

氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立 及相关指标的评价

戴冰¹, 张嘉妮², 杨梦琳², 李玉星², 肖子曾^{2*}, 杨磊¹, 韦强¹

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

【摘要】 目的 建立氢化可的松致肾阳虚、肾阴虚小鼠模型, 并探讨其相关评价指标。**方法** 采用氢化可的松灌胃建立肾阳虚及肾阴虚小鼠模型; 观察肾阳虚、肾阴虚模型小鼠生存状态, 测定各组模型小鼠体重变化; 采用放射免疫法检测 HPA 轴中促肾上腺皮质激素 (ACTH)、皮质醇 (Cor.)、HPT 轴中甲状腺激素 (TSH)、三碘甲腺原氨酸 (T₃)、甲状腺素 (T₄)、HPG 轴中卵泡素 (FSH)、雌二醇 (E₂)、睾酮 (T) 含量。**结果** 肾阳虚、肾阴虚模型小鼠体重均下降, 肾阳虚模型小鼠血清 ACTH、Cor.、TSH、T₃、T₄ 水平降低, 血清 FSH、E₂、T 水平升高, 且差异均有显著性 ($P < 0.01$); 而肾阴虚模型则反之。**结论** 肾虚小鼠内分泌系统中 ACTH、Cor.、TSH、T₃、T₄、FSH、E₂、T 各激素水平均发生了改变, 其中 Cor. 可作为评价糖皮质激素法建立肾虚模型的重要指标。

【关键词】 肾阳虚; 肾阴虚; 评价指标

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2017) 01-0070-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.01.013

Establishment of a mouse model of kidney deficiency induced by oral administration of hydrocortisone and evaluation of related factors

DAI Bing¹, ZHANG Jia-ni², YANG Meng-lin², LI Yu-xing², XIAO Zi-zeng^{2*}, YANG Lei¹, WEI Qiang¹

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of kidney-yin and kidney-yang deficiency after oral administration of hydrocortisone, and to explore the related evaluation factors. **Methods** The model was established by oral administration of hydrocortisone to induce kidney-yin and kidney-yang deficiency in mice. The survival and body weight of the mice were observed. The serum content of adrenal cortical hormone (ACTH), cortisol (Cor.) in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and thyroid stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T₃), thyrox (T₄) in the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis, follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E₂), testosterone (T) in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis were determined by radioimmunoassay. **Results** The body weight of kidney-yin and kidney-yang mice were decreased, the serum ACTH, Cor, TSH, T₃, T₄ contents were decreased, the serum FSH, E₂, T contents were increased in the kidney-yang deficiency model mice ($P < 0.01$), and those parameters in the kidney-yin deficiency model mice were changed in opposite direction. **Conclusions** It is found that the hormone levels of ACTH, Cor, TSH, T₃, T₄, FSH, E₂ and T in kidney deficiency mice are changed, and cortisol can be used as an important index to evaluate the model of kidney deficiency induced by glucocorticoid.

【Key words】 Kidney-yang deficiency; Kidney-yin deficiency; Evaluating factors; Mouse models

Corresponding author: XIAO Zi-zeng, E-mail: 1092341361@qq.com

【基金项目】 湖南省教育厅重点项目 (编号:15A140); 湖南中医药大学研究生科研创新课题 (编号:2016CX16)。

【作者简介】 戴冰 (1965 -), 女, 主任药师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药炮制、药理学及药效物质基础研究。E-mail: db0223@163.com

【通讯作者】 肖子曾 (1959 -), 男, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 方剂的应用及疗效机理研究。E-mail: 1092341361@qq.com

