

不同中药药对调节氢化可的松药源性证候小鼠肾上腺皮质功能的研究

钱宏梁, 潘志强*, 李 亚, 钱杨杨, 费敏红, 方肇勤

上海中医药大学基础医学院, 上海 201203

摘要: 目的 研究不同治法中药配伍调节肾上腺皮质功能的作用。方法 小鼠 ig 给予 1.65 mg/(kg·d) 氢化可的松 14 d 诱发药源性证候, 同步给予助阳散寒 (附子-肉桂)、滋阴泻火 (知母-黄柏)、补气生津 (人参-黄芪)、补血益精 (熟地-山茱萸) 4 种中药药对干预, 检测小鼠体质量、抓力、腋温、旷场活动度、躯体不同部位红外温度等表征信息; 取脾脏、胸腺称定质量并计算脏器指数; 运用 ELISA 法检测血清皮质酮、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、肾上腺素和去甲肾上腺素含量; 采用实时荧光定量 PCR 技术检测肾上腺类固醇合成急性调节蛋白 (StAR)、胆固醇侧链裂解酶 (Cyp11a1)、21-羟化酶 (Cyp21a1)、11 β -羟化酶 1 (Cyp11b1) 和 11 β -羟化酶 2 (Cyp11b2)、酪氨酸羟化酶 (Th)、多巴胺脱羧酶 (Ddc)、多巴胺 β -羟化酶 (Dbh)、苯乙胺-N-甲基转移酶 (Pnmt) 基因表达; 运用 Western blotting 方法检测肾上腺低密度脂蛋白受体 (LDLR)、B 族 I 型清道夫受体 (SR-BI)、StAR 蛋白表达。结果 4 种治法对氢化可的松造成的小鼠体质量下降和体温下降效果不显著, 附子-肉桂组小鼠抓力显著高于模型组 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 知母-黄柏组小鼠血清皮质酮含量显著升高 ($P < 0.01$), StAR、Cyp11b1、Cyp11b2 基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), SR-BI、StAR 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。结论 滋阴泻火治法寒性药对 (知母-黄柏) 对小剂量氢化可的松诱发的药源性证候小鼠肾上腺皮质功能的纠正作用最佳。

关键词: 药源性证候; 氢化可的松; 中药药对; 肾上腺皮质; 糖皮质激素; 附子-肉桂; 知母-黄柏; 人参-黄芪; 熟地-山茱萸
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2383-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.019

Effects of different Chinese materia medica pair on regulation of adrenal function in mice with hydrocortisone-induced syndrome

QIAN Hong-liang, PAN Zhi-qiang, LI Ya, QIAN Yang-yang, FEI Min-hong, FANG Zhao-qin

Basic Medical School of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To study the effects of different Chinese materia medica combinations on the regulation of adrenal function. **Methods** Mice with 1.65 mg/(kg·d) hydrocortisone for 14 d to induce drug-induced syndrome was treated synchronously with assisting yang and dissipating cold (*Aconm Lateralis Radix Praeparata-Cinnamomi Cortex*), nourishing yin and reducing fire (*Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex*), tonifying qi and promoting fluid production (*Ginseng Radix et Rhizoma-Astragali Radix*), and tonifying blood and benefiting spirit (*Rehmanniae Radix Praeparata-Corni Fructus*). The body mass of mice was dynamically observed every day, and the characteristic information such as body mass, holding power, axillary temperature, activity degrees of open field, and infrared temperature were detected by the experimental methodology of mice syndrome differentiation; The mice were sacrificed whose spleen, thymus was weighed and the organ index was calculated. Serum corticosterone, ACTH, adrenaline, and noradrenaline were measured by ELISA. The gene expressions of Star, Cyp11a1, Cyp21a1, Cyp11b1, Cyp11b2, Dbh, Ddc, Pnmt, and Th in the adrenal were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The protein's expressions of LDLR, SRBI, and StAR were detected by Western blotting. **Results** The effects of four different treatments on the reduction of body weight and body temperature caused by hydrocortisone were not significant. The holding power of mice in *Aconm Lateralis Radix Praeparata-Cinnamomi Cortex* group was significantly higher than that of hydrocortisone group ($P < 0.05$). Compared with the hydrocortisone group, the serum corticosterone content of mice in *Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex* group increased significantly ($P < 0.01$); The genes expression of Star, Cyp11b1, and Cyp11b2 was significantly up-regulated ($P < 0.05$, 0.01); The proteins expression of SRBI and StAR were significantly up-regulated. **Conclusion** The nourishing yin and purging fire treatment

