

地黄-知母-黄柏配伍对药源性阴虚证小鼠肾上腺皮质功能的调节作用

李 亚, 潘志强*, 钱宏梁, 谢海纳, 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 研究地黄、知母、黄柏单独及配伍使用对药源性阴虚证小鼠肾上腺皮质功能的保护作用。方法 72 只雄性 ICR 小鼠随机分为对照组、模型组、地黄组、知母组、黄柏组、地黄-知母-黄柏组, 每组 12 只。采用 25 mg/(kg·d) 氢化可的松 ig 给予小鼠, 每日 1 次, 连续 5 d, 复制药源性阴虚证模型, 给药组分别 ig 给予地黄 [9.0 g/(kg·d)]、知母 [(6.0 g/(kg·d))、黄柏 [(5.0 g/(kg·d))、地黄-知母-黄柏配伍 [(6.7 g/(kg·d))] 的水煎药液, 连续给药 5 d。透射电子显微镜检测肾上腺皮质超微结构; ELISA 检测血清皮质酮; 实时荧光定量 PCR 技术检测肾上腺类固醇激素合成酶基因 (Star、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1)、胆固醇摄取基因 (Ldlr、Scarb1, 蛋白名 SRB1)、胆固醇合成限速酶基因 (Hmgcr)、胆固醇储存基因 (Acat1、Lipe)、胆固醇流出基因 (Abca1、Abcg1)、胆固醇稳态基因 (Nr1h3, 蛋白名 LXRα) 表达变化; Western blotting 检测肾上腺 LDLR、SRB1、LIPE、ACAT1、CYP11A1、StAR、LXRα 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠体质量、血清皮质酮水平平均显著下降 ($P<0.05$), 肾上腺束状带细胞出现典型的脂滴融合现象、线粒体萎缩; 氢化可的松显著抑制肾上腺皮质激素合成过程 Star、Cyp21a1、Cyp11b1、Ldlr、Scarb1、Acat1 基因表达 ($P<0.05$), 以及抑制 StAR、LDLR、SBR1 和 LXRα 蛋白表达, 促进 Abcg1 基因表达 ($P<0.05$)。与模型组比较, 各药物治疗后肾上腺束状带细胞未见明显的脂滴融合; 地黄、知母、黄柏单独治疗后显著抑制皮质酮分泌 ($P<0.05$); 地黄-知母-黄柏配伍显著提升 Star、Cyp11a1、Cyp21a1、Lipe、Abca1、Nr1h3 基因表达 ($P<0.05$), 并增强 CYP11A1、StAR、LDLR、SBR1 和 LXRα 蛋白表达。结论 地黄、知母、黄柏单独给药及其配伍治疗可通过调节胆固醇稳态平衡及恢复部分受抑制的皮质激素合成酶, 配伍给药更有助于改善受损伤的肾上腺皮质功能。

关键词: 地黄; 知母; 黄柏; 肾上腺皮质; 氢化可的松; 阴虚证; 类固醇激素合成酶; 胆固醇摄取; 胆固醇合成限速酶; 胆固醇储存; 胆固醇稳态

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-5019-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.021

Compatibility of *Rehmanniae Radix*, *Anemarrhenae Rhizoma* and *Phellodendri Chinensis Cortex* regulates adrenal function of mice with drug-induced *yin* deficiency syndrome

LI Ya, PAN Zhi-qiang, QIAN Hong-liang, XIE Hai-na, 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 *Rehmanniae Radix* (RR), *Anemarrhenae Rhizoma* (AR) and *Phellodendri Chinensis Cortex* (PCC) on adrenal function in mice with drug-induced *yin* deficiency syndrome. **Methods** A total of 72 male ICR mice were randomly divided into normal control group, hydrocortisone model group, RR treatment group, AR treatment group, PCC treatment group, and RR-AR-PCC compatibility treatment group, with 12 mice in each group. The mice were given 25 mg/(kg·d) hydrocortisone by intragastric administration once a day for 5 consecutive days to replicate the drug-induced *yin* deficiency syndrome model, and then administrated 9 g/(kg·d) RR, 6.0 g/(kg·d) AR, 5.0 g/(kg·d) PCC, 6.7 g/(kg·d) RR-AR-PCC compatibility of water decoction liquid for 5 d. The adrenal cortex was examined by transmission electron microscopy; Serum corticosterone were measured by ELISA; The expressions of Star, Cyp11a1, Cyp21a1, Cyp11b1, Ldlr, Scarb1, Hmgcr, Acat1, Lipe, Abca1, Abcg1, Nr1h3 genes were detected by

收稿日期: 2020-01-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81873212); 上海市科委项目 (19140905000)

作者简介: 李 亚 (1992—), 女, 硕士, 主要从事中医证候实验研究。Tel: 18616024392 E-mail: ly28@163.com

*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

real-time quantitative PCR. The expressions of LDLR, SRB1, LIPE, ACAT1, CYP11A1, StAR, LXR α protein were detected by Western blotting. **Results** Compared with the normal control group, the body weight and serum corticosterone levels of the mice were significantly decreased after 5 d of administration of 25 mg/(kg·d) hydrocortisone ($P < 0.05$). Adrenal gland zona fasciculate cells appeared fat droplet fusion and mitochondrial atrophy. Hydrocortisone significantly inhibited the expression of Star, Cyp21a1, Cyp11b1, Ldlr, Scarb1 and Acat1 genes expression in adrenocortical hormone synthesis ($P < 0.05$), and inhibited the expression of StAR, LDLR, SBR1 and LXR α proteins ($P < 0.05$), and promoted the Abcg1 gene expression ($P < 0.05$). Compared with the model group, no obvious lipid droplet fusion was observed in the adrenal gland zona fasciculate cells after each drug treatment; RR, AR and PCC significantly inhibit corticosterone secretion after treatment alone ($P < 0.05$); The combination of RR, AR and PCC significantly increased the expression of Star, Cyp11a1, Cyp21a1, Lipe, Abca1, Nr1h3 genes ($P < 0.05$), and enhanced the expression of CYP11A1, StAR, LDLR, SBR1 and LXR α proteins ($P < 0.05$). **Conclusion** RR, AR and PCC combination can improve the damaged adrenal function more than their alone by regulating cholesterol homeostasis and restoring partially inhibited corticosteroid synthase.

