm$ 12.5	224.3 $\pm$ 50.8	34.9 $\pm$ 0.7**	30.8 $\pm$ 0.5**	28.2 $\pm$ 0.5**
	14 天	8	26.7 $\pm$ 6.6*	159.1 $\pm$ 14.5	35.6 $\pm$ 0.5**	30.8 $\pm$ 0.2**	27.8 $\pm$ 0.5**

注:与对照组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;下表同

表 3 各组小鼠脏器重量及脏器指数比较 ($\bar{x} \pm s$)										
组别	时间	n	各脏器重量(mg)				各脏器指数(mg/g)			
			胸腺	脾脏	心脏	肾脏	胸腺	脾脏	心脏	肾脏
对照	7 天	8	43.3 $\pm$ 6.3	106.5 $\pm$ 6.4	154.5 $\pm$ 23.3	435.8 $\pm$ 37.7	1.4 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.9	14.0 $\pm$ 0.7
	14 天	8	39.6 $\pm$ 6.0	110.7 $\pm$ 14.6	136.3 $\pm$ 32.3	433.0 $\pm$ 21.9	1.3 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.9	14.1 $\pm$ 0.9
极低剂量	7 天	8	38.3 $\pm$ 6.2	97.8 $\pm$ 9.1	133.5 $\pm$ 22.0	464.6 $\pm$ 36.2	1.2 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.6	14.9 $\pm$ 0.9
	14 天	8	33.7 $\pm$ 6.6	104.4 $\pm$ 21.4	123.2 $\pm$ 9.5	438.0 $\pm$ 36.4	1.1 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.7	4.2 $\pm$ 0.3	14.8 $\pm$ 1.0
低剂量	7 天	8	28.3 $\pm$ 5.2*	99.4 $\pm$ 16.0	146.5 $\pm$ 17.1	457.8 $\pm$ 44.4	0.9 $\pm$ 0.2*	3.3 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 1.1
	14 天	8	24.1 $\pm$ 7.9*	98.8 $\pm$ 33.0	127.5 $\pm$ 7.4	434.2 $\pm$ 34.2	0.8 $\pm$ 0.3*	3.5 $\pm$ 1.3	4.5 $\pm$ 0.2	15.3 $\pm$ 0.7
中剂量	7 天	8	14.5 $\pm$ 4.3**	83.1 $\pm$ 13.9*	147.9 $\pm$ 17.4	453.3 $\pm$ 50.7	0.5 $\pm$ 0.1**	2.8 $\pm$ 0.3*	5.0 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 1.1
	14 天	8	8.8 $\pm$ 2.5**	64.5 $\pm$ 11.5**	127.5 $\pm$ 20.9	388.2 $\pm$ 33.4	0.3 $\pm$ 0.1**	2.4 $\pm$ 0.4*	4.9 $\pm$ 1.0	14.8 $\pm$ 1.6
高剂量	7 天	8	4.6 $\pm$ 1.5**	59.5 $\pm$ 5.7**	141.3 $\pm$ 20.4	408.0 $\pm$ 34.3	0.2 $\pm$ 0.1**	2.2 $\pm$ 0.2**	5.1 $\pm$ 0.7	14.8 $\pm$ 1.5
	14 天	8	12.8 $\pm$ 6.1**	59.6 $\pm$ 8.0**	144.0 $\pm$ 10.5	436.9 $\pm$ 30.6	0.5 $\pm$ 0.2**	2.1 $\pm$ 0.3*	5.3 $\pm$ 0.6	15.7 $\pm$ 1.7

表 5 各组小鼠肾上腺 StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1、Cyp11b2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	StAR	Cyp11a1	Cyp21a1	Cyp11b1	Cyp11b2
对照	7 天	8	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.31
	14 天	8	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.16
极低剂量	7 天	8	0.63 ± 0.14 **	0.77 ± 0.18	0.60 ± 0.27 *	0.85 ± 0.09	1.20 ± 0.27
	14 天	8	0.87 ± 0.18	0.94 ± 0.19	0.97 ± 0.23	0.99 ± 0.15	1.26 ± 0.18
低剂量	7 天	8	0.66 ± 0.14 **	0.97 ± 0.16	0.74 ± 0.25	0.87 ± 0.09	1.11 ± 0.16
	14 天	8	0.59 ± 0.08 **	0.66 ± 0.16 *	0.73 ± 0.15	0.71 ± 0.17 *	1.43 ± 1.19
中剂量	7 天	8	0.49 ± 0.06 **	0.89 ± 0.20	0.56 ± 0.22 *	0.76 ± 0.13 *	0.98 ± 0.12
	14 天	8	0.26 ± 0.02 **	0.38 ± 0.20 **	0.27 ± 0.10 **	0.26 ± 0.04 **	0.70 ± 0.09 *
高剂量	7 天	8	0.37 ± 0.11 **	0.58 ± 0.12 **	0.30 ± 0.08 **	0.34 ± 0.05 **	0.76 ± 0.28
	14 天	8	0.34 ± 0.18 **	0.28 ± 0.10 **	0.18 ± 0.05 **	0.28 ± 0.17 **	0.67 ± 0.34 **