收稿日期: 2019-01-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473562); 国家自然科学基金面上项目 (81873212)

作者简介: 钱宏梁 (1992—), 男, 硕士研究生, 主要从事中医证候实验研究。

*通信作者 潘志强 (1977—), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事实验中医教学与中医基础实验研究。

Tel: (021)51322116 E-mail: pzq527@163.com

group (*Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex*) is the best to correct and protect the adrenal cortex function in mice with hydrocortisone induced syndrome at low dose.

Key words: drug-induced syndrome; hydrocortisone; Chinese materia medica pair; adrenal cortex; glucocorticoid; *Aconm Lateralis Radix Praeparata-Cinnamomi Cortex*; *Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex*; *Ginseng Radix et Rhizoma-Astragali Radix*; *Rehmanniae Radix Praeparata-Corni Fructus*

证候是中医学认识疾病的核心，也是基础领域探索的重要内容。一直以来，中医学术界对证候的发生发展及其物质基础开展了大量的探索工作。本课题组前期对糖皮质激素诱发的“药源性证候”进行了深入的研究^[1]，发现氢化可的松药源性证候小鼠出现阴虚、阳虚及气虚见证^[2]，认为氢化可的松等糖皮质激素属于辛热之品。临床观察发现，使用大剂量激素易出现食欲亢进、面赤身热、心烦少寐、兴奋激动、口干咽燥、舌红少津、脉细数等阴虚火旺之象^[3-5]；在撤减激素阶段，病变发展导致阴损及阳，形成以阴虚为主的阴阳两虚病理状态；此外阳热易耗散元气，表现为腰膝酸软、肢疲神倦、少气懒言、面色㿠白、畏寒肢冷^[6-8]。

本研究采用氢化可的松 1.65 mg/(kg·d) ig 给药 14 d 复制稳定的糖皮质激素“药源性证候”小鼠模型，并选择助阳散寒（附子-肉桂组，热性）、滋阴泻火（知母-黄柏组，寒性）、补气生津（人参-黄芪组，微温）、补血益精（熟地-山茱萸组，微温）4 种不同治法中药药对干预，研究不同治法中药配伍调节肾上腺皮质功能的作用。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 ICR 小鼠，SPF 级，72 只，体质量（20~22）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 2008001685524。

1.2 药物与试剂

氢化可的松，白色结晶粉末，批号 66003632，质量分数 99.8%，购自国药集团化学试剂有限公司；附子（批号 180427）、肉桂（批号 180818）、知母（批号 180823）、黄柏（批号 180829）、人参（批号 180904）、黄芪（批号 181008）、熟地黄（批号 180730）、山茱萸（批号 180910）8 味中药均购自上海康桥中药饮片有限公司；TRIzol、PrimeScript® RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™（TliRNaseH Plus）II 购自 TaKaRa 公司；采用 Primer3 v.0.4.0 在

线软件设计 β -actin、胆固醇侧链裂解酶（Cyp11a1）、21-羟化酶（Cyp21a1）、11 β -羟化酶 1（Cyp11b1）和 11 β -羟化酶 2（Cyp11b2）、酪氨酸羟化酶（Th）、多巴胺脱羧酶（Ddc）、多巴胺 β -羟化酶（Dbh）、苯乙胺-N-甲基转移酶（Pnmt）、类固醇合成急性调节蛋白（StAR）引物，见表 1，并委托 Life Technologies 公司合成；小鼠皮质酮 ELISA 试剂盒购自美国 Cayman 公司；促肾上腺皮质激素（ACTH）ELISA 试剂盒购自美国 Mdb 公司；小鼠肾上腺素 ELISA 试剂盒及去甲肾上腺素 ELISA 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所；低密度脂蛋白受体（LDLR）、B 族 I 型清道夫受体（SR-BI）、StAR 抗体均购自美国 Abcam 公司； β -actin 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 仪器