Key words: *Rehmanniae Radix*; *Anemarrhenae Rhizoma*; *Phellodendri Chinensis Cortex*; adrenal cortex; hydrocortisone; yin deficiency syndrome; steroid hormone synthase; cholesterol uptake; rate limiting enzyme of cholesterol synthesis; cholesterol storage; cholesterol homeostasis

证候是中医基础学长期探索的领域,本课题组既往的研究发现,糖皮质激素药物可以诱发典型的小鼠药源性虚证^[1-4],采用 25 mg/(kg·d) 及以上剂量氢化可的松短期给药后小鼠呈现类似临床阴虚证特征^[5]。临床相关报道表明大剂量使用激素后患者早期可呈现阴虚阳亢的病理状态^[6-7],因而临证拟方时往往选用滋阴清虚热的地黄、知母、黄柏等中药,以改善证候。

但是,临床药物发挥疗效的作用机制不明,本研究基于课题组长期围绕肾上腺皮质轴研究中医证候的物质基础,采用 25 mg/(kg·d) 氢化可的松 ig 给予小鼠 5 d 的方法复制药源性阴虚证小鼠模型,同步给予地黄、知母、黄柏单独或配伍药物治疗,从肾上腺皮质细胞超微结构及其合成与分泌皮质酮的生化过程深入研究滋阴类中药对肾上腺皮质功能的调节作用。

1 材料

1.1 实验动物

ICR 小鼠,雄性,体质量 22~23 g,72 只,购自上海西普尔-必凯实验动物有限责任公司,动物许可证号 SCXK(沪)2013-0016,动物合格证号 2008001685697,所有动物饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级饲养室,环境温度 22~25 °C,湿度 50%~60%,12 h 明暗交替,自由饮水,普通饲料喂养。

1.2 药物及试剂

氢化可的松,国药集团化学试剂有限公司,批号 66003632;知母(批号 180823)、黄柏(批号 180829)、地黄(批号 180910),3 味中药均购自上海康桥中药饮片有限公司,经上海中医药大学中药

学院崔亚君副教授鉴定符合药用标准。TRIzol 试剂、Prime Script[®] RT 试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TliRNaseH Plus) 试剂盒,日本 TaKaRa 公司;RIPA 裂解液、ECL 化学发光试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔/小鼠 IgG (H+L),上海碧云天生物试剂有限公司;小鼠皮质酮 ELISA 试剂盒(货号 501320),美国 Cayman 公司;低密度脂蛋白受体(LDLR)兔多克隆抗体(ab52818)、B 族 I 型清道夫受体(SRB1)兔多克隆抗体(ab52629)、类固醇合成急性调节蛋白(StAR)兔多克隆抗体(ab96637)、胆固醇侧链裂解酶(CYP11A1)兔多克隆抗体(ab175408)、胆固醇酰基转移酶 1(ACAT1)兔单克隆抗体(ab168342)、激素敏感性脂肪酶(LIPE)兔单克隆抗体(ab109400)、LXR 核受体家族成员(LXR α)兔单克隆抗体(ab176323),美国 Abcam 公司;小鼠 β -actin 单克隆抗体,美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 仪器

MP200B 型电子天平,上海良平仪器仪表有限公司;Eco-illumina 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Illumina 公司;Mini-PROTEAN Tetra 型电泳仪及转膜设备,美国 Bio-rad 公司;Alpha 化学发光凝胶成像系统,美国 ProteinSimple 公司;FEI TECNAI SPIRIT 透射电子显微镜(TEM),美国 FEI 公司。

2 方法

2.1 中药剂量确定及其制备

依据《中国药典》2015 年版中药饮片用法与用量,地黄 12~15 g、知母 6~12 g、黄柏 3~12 g,取常用量的中位数剂量,地黄 13.5 g、知母 9 g、黄柏 7.5 g,配伍组按照各单药 1/3 剂量配伍(即地黄

4.5 g、知母 3 g、黄柏 2.5 g)。分别称取各药材饮片 100 g, 分别采用 5 倍量纯净水浸泡 1 h, 煮沸后小火煎煮 45 min, 共煎煮 2 次, 2 次煎液混匀, 滤过后将药液浓缩至生药 1 g/mL 母液。考虑单一用药总剂量小于中药复方, 各组按照成人剂量 40 倍换算, 即每日小鼠给药量依据体质量换算为地黄 9 g/kg、知母 6.0 g/kg、黄柏 5.0 g/kg、地黄-知母-黄柏配伍 6.7 g/kg。

2.2 分组、造模及给药

小鼠适应性饲养 1 周, 体质量达 28~32 g 时, 随机分为对照组、模型组、地黄组、知母组、黄柏组、地黄-知母-黄柏组, 每组 12 只。采用 25 mg/(kg·d) 氢化可的松 ig 造模, 每日 9:00 时给予氢化可的松, 15:00 时给予相应剂量的药物水煎液, 连续给药 5 d, 对照组和模型组小鼠 ig 给予等量灭菌水。

2.3 体质量检测

第 6 天处死小鼠, 采用电子天平称量各组小鼠体质量。

2.4 血清皮质酮检测

摘眼球取血, 分离血清, 采用血清原液按照小鼠皮质酮 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测皮质酮含量。

