

六味地黄汤和桂附地黄汤对小剂量氢化可的松减停药后致小鼠药源性虚证的调节作用

李亚, 潘志强*, 钱宏梁, 谢海纳, 方肇勤
(上海中医药大学 基础医学院, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究补肾复方对小剂量氢化可的松减停药诱发的小鼠证候及肾上腺皮质功能的影响。方法: 48只雄性ICR小鼠随机分为正常组、氢化可的松组、六味地黄汤组、桂附地黄汤组, 每组12只。每组给予 $1.32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 氢化可的松28 d减半剂量7 d停止用药14 d造模, 减量及停药阶段同步给予相应组六味地黄汤药液 $12.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 桂附地黄汤药液 $13.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续21 d。实验第28, 49天采用小鼠辨证论治实验方法学检测小鼠表征信息(抓力、体表红外温度); 在实验第50天处死小鼠取材, 摘取脾脏、胸腺, 计算脾脏与胸腺脏器指数; 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清皮质酮含量; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)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), 细胞色素P450家族21亚家族A多肽1(Cyp21a1), 细胞色素P450家族11亚家族b多肽1(Cyp11b1), 低密度脂蛋白受体(Ldlr), B类I型清道夫受体(Scarb1/SRBI), 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(Hmgcr), 酰基辅酶A-胆固醇酰基转移酶-1(Acat1), 激素敏感性脂肪酶(HSL/LIPE), 胰岛素诱导基因1(Insig1), 固醇调节元件结合转录因子2(Srebf2) mRNA表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测低密度脂蛋白受体(LDLR), B类I型清道夫受体(Scarb1/SRBI), 胆固醇侧链裂解酶(CYP11A1), 胆固醇21-羟化酶(CYP21A2)蛋白表达。结果: 与正常组比较, 连续给药28 d后, 模型组小鼠体质量与躯体平均红外温度均显著下降($P < 0.01$); 减停药造模后, 模型组小鼠抓力明显下降($P < 0.05$), 胸腺指数显著升高($P < 0.01$), 血清皮质酮含量明显降低($P < 0.05$), 肾上腺Cyp21a1, Hmgcr mRNA表达明显下降($P < 0.05, P < 0.01$), Lipe, Acat1 mRNA表达显著上升($P < 0.01$), 肾上腺CYP11A1, SRBI蛋白表达显著下降, LDLR蛋白表达上升。与模型组比较, 中药治疗21 d后, 桂附地黄汤组小鼠体质量显著下降($P < 0.01$); 六味地黄汤组小鼠脾脏指数显著下降($P < 0.01$); 桂附地黄汤组Cyp11a1, Cyp21a1, Acat1, Lipe mRNA表达明显上升($P < 0.05, P < 0.01$), Ldlr, Scarb1 mRNA表达明显下降($P < 0.05$), 六味地黄汤组Ldlr, Acat1, Lipe mRNA表达明显下降($P < 0.05, P < 0.01$); 六味地黄汤及桂附地黄汤组CYP11A1, SRBI蛋白表达上升。结论: 桂附地黄汤可通过纠正肾上腺皮质激素合成酶的表达, 以促进药源性虚证小鼠肾上腺皮质功能恢复。

[关键词] 补肾; 六味地黄汤; 桂附地黄汤; 氢化可的松; 肾上腺皮质; 证候; 小鼠

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0063-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200902

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200206.1517.005.html>

[网络出版日期] 2020-2-6 17:23

Regulatory Effect of Liuwei Dihuangtang and Guifu Dihuangtang on Low-dose Hydrocortisone Reduction and Discontinuance in Mice with Drug-induced Deficiency Syndrome

LI Ya, PAN Zhi-qiang*, QIAN Hong-liang, XIE Hai-na, FANG Zhao-qin

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

[收稿日期] 20191021(003)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873212); 上海市科委实验动物专项(19140905000)

[第一作者] 李亚, 在读硕士, 从事中医证候实验研究工作, E-mail: ly28@163.com

[通信作者] *潘志强, 博士, 教授, 博士生导师, 从事实验中医教学与中医基础实验研究及中医内科杂病诊治工作, Tel: 021-51322116, E-mail: pzq527@163.com

