

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.11.013

实验研究

不同剂量泼尼松龙诱发小鼠药源性虚证模型的证候特征

钱宏梁, 潘志强*, 王晓敏, 卢涛, 李亚, 方肇勤

(上海中医药大学基础医学院, 上海市浦东新区蔡伦路 1200 号, 201203)

摘要 目的 探讨泼尼松龙诱发小鼠药源性证候的特征及可能物质基础。方法 80 只 ICR 小鼠随机分为正常对照组、极低剂量组、低剂量组、中剂量组、高剂量组各 16 只。极低剂量组、低剂量组、中剂量组、高剂量组分别给予醋酸泼尼松龙片 0.25、0.5、2.5、12.5 mg/(kg·d) 灌胃, 正常对照组给予等量灭菌水。每组 16 只中 8 只干预 7 天, 另外 8 只干预 14 天。隔日动态观测小鼠体质量, 分别比较干预不同时间各组小鼠体质量、抓力、腋温、旷场活动度、躯体不同部位红外温度等表征信息; 取小鼠脾脏、胸腺和睾丸称重并计算脏器指数; 检测血清皮质酮和促肾上腺皮质激素 (ACTH) 含量; 检测肾上腺功能相关基因表达和肾上腺低密度脂蛋白受体 (LDLR)、B 族 I 型清道夫受体 (SRBI)、类固醇合成急性调节蛋白 (StAR) 蛋白表达。结果 中剂量组和高剂量组干预 7 天和干预 14 天, 小鼠体质量、脾脏质量、胸腺质量、脾脏指数、胸腺指数较正常对照组同时下降, 血清皮质酮和 ACTH 含量、肾上腺功能相关基因表达和肾上腺 LDLR、SRBI、StAR 蛋白均较正常对照组不同程度降低 ($P < 0.05$), 而各组小鼠抓力、腋温、旷场活动度、躯体不同部位红外温度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 泼尼松龙造成的小鼠药源性虚证为阴虚证, 该药源性虚证的物质基础可能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-肾上腺皮质轴功能被抑制为主。

关键词 泼尼松龙; 虚证; 证候模型; 肾上腺皮质

证候是中医学的核心内容, 证候动物模型是探索证候发生与演变的重要载体。既往研究认为, 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^[1-4]。基于此, 学术界曾对氢化可的松进行了大量研究并用其稳定地复制了中医肾阳虚动物模型^[5], 但是对于同样为糖皮质激素药物的泼尼松龙研究较少。泼尼松龙, 又名氢化泼尼松, 是将可的松分子结构中的一个碳碳单键变为碳碳双键而成, 这一结构上的改变虽小, 但是泼尼松的糖代谢、抗炎和抗风湿等作用比可的松提高了 3~5 倍, 而水钠潴留副作用则大为减小, 只是增加了对肾上腺的抑制作用^[6]。泼尼松龙与泼尼松作用类似, 只是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^[7]。泼尼松龙被用于制作

骨质疏松模型有较多的研究, 但是所选择的实验动物以及给药方式方法都各不相同^[8]。长期较大剂量使用激素类药物均可能诱发新的症状或异常体征, 我们称之为“药源性证候”^[9]。为解决泼尼松龙的剂量范围、使用时间、可能诱发证候特征等学术问题, 本研究拟采用临床报道的泼尼松龙使用剂量范围对小鼠给药, 动态观察小鼠证候, 以创建标准化的泼尼松龙药源性证候模型及其评价指标, 为中药及其复方的“方-证-效”药理学研究提供可信的生物模式。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 80 只, 5 周龄, 体质量 18~20 g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2013-0016, 实验动物合格证号: 2008001685014。

基金项目: 国家自然科学基金 (81473562, 81873212)

* 通讯作者: pzq527@163.com, (021) 51322116

1.2 药物与试剂

醋酸泼尼松龙片 (批号: 017171004), 上海上药信谊药厂有限公司; RNAiso Plus (货号: 9109)、PrimeScript[®] RT 逆转录试剂盒 (货号: RR036A)、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TliRNaseH Plus) II (货号: RR820A), 均购自 TaKaRa 公司; RIPA 裂解液 (货号: P0013C), 碧云天生物技术有限公司; 小鼠皮质酮 ELISA 试剂盒 (货号: 501320), 美国 Cayman 公司; 促肾上腺皮质激素 (ACTH) ELISA 试剂盒 (货号: M046006), 美国 MDB 公司; 低密度脂蛋白受体 (LDLR) 抗体 (货号: ab52818)、B 族 I 型清道夫受体 (SRBI) 抗体 (货号: ab52629)、类固醇合成急性调节蛋白 (StAR) 抗体 (货号: ab96637), 均购自美国 Abcam 公司; β -actin 抗体 (货号: A5441), Sigma-Aldrich 公司。

