

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比较[J].中国实验动物学报,2019,27(2):173-180.

Qian HL, Pan ZQ, Peng PK, et al. Comparison of the prednisolone-induced syndromes in different strains of mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 173-180.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.008

泼尼松龙致不同品系小鼠药源性证候的比较

钱宏梁,潘志强*,彭佩克,卢涛,钱杨杨,宋秋佳,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 研究糖皮质激素药物作用于不同品系小鼠后肾上腺皮质功能抑制程度及其诱导药源性证候的差异性。方法 选用 ICR、BALB/c、C57BL/6J、KM 和裸小鼠 5 种小鼠为实验对象,采用泼尼松龙进行干预。每种小鼠 16 只,其中正常对照组 8 只,泼尼松龙组 8 只。以 0.5 mg/(kg·d)泼尼松龙连续灌胃 14 d,每日观测小鼠体重,在给药第 14 天,运用小鼠辨证论治实验方法学检测小鼠中医四诊信息,次日处死小鼠,取脾、胸腺称重并计算脏器指数;运用 ELISA 检测血清皮质酮和 ACTH 含量;采用实时荧光定量 PCR 技术检测肾上腺 *Star*、*Cyp11a1*、*Cyp21a1*、*Cyp11b1*、*Cyp11b2* 基因表达;运用 Western blot 方法检测肾上腺 LDLR、SRBI、Star 蛋白表达。结果 与各自对照组比较:1)0.5 mg/(kg·d)泼尼松龙给药后第 7 天起 ICR 小鼠体重显著下降($P<0.01$);给药后第 13 天起 BALB/c 小鼠体重显著下降($P<0.01$);给药后第 5 天起 C57BL/6J 小鼠体重显著下降($P<0.01$);给药后第 13 天裸小鼠体重显著下降($P<0.05$)。2)泼尼松龙导致 ICR 小鼠抓力显著下降以及躯干平均温度显著降低($P<0.05$)。3)泼尼松龙导致 ICR 小鼠和裸鼠脾重量显著下降($P<0.01$)以及裸鼠脾指数下降($P<0.05$),泼尼松龙导致 ICR、C57BL/6J 和 KM 小鼠胸腺重量和胸腺指数均显著下降($P<0.01$)。4)泼尼松龙显著导致 BALB/c 与 KM 小鼠血清皮质酮下降($P<0.05$),也显著引起 BALB/c 小鼠血清促肾上腺皮质激素(ACTH)含量下降($P<0.01$)。5)泼尼松龙显著下调 ICR 小鼠肾上腺 *Cyp21a1* 基因表达($P<0.05$),下调 C57BL/6J 小鼠 *Star* 基因表达($P<0.01$),下调 KM 小鼠 *Cyp11a1*、*Cyp21a1* 基因表达($P<0.01$),下调裸鼠 *Star* 与 *Cyp21a1* 基因表达($P<0.05$);且泼尼松龙抑制 ICR 小鼠肾上腺 LDLR 蛋白表达以及 KM 小鼠肾上腺 Star 蛋白表达。结论 泼尼松龙造成的小鼠药源性虚证主要表现为“气虚”,涉及中医“肾藏象”与“脾藏象”,其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;开展糖皮质激素药源性虚证研究建议首选 ICR 小鼠。

【关键词】泼尼松龙;肾上腺皮质;药源性证候;虚证;小鼠

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2019)02-0173-08

Comparison of the prednisolone-induced syndromes in different strains of mice

QIAN Hongliang, PAN Zhiqiang*, PENG Peike, LU Tao, QIAN Yangyang, SONG Qiuqia, FEI Minghong,
FANG Zhaoqin

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

Corresponding author: Pan Zhiqiang. E-mail: pzq527@163.com

【Abstract】Objective To study the degrees of adrenocortical inhibition after the action of glucocorticoid drugs, and the differences in its drug-induced syndromes in five mouse strains. Methods ICR, BALB/c, C57BL/6J, KM and nude mice were selected. Prednisolone was used as the drug for intervention. There were 16 mice of each strain, eight-each

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81473562,81873212)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81473562,81873212).