[Abstract] **Objective:** To study the effect of the kidney-tonifying recipes on mouse syndrome and adrenal function induced by low-dose hydrocortisone reduction and discontinuation. **Method:** The 48 male ICR mice were randomly divided into normal control group, hydrocortisone group, Liuwei Dihuangtang group and Guifu Dihuangtang group, with 12 rats in each group. Each group was given $1.32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ hydrocortisone for 28 days, and half a dose for 7 days, and the administration was discontinued 14 days before modeling. In the reduction and discontinuation phase, $12.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Liuwei Dihuangtang and $13.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Guifu Dihuangtang were simultaneously administered to the corresponding group for 21 d. On the 28th and 49th day of the experiment, the characteristic information of mice was detected by the experimental methodology of syndrome differentiation and treatment in mice (holding power, body surface infrared temperature). The mice were sacrificed on the 50th day of the experiment, the spleen and thymus were separated, and the spleen and thymus index were calculated, serum corticosterone content is measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the total RNA of the adrenal gland was extracted, and the expressions of Star, cholesterol-side-chain cleavage enzyme (Cyp11a1), Cyp21a1, Cyp11b1, low-density lipoprotein receptor (Ldlr), scavenger receptor class B type I (Scarb1/SRB1), Hmgcr, acyl-CoA-cholesterol acyltransferase-1 (Acat1), hormone sensitive lipase (Lipe/HSL), insulin-inducible gene 1 (Insig1) and sterol regulatory element binding transcription factor 2 (Srebf2) were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). Western blot was used to detect the expressions of LDLR, SRB1, CYP11A1 and cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (CYP21A2) in adrenal gland. **Result:** Compared with the normal control group, the body weight and the body mean infrared temperature of the model group were significantly decreased after 28 days of continuous administration ($P < 0.01$). After the administration of the drug, the mice in the model group showed a significant decrease in the grip strength ($P < 0.05$), a significant increase in the thymus index ($P < 0.01$), a significant decrease in the serum corticosterone content ($P < 0.05$). Expressions of adrenal Cyp21a1 and Hmgcr genes decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Lipe and Acat1 gene expressions increased significantly ($P < 0.01$), adrenal CYP11A1, SRBI protein expressions decreased significantly, and LDLR protein expression increased. Compared with the model group, the body weight of Guifu Dihuangtang group decreased significantly after 21 days of treatment with traditional Chinese medicine ($P < 0.01$), the spleen index of Liuwei Dihuangtang group decreased significantly ($P < 0.01$), expressions of Cyp11a1, Cyp21a1, Acat1 and Lipe genes in Guifu Dihuangtang group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), expressions of Ldlr and Scarb1 genes were significantly decreased ($P < 0.05$), and expressions of Ldlr, Acat1 and Lipe genes in Liuwei Dihuangtang group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and expressions of CYP11A1 and SRBI proteins in Liuwei Dihuangtang and Guifu Dihuangtang increased. **Conclusion:** Guifu Dihuangtang can promote the recovery of adrenal function in mice with drug-induced deficiency syndrome by correcting expression of adrenal cortex synthase.

[Key words] kidney-tonifying; Liuwei Dihuangtang; Guifu Dihuangtang; hydrocortisone; adrenal cortex; syndrome; mouse

证候是中医学的核心内容,也是中医基础理论研究的重点。中医学界很早就开展了对证候动物模型及其物质基础的研究。糖皮质激素因其具有强大的抗炎、抗毒、抗休克作用而在临床上被广泛应用,但治疗疾病的同时也带来诸多副作用,如继发性感染、消化道系统疾病、心血管系统疾病、类柯兴综合征、神经精神症状、骨关节并发症、诱发眼病等^[1-2],从中医角度来讲,患者在减量及停用激素

阶段常出现阴阳两虚证候,此时,常采用桂附地黄汤(金匱肾气丸)、六味地黄丸等补肾复方以减轻激素副作用^[3-4]。目前,潘志强教授课题组开展了大量的研究工作^[5-11],发现采用 $1.32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 氢化可的松连续给药 28 d,减半剂量给药 7 d,停止给药 14 d后,小鼠在激素维持给药期间出现典型的肾虚证状态,停止给药 14 d后,小鼠表征信息恢复快,但肾上腺皮质激素分泌功能难以恢复正常。本研究

基于前期实验,拟采用经典的补肾复方(桂附地黄汤、六味地黄汤)干预小剂量氢化可的松连续及减停给药所诱发的药源性证候小鼠,观察补肾治法对小鼠证候改善及其肾上腺皮质功能的影响。桂附地黄汤(金匱肾气丸)出自《金匱要略》,具有温补肾阳功效;六味地黄汤出自《小儿药证直诀》,具有滋补肾阴作用,有报道桂附地黄汤与六味地黄汤对肾上腺皮质轴功能具有调节作用^[12-14],但是未见报道此复方如何调节肾上腺皮质激素合成过程。本研究将着重比较2个补肾复方对氢化可的松所致药源性证候的影响及其肾上腺皮质功能的调节作用,报道如下。

1 材料

1.1 动物 48只ICR小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限责任公司,雄性,体质量22~23 g,动物合格证号SCXK(沪)2013-0016,动物合格证编号2008001685769,本研究获得上海中医药大学动物福利与伦理委员会批准(编号为PZSHUTCM190531019),所有动物均养于上海中医药大学实验动物中心SPF级饲养室。