1.3 主要仪器

YLS-43A 型小鼠抓力测定仪, 山东省医学科学院设备站; ThermaCAM P30 型红外热像仪器, 美国 FLIR 公司; QuantStudioTM3 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。

1.4 分组、造模与干预方法

小鼠适应性饲养, 当小鼠体质量稳定至 30 g 左右时, 采用随机数字表法将其分为正常对照组、极低剂量组、低剂量组、中剂量组、高剂量组各 16 只。极低剂量组、低剂量组、中剂量组、高剂量组分别给予醋酸泼尼松龙片 0.25、0.5、2.5、12.5 mg/(kg·d) 灌胃。极低剂量根据临床最小剂量折算^[10], 低剂量为极低剂量的 2 倍, 中剂量为极低剂量的 10 倍, 高剂量选取泼尼松龙小鼠造模常用剂量。正常对照组灌胃等体积的灭菌水。各组小鼠再采用随机数字表法选取 8 只每天灌胃 1 次, 持续 7 天; 剩余 8 只每天灌胃 1 次, 持续 14 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 四诊信息 运用本课题组创建的小鼠辨证论治实验方法学^[11-12]采集小鼠四诊信息, 主要包括小鼠体质量、躯体不同部位红外温度、旷场活动度、四肢抓力、腋温等表征信息。小鼠体质量隔日测量 1 次, 其余各指标分别于实验第 7 天 (干预 7 天的小鼠 8 只)、15 天 (干预 14 天的小鼠 8 只) 测量 1 次。旷场实验在底部划有 5 cm × 5 cm 方格,

3 行 × 5 列 = 15 格的实验笼中进行, 旷场活动度 = 小鼠在网格中活动 60 s 的跨格数 + 前肢离地次数。

1.5.2 血清 ACTH 及皮质酮含量 分别于实验第 7 天和第 15 天取材, 每组分别处死小鼠 8 只, 先称取体质量, 摘眼球取血, 分离血清, ELISA 试剂盒检测皮质酮与 ACTH 含量。

1.5.3 脏器质量及其指数 摘取脾脏、胸腺、睾丸, 称取脏器质量后计算脏器指数。脏器指数 = 脏器质量 (mg) / 体质量 (g)。

1.5.4 肾上腺组织中皮质功能相关基因表达 取肾上腺组织, 检测 StAR、胆固醇侧链裂解酶 (Cyp11a1)、21-羟化酶 (Cyp21a1)、11 β -羟化酶 1 (Cyp11b1)、11 β -羟化酶 2 (Cyp11b2) mRNA 表达。上下游引物序列采用 Primer3 (v. 0.4.0) 在线软件合成, 委托 Life Technologies 公司完成。 β -actin: 上游: 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3', 下游: 5'-GGGCTGTTGAAGCTCTCAAA-3', 产物长度 165bp; Cyp11a1: 上游: 5'-ACTTCCGGTACTTGGGCTTT-3', 下游: 5'-GCTTGAGAGGCTGGAAGTGTG-3', 产物长度 201bp; Cyp11b1: 上游: 5'-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3', 下游: 5'-GGGTGTATGTCGTCTCACTG-3', 产物长度 140bp; Cyp11b2: 上游: 5'-CTGAACGCTATATGCCTCAGC-3', 下游: 5'-AGTGTCTCCACCTGGAAGGTT-3', 产物长度 160bp; Cyp21a1: 上游: 5'-CTCCGGCTATGACATCCCTA-3', 下游: 5'-ACAGCCAAAGGATGTGTTC-3', 产物长度 151bp; StAR: 上游: 5'-TTGGGCATACTCAACAACCA-3', 下游: 5'-GAAACACCTTGCCACATCT-3', 产物长度 103bp。按照 RNAiso Plus 说明书抽提肾上腺总 RNA; 逆转录反应体系 20 μ l, 反应条件为 37 $^{\circ}$ C × 15 min, 85 $^{\circ}$ C × 5 s; PCR 扩增反应体系为 20 μ l, 反应程序为 95 $^{\circ}$ C × 3 min, 95 $^{\circ}$ C × 5 s, 60 $^{\circ}$ C × 30 s, 40 个循环。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析, 以正常组作为对照, 以 β -actin 基因 Ct 均值作为内参组。 $\Delta Ct = Ct$ 目的基因 - Ct 内参基因 (Ct 值为扩增 n 个循环基因的荧光数值), $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ 实验组 - ΔCt 对照组, 目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.5.5 肾上腺组织中相关蛋白表达 取肾上腺组织检测 LDLR、SRBI、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 : 20000