[作者简介]钱宏梁(1992—),男,硕士生,研究方向: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。Email: pzq527@163.com

in the normal control group and prednisolone group. Prednisolone (0.5 mg/kg·d) was administered for 14 consecutive days in the prednisolone group. The body weight of mice was recorded every day, and TCM diagnostic information were detected by the experimental methodology of syndrome differentiation and treatment in mice on the 14th day. Mice was sacrificed and their spleen and thymus were weighed, and the organ indexes were calculated. Serum levels of corticosterone and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) were measured by ELISA. Gene expression of *Star* (steroidogenic acute regulatory protein), *Cyp11a1* (cytochromes P450 11A1), *Cyp21a1* (cytochromes P450 21A1), *Cyp11b1* (cytochromes P450 11B1) and *Cyp11b2* (cytochromes P450 11B2) in the adrenal glands were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Protein expression of LDLR (low-density lipoprotein receptor), SRBI (scavenger receptor class B member 1) and StAR (steroidogenic acute regulatory protein) was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group of the respective strains, the body weight of ICR mice decreased significantly 7 days after prednisolone administration ($P < 0.01$), BALB/c mice decreased significantly 13 days after prednisolone administration ($P < 0.01$), C57BL/6J mice decreased significantly 5 days after prednisolone administration ($P < 0.01$), and nude mice decreased significantly 13 days after prednisolone administration ($P < 0.05$). Prednisolone administration resulted in a significant decrease in the grip strength and a significant decrease in the mean temperature of the body trunk of ICR mice ($P < 0.05$). Prednisolone resulted in a significant decrease in the spleen weight of ICR mice and nude mice ($P < 0.01$) and a decrease in the splenic index of nude mice ($P < 0.05$), whereas prednisolone administration resulted in a significant decrease in the thymic weight and thymic index of ICR, C57BL/6J and KM mice ($P < 0.01$). Prednisolone administration significantly decreased the serum corticosterone level in BALB/c and KM mice ($P < 0.05$), and serum level of ACTH in BALB/c mice ($P < 0.01$). Prednisolone significantly downregulated the *Cyp21a1* expression in ICR mice ($P < 0.05$), *Star* expression in C57BL/6J mice ($P < 0.01$), *Cyp11a1* and *Cyp21a1* expression in KM mice ($P < 0.01$), and *Star* and *Cyp21a1* expression in nude mice ($P < 0.05$). In addition, prednisolone inhibited expression of LDLR and StAR in the ICR and KM mice. **Conclusions** The prednisolone-induced deficiency syndrome in mice is mainly characterized by “qi deficiency”, which is involved in the “kidney state” and “spleen state”. The basis of this deficiency syndrome is primarily inhibition of expression of adrenocortical steroid synthase and function of the pituitary–adrenocortical axis. ICR mice is suggested to be used for studies of glucocorticoid-induced asthenia.

【**Keywords**】 prednisolone; adrenal cortex; drug-induced syndrome; deficiency syndrome; mice

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

证候动物模型是中医证候基础学研究的重要内容。在开展证候动物模型时究竟选择哪种品种与品系,是研究者首要取舍的问题,基于此,本文在课题组既往大量的小鼠证候研究基础上^[1-2],比较常用 5 种品系小鼠对糖皮质激素药物泼尼松龙的反应,以明确最适合作为糖皮质激素药源性证候的实验小鼠,为后续建立“糖皮质激素药源性证候模型标准化方法与评价体系”奠定基础。

糖皮质激素是一种类固醇激素,生理上发挥不可或缺作用,而机体在多种病理状态下需要补充外源性糖皮质激素药物以发挥抗病作用。值得注意的是,大剂量或长期使用糖皮质激素药物不可避免产生一系列不良反应,从中医学理论上分析可以辨证相关的证候,称之为糖皮质激素导致的“药源性证候”^[3]。本研究以 0.5 mg/(kg·d)泼尼松龙连续灌胃 5 种小鼠 14 d 后,观察其对不同品系小鼠的影响,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性 ICR、BALB/c、C57BL/6J 和 BALB/c 裸小鼠共 64 只,SPF 级,5 周龄,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0016】;雄性 KM 小鼠 16 只,SPF 级,20~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0011】。小鼠均饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房【SYXK(沪)2014-0008】。实验伦理声明:本设施的环境条件符合中国国家标准《实验动物环境及设施》(GB14925-2001)对普通动物实验设施的有关标准,动物饲养管理和动物实验操作符合《实验动物管理条例》。实验动物伦理委员会批准号 SZY201803011。

1.1.2 药物与试剂

醋酸泼尼松龙片(国药准字 H31020771),购自

上海上药信谊药厂有限公司。TRIzol 购自 Invitrogen 公司。PrimeScript® RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus) II 购自 TaKaRa 公司。采用 Primer3 (v.0.4.0) 在线软件设计引物,见表 1,并委托 Life Technologies 公司合成。皮质酮 ELISA 试剂盒 (货号 501320) 购自美国 Cayman 公司,促肾上

腺皮质激素 (ACTH) ELISA 试剂盒 (货号 M046006) 购自美国 Mdb 公司。LDL Receptor 抗体 (ab52818)、SR-BI 抗体 (ab52629)、StAR 抗体 (ab96637) 均购自美国 Abcam 公司。 β -actin 抗体 (货号 A5441) 购自 Sigma-Aldrich 公司。