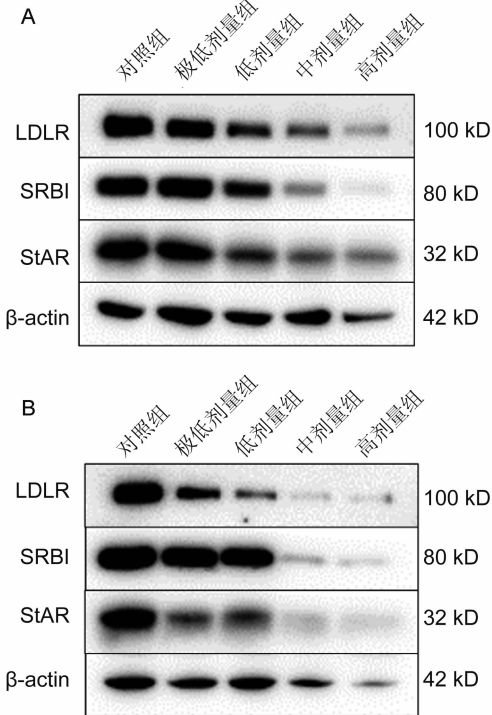
表 6 各组小鼠肾上腺 LDLR、SRBI、StAR 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	LDLR	SRBI	StAR
对照	7 天	8	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.16
	14 天	8	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.24	1.00 ± 0.13
极低剂量	7 天	8	0.91 ± 0.08	1.08 ± 0.22	0.95 ± 0.20
	14 天	8	0.68 ± 0.18 *	0.96 ± 0.21	0.15 ± 0.04 *
低剂量	7 天	8	0.58 ± 0.11 *	0.65 ± 0.07 *	0.41 ± 0.06 *
	14 天	8	0.46 ± 0.12 *	0.92 ± 0.19	0.21 ± 0.06 *
中剂量	7 天	8	0.21 ± 0.05 **	0.12 ± 0.04 **	0.13 ± 0.05 **
	14 天	8	0.08 ± 0.02 **	0.12 ± 0.03 **	0.09 ± 0.01 **
高剂量	7 天	8	0.11 ± 0.04 **	0.08 ± 0.01 **	0.13 ± 0.06 **
	14 天	8	0.09 ± 0.01 **	0.10 ± 0.02 **	0.07 ± 0.01 **

结构最接近生理状态下的可的松且不需要在肝脏转化即可发挥较强的药理作用,因此,在临床被广泛运用。

既往以实验动物为对象采用氢化可的松模拟临床给药,从中医学“肾”藏象角度开展了多项疾病、证候模型及其物质基础研究^[8-10]。但是依然存在一些问题:第一,关于氢化可的松造模的用药剂量,不同文献差异较大,检索文献发现小鼠造模期间体内接受氢化可的松总量为 35 ~ 600 mg/kg (以 200 ~ 350 mg/kg 居多)。第二,关于氢化可的松造模小鼠的时间和给药方式也存在较大差异,最短者 3 天,最长者达 29 天;给药方式以注射剂为主,包括肌肉注射、皮下注射和腹腔注射,也包括灌胃或饮水给药等方式。第三,对于氢化可的松造模小鼠后证候的评判指标不统一,主要涉及小鼠外观表现、体重、体温、免疫学指标、血液激素等。最后,对氢化可的松抑制肾上腺皮质轴的分子机制阐明不足。解决上述问题有利于创建标准化的氢化可的松模型小鼠,有助于中药及其复方的“方-证-效”的疗效评价研究。

本实验为探索氢化可的松造成小鼠虚证的最佳剂量和给药时间,采取 4 个浓度的氢化可的松、以及 7 天与 14 天两个给药时程进行研究,并对肾上腺皮质激素合成与分泌的分子功能予以探索。结果显示 0.66、3.3 mg/(kg · d) 氢化可的松给药 4 ~ 14 天内小鼠体重下降($P < 0.05$),表现出消瘦特征,与中医学中阴虚证表现相似。不同剂量氢化可的松均造成小鼠躯体体表温度下降并与剂量大小正相关,表现出体表与肢体末端阳热不足现象,与中医学中阳虚证表现相似。12.5 mg/(kg · d) 氢化可的松给药后小鼠出现旷场活动度下降,呈现疲倦与乏力特点,与中医学中气虚证表现相似。3.3、12.5 mg/(kg · d) 氢化可的松导致小鼠脾脏萎缩,大于或等于 0.66 mg/(kg · d) 剂量氢化可的松均导致小鼠胸腺明显萎缩,呈现显著的量效关系,但不同剂量氢化可的松对小鼠心脏和肾脏无明显影响,提示免疫抑制小鼠模型,可以采用低、中剂量