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);熟地黄、山药、泽泻、牡丹皮、山茱萸、茯苓、肉桂、附子(批号分别为180816, 180814-2, 180711-2, 180715, 180709, 180820, 180531, 180709),8味中药均购自上海中医药大学附属曙光医院并经上海中医药大学药学院崔亚君副教授鉴定符合药用标准;trizol试剂,PrimeScript[®]RT试剂盒,SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TliRNaseH Plus)试剂盒(日本TaKaRa公司,批号分别为AI91727A, AIE0428A, AIF2225A);细胞裂解液,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔,小鼠免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(上海碧云天生物试剂有限公司,批号分别为P0013C, A0208, A0216);ECL化学发光试剂盒(上海圣尔生物科技有限公司,批号20181010);小鼠皮质酮酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国Cayman公司,批号501320);低密度脂蛋白受体(LDLR),B族I型清道夫受体(SRBI),胆固醇侧链裂解酶(CYP11A1),胆固醇21-羟化酶(CYP21A1)一抗(美国Abcam公司,批号分别为ab52818, ab52629, ab175408, ab232701);小鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国Sigma-Aldrich公司,批号122M4782)。

1.3 仪器 MP200B型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);Eco-illumina型实时荧光定量聚合酶

链式反应(Real-time PCR)仪(美国Illumina公司);PowerPac[™]Basic型电泳仪,Mini PROTEAN[®]Tetra Cell型转膜设备(美国Bio-Rad公司);Hybrid HY8300型化学发光凝胶成像系统(美国Protein Simple公司)。

2 方法

2.1 中药剂量确定及水煎液制备 依据《中国药典》(2015年版)中药饮片用法与用量,六味地黄汤:熟地黄24 g,山萸肉12 g,干山药12 g,泽泻9 g,牡丹皮9 g,茯苓9 g,共75 g;桂附地黄汤:干地黄24 g,山茱萸12 g,山药12 g,泽泻9 g,牡丹皮9 g,茯苓9 g,肉桂3 g,附子3 g,共81 g。分别称量75 g和81 g药材,采用5倍量纯净水浸泡2 h,然后煮沸后小火煎煮30 min,共煎煮2次,2次煎液混匀,过滤后将六味地黄汤药液浓缩至 $1.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,桂附地黄汤药液浓缩至 $1.62 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。各组按照成人公斤体质量10倍剂量灌胃。即每日小鼠灌胃量依据体质量给六味地黄汤 $12.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,桂附地黄汤药液 $13.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

2.2 分组与造模 小鼠适应性饲养1周,体质量达28~32 g时,随机分为正常组、氢化可的松组,六味地黄汤组、桂附地黄汤组,每组12只。采用 $1.32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 氢化可的松灌胃小鼠,每日上午9:00造模,连续28 d;第29天每日上午9:00采用 $0.66 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 氢化可的松灌胃小鼠^[15-17],每日下午3:00给予六味地黄汤药液 $12.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,桂附地黄汤药液 $13.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连续7 d;第36天起各组停止给予氢化可的松,六味地黄汤组和桂附地黄汤组继续使用中药治疗,连续21 d。

2.3 四诊指标检测 给药后第28,49天,采用课题组创建的小鼠辨证论治实验方法学,运用小鼠抓力测定仪测量小鼠四肢抓力;红外热像仪采集小鼠左侧面照片并用ThermaCAM Reporter 2000软件分析其头部最高温度、躯干平均温度及尾部最低温度等表征信息,再进行计量化辨证,具体方法参见文献^[18]。

2.4 脏器指数检测 第50天处死各组小鼠,摘取每只小鼠脾脏、胸腺,称质量,计算脏器指数。

$$\text{脾脏指数} = \frac{\text{脾脏质量}(\text{mg})}{\text{体质量}(\text{g})}$$

$$\text{胸腺指数} = \frac{\text{胸腺质量}(\text{mg})}{\text{体质量}(\text{g})}$$

2.5 血清皮质酮检测 摘眼球取血, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 $4\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,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。

2.6 Real-time PCR检测肾上腺相关基因表达 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40 μL,反应程序为37°C 15 min,85°C 5 s,4°C终止。扩增反应体系为20 μL,反应程序为95°C变性3 min,95°C退火30 s,60°C延伸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,目的基因分别为肾上腺类固醇合成急性调节蛋白(Star),胆固醇侧链裂解酶(Cyp11a1),细胞色素P450家族21亚家族A多肽1(Cyp21a1),细胞色素P450家族11亚家族b多肽1(Cyp11b1),低密度脂蛋白受体(Ldlr),B类I型清道夫受体(Scarb1/SRBI),3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(Hmgcr),酰基辅酶A-胆固醇酰基转移酶-1(Acat1),激素敏感性脂肪酶(HSL/Lipe),胰岛素诱导基因1(Insig1),固醇调节元件结合转录因子2(Srebf2),采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算分析目的mRNA相对表达量。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测LDLR,SRBI,CYP11A1,CYP21A2蛋白的表达 取小鼠肾上腺组织,置于装有RIPA裂解液500 μL的离心管中,冰上超声研磨后,4°C条件下14 000 r·min⁻¹离心15 min,收集上清液。采用BCA法测定总蛋白浓度。每孔取15 μg蛋白上样,在10%SDS-PAGE凝胶中进行蛋白分离(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)。5%脱脂奶粉封闭1.5 h。洗膜(用TBST溶液摇床上清洗3次,每次10 min),分别加入一抗抗体(β -actin稀释比例为1:2万,LDLR,SRBI,CYP11A1,CYP21A2稀释比例为1:2 000),4°C孵育过夜。次日洗膜,后加入HRP标记的山羊抗兔/小鼠IgG(1:2 000),室温摇床孵育1.5 h。洗膜。依据说明书滴加显色剂进行曝光。Image J软件测定各目的条带及内参的灰度值,计算目的蛋白的相对表达含量。