肾虚模型是具有代表性的中医动物模型,是中医根本脏器的虚损、证候模型。随着现代医学对于中医肾虚理论的不断深入研究,目前已积累了大量肾虚动物模型的建立方法^[1],其常用的糖皮质激素类药物有氢化可的松、醋酸可的松、醋酸氢化可的松、地塞米松磷酸钠、地塞米松等。本课题组前期研究发现,采用氢化可的松连续灌胃 4 d,可使小鼠血浆 cAMP 含量升高,能成功复制出良好的肾阴虚小鼠模型^[2]。虽然现已对肾虚模型有较深入的研究,但由于临床上对肾虚病症尚无标准可控的生化诊断指标,使模型在模拟肾虚证候的研究中仅能反映某一方面的病理变化特征,并不能完全体现临床上疾病发生的复杂性和中医单一病因的复杂性^[3],因此建立规范、标准、可重复的理想肾虚动物模型具有一定的困难;目前用于评价肾虚模型的指标还尚无统一的标准,其大多仅以造模动物的一般体征变化作为观察指标,或少有以生化指标如动物体内 cAMP、cGMP 含量对肾虚模型进行评价,使实验结果发生偏差,缺乏一定的科学性,故肾虚模型的建立方法及评价相关指标的选择仍值得探讨研究。

中医认为肾为先天之本,藏精气,主骨、生髓、化血,主持人体生长发育、生殖和调节机体代谢,为正气之根。现代研究进展表明,肾虚者往往表现为 NIM 中的内分泌系统功能障碍即下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴功能失调,性腺轴 (HPG) 和甲状腺轴 (HPT) 功能紊乱^[4-6]。因此,本研究根据《中药药理研究方法学》^[7]中肾阳虚、肾阴虚模型的造模方法,结合前期研究基础,采用氢化可的松灌胃建立肾阳虚、肾阴虚小鼠模型,通过观察各组小鼠精神状态等情况,测定体重,并采用放免法测定各靶腺轴中激素的含量对肾虚 (肾阳虚、肾阴虚) 证小鼠模型进行评价,为肾阳虚、肾阴虚的模型评判标准提供实验依据,使该模型的建立及评价方法更加完善、严谨,也为提高临床治疗肾虚证的可靠性和适用性提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组

清洁级健康 KM 小鼠 90 只,雌雄各半,体重 (20 ± 2) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2011-0003】;饲养于湖南中医药大学实验动物中心【SYXK(湘)2013-0005】。采用完全随机法将小鼠分为 3 组,即空白对照组、肾阴虚模型组、肾阳虚模型组,每组 30 只。

1.1.2 试剂及药物

氢化可的松注射液 (10 mg/2 mL),安阳九州药业有限责任公司,批号:140820001A。促肾上腺皮质激素、皮质醇、促甲状腺激素、三碘甲状腺原氨酸、甲状腺素、促卵泡激素、雌二醇、睾酮放射免疫分析试剂盒,以上试剂盒均由北京北方生物技术研究提供 (批号:150820)。

1.1.3 仪器

小型冷冻离心机 (centrifuge 5415R 型,德国 Eppendorf 公司); Haier 冰箱 (bcd-268tn 型,青岛海尔股份有限公司); 电子天平 (Y3002 型,上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立方法

(1)空白对照组:每天按 0.02 mL/g 灌胃蒸馏水,自由饮水、饮食,连续 10 d。

(2)肾阳虚模型组:每天按 25 mg/kg 给予灌胃氢化可的松,自由饮水、饮食,连续 10 d。

(3)肾阴虚模型组:每天按 0.02 mL/g 灌胃蒸馏水,连续 6 d,第 7 ~ 10 天,按 50 mg/kg 给予灌胃氢化可的松,自由饮水、饮食,连续 4 d。

1.2.2 标本采集及指标检测

(1)观察指标

从实验开始,每日观察小鼠活动力、精神状态、毛发光泽度、进食、排便及有无死亡情况等。

(2)测量指标

于造模前、造模后 (取材前) 分别对各组小鼠进行称重,并记录。

(3)生化指标

末次给药后禁食 24 h,于试验第 11 天摘眼球取血,3500 r/min 离心 15 min,分离血清,采用放射免疫分析法测定血清中促肾上腺皮质激素 (ACTH)、皮质醇 (Cor.)、促甲状腺激素 (TSH)、三碘甲状腺原氨酸 (T3)、甲状腺素 (T4)、促卵泡素 (FSH)、雌二醇 (E2)、睾酮 (T) 的含量。