稀释, LDLR 抗体以 1 : 5000 稀释, SRBI、StAR 抗体均以 1 : 2000 稀释。以 β -actin 为内参对照, 分析蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.0 专业软件进行统计分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠分别干预不同时间体质量比较

图 1 示, 正常对照组小鼠体质量平稳增长, 在实验过程中小鼠体质量稳定在 (32.0 ± 0.7) g。经统计学分析: 与正常对照组比较, 干预 7 天, 极低剂量组、低剂量组小鼠体质量下降不显著 ($P > 0.05$), 中、高剂量组小鼠体质量持续下降, 在干预 5~7 天显著低于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。干预 14 天, 与正常对照组比较, 各剂量组小鼠体质量均有不同程度的下降, 并且随着用药时间的推移体质量下降加剧。经统计学分析: 极低剂

量组、低剂量组小鼠体质量在实验第 9、11、13、15 天显著低于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中剂量组小鼠体质量在实验第 5、7、9、11、13、15 天显著低于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 高剂量组小鼠体质量实验第 3、5、7、9、11、13、15 天显著低于正常对照组 ($P < 0.01$)。

2.2 各组小鼠分别干预不同时间旷场活动度、抓力、腋温、头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度比较

表 1、表 2 示, 与正常对照组比较, 干预 7、14 天各剂量组小鼠旷场活动度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常对照组比较, 干预 7 天各剂量组小鼠抓力差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干预 14 天低剂量组小鼠抓力下降 ($P < 0.05$); 高剂量组小鼠抓力较极低剂量组、低剂量组上升 ($P < 0.05$)。干预 7 天, 与正常对照组比较, 低剂量组小鼠腋温显著下降 ($P < 0.05$), 而头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度各组差异均无统计学

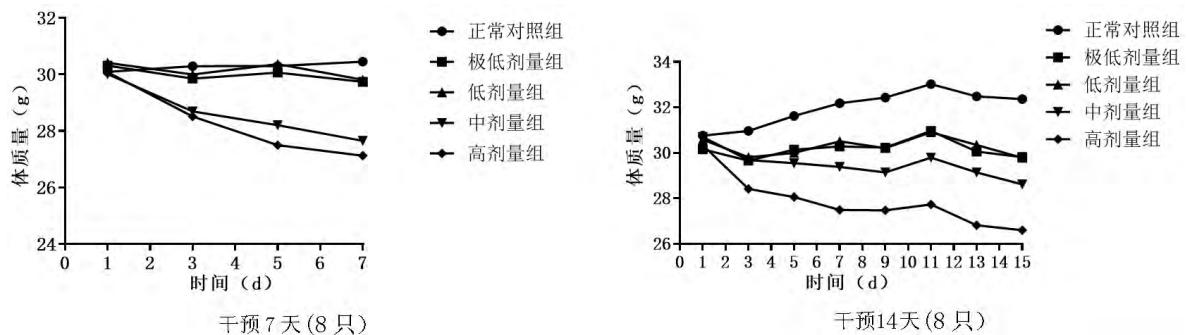


图 1 各组小鼠分别干预 7、14 天情况下体质量动态变化图

表 1 各组小鼠干预 7 天旷场活动度、抓力、腋温、头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	旷场活动度	抓力 (g)	腋温 (°C)	头部最高温度 (°C)	躯干平均温度 (°C)	尾部最低温度 (°C)
正常对照组	8	33.3 $\pm$ 17.3	146.4 $\pm$ 22.7	37.0 $\pm$ 0.4	34.4 $\pm$ 0.6	30.0 $\pm$ 0.3	27.7 $\pm$ 0.3
极低剂量组	8	45.9 $\pm$ 13.9	151.8 $\pm$ 25.5	36.9 $\pm$ 0.5	34.7 $\pm$ 0.4	30.2 $\pm$ 0.1	28.1 $\pm$ 0.3
低剂量组	8	46.0 $\pm$ 19.0	152.6 $\pm$ 31.4	36.7 $\pm$ 0.3*	34.2 $\pm$ 0.6	30.0 $\pm$ 0.4	27.9 $\pm$ 0.3
中剂量组	8	51.3 $\pm$ 14.9	144.7 $\pm$ 18.6	36.8 $\pm$ 0.3	34.2 $\pm$ 0.7	30.1 $\pm$ 0.3	27.6 $\pm$ 0.3
高剂量组	8	48.6 $\pm$ 16.3	147.2 $\pm$ 28.4	37.4 $\pm$ 0.4	34.4 $\pm$ 0.5	30.3 $\pm$ 0.3	27.5 $\pm$ 0.5