2.8 统计学方法 实验数据采用GraphPad Prism7.0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,组间两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对药源性虚证小鼠体质量的影响 在整个实验过程中,正常组小鼠体质量平稳增长。与正常组

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
β -actin	上游 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	165
	下游 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'	
Cyp11a1	上游 5'-ACTTCCGGTACTTGGGCTTT-3'	201
	下游 5'-GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG-3'	
Cyp11b1	上游 5'-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3'	140
	下游 5'-GGGTTGATGTCGTGTCAGTG-3'	
Cyp21a1	上游 5'-CTCCGGCTATGACATCCCTA-3'	151
	下游 5'-ACAGCCAAAGGATGGTGTTC-3'	
Star	上游 5'-TTGGGCATACTCAACAACCA-3'	103
	下游 5'-GAAACACCTTGCCACATCT-3'	
Ldlr	上游 5'-TCCTGGAGATGTGATGGACA-3'	158
	下游 5'-GAGCCATCTAGGCAATCTCG-3'	
Scarb1	上游 5'-AAGTGGTCAACCCAAACGAG-3'	121
	下游 5'-ACGGTGTCTGTTGTCATTGAA-3'	
Hmgcr	上游 5'-TGGAGATCATGTGCTGCTTC-3'	248
	下游 5'-GCGACTATGAGCGTGAACAA-3'	
Lipe	上游 5'-AGACACCAGCCAACGGATAC-3'	239
	下游 5'-ATCACCTCGAAGAAGAGCA-3'	
Acat1	上游 5'-TATTTCCACTCCATGCACCA-3'	133
	下游 5'-ATTGGACATGCTCTCCATCC-3'	
Insig1	上游 5'-ACCTGGGAGAACCACACAAG-3'	178
	下游 5'-CTTCGGGAACGATCAAATGT-3'	
Srebf2	上游 5'-GGATCTCCCAAAGAAGGAG-3'	147
	下游 5'-TTCCTCAGAACGCCAGACTT-3'	

比较,给予氢化可的松造模14 d后,各组小鼠体质量明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),直至减半剂量0.66 mg·kg⁻¹·d⁻¹造模7 d(即至实验第35天),各组小鼠体质量显著降低($P < 0.01$),第36~49天停止给予氢化可的松后,小鼠体质量呈现快速恢复现象;与模型组比较,给予中药治疗21 d后,六味地黄汤组小鼠体质量明显升高,但差异无统计学意义,桂附地黄汤组小鼠体质量显著下降($P < 0.01$)。见表2。

3.2 对药源性虚证小鼠抓力的影响 与正常组比较,给予氢化可的松28 d后,小鼠抓力下降,撤停给药后,模型组小鼠抓力仍显著下降($P < 0.01$)。与模型组比较,六味地黄汤组和桂附地黄汤组小鼠抓力升高,但差异无统计学意义。见表3。

3.3 对药源性虚证小鼠体表红外温度变化的影响 与正常组比较,给予氢化可的松28 d后,各组

表 2 补肾复方对药源性虚证小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Effect of kidney compound on body weight in mice with drug deficiency syndrome(DDS)($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d
正常	-	26.76±2.31	30.05±2.71	32.49±3.10	33.32±3.01	33.76±3.05	33.55±3.79	33.80±3.32	34.75±3.13
氢化可的松	-	27.10±1.22	28.05±1.17 ¹⁾	28.75±1.27 ²⁾	29.20±1.21 ²⁾	29.95±2.46 ²⁾	29.94±1.17 ²⁾	31.60±1.66	32.89±2.95
六味地黄汤	12.50	27.16±1.24	28.07±1.63	29.15±1.57 ²⁾	29.75±1.95 ²⁾	29.80±1.80 ²⁾	29.92±1.65 ²⁾	31.45±1.64 ¹⁾	33.80±1.73
桂附地黄汤	13.50	26.95±1.30	27.67±1.68	27.89±1.90 ²⁾	28.16±1.72 ²⁾	28.56±1.67 ²⁾	28.3±1.89 ²⁾	30.08±2.05 ²⁾	30.61±3.22 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.05$;与氢化可的松组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表 3~8 同)。