2.5 肾上腺 TEM 检测

摘取小鼠肾上腺, 剥离周围脂肪组织, 置于预冷的 2.5%戊二醛中固定 2 h 后, 将肾上腺组织对半切开修整, 按照“缓冲液漂洗、1%锇酸固定、再漂洗、乙醇梯度脱水、100%丙酮浸透包埋处理, 再超薄切片、3%醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色”流程进行样品处理, 最后在透射电子显微镜 6 000 倍下观察细胞超微结构, 并拍照。

2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测相关基因的表达

取小鼠肾上腺组织, 加入 TRIzol 试剂抽提总 RNA。应用 Prime Script RT 试剂盒进行逆转录制备 cDNA, 逆转录反应体系为 60 μ L, 反应程序为 37 $^{\circ}$ C $\times$ 15 min, 85 $^{\circ}$ C $\times$ 5 s, 4 $^{\circ}$ C 终止。扩增反应体系为 20 μ L, 反应程序为 95 $^{\circ}$ C (变性) $\times$ 3 min, 95 $^{\circ}$ C (退火) $\times$ 30 s, 60 $^{\circ}$ C (延伸) $\times$ 30 s, 40 个循环。扩增引物由 Primer3 (v.0.4.0) 在线软件设计、美国 Life Technologies 公司合成, 引物序列见表 1。各组均设 4 个复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算分析, $\Delta C_t = C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 实验组}} - \Delta C_{t \text{ 对照组}}$; 目的基因 mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, C_t 为扩增 n 个循环荧光数值。

2.7 Western blotting 检测相关蛋白表达

取小鼠肾上腺组织, 置于预冷的 RIPA 裂解液中, 湿冰上超声裂解后, 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。采用 BCA 法测定总蛋白浓度。各孔取 12 μ g 蛋白上样, 于 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离 (浓缩胶电压 80 V, 30 min; 分离胶电压 120 V, 90 min)。将分离后的蛋白电转移 (恒流 250 mA, 150 min)。加入 5%脱脂奶粉于摇床上室温封闭 1.5 h (磷酸化蛋白 LIPE 加入 5% BSA 于摇床上室温封闭 1.5 h)。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 分别加入一抗抗体 (β -actin 体积稀释比例为 1:20 000, LXR α 、ACAT1 体积稀释比例为 1:1 000, StAR、LDLR、SRB1、CYP11A1 体积稀释比例均为 1:2 000, LIPE 体积稀释比例为 1:5 000), 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。次日先以 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。后加入 HRP 标记的山羊抗兔/小鼠 IgG (体积稀释比例为 1:2 000), 室温反应 1.5 h。再用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。按 ECL 试剂盒说明进行显影。

2.8 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析和作图, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两组间比较采用 LSD- t 检验。

3 结果

3.1 滋阴中药对小鼠体质量的影响

与对照组比较, 氢化可的松造模 5 d 后, 小鼠体质量显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地黄、知母、黄柏单独给药及配伍给药对小鼠体质量无明显影响, 见图 1。提示滋阴类中药对氢化可的松短期造模后小鼠体质量影响较小。

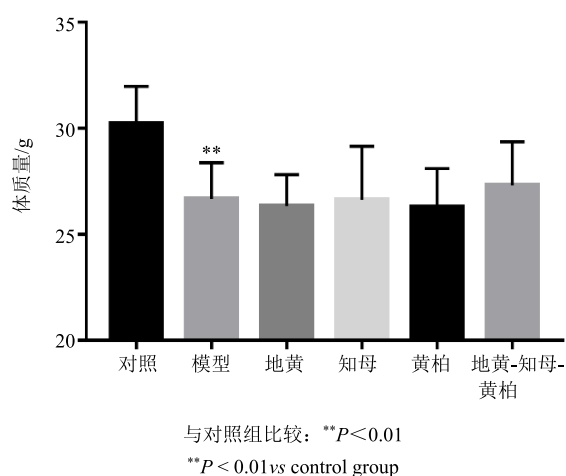
3.2 滋阴中药对小鼠肾上腺皮质超微结构的影响

对照组小鼠肾上腺皮质束状带细胞结构清晰, 细胞核染色质均一、核膜清楚完整, 细胞质内见丰富的脂滴、分布均匀, 线粒体数量多、呈卵圆形或球形、嵴密呈管泡状, 滑面内质网散在围绕在脂滴和线粒体周围。与对照组比较, 模型组小鼠肾上腺皮质细胞内可见脂滴融合现象, 线粒体体积缩小、嵴结构欠清晰, 脂滴与线粒体周围亚细胞器结构欠清晰, 可见细胞核固缩的凋亡小体。与模型组比较, 地黄、知母、黄柏单独及配伍给药后, 小鼠肾上腺皮质束状带细胞结构清楚, 细胞内未见明显的融合大脂滴, 线粒体体积缩小, 也可见细胞核固缩的凋