表 1 小鼠肾上腺皮质功能基因

Table 1 Genes of adrenal cortical function in the mice

基因名称 Gene names	基因库号 Genbank number	引物序列 Primer sequences	产物长度 (bp) Product length
β -actin	NM_007393	上游 FORWARD:5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' 下游 REVERSE:5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAA-3'	165
Cyp11a1	NM_019779	上游 FORWARD:5'-ACTCCGGTACTTGGGCTTT-3' 下游 REVERSE:5'-GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG-3'	201
Cyp11b1	NM_001033229	上游 FORWARD:5'-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3' 下游 REVERSE:5'-GGGTTGATGTCGTGTCAGTG-3'	140
Cyp11b2	NM_009991	上游 FORWARD:5'-CTGAACGCTATATGCCTCAGC-3' 下游 REVERSE:5'-AGTGCTCTCCACCTGGAAGGT-3'	160
Cyp21a1	NM_009995	上游 FORWARD:5'-CTCCGGCTATGACATCCCTA-3' 下游 REVERSE:5'-ACAGCCAAAGGATGCTGTTC-3'	151
Star	NM_011485	上游 FORWARD:5'-TTGGCATACTCAACAACCA-3' 下游 REVERSE:5'-GAAACACCTGCCACATCT-3'	103

1. 1. 3 实验设备

四诊设备: YLS-13 A 型小鼠抓力测定仪 (购自山东省医学科学院设备站), 底部划有 5 cm×5 cm 方格 (3 行×5 列=15 格) 的实验笼, ThermoCAM P30 型红外热像仪器 (购自美国 FLIR 公司)。QuantStudio™3 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司), Elx800 型酶标仪 (美国 Biotek 公司), Alpha 化学发光凝胶成像系统 (Protein-Simple 公司) 等。

1. 2 方法

1. 2. 1 分组与造模

小鼠适应性饲养后, ICR、BALB/c、C57BL/6J、KM 和裸鼠均随机分为 2 组: 正常对照组 ($n=8$)、泼尼松龙组 ($n=8$)。泼尼松龙组灌胃 0.5 mg/(kg·d) 泼尼松龙 (此剂量则是根据临床常用量每日 30 mg/kg 折算到小鼠所得), 每日 1 次; 正常对照组灌胃等体积的灭菌水。

1. 2. 2 四诊指标观测

在实验第 14 天, 运用小鼠辨证论治实验方法学采集小鼠四诊信息: 一般外观表现、体重、躯体不同部位红外温度、旷场实验活动度 (计算方法: 在网格中活动 60 s 的跨格数以及前肢离地次数的总和)、四肢抓力、腋温等表征信息, 然后进行计量化辨证。具体参见有关文献^[1,4-6]。

1. 2. 3 取材

在实验第 15 天处死小鼠, 先称体重, 取材如下:

(1) 眼球取血, 分离血清, 检测皮质酮与 ACTH 含量。

(2) 脾、胸腺称取重量并计算脏器指数。脾指数=脾重量 (mg)/体重 (g)。

(3) 取肾上腺组织检测 *Star*、*Cyp11a1*、*Cyp21a1*、*Cyp11b1*、*Cyp11b2* 的 mRNA 表达, 以及 LDLR、SRBI、StAR 蛋白表达。

1. 2. 4 实时荧光定量 PCR 检测基因 mRNA 表达

按照 TRIzol 试剂盒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℃×15 min, 85℃×5 s, 4℃; PCR 扩增反应体系为 20 μ L, 反应程序为 95℃×3 min, 95℃×5 s, 60℃×30 s, 40 个循环。基因相对表达量分析方法: 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析。

1. 2. 5 ELISA 检测血清激素

依据 ELISA 试剂盒说明书操作, 用血清样本检测皮质酮和 ACTH 含量。

1. 2. 6 Western blot 检测蛋白表达

采用 RIPA 裂解液处理肾上腺组织, 提取蛋白质样品并定量, 通过变性后, 分别执行聚丙烯凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗涤、二抗孵育、再洗涤、显影等常规实验流程, 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。