表 3 补肾复方对药源性虚证小鼠抓力的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of kidney compound on holding power in mice with DDS($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	28 d	49 d
正常	-	206.11±75.93	170.61±27.62
氢化可的松	-	161.21±48.14	132.53±30.80 ⁴⁾
六味地黄汤	12.50	148.63±25.18 ³⁾	151.75±25.91
桂附地黄汤	13.50	143.33±26.92 ⁴⁾	143.81±27.02

小鼠躯体平均红外温度显著下降($P<0.01$);撤停给药后,各组小鼠红外热像温度没有显著变化;与模型组比较,给予中药治疗 21 d 后,六味地黄汤组和桂附地黄汤组小鼠腋温和头部最高温度、尾部最

低温度、躯干平均温度差异无统计学意义。见表 4。

3.4 对药源性虚证小鼠脾脏指数和胸腺指数变化的影响 与正常组比较,给予氢化可的松 28 d,减半剂量 7 d 停止给药 14 d 后,模型组小鼠脾脏指数差异无统计学意义,鼠胸腺指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄汤组小鼠脾脏指数显著下降($P<0.01$),桂附地黄汤组小鼠脾脏指数没有明显差异。见表 5。与正常组比较,给予氢化可的松 28 d,减半剂量 7 d 停止给药 14 d 后,模型组小鼠胸腺指数均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄汤组和桂附地黄汤组小鼠胸腺指数差异无统计学意义。见表 5。

表 4 补肾复方对药源性虚证小鼠体表红外温度变化的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Effect of kidney compound on changes of infrared thermography temperature in mice with DDS($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	28 d			49 d		
		头部最高温度	尾部最低温度	躯干平均温度	头部最高温度	尾部最低温度	躯干平均温度
正常	-	34.55±0.84	25.2±0.50	28.94±0.67	34.55±0.75	25.20±0.50	28.94±0.49
氢化可的松	-	34.64±0.57	26.3±0.87	29.67±0.50 ²⁾	34.06±0.84	25.38±0.78	29.11±0.49
六味地黄汤	12.50	34.53±0.35	26.49±0.51	29.82±0.55	33.96±0.85	25.03±0.75	29.06±0.75
桂附地黄汤	13.50	33.88±0.54	26.17±0.60	29.21±0.36	34.01±0.71	25.14±0.77	29.02±0.40

表 5 补肾复方对药源性虚证小鼠脾脏指数和胸腺指数变化的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 5 Effect of kidney compound on changes of spleen index and thymus index in mice with DDS($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脾脏指数	胸腺指数
正常	-	4.61±0.98	1.22±0.20
氢化可的松	-	4.46±0.88	1.61±0.17 ²⁾
六味地黄汤	12.50	3.06±0.32 ²⁾	1.67±0.26
桂附地黄汤	13.50	3.75±0.55	1.60±0.42

3.5 对药源性虚证小鼠皮质酮含量的影响 与正常组比较,给予氢化可的松 28 d,减半剂量 7 d 停止给药 14 d 后,模型组小鼠皮质酮含量明显降低($P<$

0.05);与模型组比较,六味地黄汤组和桂附地黄汤组小鼠皮质酮含量差异无统计学意义。见表 6。

表 6 补肾复方对药源性虚证小鼠皮质酮含量的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 6 Effect of kidney compound on corticosterone content in mice with DDS($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	皮质酮/ng·L ⁻¹
正常	-	7 313.80±2 549.91
氢化可的松	-	5 584.12±2 108.10 ¹⁾
六味地黄汤	12.50	3 977.70±1 266.20
桂附地黄汤	13.50	3 413.16±2 236.56

3.6 对药源性虚证小鼠肾上腺相关基因表达的影响 与正常组比较,给予氢化可的松 28 d,减半剂量

7 d 停止给药 14 d 后,模型组小鼠 Cyp21a1, Hmgcr mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), Acat1, Lipe, Srebf2, Insig1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), Ldlr, Scarb1 mRNA 表达差异无统计学意义;与模型组比较,桂附地黄汤组 Cyp11a1, Cyp21a1 mRNA 表达明显上升 ($P < 0.05, P < 0.01$), 桂附地黄汤组小鼠

Ldlr, Scarb1, Acat1, Lipe, Srebf2, Insig1 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), 六味地黄汤组小鼠 Ldlr, Acat1, Lipe, Srebf2, Insig1 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), 六味地黄汤组和桂附地黄汤组小鼠 Hmgcr mRNA 表达差异无统计学意义。见表 7。