1.2.3 统计学分析

采用 SPSS. 19 统计软件,实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计学处理方法采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对肾阳虚、肾阴虚模型小鼠生存状态的影响

空白对照组小鼠活动自如、反应灵敏、毛发润

泽、大便黄褐色,不干不稀;肾阳虚模型组小鼠出现精神倦怠、活动减少、反应迟钝、肢尾冷、蜷曲拱背、皮毛无光泽、不欲饮食、大便稀溏等症状;肾阴虚模型组小鼠出现烦躁、易激惹、拱背扎堆、毛发枯槁易脱落、大便干结、饮食增多等症状。

2.2 对肾阳虚、肾阴虚模型小鼠体重的影响

与空白对照组比较,肾阳虚模型组、肾阴虚该模型组小鼠体重差异均有显著性($P < 0.01$)。提示肾阳虚模型小鼠及肾阴虚模型小鼠体重均降低。结果见图 1。

2.3 对肾阳虚、肾阴虚模型小鼠 HPA 轴中 ACTH、Cor. 含量的影响

与空白对照组比较,肾阳虚模型、肾阴虚模型组小鼠血清 ACTH、Cor. 含量均有显著性差异($P < 0.01$);提示肾阳虚模型小鼠血清 ACTH、Cor. 含量均降低,而肾阴虚模型小鼠则反之,结果见表 1。

2.4 对肾阳虚、肾阴虚模型小鼠 HPT 轴中 TSH、T3、T4 含量的影响

与空白对照组比较,肾阳虚模型、肾阴虚模型组

小鼠血清 TSH、T3、T4 含量均有显著性差异($P < 0.01$);提示肾阳虚模型小鼠血清 TSH、T3、T4 含量均降低,而肾阴虚模型小鼠则反之,结果见表 2。

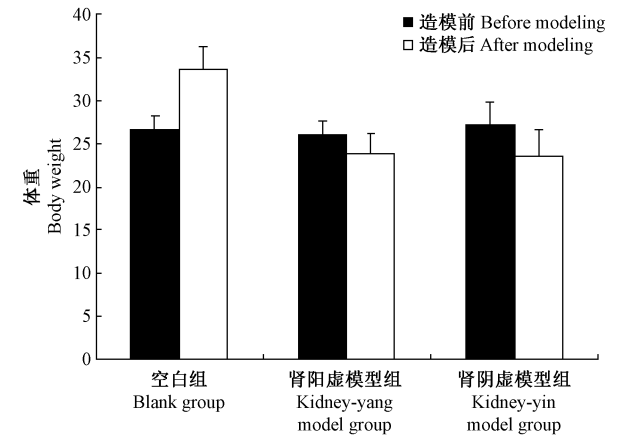


图 1 对糖皮质激素肾阳虚模型小鼠及肾阴虚模型小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

Fig.1 Effect of body weight of kidney-yang and kidney-yin deficiency mice induced by oral administration of hydrocortisone

表 1 对小鼠血清 ACTH、Cor. 及 TSH、T3、T4 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Tab.1 Changes of serum ACTH, cortisone contents and TSH, T ₃ , T ₄ in the mice					
组别 Groups	促肾上腺皮质激素 ACTH/ng/mL	皮质醇 Cortisone/ng/mL	促甲状腺激素 TSH/nmol/L	三碘甲状腺原氨酸 T ₃ /nmol/L	甲状腺素 T ₄ /nmol/L
空白对照组 Blank group	305.31 ± 24.12	714.98 ± 96.94	3.55 ± 0.54	3.38 ± 0.34	19.85 ± 2.71
肾阳虚模型组 Kidney-yang model group	214.97 ± 23.83 **	609.53 ± 30.59 **	1.53 ± 0.33 **	1.42 ± 0.30 **	13.45 ± 1.36 **
肾阴虚模型组 Kidney-yin model group	450.64 ± 16.35 **	835.07 ± 31.73 **	6.51 ± 0.54 **	5.84 ± 0.36 **	35.66 ± 2.78 **