小鼠四诊设备包括：YLS-13A 型小鼠抓力测定仪（购自山东省医学科学院设备站）用于抓力检测；底部划有 5 cm×5 cm 方格（3 行×5 列=15 格）的实验笼用于旷场检测；ThermaCAM P30 型红外热像

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
β -actin	上游 TGTTACCAACTGGGACGACA 下游 GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	165
Cyp11a1	上游 ACTTCCGGTACTTGGGCTTT 下游 GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG	201
Cyp11b1	上游 GTATCGAGAGCTGGCAGAGG 下游 GGGTTGATGTCGTGTCAGTG	140
Cyp11b2	上游 CTGAACGCTATATGCCTCAGC 下游 AGTGTCTCCACCTGGAAGGTT	160
Cyp21a1	上游 CTCCGGCTATGACATCCCTA 下游 ACAGCCAAAGGATGGTGTTC	151
StAR	上游 TTGGGCATACTCAACAACCA 下游 GAAACACCTTGCCCCACATCT	103
Dbh	上游 AATCTGCAGCCTTTGCCTAA 下游 TTCAGCATCTGCCTCTGTTG	123
Ddc	上游 TGGCTGCTCGGACTAAAGTT 下游 TCCACCAATTAACCCAGCTC	140
Pnmt	上游 TCCTTGGTGGTTACGAGGTC 下游 ACACCTGCACCTCCATCTTC	123
Th	上游 CAGCTGGAGGATGTGTCTCA 下游 GGCATGACGGATGTACTGTG	141

仪器(购自美国 FLIR 公司)用于检测体表红外温度; QuantStudio™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); 5417R 型 Eppendorf 台式离心机(德国 Eppendorf 公司); Alpha 化学发光凝胶成像系统(Protein-Simple 公司)。

2 方法

2.1 分组与造模

小鼠适应性饲养 1 周后开始实验。随机分为对照组、模型组、附子-肉桂组、知母-黄柏组、人参-黄芪组和熟地-山茱萸组, 每组 12 只。除对照组外各组小鼠均 ig 给予 1.65 mg/(kg·d) 氢化可的松造模, 共 14 d, 对照组小鼠 ig 等体积灭菌水。

附子-肉桂组、知母-黄柏组、人参-黄芪组、熟地-山茱萸组小鼠每日分别 ig 给予含有 8.0、11.1、20.0、14.0 g/kg 相应药对的生药水煎剂。中药用量参考《中国药典》2015 年版, 如知母 6~12 g、黄柏 3~12 g, 每种药取中位数剂量即知母 9 g、黄柏 7.5 g, 依据药动学小鼠剂量为人用剂量 10 倍, 折算 30 g 小鼠每日用量为 0.33 g。从第 1 天造模开始给药, 持续 14 d。

2.2 小鼠四诊指标观测

在实验第 14 天, 运用本课题组创建的小鼠辨证论治实验方法学采集小鼠四诊信息, 主要包括小鼠一般外观表现、体质量、躯体不同部位红外温度、旷场实验小鼠活动度(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、腋温等表征信息, 然后进行计量化辨证^[9-11]。

2.3 小鼠脏器变化检测

实验第 15 天, 各处死每组小鼠 12 只, 称取脾脏、胸腺质量, 计算脏器指数(脾脏指数=脾脏质量/体质量, 胸腺指数=胸腺质量/体质量)。

2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测相关基因表达

取小鼠肾上腺组织, 按照 TRIzol 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 °C, 15 min; 85 °C, 5 s, 降至 4 °C 保存; PCR 扩增反应体系为 20 μL, 反应程序为 95 °C, 3 min; 95 °C, 5 s; 60 °C, 30 s, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析基因相对表达量。