注:A 为给药 7 天;B 为给药 14 天

图 2 各组肾上腺类固醇激素合成相关蛋白表达

讨 论

氢化可的松为常用的糖皮质激素药物,因其分子

的氢化可的松短期给药 7 天诱发免疫功能低下。不同剂量氢化可的松均可抑制 CORT 与 ACTH 分泌,以 3.3、12.5 mg/(kg · d) 氢化可的松作用最为显著。此外,大于或等于 0.66 mg/(kg · d) 氢化可的松均可抑制肾上腺类固醇激素合成酶 (StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1) 表达并抑制肾上腺胆固醇转化为激素过程中相关蛋白 (LDLR、SRBI、StAR) 表达,呈现显著的量效关系。由于这些分子是肾上腺皮质激素合成的重要酶,其表达低下将导致皮质激素合成能力减弱以及分泌至血液的皮质醇或 CORT 水平下降,充分反应了肾上腺皮质功能的低下状态,与中医临床肾阳虚证尿 17-羟皮质类固醇含量下降相符^[2],因此它们是中医学“肾”亏损的物质基础的功能体现。

吕颖坚等^[11]报道氢化可的松小鼠脾指数、胸腺指数、腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球功能、NK 细胞活性、迟发型变态反应、白细胞计数均降低。马晓宇等^[12]发现氢化可的松大鼠体重、体温、脏器指数、血浆 cAMP 水平、血清 T3、T4、E₂、T、ACTH、CORT、GH 含量等均呈现低下状态。潘志强等^[13,14]发现动态观察氢化可的松给药后小鼠肾上腺、脾脏与胸腺持续性萎缩;血液 ACTH 水平下降;肾上腺皮质激素合成过程重要受体 Scarb1、Ldlr 基因表达降低,类固醇激素合成酶 StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1、Cyp11b2 基因表达及其酶的调节因子 Fdx1、Fdxr、Nr4a1、Nr4a2、Nr5a1 基因表达均显著下降,以及 StAR 蛋白表达水平明显降低。纵观文献及本研究数据,提示氢化可的松主要导致机体肾上腺皮质轴与免疫能力的下降,从中医证候角度表现为脾肾两脏的阴阳失衡与功能虚衰,因此,建立脾肾虚证小鼠模型,可以采用中低剂量氢化可的松持续给药 14 天以诱发稳定的动物模型。

综上所述,本研究结果显示氢化可的松造成小鼠药源性虚证主要包括气虚、阴虚和阳虚特征,其脏腑定位主要在脾、肾。药源性虚证的物质基础以肾上腺皮质类固醇激素合成酶分子表达被抑制、以及垂体-肾上腺皮质轴功能低下为主。制作免疫抑制动物模型,建议氢化可的松给药剂量 3.3 mg/(kg · d) 左右,用药时间 7 天。制作脾肾虚证模型,建议氢化可的松给药剂量 0.66~3.3 mg/(kg · d) 之间,用药时间 14 天。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 潘志强. “药源性证候”的新生学术问题与思考[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(6): 5-8.
- [2] 沈自尹. 中西医结合肾本质研究回顾[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 304-306.
- [3] 彭国瑞, 许志奇, 杨学海, 等. 不同糖皮质激素所致“阳虚”动物模型的实验研究[J]. 中医杂志, 1984, 34(4): 74-76.
- [4] 吕颖坚, 黄俊明, 蔡玫, 等. 氢化可的松对小鼠免疫功能低下模型的建立及其验证[J]. 毒理学杂志, 2013, 27(3): 194-196.
- [5] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 大鼠/小鼠证候及辨证论治方法学的探索与发展[J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(4): 12-16.
- [6] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 小鼠常见证候的辨证标准[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(7): 508-510.
- [7] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 大鼠、小鼠常见证候计量化辨证方法的建立及其评价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(7): 502-505.
- [8] 何书芬, 居文政, 胡浩彬, 等. 肾阳虚型抑郁症大鼠模型的建立和评价[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1): 140-143.
- [9] 刘欣, 张冰, 刘小青, 等. 氢化可的松诱导大鼠类阳虚状态的动态观察[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(1): 126-128.
- [10] 戴冰, 张嘉妮, 杨梦琳, 等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 70-73.
- [11] 吕颖坚, 黄俊明, 蔡玫, 等. 环磷酸胺和氢化可的松建立免疫抑制模型方法比较[J]. 卫生研究, 2012, 41(6): 951-955.
- [12] 马晓宇, 姜梦如, 张涛, 等. 氢化可的松诱导大鼠肾阳虚模型评价[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(9): 1763-1765.
- [13] 潘志强, 梁龙龙, 王晓敏, 等. 氢化可的松诱发虚证模型小鼠的证候特征再评价及肾上腺皮质功能变化研究[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(8): 13-20, 29.
- [14] 潘志强, 钱宏梁, 王晓敏, 等. 经典气血阴阳虚证模型小鼠在“肾藏象”层面的证候物质基础研究[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(2): 17-25.

(收稿: 2018-09-05 在线: 2019-04-07)

责任编辑: 邱 禹