注:与空白组比, ** $P < 0.01$ (表 2 同)。
Note. ** $P < 0.01$, compared with the blank group. (The same as the Tab. 2)

2.5 对肾阳虚、肾阴虚模型小鼠 HPG 轴中 FSH、E2、T 含量的影响

与空白对照组比较,肾阳虚模型、肾阴虚模型组小鼠血清 FSH 含量差异均有显著性($P < 0.01$);雌鼠血清 E2 含量差异有显著性($P < 0.01$),但雄鼠差异无显著性;雄鼠血清 T 含量差异有显著性($P <$

0.01),但雌鼠差异无显著性。提示肾阳虚模型、肾阴虚模型组小鼠均存在 HPG 轴功能紊乱,且不同性别的小鼠性激素也具有不同的表现,肾阳虚模型小鼠血清 FSH 含量升高,雌鼠血清 E2 含量及雄鼠血清 T 含量升高,而肾阴虚模型小鼠血清 FSH 含量降低,雌鼠血清 E2 含量及雄鼠血清 T 含量降低,结果见表 2。

表 2 对小鼠血清 FSH、E2、T 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Tab.2 Changes of serum FSH, E2 and T contents in the mice						
组别 Groups	促卵泡素 FSH /mIU/mL		雌二醇 E2/pg/mL		睾酮 T/ng/mL	
	雄鼠 Male	雌鼠 Female	雄鼠 Male	雌鼠 Female	雄鼠 Male	雌鼠 Female
空白对照组 Blank group	1.44 ± 0.08	1.37 ± 0.16	17.85 ± 0.57	17.27 ± 0.79	5.98 ± 0.18	5.68 ± 0.60
肾阳虚模型组 Kidney-yang model group	2.45 ± 0.22 **	2.96 ± 0.18 **	18.03 ± 0.43	24.16 ± 0.59 **	12.05 ± 0.32 **	5.87 ± 0.21
肾阴虚模型组 Kidney-yin model group	0.48 ± 0.03 **	0.66 ± 0.02 **	17.29 ± 0.74	13.72 ± 0.16 **	2.14 ± 0.05 **	5.40 ± 0.04

3 讨论

肾虚是常见的中医临床体质之一,是以肾中精气虚损,机体表现以肾的脏腑的功能低下为主要特征的一种生理状态。目前主要通过药物致内分泌、免疫等多系统功能紊乱的方法建立肾虚证动物模型,其中多采用糖皮质激素类药物(氢化可的松)来造模,而氢化可的松所使用的给药剂量、持续天数不同,可分别复制出肾阳虚和肾阴虚模型。大剂量外源性皮质激素早期能使机体呈烦躁多动等肾阴虚表现^[8],但由于肾上腺皮质激素可使促肾上腺皮质激素释放受抑制,而使类固醇激素分泌减少,所以出现一系列“耗竭”现象,晚期出现“阴损及阳”的转变,特别是突然停用,肾上腺轴的抑制状态立即暴露,出现一系列肾阳虚的表现^[9]。

目前报道的肾虚模型多采用肌肉或皮下注射氢化可的松造模,而笔者前期实验中发现,小鼠经肌肉或皮下注射后死亡率过高,故本实验改用灌胃给药造模,该方法操作简便,成功率高。本实验结果发现,采用不同剂量的氢化可的松灌胃不同时间造模后,肾阳虚模型小鼠出现体重下降,活动迟缓、反应迟钝、肢尾冷,卷曲拱背,皮毛无光泽、不欲饮食等症状;肾阴虚模型小鼠出现体重下降,烦躁、易激惹、拱背扎堆、毛发枯槁易脱落、大便干结、饮食增多等症状,这与过去报道的肾阳虚、肾阴虚模型的症状体征基本一致^[10]。