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 各组小鼠干预 14 天旷场活动度、抓力、腋温、头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	旷场活动度	抓力 (g)	腋温 (°C)	头部最高温度 (°C)	躯干平均温度 (°C)	尾部最低温度 (°C)
正常对照组	8	37.9 $\pm$ 10.6	158.9 $\pm$ 22.4	37.1 $\pm$ 0.3	34.6 $\pm$ 0.2	30.1 $\pm$ 0.5	27.7 $\pm$ 0.5
极低剂量组	8	49.9 $\pm$ 16.8	138.3 $\pm$ 16.4 [△]	37.0 $\pm$ 0.3	33.9 $\pm$ 0.4*	29.7 $\pm$ 0.4	27.8 $\pm$ 0.2
低剂量组	8	46.9 $\pm$ 9.5	131.5 $\pm$ 18.2* [△]	37.3 $\pm$ 0.4	34.2 $\pm$ 0.8	29.8 $\pm$ 0.2	27.4 $\pm$ 0.4
中剂量组	8	49.2 $\pm$ 16.7	155.6 $\pm$ 18.1	37.2 $\pm$ 0.3	34.3 $\pm$ 0.7	30.1 $\pm$ 0.2	27.3 $\pm$ 0.5
高剂量组	8	37.4 $\pm$ 11.1	169.4 $\pm$ 16.2	37.3 $\pm$ 0.2	34.2 $\pm$ 0.4	29.7 $\pm$ 0.2	27.2 $\pm$ 0.5

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

意义 ($P > 0.05$)。干预 14 天,与正常对照组比较,极低剂量组小鼠头部最高温度显著下降 ($P < 0.05$),腋温、躯干平均温度、尾部最低温度各组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组小鼠分别干预不同时间血清皮质酮与 ACTH 含量比较

表 3 示,与正常对照组同时间比较,干预 7 天各剂量组血清皮质酮含量均显著下降 ($P < 0.05$),且中、高剂量组血清皮质酮含量低于极低剂量组,高剂量组低于低剂量组 ($P < 0.05$);干预 14 天中、高剂量组血清皮质酮含量较正常对照组显著下降,高剂量组较极低剂量组下降 ($P < 0.05$)。与正常对照组同时间比较,干预 7 天中、高剂量组血清 ACTH 含量显著下降 ($P < 0.05$),高剂量组血清 ACTH 含量较极低剂量组、低剂量组下降 ($P < 0.05$);干预 14 天极低剂量组、中剂量组、高剂量组小鼠血清 ACTH 含量较正常对照组显著下降 ($P < 0.05$),低剂量组血清 ACTH 含量高于极低剂量组中、高剂量组 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠分别干预不同时间脏器质量及指数比较

表 4、表 5 示,干预 7 天,中剂量组和高剂量组小鼠脾脏质量、脾脏指数、胸腺质量、胸腺指数均较正常对照组、极低剂量组、低剂量组显著下降 ($P < 0.05$),低剂量组和极低剂量组胸腺质量、胸腺指数低于正常对照组,低剂量组脾脏质量亦低于正常对照组 ($P < 0.05$)。干预 14 天,各剂量组脾脏质量、胸腺质量和胸腺指数均低于正常对照组,低剂量组、中剂量组、高剂量组小鼠脾脏指数亦低于正常对照组,高剂量组睾丸质量低于正常对照组 ($P < 0.05$);中剂量组、高剂量组小鼠脾脏质量、脾脏指数、胸腺质量、胸腺指数低于极低剂量组,中剂量组小鼠脾脏质量、脾脏指数低于低剂量组,高剂量组小鼠脾脏质量、脾脏指数、胸腺质量较低剂量组降低,高剂量组小鼠脾脏指数亦低于中剂量组 ($P < 0.05$)。各组小鼠干预 7 天睾丸质量、睾丸指数差异均无统计学意义,各组小鼠干预 14 天睾丸指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠干预不同时间血清皮质酮与 ACTH 含量比较 (pg/ml , $\bar{x} \pm s$)

组别	皮质酮		ACTH	
	干预 7 天 (8 只)	干预 14 天 (8 只)	干预 7 天 (8 只)	干预 14 天 (8 只)
正常对照组	7748.4 $\pm$ 845.7	3283.8 $\pm$ 804.1	102.1 $\pm$ 19.4	97.8 $\pm$ 19.7
极低剂量组	2614.6 $\pm$ 311.5*	2140.1 $\pm$ 1411.6	70.5 $\pm$ 26.9	44.5 $\pm$ 8.6*
低剂量组	2162.0 $\pm$ 1019.4*	1598.5 $\pm$ 1209.2	68.4 $\pm$ 20.9	87.5 $\pm$ 21.6 Δ
中剂量组	645.7 $\pm$ 485.3* Δ	598.5 $\pm$ 707.7*	38.2 $\pm$ 12.9*	27.9 $\pm$ 8.6* Δ
高剂量组	118.1 $\pm$ 16.9* Δ Δ	6.5 $\pm$ 3.4* Δ	12.6 $\pm$ 4.8* Δ Δ	12.6 $\pm$ 6.6* Δ