2.5 ELISA 检测血清相关指标含量

取小鼠血清样本, 依据 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测血清皮质酮、促肾上腺皮质激素

(ACTH)、肾上腺素和去甲肾上腺素含量。

2.6 Western blotting 检测相关蛋白表达

取小鼠肾上腺组织, 采用 RIPA 裂解液处理组织, 收集蛋白质样品, 定量, 蛋白变性处理后进行聚丙烯酰胺电泳, 转膜, 封闭, 一抗孵育、洗涤、二抗孵育、再洗涤、显影等实验流程, 一抗稀释比例为 β-actin 1:20 000, LDLR 1:5 000, SR-BI、StAR 1:2 000。

2.7 数据分析

采用 GraphPad.Prism 7.0 软件进行作图及统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-way ANOVA 方差分析和 *t* 检验分析。

3 结果

3.1 小鼠四诊指标

3.1.1 小鼠体质量变化(阴盛衰程度) 实验开始时, 小鼠体质量在 29 g 左右。实验过程中对照组小鼠体质量平稳增长。与对照组比较, 氢化可的松造模的 5 组小鼠体质量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 1。

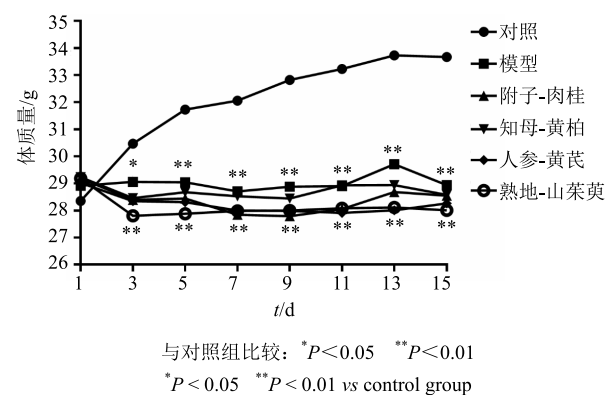


图 1 小鼠体质量变化

Fig. 1 Change of body mass of mice

3.1.2 小鼠旷场活动度及抓力差异(气盛衰程度) 与对照组比较, 模型组小鼠旷场活动度无显著变化, 附子-肉桂组和人参-黄芪组小鼠旷场活动度有上升趋势, 知母-黄柏组和熟地-山茱萸组小鼠旷场活动度有下降趋势。与对照组比较, 模型组小鼠抓力显著下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 附子-肉桂组小鼠抓力显著上升 ($P < 0.05$), 见表 2。

3.1.3 小鼠不同部位红外温度与腋温差异(阳盛衰程度) 各组小鼠腋温未出现显著性差异。与对照组比较, 其余各组小鼠头部最高温度、躯干平均温度均显著下降 ($P < 0.05$), 除了人参-黄芪组外, 小鼠尾部最低温度均显著下降 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 小鼠四诊指标 ($\bar{x} \pm s, n=12$)Table 2 TCM four diagnostic indexes of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	抓力/g	旷场活动度	腋温/℃	头部最高温度/℃	躯干平均温度/℃	尾部最低温度/℃
对照	—	157±17	37±10	37.2±0.5	35.3±0.5	30.4±0.5	27.4±0.6
模型	—	130±21*	38±13	37.0±0.5	34.7±0.5*	29.7±0.4*	26.6±0.5*
附子-肉桂	8.0	165±41 [#]	46±13	37.1±0.3	34.3±0.8*	29.1±0.5*	26.4±0.5*
知母-黄柏	11.1	151±23	35±9	37.3±0.3	34.5±0.4*	29.2±0.5*	26.3±0.5*
人参-黄芪	20.0	148±16	46±13	37.4±0.3	34.4±0.7*	29.4±0.7*	26.8±0.6
熟地-山茱萸	14.0	147±23	30±14	37.2±0.4	34.8±0.7*	29.2±0.3*	26.3±0.5*

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

3.2 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠脾脏、胸腺指数的影响

与对照组比较, 其余各组小鼠脾脏指数显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 附子-肉桂组和人参-黄芪组小鼠脾脏指数有上升趋势。与对照组比较, 其余各组小鼠胸腺指数均显著下降 ($P<0.01$)。与模型组比较, 人参-黄芪组胸腺指数有上升趋势, 见表 3。