也有许多学者发现肾虚者内分泌系统各激素水平发生了一定程度的紊乱,并通过观察 HPA 轴中的 ACTH、Cor. 含量,HPG 轴中的 FSH、E₂、T 含量或 HPT 轴中 TSH、T₃、T₄ 的含量的变化来判断肾阳虚和肾阴虚^[11-13]。本实验研究结果发现,肾阳虚模型小鼠血清 ACTH、Cor.、TSH、T₃、T₄ 水平降低,血清 FSH、E₂、T 水平升高,而肾阴虚模型则反之,这进一步证明肾虚小鼠内分泌系统中各激素水平均发生紊乱。而糖皮质激素(皮质醇、皮质酮)是由肾上腺皮质产生和分泌的激素,在体内主要发挥调节糖代谢的作用。皮质醇(Cor.)的分泌依赖于 HPA 轴的分泌规律,受垂体前叶促肾上腺皮质激素的控制,Cor. 的合成量不足或分泌过多均会导致体内糖代谢紊乱,故血清中 Cor. 的水平高低是反映肾上腺皮质功能的重要指标^[14-15]。肾阳虚者大多表现为肾上腺

皮质功能抑制,肾阴虚者反之,因此 Cor. 可用于评价肾虚模型的成功与否,尤其是对于采用糖皮质激素法建立的肾虚模型,这为中医肾阳虚、肾阴虚模型的成功建立及相关评价指标的标准化提供一定的实验依据。

参 考 文 献

- [1] 李晓清, 杨国汉. 肾虚证物质基础及模型研究现状 [J]. 贵阳中医学院学报, 2009, 31(3): 64-66.
- [2] 肖子曾, 戴冰, 黄开颜, 等. 六味地黄汤对小鼠血浆中环核苷酸的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(1): 44-46.
- [3] 周小航, 王喜军. 关于中医证候动物模型的思考与展望 [J]. 中医药信息, 2014, 31(4): 78-80.
- [4] Wang XF, Zhang L, Huang RB, et al. Regulatory mechanism of hormones of the pituitary-target gland axes in kidney-Yang deficiency based on a support vector machine model [J]. J Tradit Chin Med. 2015, 35(2): 238-243.
- [5] Wang P, Sun H, Lv H, et al. Thyroxine and reserpine-induced changes in metabolic profiles of rat urine and the therapeutic effect of Liu Wei Di Huang Wan detected by UPLC-HDMS [J]. J Pharm Biomed Anal. 2010, 53(3): 631-645.
- [6] Uschold-Schmidt N, Peterlik D, Füchsl AM, et al. HPA axis changes during the initial phase of psychosocial stressor exposure in male mice [J]. J Endocrinol. 2013, 218(2): 193-203.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1028.
- [8] 陈奕权. 大剂量醋酸可的松对大白鼠甲状腺的影响的组织学及组织化学观察 [J]. 解剖学报, 1964, 7(1): 64.
- [9] 杜江, 李楠, 王和鸣. 肾虚模型造模方法及相关指标 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50): 9433-9436.
- [10] 张子怡, 陈宝军, 张庆, 等. 肾阳虚证动物模型的造模方法与评价指标 [J]. 福建中医药, 2014, 45(2): 61-63.
- [11] 苟小军, 韩宝侠, 王朝廷, 等. 肾阳虚证造模方法考察 [J]. 吉林中医药, 2009, 29(9): 814-815.
- [12] 王萍, 王喜军. 肾阴虚证动物模型研究概况 [J]. 中医药信息, 2013, 30(4): 123-125.
- [13] 梁汝圣, 徐宗佩. 大鼠肾阳虚模型建立方法 [J]. 吉林中医药, 2008, 28(9): 685-687.
- [14] 傅万山, 杨解人, 丁伯平, 等. 六味地黄丸对肾上腺皮质激素型肾阴虚小鼠的药效学研究 [J]. 皖南医学院学报, 2002, 21(1): 11-13.
- [15] 薛莎, 汤学军, 马威, 等. 右归丸对家兔肾阳虚证生化指标及皮质醇的影响 [J]. 中医杂志, 2001, 42(7): 434-437.