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	基因库号	引物序列	长度/bp
β -actin	NM_007393	上游: 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' 下游: 5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA-3'	165
Cyp21a1	NM_009995	上游: 5'-CTCCGGCTATGACATCCCTA-3' 下游: 5'-ACAGCCAAAGGATGGTGTTC-3'	151
Cyp11a1	NM_019779	上游: 5'-ACTTCCGGTACTTGGGCTTT-3' 下游: 5'-GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG-3'	201
Cyp11b1	NM_001033229	上游: 5'-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3' 下游: 5'-GGGTGATGTCGTGTCAGTG-3'	140
Star	NM_011485	上游: 5'-TTGGGCATACTCAACAACCA-3' 下游: 5'-GAAACACCTTGCCCACATCT-3'	103
Ldlr	NM_001252658	上游: 5'-TCCTGGAGATGTGATGGACA-3' 下游: 5'-GAGCCATCTAGGCAATCTCG-3'	158
Scarb1	NM_001205082	上游: 5'-AAGTGGTCAACCCAAACGAG-3' 下游: 5'-ACGGTGTCTGTTGTCATTGAA-3'	121
Hmgcr	NM_008255	上游: 5'-TGGAGATCATGTGCTGCTTC-3' 下游: 5'-GCGACTATGAGCGTGAACAA-3'	248
Lipe	NM_010719	上游: 5'-AGACACCAGCCAACGGATAC-3' 下游: 5'-ATCACCTCGAAGAAGAGCA-3'	239
Acat1	NM_144784	上游: 5'-TATTTCCACTCCATGCACCA-3' 下游: 5'-ATTGGACATGCTCTCCATCC-3'	133
Abca1	NM_013454	上游: 5'-AACAGTTTGTGGCCCTTTTG-3' 下游: 5'-AGTTCCAGGCTGGGGTACTT-3'	157
Abcg1	NM_009593	上游: 5'-GAAGTGGCATCAGGGGAGTA-3' 下游: 5'-AAAGAAACGGGTTACATCG-3'	124
Nr1h3	NM_001177730	上游: 5'-GCAGGACCAGCTCCAAGTAG-3' 下游: 5'-GGCTCACCAGCTTCATTAGC-3'	125

图 1 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Fig. 1 Body mass changes of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

亡小体, 其中, 黄柏对肾上腺皮质束状带细胞异常特征恢复效果最佳, 其次是地黄组、地黄-知母-黄柏组, 见图 2。提示滋阴类中药单独及配伍均有助于恢复氢化可的松对小鼠肾上腺皮质功能的损伤作

用, 但是配伍未见更显著的改善作用。

3.3 滋阴中药对小鼠肾上腺皮质酮分泌的影响

与对照组比较, 模型组小鼠血清皮质酮显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地黄、知母、黄柏单独给药 5 d 后加剧血清皮质酮水平下降趋势 ($P < 0.05$ 、 0.01), 而取单味药物各 1/3 剂量配伍给药组血清皮质酮水平下降趋势未加剧, 见图 3。

3.4 滋阴中药对小鼠肾上腺皮质酮合成过程的影响

3.4.1 皮质酮合成酶的基因与蛋白表达 与对照组比较, 模型组小鼠肾上腺皮质细胞 Star、Cyp21a1、Cyp11b1 基因表达均显著下降 ($P < 0.01$), StAR 蛋白完全被抑制; 与模型组比较, 地黄-知母-黄柏配伍给药后显著促进 Star、Cyp11a1、Cyp21a1 基因表达上调, 知母、黄柏及地黄-知母-黄柏配伍促进 CYP11A1 和 StAR 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 4。提示氢化可的松短期给药即可抑制肾上腺皮质细胞皮质激素合成, 地黄-知母-黄柏配伍有助于恢复被抑制的皮质激素合成酶。

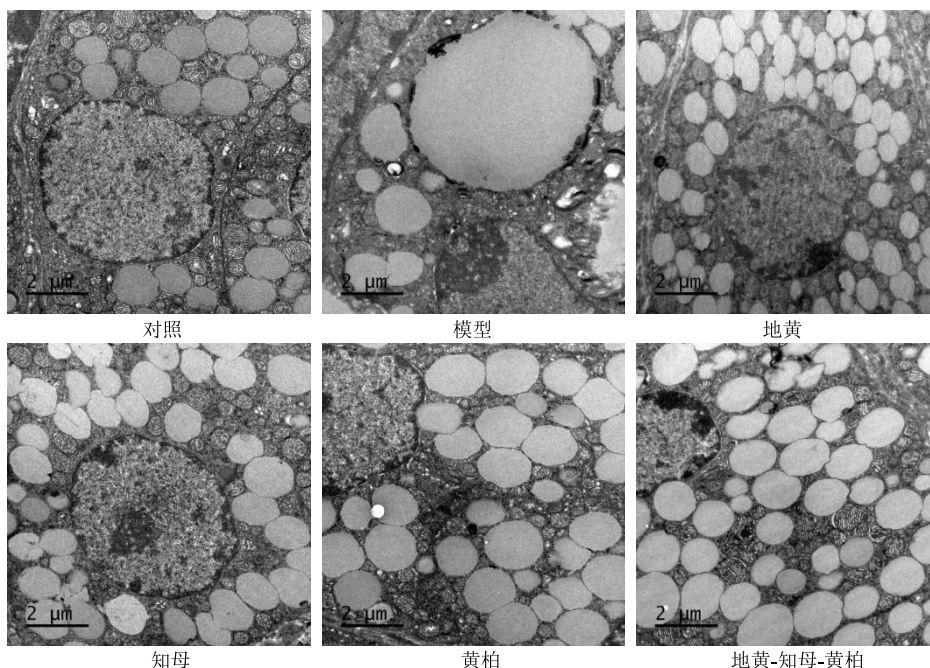
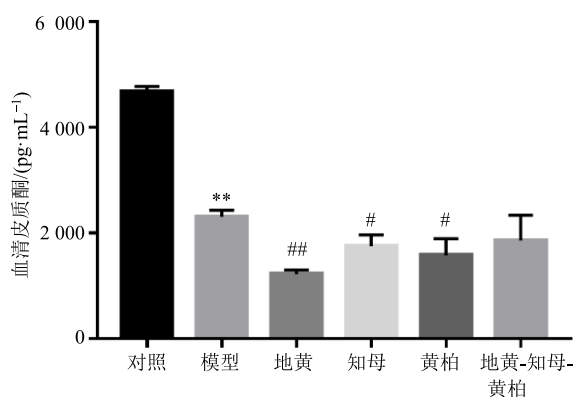


图 2 各组小鼠肾上腺皮质电镜形态

Fig. 2 Adrenal cortex electron microscopic morphology of mice in each group



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

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 3 各组小鼠血清皮质酮变化 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 3 Changes of serum corticosterone of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3.4.2 皮质酮合成前期胆固醇利用的变化