表 3 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠脾脏、胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)Table 3 Effects of different Chinese materia medica pair on indexes of spleen and thymus in mice with hydrocortisone-induced syndrome ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脾脏指数/ (mg·g ⁻¹)	胸腺指数/ (mg·g ⁻¹)
对照	—	3.7±0.3	1.7±0.4
模型	—	2.7±0.3**	0.8±0.2**
附子-肉桂	8.0	3.0±0.6*	0.9±0.3**
知母-黄柏	11.1	2.7±0.3**	0.9±0.2**
人参-黄芪	20.0	3.0±0.6*	1.0±0.4**
熟地-山茱萸	14.0	2.7±0.3**	0.8±0.3**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

3.3 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠血清皮质酮、ACTH、肾上腺素、去甲肾上腺素水平的影响

与对照组比较, 其余各组小鼠血清皮质酮含量显著下降 ($P<0.01$); 与模型组比较, 知母-黄柏组小鼠血清皮质酮含量显著上升 ($P<0.01$), 人参-黄芪组和熟地-山茱萸组小鼠血清皮质酮含量显著下降 ($P<0.01$)。各组小鼠促肾上腺皮质激素含量未出现显著差异, 见表 4。

各组小鼠血清肾上腺素未出现显著差异。熟地-山茱萸组小鼠血清去甲肾上腺素显著低于对照组 ($P<0.05$), 见表 4。

3.4 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠肾上腺类固醇激素合成酶 mRNA 表达水平的影响

与对照组比较, 模型组小鼠肾上腺 StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1、Cyp11b2 mRNA 表达水平显著下调 ($P<0.01$)。与模型组比较, 附子-肉桂组小鼠 StAR、Cyp11b2 mRNA 表达水平显著上调 ($P<0.01$), Cyp11a1、Cyp21a1 mRNA 表达水平显著下调 ($P<0.01$); 知母-黄柏组小鼠 StAR、Cyp11b1、Cyp11b2 mRNA 表达水平显著上调 ($P<0.05$ 、 0.01); 熟地-山茱萸组小鼠 StAR、Cyp11a1、

表 4 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠血清皮质酮、ACTH、肾上腺素、去甲肾上腺素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)Table 4 Effects of different Chinese materia medica pair on serum corticosterone, ACTH, adrenaline, and noradrenaline levels in mice with hydrocortisone-induced syndrome ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	皮质酮/(pg·mL ⁻¹)	ACTH/(pg·mL ⁻¹)	肾上腺素/(ng·mL ⁻¹)	去甲肾上腺素/(nmol·mL ⁻¹)
对照	—	1 707±84	104±8	1 155±97	44.1±14.4
模型	—	348±79**	100±1	1 225±216	20.3±19.2
附子-肉桂	8.0	269±45**	95±2	1 155±268	51.6±38.2
知母-黄柏	11.1	674±121** ^{##}	105±8	1 198±220	41.6±40.7
人参-黄芪	20.0	162±41** ^{##}	102±10	939±53	27.8±9.0
熟地-山茱萸	14.0	97±12** ^{##}	97±5	1 043±189	11.7±16.9*

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group

Cyp21a1、Cyp11b1、Cyp11b2 mRNA 表达水平显著下调 ($P<0.05$ 、 0.01)，见表 5。

3.5 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠肾上腺皮质酮合成过程相关蛋白表达的影响

与对照组比较，模型组小鼠肾上腺 LDLR、SR-BI、StAR 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，附子-肉桂组小鼠 LDLR 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)，SR-BI、StAR 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)；知母-黄柏和人参-黄芪组

小鼠 LDLR 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)，SRBI、StAR 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)；熟地-山茱萸组小鼠 LDLR、SR-BI 及 StAR 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)，见图 2。