1. 2. 7 数据分析

采用 GraphPad Prism7.0 专业软件进行作图, 及

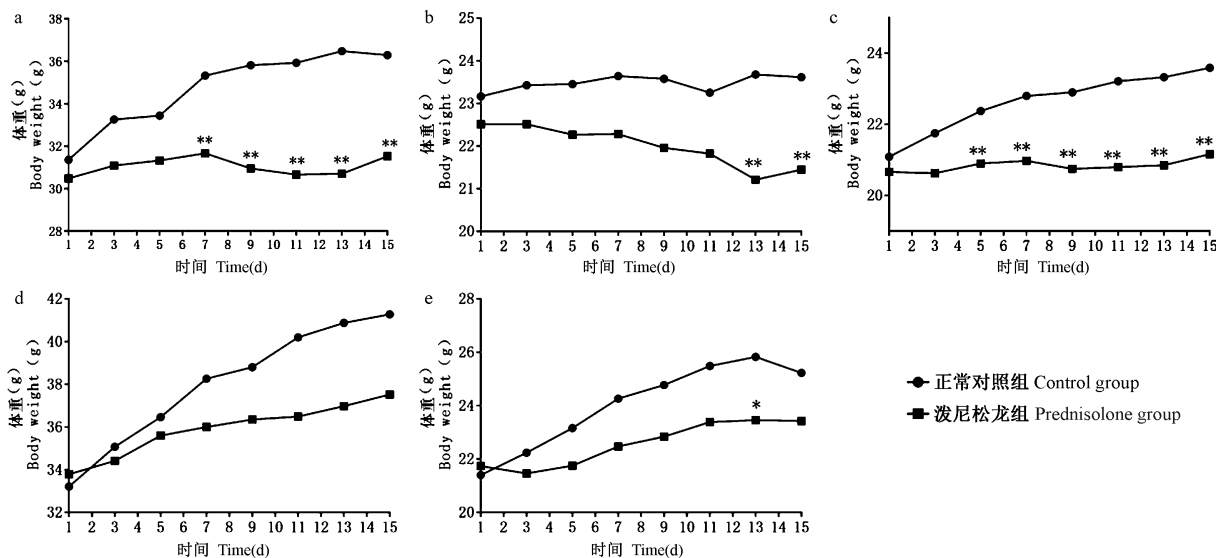
统计分析。

2 结果

2.1 小鼠四诊指标

2.1.1 体重动态变化(阴盛衰程度)

与各自正常对照组比较, 给药泼尼松龙后小鼠



注: a 为 ICR 小鼠, b 为 BALB/c 小鼠, c 为 C57BL/6J 小鼠, d 为 KM 小鼠, e 为裸鼠。与各自的正常对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。(下图同)。

图 1 体重动态变化

Note. a: ICR mice; b: BALB/c mice; c: C57BL/6J mice; d: KM mice; e: nude mice. Compared with their normal control groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Dynamic changes of body weight

2.1.2 旷场活动度、抓力差异(气盛衰程度)

与正常对照组比较, 泼尼松龙给药后 5 种小鼠抓力均有一定下降, 其中泼尼松龙给药后 ICR 小鼠抓力显著下降 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.1.3 不同部位红外温度、腋温差异(阳盛衰程度)

与正常对照组比较, 泼尼松龙给药后 ICR 小鼠腋温、头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度均有一定下降, 其中躯干平均温度显著下降 ($P < 0.01$)。其他小鼠不同部位红外温度、腋温均有一定程度下降但未出现统计学差异, 见图 2。

2.2 小鼠脏器变化

2.2.1 脾重量及指数

与正常对照组比较, 泼尼松龙给药后 5 种小鼠脾重量指数均出现下降, 其中, ICR 和裸鼠的脾重量显著下降 ($P < 0.01$), 裸鼠脾指数显著下降 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.2.2 胸腺重量及指数

与正常对照组比较, 泼尼松龙组小鼠胸腺重量

体重均出现增长减缓。其中, 给药后第 7 天起, ICR 小鼠体重显著下降 ($P < 0.01$); 给药后第 13 天起 BALB/c 小鼠体重显著下降 ($P < 0.01$); 给药后第 5 天起 C57BL/6J 小鼠体重显著下降 ($P < 0.01$); 给药后第 13 天裸鼠体重显著下降 ($P < 0.05$), 见图 1。

指数均出现下降。其中, ICR、C57BL/6J 和 KM 胸腺重量指数显著下降 ($P < 0.01$), BALB/c 泼尼松龙组胸腺重量指数变化不明显, 见图 3。此外裸鼠免疫缺陷故无胸腺。