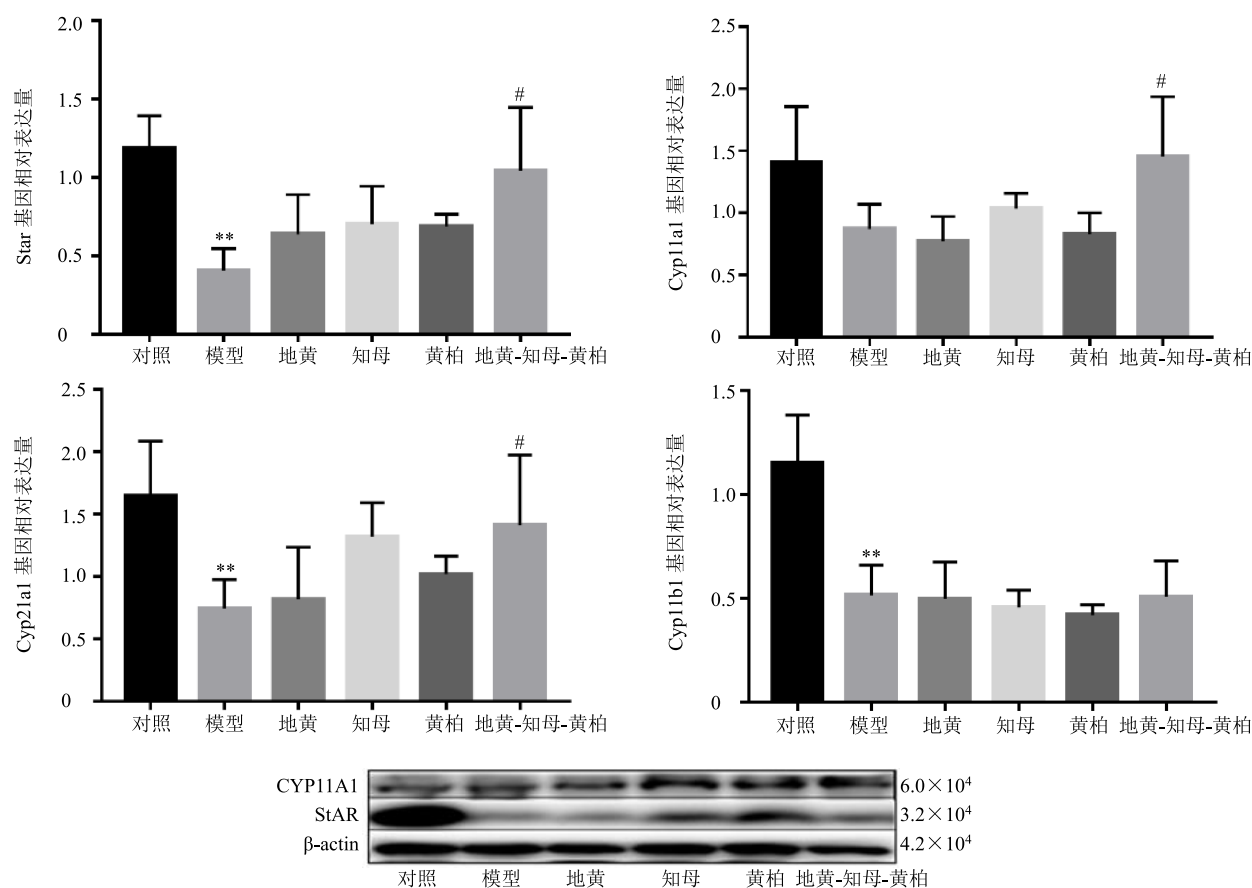
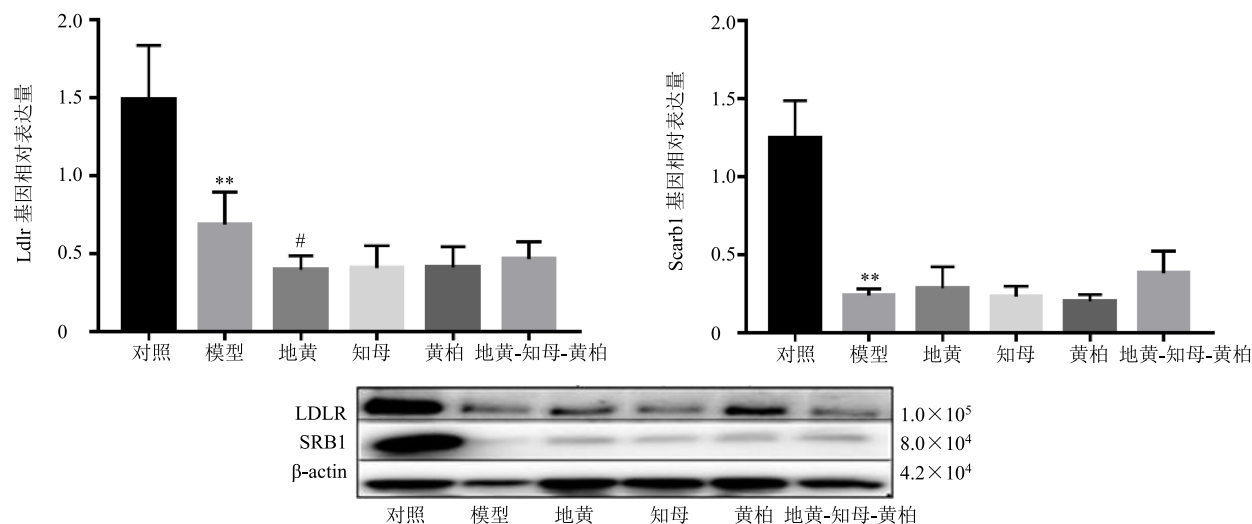
(1) 胆固醇摄取过程: 与对照组比较, 模型组小鼠肾上腺皮质细胞膜上摄取胆固醇的重要受体 Ldlr、Scarb1 基因与 LDLR、SRB1 蛋白表达均显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地黄治疗后更加显著抑制 Ldlr 基因表达 ($P < 0.05$), 见图 5。提示氢化可的松短期给药可抑制肾上腺皮质细胞利用血液中胆固醇, 地黄、知母、黄柏单独及配伍给药对细胞膜 Ldlr 和 Scarb1 基因与蛋白表达影响较弱。