表 7 补肾复方对药源性虚证小鼠肾上腺相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 7 Effect of kidney compound on adrenal gland-related gene expression changes in mice with DDS ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	Star	Cyp11a1	Cyp21a1	Cyp11b1	Ldlr	Scarb1	Hmgcr	Lipe	Acat1	Srebf2	Insig1
正常	-	0.76±0.19	0.71±0.22	0.80±0.20	0.67±0.24	0.86±0.37	0.60±0.41	1.14±0.63	1.57±0.69	1.06±0.28	0.73±0.17	0.70±0.20
氢化可的松	-	0.60±0.07	0.49±0.06	0.41±0.06 ²⁾	0.53±0.01	0.62±0.08	0.69±0.10	0.18±0.13 ¹⁾	2.66±0.40 ²⁾	2.27±0.50 ²⁾	1.38±0.26 ²⁾	5.86±1.12 ²⁾
六味地黄汤	12.50	0.49±0.14	0.79±0.21	0.58±0.14	0.55±0.13	0.37±0.11 ³⁾	0.43±0.15	0.58±0.25	0.67±0.09 ⁴⁾	1.20±0.16 ⁴⁾	0.59±0.15 ⁴⁾	0.52±0.09 ⁴⁾
桂附地黄汤	13.50	0.54±0.06	1.13±0.38 ³⁾	0.69±0.14 ³⁾	0.60±0.07	0.64±0.13	0.41±0.05	0.58±0.36	1.21±0.21 ⁴⁾	1.35±0.43 ³⁾	0.79±0.14 ⁴⁾	1.16±0.20 ⁴⁾

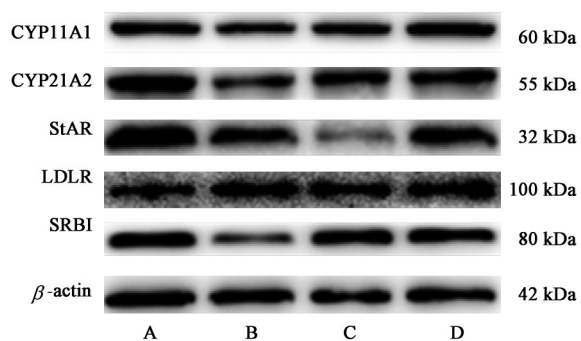
3.7 对药源性虚证小鼠肾上腺相关蛋白表达的影响 与正常组比较,给予氢化可的松 28 d,减半剂量 7 d 停止给药 14 d 后 CYP11A1, SRBI, CYP21A2, StAR 蛋白表达下降, LDLR 蛋白表达上升,但均无统计学意义;与模型组比较,六味地黄汤 CYP11A1, CYP21A2, SRBI 蛋白表达上升,六味地黄汤组

StAR, LDLR 蛋白表达下降,但均无统计学意义,桂附地黄汤组 CYP11A1, CYP21A2, StAR 蛋白表达上升,其中 StAR 蛋白表达上升最为明显 ($P < 0.05$), 桂附地黄汤组 SRBI 蛋白表达上升,但无统计学意义,桂附地黄汤组 LDLR 蛋白表达无显著变化。见表 8 和图 1。

表 8 补肾复方对药源性虚证小鼠肾上腺相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 8 Effect of kidney compound on adrenal-associated protein expression changes in mice with DDS ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CYP11A1/ β -actin	CYP21A2/ β -actin	StAR/ β -actin	LDLR/ β -actin	SRBI/ β -actin
正常	-	0.85±0.06	1.11±0.03	1.36±0.26	0.88±0.42	0.95±0.16
氢化可的松	-	0.78±0.09	1.00±0.08	1.24±0.28	1.32±0.59	0.57±0.28
六味地黄汤	12.50	0.90±0.09	1.13±0.18	0.95±0.21	1.12±0.60	1.01±0.37
桂附地黄汤	13.50	0.98±0.13	1.03±0.14	1.95±0.28 ³⁾	1.34±0.49	0.77±0.41



A. 正常组; B. 氢化可的松组; C. 六味地黄汤组; D. 桂附地黄汤组

图 1 小鼠肾上腺组织中 CYP11A1, CYP21A2, StAR, LDLR, SRBI 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of CYP11A1, CYP21A2, StAR, LDLR, SRBI protein expression in mouse adrenal tissue

4 讨论

临床上长期使用小剂量糖皮质激素治疗各种

疾病时,在减量维持阶段以及撤药后,患者可出现肢冷、五心烦热、盗汗、舌淡少津、脉弱数等症状,类似于中医阴阳两虚证候,停用激素后,机体可能出现脾肾两虚证候,此时,常用金匮肾气丸(桂附地黄汤)、六味地黄丸等补肾复方以改善证候并纠正被抑制的肾上腺皮质功能^[3-4],如胡顺金等^[19]使用六味地黄丸滋阴降火以对抗长期使用激素及激素撤减阶段治疗肾病综合征诱发的副作用,刘涛等^[20]以双补肾阴阳之法选用桂附地黄汤纠正激素撤减后诱发的脾肾阳虚证候,钟丹等^[21]在激素停用阶段采用金匮肾气丸加减以减少病情复发,改善阴阳两虚证候等。然而,使用滋阴补阳中药改善证候的机制尚不明了。基于此,本研究着重观察了六味地黄汤和桂附地黄汤对小剂量氢化可的松减停给药及撤药后小鼠肾上腺皮质功能的调节作用。根据小鼠四