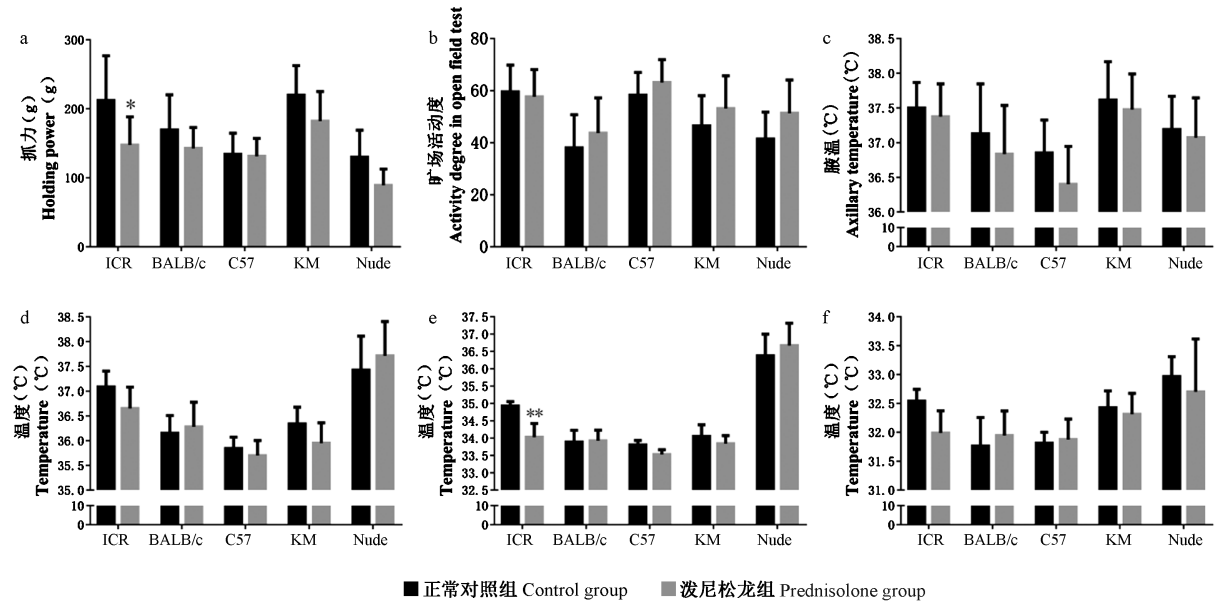
2.3 血清皮质酮与促肾上腺皮质激素 (ACTH) 含量

与正常对照组比较, BALB/c 的血清皮质酮与 ACTH 含量下降显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); KM 血清皮质酮含量下降显著 ($P < 0.01$), 见图 4。

2.4 肾上腺类固醇激素合成酶的基因表达

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) 是肾上腺皮质细胞肾上腺类固醇激素合成过程中的重要酶。

如图 5 所示, 与正常对照组比较, ICR 小鼠的 Cyp21a1 基因显著下调 ($P < 0.05$); 裸鼠的 Star 基因表达显著下调 ($P < 0.05$), Cyp21a1 基因表达显著下调 ($P < 0.01$)。



注:a 为小鼠抓力,b 为小鼠旷场活动度,c 为小鼠腋温,d 为头部最高温度,e 为躯干平均温度,f 为尾部最低温度。

图 2 四诊指标变化

Note.a, Holding power. b, Activity degree of open field. c, The axillary temperature. d, The highest temperature of head. e, The average temperature of body trunk. f: The lowest temperature of tail.

Figure 2 Changes of four diagnostic indexes

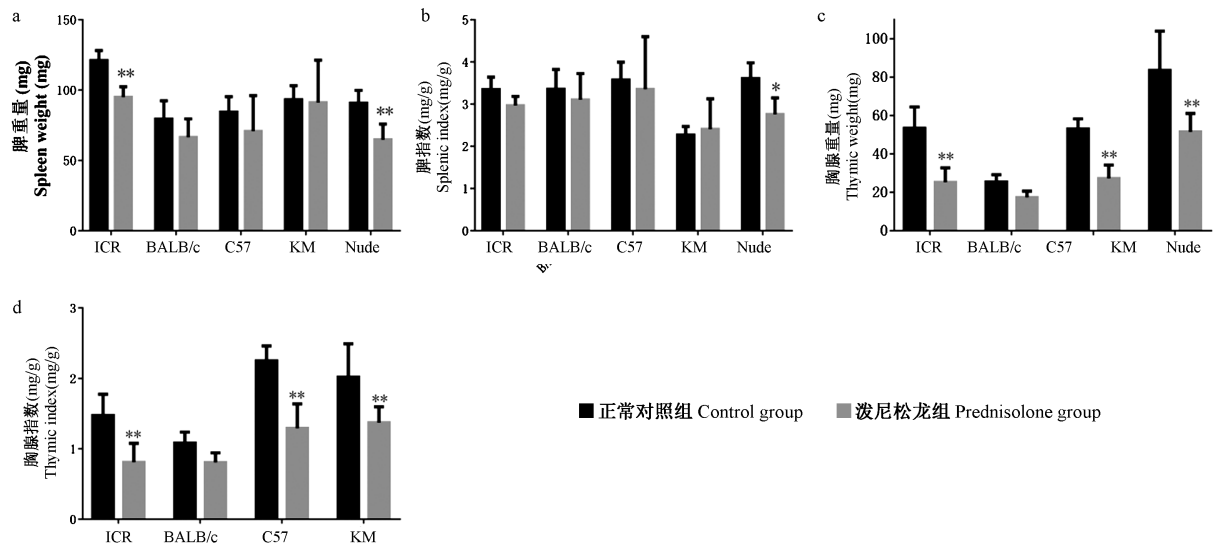


图 3 泼尼松龙对小鼠脾、胸腺重量以及指数影响

Figure 3 Effects of prednisolone on the mass and index of mouse spleen and thymus