(2) 胆固醇合成过程: 与对照组比较, 模型组小鼠肾上腺 Hmgcr 基因表达下降 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 地黄治疗后 Hmgcr 基因表达下降 ($P < 0.05$), 见图 6。由于 Hmgcr 参与细胞内胆固醇的自身合成过程, 提示地黄具有抑制肾上腺皮质细胞胆固醇合成过程的作用。

(3) 胆固醇储存过程: 与对照组比较, 氢化可的松显著抑制 Acat1 基因表达 ($P < 0.05$), 而 Lipe 基因与蛋白表达无明显变化; 与模型组比较, 地黄-知母-黄柏配伍给药后 Acat1、Lipe 基因表达显著上调 ($P < 0.05$), 滋阴中药均显著抑制 Acat1 蛋白表达 ($P < 0.05$), 见图 7。由于 Lipe 参与细胞内脂滴内酯化的胆固醇转化为游离胆固醇, 而 Acat1 参与游离胆固醇酯化后储存于脂滴, 提示地黄-知母-黄柏配伍有助于加速酯化胆固醇转化为游离胆固醇, 以供细胞应激状态下合成皮质激素。

(4) 胆固醇流出过程: 与对照组比较, 氢化可的松显著促进 Abcg1 基因表达 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 地黄-知母-黄柏配伍促进 Abca1 基因表达上调 ($P < 0.05$), 地黄、知母、黄柏单独及配伍给药后抑制 Abcg1 基因表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 8。由于 Abca1、Abcg1 参与细胞内胆固醇流出过程, 提示滋阴类中药可通过调节 Abcg1 基因表达抑制肾上腺皮质细胞内胆固醇流出的代谢过程。

(5) 调节胆固醇稳态分子表达: 与对照组比较,

图 4 各组小鼠皮质酮合成酶相关基因及蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Fig. 4 Gene and protein expression of corticosterone synthase of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)图 5 各组小鼠胆固醇摄取过程相关基因与蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Fig. 5 Changes in genes and protein expression related to cholesterol intake in mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

氢化可的松给药后 Nr1h3 基因表达无明显变化, 但是 LXR α 蛋白表达显著被抑制; 与模型组比较, 地黄-知母-黄柏配伍给药后促进 Nr1h3 基因及 LXR α 蛋白表达 ($P < 0.01$), 见图 9。由于 Nr1h3 (LXR α)

参与细胞内胆固醇稳态的调节, 提示地黄-知母-黄柏配伍有助于调节细胞内胆固醇稳态平衡。

4 讨论

本研究采用 25 mg/(kg·d) 氢化可的松短期 ig 给

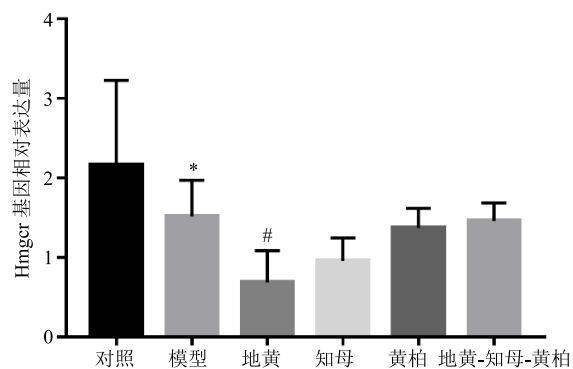
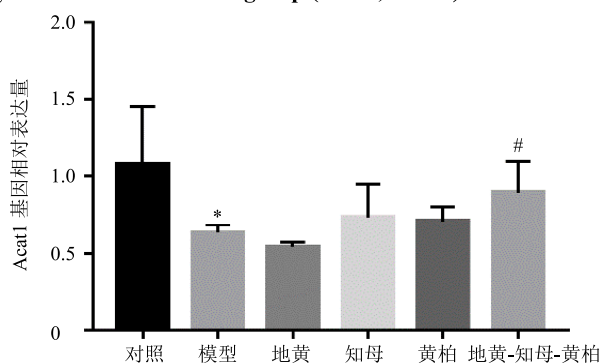


图 6 各组小鼠胆固醇合成基因表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 6 Changes in gene expression related to cholesterol synthesis in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)



予小鼠 5 d,发现小鼠体质量显著下降,肾上腺萎缩,电镜观察表现为皮质束状带细胞出现脂滴融合现象、线粒体萎缩等特征性变化,肾上腺皮质激素合成过程处于抑制状态,血液皮质酮分泌也明显受抑制,提示大剂量氢化可的松短期给药即可导致小鼠肾上腺皮质功能处于抑制状态,依据课题组前期的研究发现^[5],该“药源性虚证”类似于临床的阴虚证,脏腑定位在“脾与肾”。

临床上使用糖皮质激素治疗各种慢性疾病也常见诱发阴虚表现,因此,常采用滋阴清虚热法以求改善证候,如皮持衡教授^[6]用知柏地黄丸加味以纠正糖皮质激素引起的阴虚证候,汪贤聪等^[8]使用知