诊信息发现,小剂量氢化可的松长期及减停给药,小鼠体内物质基础代谢逐渐恢复,体质量逐渐升高,补肾复方治疗后小鼠体质量并未明显改善,提示六味地黄汤和桂附地黄汤对糖皮质激素导致的小鼠体质量下降无明显纠正作用。抓力是评价小鼠“气”盛衰的重要指标,实验结果表明,氢化可的松和补肾复方对小鼠抓力影响不大,给予补肾复方治疗后,小鼠抓力没有明显恢复,提示小鼠自我恢复后,六味地黄汤和桂附地黄汤未显示出明显药效。温度是评价小鼠“阳”盛衰程度的一个重要指标,实验结果表明,小剂量氢化可的松长期给药导致小鼠体温下降,减停给药后,小鼠体温可自行恢复。提示,六味地黄汤和桂附地黄汤对小鼠体温的自我恢复没有明显影响。总之,小剂量氢化可的松维持给药阶段在减停后,小鼠四诊指标均不同程度恢复正常水平,补肾复方六味地黄汤和桂附地黄汤治疗后未显示出明显的药效,可能因小鼠自我恢复能力掩盖了药物疗效或者中药药效不显著所致。

实验结果表明,小剂量氢化可的松长期及减停给药后,小鼠胸腺指数显著升高,提示胸腺自我恢复能力强,而补肾复方六味地黄汤和桂附地黄汤对小剂量氢化可的松长期及减停给药后诱导的胸腺指数升高没有明显的调节作用。此外,从激素分泌功能分析,小剂量氢化可的松给药及减停后,依然显著抑制小鼠肾上腺皮质酮的分泌功能,值得注意的是,桂附地黄汤治疗后小鼠皮质酮分泌量呈现上升趋势,推测附子与肉桂可能具有促进垂体促肾上腺皮质功能以及肾上腺皮质自身激素分泌功能。

由于激素主要是由肾上腺皮质细胞以胆固醇为原料合成,因此,本研究检测了皮质酮合成全过程相关分子的基因或蛋白表达。从细胞对胆固醇利用的层面分析,发现,小剂量氢化可的松长期给药及减停后,SRBI蛋白表达显著下降,给予补肾复方桂附地黄汤和六味地黄汤后SRBI蛋白表达上升,提示,小剂量氢化可的松长期给药及减停后持续抑制肾上腺皮质细胞摄取胆固醇的能力。同时发现,胆固醇合成基因Hmgcr表达显著上调,六味地黄汤和桂附地黄汤显著改善Hmgcr基因表达情况,提示,Hmgcr是胆固醇生物合成的限速酶,参与生物体内各种内源性胆固醇的生物合成,六味地黄汤和桂附地黄汤却显著抑制细胞内内质网胆固醇从头合成过程;氢化可的松小剂量长期给药及减停后,胆固醇储存相关基因Lipe, Acat1表达显著上调,六味地黄汤和桂附地黄汤显著改善Lipe, Acat1

基因表达情况。提示六味地黄汤和桂附地黄汤能够加速应激状态下增多的酯化胆固醇快速转化为游离胆固醇,以供细胞应激状态下合成类固醇激素;氢化可的松小剂量长期给药及减停后,胆固醇转运相关蛋白StAR表达显著降低,六味地黄汤加剧StAR蛋白表达降低,桂附地黄汤促进StAR蛋白表达,提示桂附地黄汤可在一定程度上改善此种情况,而六味地黄汤可能加剧肾上腺皮质细胞内胆固醇转运失调状况,进而影响肾上腺皮质功能的恢复;Srebf2和Insig1基因参与细胞内胆固醇稳态的调节,小剂量氢化可的松长期给药及减停后Srebf2, Insig1基因表达显著上调,给予补肾复方治疗后Srebf2, Insig1基因表达下调。提示,小剂量氢化可的松长期给药及减停后难以自我恢复细胞内胆固醇平衡状态,而六味地黄汤和桂附地黄汤能很好的纠正和调节细胞内胆固醇稳态相关基因表达紊乱状况以维持细胞内胆固醇稳态平衡^[22-26]。