与正常对照组比较,C57BL/6J 泼尼松龙组小鼠 *Star* 基因表达显著下调($P<0.01$)。

与正常对照组比较,KM 泼尼松龙组小鼠 *Cyp11a1*、*Cyp21a1* 基因显著下调 60%~70% ($P<0.01$)。

总体分析,0.5 mg/(kg·d)泼尼松龙对BALB/c、C57BL/6J 小鼠的肾上腺功能抑制程度较轻,而对

KM 小鼠的抑制程度较强。泼尼松龙对 ICR 小鼠肾上腺合成类固醇激素过程的相关基因均出现抑制且抑制程度在 10%~30%之间较为稳定。

2.5 肾上腺类固醇激素合成相关蛋白表达

如图 6 所示,与正常对照组比较,泼尼松龙显著抑制 ICR 小鼠肾上腺 LDLR 蛋白表达、*Star* 蛋白表达有所下降。泼尼松龙显著抑制 KM 小鼠肾上腺

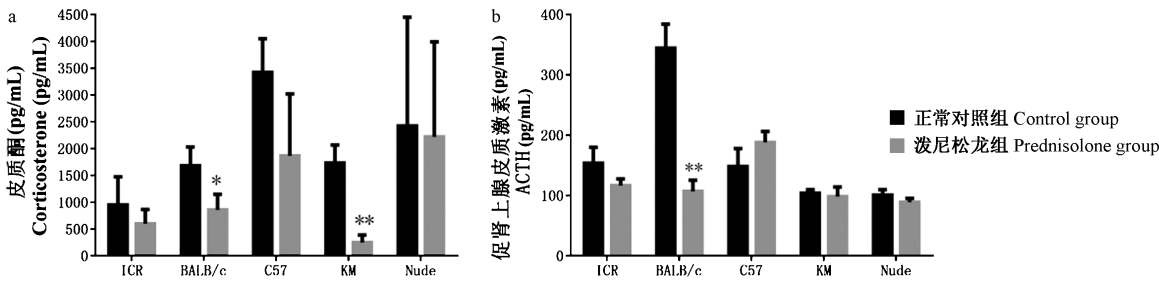


图 4 血清皮质酮与 ACTH 水平变化

Figure 4 Changes of serum corticosterone and ACTH

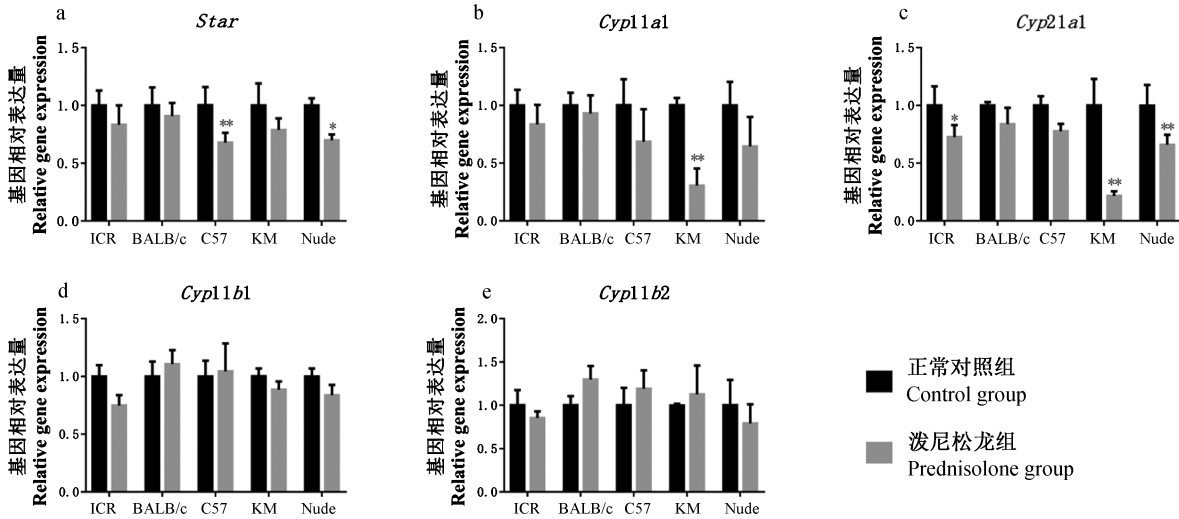
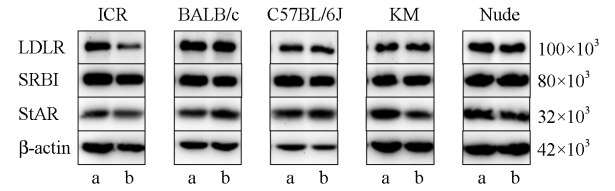