3.6 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠肾上腺素合成酶 mRNA 表达水平的影响

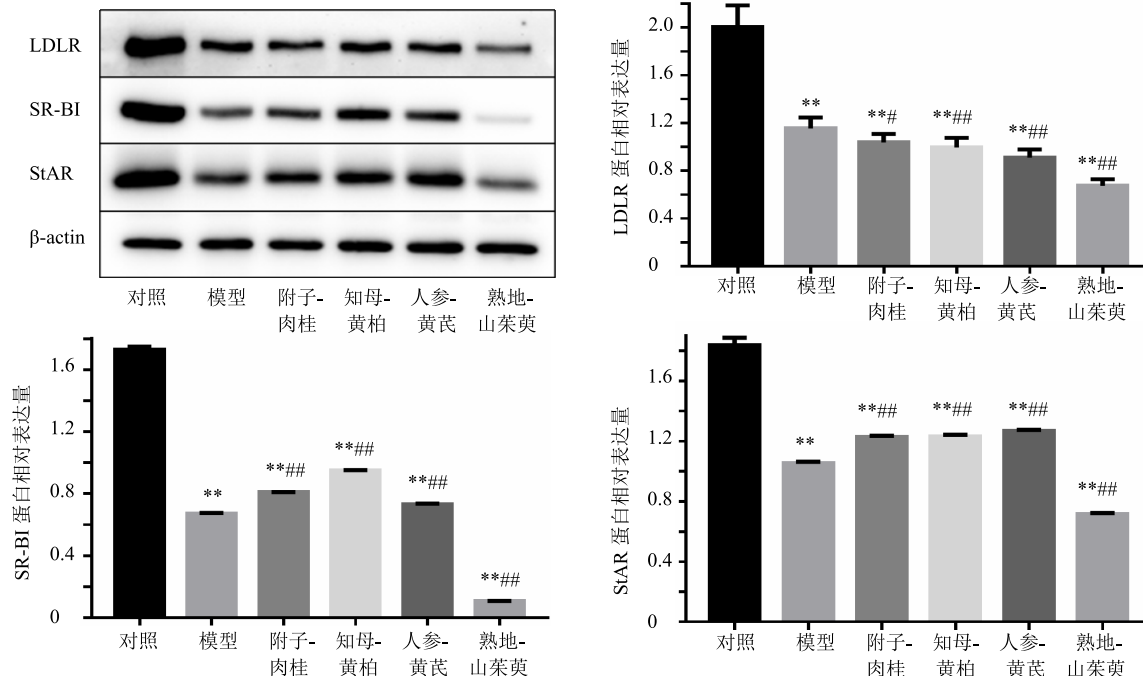
与对照组比较，氢化可的松组小鼠肾上腺 Th、Ddc、Dbh mRNA 表达水平显著上调 ($P<0.01$)。与模型组比较，附子-肉桂组和人参-黄芪组小鼠 Th、

表 5 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠肾上腺类固醇激素合成酶 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 5 Effects of different Chinese materia medica pair on mRNA expression of adrenal steroid hormone synthase in mice with hydrocortisone-induced syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量				
		StAR	Cyp11a1	Cyp21a1	Cyp11b1	Cyp11b2
对照	—	1.00±0.06	1.00±0.08	1.00±0.05	1.00±0.16	1.00±0.06
模型	—	0.47±0.01**	0.71±0.04**	0.52±0.03**	0.55±0.07**	0.85±0.02**
附子-肉桂	8.0	0.59±0.02**##	0.50±0.05**##	0.41±0.02**##	0.63±0.01**	1.00±0.05##
知母-黄柏	11.1	0.67±0.08**##	0.69±0.06**	0.59±0.02**	0.70±0.03**	1.02±0.04##
人参-黄芪	20.0	0.50±0.02**	0.70±0.05**	0.51±0.06**	0.56±0.02**	0.84±0.04**
熟地-山茱萸	14.0	0.27±0.03**##	0.42±0.05**##	0.27±0.03**##	0.31±0.03**##	0.75±0.07**##

与对照组比较：** $P<0.01$ ；与模型组比较：# $P<0.05$ ## $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group



与对照组比较：** $P<0.01$ ；与模型组比较：# $P<0.05$ ## $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group