注: ACTH, 促肾上腺皮质激素; 与正常对照组同时间比较, * $P < 0.05$; 与极低剂量组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与低剂量组同时间比较, $\Delta P < 0.05$

表 4 各组小鼠干预 7 天脾脏、胸腺、睾丸质量及其指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脾脏质量 (g)	脾脏指数	胸腺质量 (g)	胸腺指数	睾丸质量 (g)	睾丸指数
正常对照组	8	103.4 $\pm$ 11.1	3.5 $\pm$ 0.4	47.9 $\pm$ 14.8	1.6 $\pm$ 0.5	204.6 $\pm$ 6.5	6.8 $\pm$ 0.4
极低剂量组	8	98.0 $\pm$ 15.1	3.4 $\pm$ 0.6	28.9 $\pm$ 7.5*	1.0 $\pm$ 0.3*	175.1 $\pm$ 42.0	6.0 $\pm$ 1.5
低剂量组	8	88.5 $\pm$ 9.4*	3.0 $\pm$ 0.3	31.4 $\pm$ 8.2*	1.1 $\pm$ 0.3*	198.6 $\pm$ 21.7	6.8 $\pm$ 0.8
中剂量组	8	65.6 $\pm$ 10.1* Δ Δ	2.4 $\pm$ 0.4* Δ Δ	16.5 $\pm$ 5.8* Δ Δ	0.6 $\pm$ 0.2* Δ Δ	197.6 $\pm$ 18.1	7.1 $\pm$ 0.5
高剂量组	8	57.8 $\pm$ 8.4* Δ Δ	2.2 $\pm$ 0.3* Δ Δ	9.6 $\pm$ 6.8* Δ Δ	0.4 $\pm$ 0.3* Δ Δ	210.0 $\pm$ 13.7	7.9 $\pm$ 0.6

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与极低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

表 5 各组小鼠干预 14 天脾脏、胸腺、睾丸质量及其指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脾脏质量 (g)	脾脏指数	胸腺质量 (g)	胸腺指数	睾丸质量 (g)	睾丸指数
正常对照组	8	119.6 $\pm$ 12.4	3.7 $\pm$ 0.3	53.4 $\pm$ 11.0	1.6 $\pm$ 0.3	223.1 $\pm$ 12.4	6.9 $\pm$ 0.6
极低剂量组	8	102.0 $\pm$ 15.6*	3.4 $\pm$ 0.5	37.6 $\pm$ 4.6*	1.3 $\pm$ 0.2*	204.1 $\pm$ 21.1	6.8 $\pm$ 0.6
低剂量组	8	87.9 $\pm$ 13.5*	3.0 $\pm$ 0.5*	28.8 $\pm$ 11.1*	1.0 $\pm$ 0.4*	208.1 $\pm$ 9.5	7.0 $\pm$ 0.3
中剂量组	8	70.8 $\pm$ 6.1* Δ Δ	2.5 $\pm$ 0.2* Δ Δ	19.1 $\pm$ 7.4* Δ	0.7 $\pm$ 0.2* Δ	209.4 $\pm$ 19.7	7.3 $\pm$ 0.8
高剂量组	8	47.9 $\pm$ 7.6* Δ Δ	1.8 $\pm$ 0.36* Δ Δ Δ	16.6 $\pm$ 6.9* Δ Δ	0.6 $\pm$ 0.2* Δ	200.9 $\pm$ 10.6*	7.6 $\pm$ 0.7

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与极低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

表 6 各组小鼠干预 7 天肾上腺功能相关基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	StAR	Cyp11a1	Cyp21a1	Cyp11b1	Cyp11b2
正常对照组	8	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.13
极低剂量组	8	0.84 ± 0.12	0.75 ± 0.37	0.84 ± 0.59	0.95 ± 0.06	0.97 ± 0.21
低剂量组	8	0.60 ± 0.10 [*] △	0.67 ± 0.37	0.80 ± 0.33	0.93 ± 0.23	0.97 ± 0.28
中剂量组	8	0.50 ± 0.05 [*] △	0.59 ± 0.21	0.38 ± 0.24 [*]	0.73 ± 0.27	0.78 ± 0.29
高剂量组	8	0.37 ± 0.07 [*] △▲	0.48 ± 0.06 [*]	0.26 ± 0.11 [*] △▲	0.53 ± 0.07 [*] △▲	0.74 ± 0.09