图 5 肾上腺类固醇激素合成酶的基因表达

Figure 5 Gene expression of adrenal steroid synthase

StAR 蛋白表达。然而,泼尼松龙给药后 BALB/c、C57BL/6J 以及裸鼠的肾上腺 LDLR、SRBI、StAR 蛋白表达未呈现显著变化。



注: a.正常对照组;b.泼尼松龙组。

图 6 小鼠肾上腺类固醇激素合成蛋白表达

Note. a, Normal control group. b, Prednisolone group.

Figure 6 Expression of adrenal steroid synthetic protein

低密度脂蛋白受体 (LDLR) 是一种细胞表面糖蛋白在胆固醇代谢中起关键作用^[7]。而 B 族 I 型清道夫受体 (SR-BI) 是高密度脂蛋白的受体^[8]。类固醇合成急性调节蛋白 (StAR) 是胆固醇的一种转运蛋白对合成类固醇激素有调节作用^[9]。

从以上肾上腺蛋白表达的变化来看,0.5 mg/(kg·d)

泼尼松龙对于 ICR 和 KM 小鼠肾上腺摄取胆固醇以及将胆固醇转化为肾上腺皮质激素过程有一定抑制作用。

3 讨论

3.1 泼尼松龙的毒理呈现的类似中医证候

泼尼松龙是临床常用的糖皮质激素药物,具有抗炎、免疫抑制、抗休克、抗毒等药效^[10]。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,还有面部、鼻黏膜及眼睑肿胀,荨麻疹,气短,胸闷,喘鸣等症状。推测中医证候以火毒壅盛、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。推测中医证候以脾肾两脏的阳气虚衰、水湿壅盛为主。③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。推测中医证候以全身性的气虚和阴阳两虚为主。

总之,泼尼松龙短时间引起的证候主要以阴虚火旺为主,长时间引起的证候主要阳、气虚衰及肾虚为主。本实验通过小鼠辨证论治实验方法学评估小鼠的气、阴、阳三个方面的盛衰。结果表明,小鼠体重下降阴虚见证显著于临床表现类似。小鼠肾上腺功能下降、脾和胸腺萎缩出现肾虚、气虚见证显著,临床相关表现为骨质疏松或骨折、肌无力、乏力、软弱等常见症状。

3.2 泼尼松龙诱导药源性证候特征及其肾上腺皮质抑制差异

基于实验小鼠品系的多样性,为探索不同品系小鼠对同一药物作用及其耐受性的差异性,本研究选用目前常用的 ICR、BALB/c、C57BL/6J、KM 和裸小鼠共 5 种品系小鼠为受试对象,采用临床常用的糖皮质激素药物泼尼松龙灌胃小鼠,然后运用本课题组研究与创建的“实验大鼠/小鼠四诊与辨证方法学”对小鼠证候进行评估^[1,6]。

体重下降提示机体物质基础的减少,体重是中医“阴”盛衰程度的重要评价指标。小鼠旷场活动度和抓力体现机体的“气”的盛衰程度。体温可以最直观地体现机体的阳热程度。脾和胸腺的免疫功能强弱与中医“气”盛衰程度有密切关系。血清皮质酮、ACTH 含量、肾上腺类固醇激素合成酶基因变化以及此过程相关的蛋白是评价中医“肾”功能的分子指标。结果发现,从小鼠四诊相关指标来看,0.5 mg/(kg·d)泼尼松龙造成 5 种小鼠体重增长减缓或下降,其中,KM、BALB/c 和裸鼠体重变化相对较小,而对 ICR 和 C57BL/6J 的体重影响较大。泼尼松龙给药后 ICR 小鼠出现一定程度的气虚和阳虚见证,KM 小鼠出现体温下降趋势类似阳虚见证,而其他品系小鼠“气”和“阳”的盛衰程度变化不显著。

深入探索泼尼松龙诱发药源性证候的内在物质基础及其功能变化,发现 0.5 mg/(kg·d)泼尼松龙造成 ICR 和裸鼠的脾显著萎缩以及 ICR、C57BL/6J、KM 和裸鼠的胸腺显著萎缩,而 BALB/c 小鼠脾和胸腺变化均不明显。从生化指标上看,泼尼松龙造成 BALB/c 小鼠血清皮质酮与 ACTH 含量下降,相对其他品系小鼠最显著。此外,泼尼松龙对 BALB/c、C57BL/6J 小鼠的肾上腺合成类固醇激素过程的相