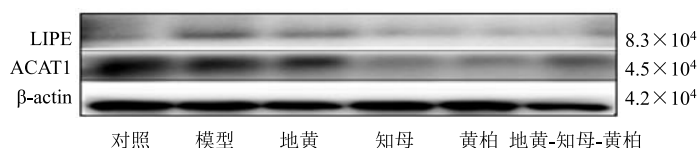
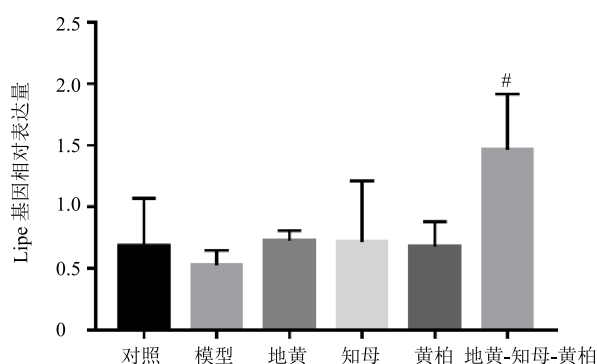


图 7 各组小鼠胆固醇储存相关基因与蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 7 Changes in cholesterol storage-related genes and protein expression in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

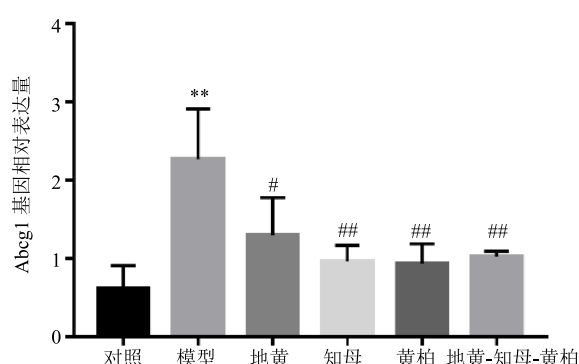
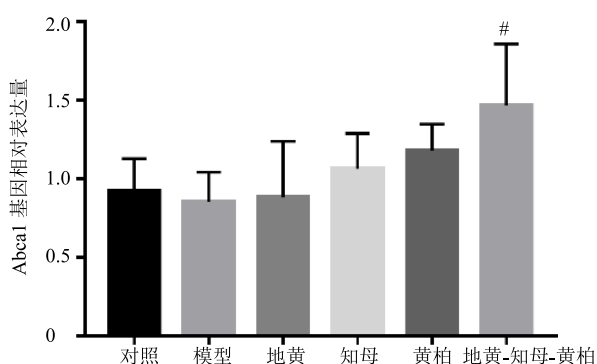


图 8 各组小鼠胆固醇流出相关基因表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 8 Changes in cholesterol efflux gene expression in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

柏地黄丸滋阴降火以改善医源性肾上腺皮质激素功能亢进症,余敏^[9]采用六味地黄丸缓解大剂量糖皮质激素冲击治疗时诱发的阴虚阳亢证候,然而,使用滋阴类中药改善证候的机制尚不清楚。前期研究发现知母黄柏药对可以显著纠正 1.65 mg/(kg·d) 氢

化可的松给药 14 d 导致的肾上腺皮质抑制情况^[10-11],基于此发现,本研究着重观察了地黄、知母、黄柏单独及其配伍使用对 25 mg/(kg·d) 氢化可的松短期抑制肾上腺皮质功能的调节作用。从肾上腺皮质束状带细胞电镜超微结果分析,氢化可的松造模后小

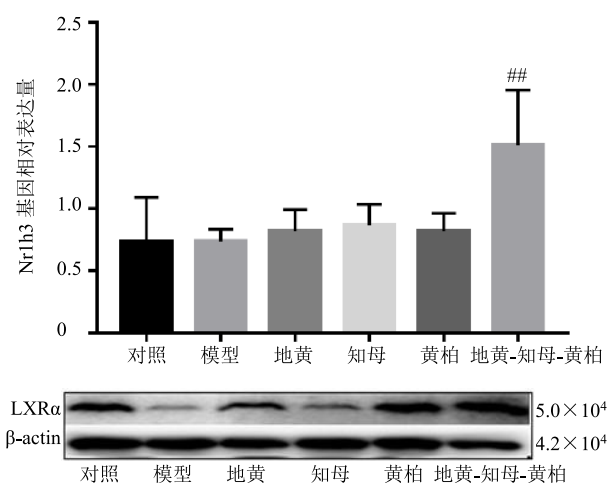


图 9 调节胆固醇稳态的 LXR α 基因与蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 9 Expression changes in LXR α gene and protein that regulates cholesterol homeostasis ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

鼠肾上腺皮质束状带细胞脂滴融合现象相对明显, 因胞浆内脂滴增大, 在有限的空间内挤压线粒体等亚细胞器, 导致线粒体体积缩小、嵴结构欠清晰, 脂滴与线粒体周围亚细胞器结构欠清晰, 地黄、知母、黄柏单独及配伍治疗后, 细胞内融合大脂滴明显减少, 尤其是黄柏、地黄单独治疗有助于恢复细胞内超微结构, 而地黄-知母-黄柏配伍治疗后线粒体嵴扩张相对明显, 因此滋阴类中药配伍将有助于修复氢化可的松所抑制的束状带细胞的超微结构, 从而为激素在线粒体内合成增加创造条件。

检测肾上腺皮质束状带细胞合成皮质酮的过程的分子表达变化, 因皮质酮合成主要由束状带细胞膜上 LDLR 和 SRB1 受体摄取血液中胆固醇, 并通过 StAR 蛋白转运到细胞内线粒体内, 在 CYP11A1 裂解酶的作用下合成孕烯醇酮, 然后经过 CYP21A1、CYP11B1 等酶的催化作用合成皮质酮。实验结果表明, 氢化可的松给药 5 d 后, 小鼠肾上腺 Ldlr、Scarb1、Star、Cyp21a1、Cyp11b1 基因表达均显著下降, LDLR、SBR1、StAR 蛋白完全被抑制, 提示 25 mg/(kg·d) 氢化可的松类似于临床大剂量冲击疗法短期即可严重抑制肾上腺皮质细胞激素合成的生化过程, 血液皮质酮含量下降, 进一步证实了肾上腺皮质功能处于抑制状态。然而, 采用地黄、知母、黄柏单独及配伍同步治疗后, 发现知母组对受抑制的激素合成酶恢复作用相对强, 但是统计分析无明显的优势, 地黄-知母-黄柏配伍治疗显著促进 Star、Cyp11a1、Cyp21a1 基因表达上调, 知