注: StAR, 类固醇合成急性调节蛋白; Cyp11a1, 胆固醇侧链裂解酶; Cyp21a1, 21-羟化酶; Cyp11b1, 11β-羟化酶 1; Cyp11b2, 11β-羟化酶 2; 与正常对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与极低剂量组比较, [△] $P < 0.05$; 与低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$; 与中剂量组比较, [#] $P < 0.05$

表 7 各组小鼠干预 14 天肾上腺功能相关基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	StAR	Cyp11a1	Cyp21a1	Cyp11b1	Cyp11b2
正常对照组	8	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.04
极低剂量组	8	0.77 ± 0.22 [*]	1.27 ± 0.20 [#]	0.97 ± 0.18	0.85 ± 0.09	0.74 ± 0.09
低剂量组	8	0.64 ± 0.09 [*]	1.05 ± 0.04	0.75 ± 0.05	0.87 ± 0.09	0.81 ± 0.09
中剂量组	8	0.43 ± 0.13 [*] △	0.74 ± 0.24 [△]	0.51 ± 0.22	0.76 ± 0.13	0.63 ± 0.13 [*]
高剂量组	8	0.24 ± 0.03 [*] △▲	0.32 ± 0.04 [*] △▲ [#]	0.19 ± 0.01 [*] △▲	0.34 ± 0.05 [*] △▲ [#]	0.54 ± 0.08 [*]

注: StAR, 类固醇合成急性调节蛋白; Cyp11a1, 胆固醇侧链裂解酶; Cyp21a1, 21-羟化酶; Cyp11b1, 11β-羟化酶 1; Cyp11b2, 11β-羟化酶 2; 与正常对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与极低剂量组比较, [△] $P < 0.05$; 与低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$; 与中剂量组比较, [#] $P < 0.05$

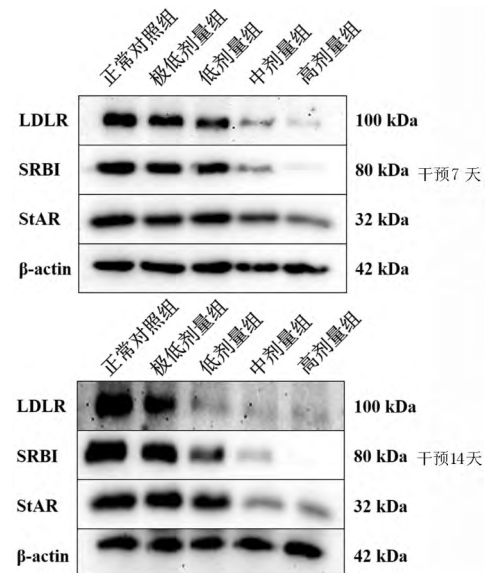
2.5 各组小鼠分别干预不同时间肾上腺功能相关基因表达比较

表 6、表 7 示, 干预 7 天, 低、中剂量组 StAR 基因表达低于正常对照组和极低剂量组, 高剂量组 StAR Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1 基因表达低于正常对照组, 高剂量组 StAR Cyp21a1、Cyp11b1 基因表达低于极低剂量组和低剂量组, 中剂量组 Cyp21a1 基因表达低于正常对照组 ($P < 0.05$), 各组 Cyp11b2 基因表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。干预 14 天, 各剂量组 StAR 基因表达均低于正常对照组, 中剂量组 StAR、Cyp11a1 基因表达低于极低剂量组, 高剂量组 StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1 基因表达低于极低剂量组和低剂量组, 高剂量组 Cyp11a1、Cyp11b1 基因表达低于中剂量组, 中、高剂量组 Cyp11b2 基因表达低于正常对照组 ($P < 0.05$)。

2.6 各组小鼠分别干预不同时间肾上腺相关蛋白表达比较

图 2 示, 干预 7 天, 与正常对照组比较, 极低剂量组、低剂量组 LDLR、SRBI 和 StAR 蛋白表达无明显变化; 中剂量组 LDLR、SRBI 和 StAR 蛋白表达显著下降; 高剂量组 LDLR、SRBI 和 StAR 蛋白表达几乎被完全抑制。干预 14 天, 与正常对照组比较, 极低剂量组 LDLR、SRBI 和 StAR 蛋白表达下调不明显; 低剂量组 SRBI 和 StAR 蛋白表达显著下降, LDLR 表达几乎被完全抑制; 中剂量组和高剂量组 LDLR、SRBI 和 StAR 蛋白表达几乎被