图 2 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠肾上腺皮质酮合成过程相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Fig. 2 Effects of different Chinese materia medica pair on proteins expression associated with adrenal steroid hormone synthesis in mice with hydrocortisone-induced syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Dbh、Pnmt mRNA 表达水平均显著下调 ($P<0.05$ 、 0.01)，知母-黄柏组小鼠 Dbh mRNA 表达水平显著下调 ($P<0.01$)，熟地-山茱萸组小鼠 Th、Ddc mRNA

表达水平均显著下调 ($P<0.05$ 、 0.01)，熟地-山茱萸组小鼠 Dbh mRNA 表达水平显著上调 ($P<0.01$)，见表 6。

表 6 不同药对对氢化可的松药源性证候小鼠肾上腺素合成酶 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 6 Effects of different Chinese materia medica pair on mRNA expression of adrenaline synthase in mice with hydrocortisone-induced syndrome ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量			
		Th	Ddc	Dbh	Pnmt
对照	—	1.00±0.11	1.00±0.07	1.00±0.09	1.00±0.09
模型	—	1.96±0.58**	1.23±0.04**	1.66±0.07**	1.10±0.16
附子-肉桂	8.0	1.36±0.07 [#]	1.35±0.10**	0.94±0.04 ^{###}	0.59±0.07 ^{**##}
知母-黄柏	11.1	1.72±0.12*	1.16±0.03**	1.28±0.07 ^{###}	1.02±0.11
人参-黄芪	20.0	1.23±0.16 ^{###}	1.18±0.03**	1.33±0.09 ^{**##}	0.88±0.07 [#]
熟地-山茱萸	14.0	1.42±0.14 [#]	0.83±0.08 ^{**##}	1.95±0.22 ^{**##}	0.99±0.10

与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与模型组比较：[#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$ vs model group

4 讨论

本研究选择氢化可的松 1.65 mg/(kg·d) 给药 14 d，发现小鼠体质量显著下降、抓力下降、体温降低，脾脏和胸腺萎缩。肾上腺类固醇激素合成酶相关基因表达水平均下降 50% 左右，血清皮质酮含量低于正常水平的 1/3，肾上腺类固醇激素合成过程相关蛋白表达也显著下降，形成稳定的氢化可的松药源性证候模型小鼠，排除以药测证分析，该证候兼有气虚、阳虚、阴虚，其脏腑定位主要在肾藏象、脾藏象。

从中医四诊方面评价，体质量是中医“阴”盛衰程度的重要评价指标，体质量下降提示了机体物质基础的减少。在日饮食量稳定的情况下，氢化可的松能够显著抑制小鼠体质量的生长，造成体质量的下降，使得机体出现中医的阴虚见证。本实验结果显示，4 种不同治法对氢化可的松造成的小鼠体质量下降未见显著疗效，也提示氢化可的松造成的阴虚不是单一的阴虚证。小鼠旷场活动度和抓力体现机体“气”的盛衰程度。实验结果表明，氢化可的松对小鼠“气”有一定程度的损耗，助阳散寒法（附子-肉桂）有促进“气”增强的作用。体温可以最直观的体现机体的阳热程度。依据数据显示，氢化可的松造成小鼠头部最高温度、躯干平均温度和尾部最低温度下降，表现出明显的阳虚见证，补气生津法（人参-黄芪）对于氢化可的松造成小鼠阳虚见证有一定效果，而附子-肉桂这种助阳药物对于氢化可的松造成小鼠阳虚见证效果不显著，也提示氢