从胆固醇被利用后转化成类固醇激素层面分析,小剂量氢化可的松长期给药及减停后,CYP11A1蛋白表达下降,CYP21A2蛋白表达没有显著变化,六味地黄汤和桂附地黄汤组CYP11A1蛋白表达上升,CYP21A2蛋白表达无明显变化,CYP11A1是生物体内合成类固醇激素的限速酶(P450scc),21-羟化酶CYP21A2是类固醇激素前期转化为皮质激素的方向酶。提示,小剂量氢化可的松长期给药及减停后,肾上腺类固醇激素合成前期过程依然受抑制(以Cyp11a1和Cyp21a1为主),皮质激素合成最后过程也呈低下状态(以Cyp11b1和Cyp11b2为主);中药治疗后,尤其以桂附地黄汤能显著增强肾上腺类固醇激素合成前期过程(以促进Cyp11a1和Cyp21a1为主),推测桂附地黄汤中附子、肉桂可能具有调控肾上腺皮质激素合成酶的作用。类似报道,肖子曾等^[13]发现六味地黄汤可能通过下调肾上腺分泌的皮质酮等途径以改善HPA轴功能及肾上腺组织形态有关,付正丰等^[27]发现金匱肾气丸(桂附地黄丸)可明显改善肾阳虚大鼠血清相关激素水平,邱洪等^[28]发现金匱肾气丸具有调节肾阳虚小鼠体内激素水平和改善内分泌功能的作用。

综上所述,本研究采用课题组前期所建立的稳定性氢化可的松药源性小鼠虚证模型,同步观察常用补肾复方对该药源性虚证小鼠肾上腺皮质功能的调节作用,发现持续给予ICR小鼠小剂量氢化可的松28 d,减半剂量7 d,停药14 d并给予补肾中药

治疗21 d后,六味地黄汤未能明显改善氢化可的松所抑制的肾上腺皮质酮分泌状况,而桂附地黄汤可能具有调节垂体促肾上腺皮质激素或肾上腺皮质激素分泌功能,其机制可能通过调节肾上腺皮质类固醇激素合成关键酶的表达,进而提高肾上腺皮质细胞合成类固醇激素能力。

[参考文献]

[1] 杨清儒,杨璐舟. 糖皮质激素的副作用及并发症对策[J]. 中国现代医生,2008,46(3):31-32.

[2] 马茂森. 糖皮质激素的副作用及并发症治疗[J]. 中国城乡企业卫生,2011,26(3):34-36.

[3] 金明柱,郑洪新. 中医药干预糖皮质激素副作用的研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2007,9(2):23-24.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 钱宏梁,潘志强,彭佩克,等. 泼尼松龙致不同品系小鼠药源性证候的比较[J]. 中国实验动物学报,2019,27(2):173-180.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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.

[12] ZHAO L, ZHAO A, CHEN T, et al. Global and targeted metabolomics evidence of the protective effect of Chinese patent medicine Jinkui Shenqi pill on adrenal insufficiency after acute glucocorticoid withdrawal in rats[J]. J Proteome Res, 2016, 15(7): 2327-2336.

[13] 肖子曾,杨梦琳,戴冰,等. 六味地黄汤及“补泻”药对对肾阴虚模型小鼠HPA轴功能及肾上腺组织形态学的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2016,36(3):

17-20.

[14] 薛岱榆,包文健,梁幼雅,等. 六味地黄汤干预抑郁大鼠学习记忆的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20200503.

[15] 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.

[16] 蒋倩,李锋涛,钱大玮,等. 麋鹿角不同部位对肾阳虚证大鼠的作用[J]. 中药药理与临床,2014,30(6):84-86.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 胡顺金,刘家生,张莉,等. 六味地黄丸对糖皮质激素治疗肾病综合征增效减毒作用的临床研究[J]. 世界科学技术,2006,8(2):113-116.

[20] 刘涛,聂莉芳,孙红颖. 聂莉芳教授中医辨证治原发性肾病综合征的经验[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2015,16(4):286-288.

[21] 钟丹,杨霓芝. 杨霓芝教授治疗肾脏病经验点滴[J]. 江苏中医药,2005,26(10):9-10.

[22] 杨巧红. 黄芪抑制小鼠胸腺淋巴细胞凋亡与促进增殖的作用[D]. 广州:广州中医药大学,2008.

[23] KRAEMER F B, SHEN W J, HARADA K, et al. Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesteryl ester-supported adrenal steroidogenesis [J]. Mol Endocrinol, 2004, 18 (3) : 549-557.

[24] HOLYSZ M, TRZECIAK W H. Hormone-sensitive lipase/cholesteryl esterase from the adrenal cortex - structure, regulation and role in steroid hormone synthesis[J]. Postepy Biochem,2015,61(2):138-146.

[25] CHANG T Y, CHANG C C, LIN S, et al. Roles of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 and -2 [J]. Curr Opin Lipidol,2001,12(3):289-296.

[26] 李慧,景贤,邓晓兰,等. 调脂药物的作用靶点[J]. 中南大学学报:医学版,2013,38(1):101-108.

[27] 付正丰,龚明,苗家伟,等. 金匮肾气丸温补肾阳药理作用的实验研究[J]. 中成药,2015,37(5):1111-1114.

[28] 邱洪,刘景会,骆鹏飞,等. 金匮肾气丸水提液对肾阳虚雄鼠生长性能及其睾丸形态结构的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014(11):4-7.

[责任编辑 周冰冰]