完全抑制。



注: LDLR, 低密度脂蛋白受体; SRBI, B 族 I 型清道夫受体; StAR, 类固醇合成急性调节蛋白

图 2 各组小鼠分别干预不同时间肾上腺相关蛋白电泳图

3 讨论

泼尼松龙是临床常用的糖皮质激素药物之一, 具有抗炎作用、免疫抑制作用、抗休克、抗毒作用等药效^[3]。泼尼松龙常见的不良反应包括: 1) 大剂量给药后可能出现全身性的过敏反应、各种细菌真菌和疱疹病毒感染, 症见面部、鼻黏膜、眼睑肿胀, 荨麻疹, 气短, 胸闷, 喘鸣等, 我们认为以火毒壅盛、阳浮阴弱、上盛下虚为主。2) 长程用药可引起医源性柯兴综合征面容和体态、体重增加、

下肢浮肿、骨质疏松或骨折、肌无力、消化性溃疡或肠穿孔,儿童生长受到抑制和肾上腺轴功能减退,我们认为以脾肾两脏的阳气虚衰、水湿壅盛为主。3) 糖皮质激素停药后出现血压偏低、头晕、头疼、昏厥倾向、腹痛或背痛、低热、食欲减退、恶心、呕吐、肌肉或关节疼痛、乏力、软弱,我们认为其以全身性的气虚和阴阳两虚为主。

国内外学术界有大量关于运用泼尼松龙制作骨质疏松疾病模型的研究^[8]。王长梅等^[4]首次采用斑马鱼为模型动物,以糖皮质激素泼尼松龙为造模用药,建立一种快速、高效的骨质疏松新动物模型。章建华等^[5]在 SD 大鼠上比较了甲基强的松龙、泼尼松龙、地塞米松 3 种糖皮质激素,发现甲基强的松龙为激素性股骨头坏死的最佳造模激素。夏炳江等^[6]运用醋酸泼尼松龙构建和评价了大鼠激素性股骨头坏死肾阳虚型病证结合模型。衣欣等^[7]用醋酸泼尼松龙复制中医肾阳虚模型大鼠。以上这些实验中存在泼尼松龙或泼尼松龙剂量差异较大、造模时间和给药方式不同、对于骨质疏松疾病模型评判指标单一等问题。本实验为了探索泼尼松龙造成小鼠虚证的最佳剂量和给药时间,采取 4 个泼尼松龙剂量和干预 7 天、14 天两个给药时长进行实验。结果实验发现:各剂量组小鼠随着时间延长,体质量、脏器质量及脏器指数、血清皮质酮和 ACTH 含量、肾上腺功能相关基因表达均不同程度下降,并且以中、高剂量效果最明显,而旷场活动度、抓力、腋温、头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度变化不明显。

体质量下降提示了机体物质基础的减少,研究结果提示,在小鼠日饮食量稳定的情况下泼尼松龙可能加快体内代谢水平造成物质基础的消耗增加,使得机体出现中医的阴虚证^[18-20],并且小鼠体质量随着泼尼松龙用药剂量和用药时间的增加而显著下降,表现出的中医阴虚证候愈加显著。中、高剂量组小鼠脾脏、胸腺质量及脏器指数下降,提示免疫相关器官明显萎缩,出现免疫抑制,而对睾丸无明显影响。中、高剂量组亦可以抑制皮质酮与 ACTH 分泌,减少肾上腺类固醇激素合成酶 (StAR、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1) 和肾上腺胆固醇转化为激素过程中相关蛋白 (LDLR、SRBI 和 StAR) 的表达。我们从中医证候角度认为,机体肾上腺轴与免疫能力的下降,表现为脾肾两脏的阴阳失衡与功能虚衰^[21]。泼尼松龙造成肾上腺功能下降的可能原因是对肾上腺轴的负反馈调节作用

导致的。外源性的泼尼松龙被摄入后机体的糖皮质激素过量,当供应远大于需求即导致了自身糖皮质激素的产生减少,长此以往肾上腺功能被严重抑制,免疫功能亦如此。

综上所述,泼尼松龙造成的小鼠药源性虚证为阴虚证,其脏腑定位主要在肾、脾。该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-肾上腺皮质轴功能被抑制为主。泼尼松龙药源性虚证模型建议泼尼松龙给药剂量 2.5 mg/(kg·d) 左右,用药时间 7 天。

参考文献

- [1] 李道中. 初探“肾”实质与免疫 [J]. 广州中医学院学报, 1984, 1(2): 12-17.
- [2] 时人. 对中医肾本质的认识 [J]. 广西医学, 1987, 6(3): 65-67.
- [3] 张经明. 关于“肾”本质的探讨 [J]. 青海医学院通讯, 1978, 1(1): 131-136.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 张季平. 类固醇皮质激素药物概述 [J]. 中国药学杂志, 1965, 13(7): 320-324.
- [7] 陈巍, 江锦鹏. 肾上腺皮质激素类药物研究的进展 [J]. 天津医药杂志, 1964, 2(3): 243-249.
- [8] 林涛, 傅德皓, 杨述华, 等. 糖皮质激素性骨质疏松模型研究进展 [J]. 中国骨肿瘤骨病, 2011, 10(2): 192-195.
- [9] 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.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 梅长林, 吉程程. 糖皮质激素在内科临床的应用及思考 [J]. 中国实用内科杂志, 2006, 26(19): 1468-1470.
- [14] 王长梅, 韦英杰, 贾晓斌, 等. 泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松模型的建立 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(3): 509-514.
- [15] 章建华, 张成龙, 尹华. 激素类型对大鼠股骨头坏死模型的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(12): 3969-

3973.