化可的松造成小鼠阳虚证不是单纯的阳虚证，而是兼有其他证候。

从脏器变化来看，氢化可的松能够显著降低小鼠脾脏以及胸腺指数，助阳散寒法（附子-肉桂）与补气生津法（人参-黄芪）对免疫系统有一定保护作用。

从相关分子变化来看，氢化可的松能够显著抑制小鼠血清皮质酮含量，滋阴泻火药对知母-黄柏对肾上腺皮质激素合成酶功能有显著的保护作用。StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1 和 Cyp11b2 是肾上腺中胆固醇转化为肾上腺类固醇激素过程中的一些重要酶。在氢化可的松造模情况下，助阳散寒药对附子-肉桂可促进 StAR、Cyp11b2 mRNA 表达，但造成 Cyp11a1、Cyp21a1 mRNA 表达水平下调。滋阴泻火药对知母-黄柏能够促进 StAR、Cyp11b1、Cyp11b2 mRNA 表达。而补血益精药对熟地-山茱萸对以上基因均有抑制作用。LDLR 是一种细胞表面糖蛋白，主要功能是结合低密度脂蛋白或其他含载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的脂蛋白，然后内吞入细胞，在胆固醇代谢中起关键作用^[12]。而 SR-BI 是高密度脂蛋白的受体，能够介导 HDL 胆固醇酯的选择性吸收^[13]。StAR 是胆固醇的一种转运蛋白，主要参与细胞内胆固醇的代谢转化为类固醇激素前体物质^[14]。滋阴泻火药对知母-黄柏能够显著缓解氢化可的松造成的 SR-BI 及 StAR 蛋白表达水平的下降，助阳散寒法（附子-肉桂）与补气生津法（人参-黄芪）对此也有一定效果，而补血益精药

对熟地-山茱萸加重了氢化可的松造成的 LDLR、SRBI 及 StAR 蛋白表达水平的下降。

酪氨酸被肾上腺髓质细胞摄取通过 Th 转化为多巴,再经过 Ddc 转化为多巴胺,多巴胺通过 Dbh 在细胞核中形成去甲肾上腺素,然后进一步经 Pnmt 的作用,使去甲肾上腺素甲基化形成肾上腺素。尽管糖皮质激素对肾上腺髓质功能无明显的影响,但是本研究发现氢化可的松造模后 Th、Ddc、Dbh 基因显著上调,说明氢化可的松给药后对小鼠可能产生一定的应激效应。助阳散寒药对附子-肉桂和补气生津药对人参-黄芪对于肾上腺素合成过程的基因影响一致,缓解了氢化可的松造成的应激。

综上,药性为寒性的滋阴泻火药对知母-黄柏纠正与保护轻度低下状态的肾上腺皮质功能效果最佳。进而提示小剂量(1.65 mg/kg)氢化可的松给药 14 d 诱发小鼠药源性证候以肾阴虚为主。

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] 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.
- [3] 万姜维, 刘 锋. 中医药治疗糖皮质激素副作用研究进展 [J]. 河南中医, 2016, 36(5): 914-917.
- [4] 钟天飞, 徐 莉, 李海昌. 中医角度浅析糖皮质激素与上火的关系 [J]. 山西中医学院学报, 2016, 17(2): 12-14.
- [5] 田 丽, 张 伟. 从少火壮火论浅析中药对糖皮质激素的增效减毒作用 [J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(1): 13-15.
- [6] 吴 斌. 糖皮质激素副作用的中医药研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 719-721.
- [7] 章 伟. 糖皮质激素治疗中的中医思维与对策 [J]. 医学理论与实践, 2017, 30(18): 2683-2684.
- [8] 范永升. 对中医药减轻激素副作用的思考与实践 [A] // 全国第十二届中西医结合风湿病学术会议论文汇编 [C]. 天津: 中国中西医结合学会, 2014.
- [9] 方肇勤, 潘志强, 汤伟昌, 等. 小鼠“四诊工作站”构建与操作标准探讨 [J]. 上海中医药大学学报, 2006, 20(1): 42-46.
- [10] 方肇勤, 潘志强, 付晓伶, 等. 小鼠四诊采集项目标准的建议 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(9): 692-694.
- [11] 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.
- [12] 杨洪雁, 苏双良, 付 晶, 等. 低密度脂蛋白受体基因研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(3): 141-146.
- [13] 常冠楠, 徐 新, 张社兵. B 类 I 型清道夫受体的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(9): 1126-1129.
- [14] 李 娟, 栾新红. 类固醇合成急性调节蛋白的生物学特性及作用研究概况 [J]. 动物医学进展, 2016, 37(1): 110-113.