母、黄柏及地黄-知母-黄柏配伍后促进 CYP11A1 和 StAR 蛋白表达, LDLR 和 SBR1 蛋白表达也显著增强, 提示本研究采用的滋阴中药均有助于恢复被抑制的肾上腺皮质激素合成酶, 各单药药效相似, 而地黄-知母-黄柏配伍则显示更加明显的药效。类似研究报道有史正刚等^[12]采用知柏地黄丸治疗肾阴虚幼龄大鼠发现药物可有效拮抗外源性糖皮质激素对 HPA 轴的抑制作用, 王秀荣等^[13]发现六味地黄汤能提高氢化可的松所致肾阴虚小鼠的免疫功能。张凡等^[14]发现黄柏可有效改善肾阴虚模型大鼠肾上腺皮质功能。赵树进等^[15]发现知母提取物皂苷类物质对氢化可的松所致家兔皮质醇分泌无影响, 但可以调节升高的 β 肾上腺素受体。

由于皮质酮合成需要依赖胆固醇为原料, 因而, 进一步检测了皮质酮合成前期胆固醇利用相关分子表达情况。发现氢化可的松显著抑制 Acat1 基因表达、促进 Abcg1 基因表达上调, 由于 Acat1 参与游离胆固醇酯化后储存于脂滴过程, Abcg1 参与细胞内胆固醇流出过程, 提示氢化可的松容易导致细胞内游离胆固醇流动性增加。采用滋阴类中药治疗后, 地黄-知母-黄柏配伍治疗促进 Abca1、Lipe、Nrlh3 基因表达并增强 LXR α 蛋白表达; 但是抑制 Hmgcr、Abcg1 基因与 ACAT1 蛋白表达。由于 Lipe 参与细胞内脂滴内酯化的胆固醇转化为游离胆固醇, Hmgcr 参与细胞内胆固醇的自身合成过程, Abca1 也参与细胞内胆固醇流出过程, Nrlh3 (LXR α) 是调节细胞内胆固醇稳态的主要分子。提示滋阴类中药可通过增强 LXR α 表达调节细胞内胆固醇的稳态, 并通过调节 Abcg1 基因表达抑制肾上腺皮质细胞内胆固醇流出的代谢过程, 加速酯化胆固醇转化为游离胆固醇, 以供细胞应激状态下合成皮质激素, 尤其以地黄-知母-黄柏配伍效果更佳, 提示小剂量单药组成的配伍复方优于大剂量的单药药效。

综上所述, 短期内使用大剂量氢化可的松冲击给药也将导致肾上腺皮质功能处于抑制状态, 主要体现在肾上腺皮质束状带细胞脂滴融合和线粒体萎缩等超微结构变化及其合成皮质激素的重要功能分子表达低下。地黄、知母、黄柏单独给药及其配伍治疗可通过调节胆固醇稳态平衡及部分皮质激素合成酶, 其中配伍给药更有助于保护受损伤的肾上腺皮质功能。

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, 钱宏梁, 王晓敏, 等. 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 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(4): 480-485.
- [3] 钱宏梁, 潘志强, 王晓敏, 等. 不同剂量泼尼松龙诱发小鼠药源性虚证模型的证候特征 [J]. 中医杂志, 2019, 60(11): 957-963.
- [4] 钱宏梁, 潘志强, 王晓敏, 等. 不同剂量地塞米松诱发小鼠药源性虚证评价研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(2): 611-615.
- [5] 李 亚, 潘志强, 钱宏梁, 等. 短期大剂量氢化可的松诱发小鼠药源性证候的评价研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(2): 55-60.
- [6] 饶克瑯, 皮持衡. 皮持衡教授对激素毒副作用的中医病机探析及临证经验 [J]. 四川中医, 2011, 29(8): 9-10.
- [7] 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.
- [8] 汪贤聪, 郭志义, 朱小红. 知柏地黄丸减轻大剂量激素应用后不良反应的临床观察 [J]. 湖北中医杂志, 2000, 22(8): 16.
- [9] 余 敏. 知柏地黄丸对泼尼松副作用的影响 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2013, 23(3): 163-164.
- [10] 钱宏梁, 潘志强, 李 亚, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2383-2389.
- [11] 钱宏梁, 潘志强, 李 亚, 等. 补肾健脾法对氢化可的松诱发的脾肾虚证小鼠肾上腺功能的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(2): 334-343.
- [12] 史正刚, 潘翌翌, 张士卿. 知柏地黄丸对肾上腺皮质激素型肾阴虚幼龄大鼠血浆 CORT、ACTH、CRH 及肾上腺指数和组织学结构的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(3): 167-171.
- [13] 王秀荣, 张永红, 王秀英, 等. 六味地黄汤对糖皮质激素肾阴虚模型免疫功能的影响 [J]. 河北医科大学学报, 2005, 26(6): 451-452.
- [14] 张 凡, 徐 珊, 刘蓬蓬, 等. 黄柏不同炮制品对甲亢型肾阴虚模型大鼠甲状腺和肾上腺皮质功能的影响 [J]. 中国药房, 2017, 28(1): 27-30.
- [15] 赵树进, 韩丽萍, 李俭洪. 知母皂苷及其苷元对动物模型 β 肾上腺素受体的调整作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(2): 70-73.