- 〔6〕 夏炳江,童培建,肖鲁伟,等. 大鼠激素性股骨头坏死
肾阳虚型病证结合模型构建与评价的实验研究 〔J〕.
中华中医药学刊, 2013, 31(2): 301-304, 454.
- 〔7〕 衣欣,李健民,袁慎英,等. 肾阳虚模型大鼠与衰老的
关系及鹿茸的作用 〔J〕. 中药药理与临床, 1997, 13
(5): 35-36.
- 〔8〕 方肇勤,潘志强,卢文丽,等. 大鼠和小鼠辨证论治标

准的建立和用途 〔J〕. 中西医结合学报, 2009, 7(10):
907-912.

- 〔9〕 方肇勤,潘志强,卢文丽,等. 大鼠、小鼠辨证的思路与
方法 〔J〕. 中国比较医学杂志, 2009, 19(10): 53-59,
85.
- 〔10〕 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.

Characteristics of Syndrome of Different Doses of Prednisolone Induced Deficiency Syndrome Model Mice

QIAN Hongliang, PAN Zhiqiang, WANG Xiaomin, LU Tao, LI Ya, FANG Zhaoqin

(Basic Medical College, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

ABSTRACT Objective To investigate the characteristics and possible material basis of drug-induced syndromes in mice induced by prednisolone. **Methods** A total of 80 Institute of Cancer Research (ICR) mice were randomly divided into a normal control group, a very low dose group, a low dose group, a middle dose group and a high dose group, with 16 mice in each group. The very low dose group, low dose group, middle dose group and high dose group were given 0. 25, 0. 5, 2. 5, 12. 5 mg/(kg · d) of prednisolone acetate tablets, while the normal control group was given equivalent distilled water 8 mice of each group were intervened for 7 days, and another 8 mice were intervened for 14 days. The body weight of the mice was dynamically observed every other day. After 7 and 14 days of intervention, the characterization information of body mass, grip strength, axillary temperature, open field activity, and infrared temperature of different parts of the body were compared respectively. The spleen, thymus and testis were weighed and the organ index was calculated. The serum corticosterone and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels were measured; The adrenal function-related gene expression and adrenal low-density lipoprotein receptor (LDLR), scavenger receptor class B type I (SRBI), steroidogenic acute regulatory protein (StAR) protein expression were detected. **Results** After 7 and 14 days of intervention, the middle dose and high dose groups, the body weight, spleen mass, thymus mass, spleen index and thymus index of the mice decreased than those of the normal control group and the very low dose group at same time, while serum corticosterone and ACTH content, the expression of adrenal gland function-related genes and adrenal LDLR, SRBI and StAR proteins were decreased to different degrees ($P < 0. 05$), but there was no statistical difference in the grip force, axillary temperature, open field activity and infrared temperature of different parts of the mice ($P > 0. 05$). **Conclusion** The drug-induced deficiency syndrome caused by prednisolone is *yin* deficiency syndrome. The material basis of the drug-deficiency syndrome may be inhibited expression of adrenal corticosteroid synthase and inhibited function of the cortical axis of the pituitary adrenal gland.

Keywords prednisolone; deficiency syndrome; syndrome model; adrenal cortex

(收稿日期: 2018 - 09 - 05; 修回日期: 2018 - 12 - 17)

编辑: 邓 媛

欢迎邮购 《中医杂志》 过刊

1988、1989、2000、2001 年合订本, 每本 100 元, 2002 年合订本 105 元, 2003 年合订本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本每年 140 元。2011(缺 5、6 期) —2013 年每册 9. 80 元, 2014(缺 21 期) —2017 年(缺 3、5、15、18 期) 每册 15 元, 2018 年每册 20 元(缺 5、7、9 期)。2011—2013 年合订本(每年 4 本), 每年 280 元, 2014、2015、2016、2017 年合订本(每年 4 本), 每年 400 元。2018 年合订本, 600 元(共 4 本)。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信(zyzzgz) 购买。邮编: 100700, 电话: (010) 64089195。