关基因和蛋白抑制程度较小,而对 KM 小鼠抑制程度相对较强,对 ICR 小鼠相对稳定。

由于泼尼松龙药理毒理作用广泛,王火等^[10]发现甲基泼尼松龙可导致长期肾上腺皮质功能抑制,与使用剂量有关。此外,有临床观察发现 6.8 g/d 泼尼松临床用量有增加骨质疏松的风险^[11]。基于此,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^[12],发现泼尼松龙具有导致机体肾藏象亏虚的现象,与本研究结论相似,然而既往文献缺乏对其分子机制的深入认识,本研究发现,提示 0.5 mg/(kg·d)剂量的泼尼松龙抑制小鼠体重增长,造成脾和胸腺的萎缩抑制免疫系统功能,抑制垂体-肾上腺皮质轴功能,从而呈现类似临床的“肾虚”或“脾虚”为主的全身性虚弱证候。这有助于从肾上腺皮质轴分子功能层面深入揭示泼尼松龙所致的小鼠药源性证候内涵。

4 结论

糖皮质激素药物泼尼松龙给药 14 d 后具有明确的诱导小鼠发生药源性虚证的效应,以“气虚”为主,中医脏腑定位于“肾藏象”与“脾藏象”;其相应的物质基础以脾、胸腺免疫功能及其垂体-肾上腺皮质轴的功能受抑制为主。

从不同品系小鼠综合比较分析,发现 ICR 小鼠对泼尼松龙所致药源性虚证更为稳定,建议后续开展糖皮质激素药源性虚证研究首选 ICR 小鼠。

参 考 文 献 (References)

- [1] 方肇勤,潘志强,卢文丽,等. 大鼠/小鼠证候及辨证论治方法学的探索与发展[J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(4): 12-16.
Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, et al. Research and development on syndromes and methodology of syndromes differentiation and treatment in rats and mice [J]. J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2008, 22(4): 12-16.
- [2] 潘志强,方肇勤,卢文丽,等. 不同品系 H22 肝癌小鼠证候特征的比较研究[J]. 上海中医药大学学报, 2011, 25(1): 56-59.
Pan ZQ, Fang ZQ, Lu WL, et al. Comparative study on syndrome characteristics of H22 tumor mice from different strains [J] J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2011, 25(1): 56-59.
- [3] 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.
Pan ZQ. New academic problems and thinking of drug-induced syndromes [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2018, 52(6): 5-8.
- [4] 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.
- Fang ZQ, Pan ZQ, Tang WC, et al. Construction and operational standard of four diagnostic methods workstation for mice [J]. J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2006, 20(1): 42-46.
- [5] 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.
- Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, et al. Thoughts and methods of syndrome differentiation on rats and mice [J]. Chin J Comparat Med, 2009, 19(10): 53-59, 85.
- [6] 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.
- Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, et al. Establishment and evaluation of quantitative syndrome differentiation method of common witness in rats and mice [J]. Chin J Basic Chin Tradit Med, 2007, 13(7): 502-505.
- [7] 陈芬,王绿娅,尹卫东. 低密度脂蛋白受体功能及其影响因素研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(5): 448-450.
- Chen F, Wang LY, Yin WD. Research progress on receptor function of low density lipoprotein and its influencing factors [J]. Chin J Arteriosclerosis, 2006, 14(5): 448-450.
- [8] 秦媛媛,凌文华. B 族 I 型清道夫受体与高密度脂蛋白代谢[J]. 国际内科学杂志, 2009, 36(5): 286-289.
- Qin YY, Ling WH. Scavenger receptor class B type I and high density lipoprotein, metabolism [J]. Int J Intern Med, 2009, 36(5): 286-289.
- [9] 许雅丽,殷莲华. 类固醇激素合成急性调节蛋白(StAR)与胆固醇代谢[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(4): 358-361.
- Xu YL, Yin LH. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol metabolism [J]. Int J Pathol Clin Med, 2008, 28(4): 358-361.
- [10] 王火,苏彬,李玉明,等. 大剂量甲基泼尼松龙对严重急性呼吸综合征患者肾上腺皮质功能的影响[J]. 中国实用内科杂志, 2006, 26(15): 1161-1163.
- Wang H, Su B, Li YM, et al. Dynamic changes of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol (Cr) in SARS patients who received large dose of methylprednisolone therapy [J]. Chin J Pract Intern Med, 2006, 26(15): 1161-1163.
- [11] 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.
- Mei CL, Ji CC. Application and thinking of glucocorticoid in internal medicine [J]. Chin J Pract Intern Med, 2006, 26(19): 1468-1470.
- [12] 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.
- Lin T, Fu DH, Yang SH, et al. Advances in the study of glucocorticoid osteoporosis models [J]. Chin J Bone Tumor Bone Dis, 2011, 10(2): 192-195.

[收稿日期] 2018-11-01