

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

钱宏梁， 潘志强*， 李 亚， 钱杨杨， 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。**方法** 将 60 只 ICR 小鼠随机分为正常对照组、氢化可的松组、四君子汤组 [12.75 g (生药)/kg]、六味地黄汤组 [12.5 g (生药)/kg]、桂附地黄汤组 [13.5 g (生药)/kg]，连续灌胃给药氢化可的松 (1.65 mg/kg) 14 d 建立药源性证候模型；各中药复方组在灌胃氢化可的松的同时及停止氢化可的松灌胃后 7 d，每日分别灌胃给药 3 个中药复方。每日称定小鼠体质量；在第 14、21 天，运用小鼠辨证论治实验方法学观测小鼠四诊指标；在第 15、22 天，计算脾脏、胸腺指数，ELISA 检测血清皮质酮、促肾上腺皮质激素、肾上腺素和去甲肾上腺素水平，采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *Star*、*Cyp11a1*、*Cyp21a1*、*Cyp11b1*、*Cyp11b2*、*Dbh*、*Ddc*、*Pnmt*、*Th* mRNA 表达，Western blot 检测 LDLR、SRBI、Star 蛋白表达。**结果** 氢化可的松干预后，小鼠体质量，抓力，尾部最低温度，脾脏、胸腺指数，血清皮质酮、促肾上腺皮质激素水平显著下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)；显著抑制相关肾上腺类固醇激素合成酶 (*Star*、*Cyp11a1*、*Cyp21a1*、*Cyp11b1*) mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并抑制胆固醇转化为肾上腺类固醇激素过程中相关蛋白 (LDLR、SRBI、StAR) 表达。与氢化可的松组比较，桂附地黄汤组显著增加小鼠抓力 ($P<0.01$)，四君子汤组、六味地黄汤组和桂附地黄汤组显著升高血清皮质酮均水平 ($P<0.01$)，四君子汤组、桂附地黄汤组明显抑制 *Star*、*Cyp11a1*、*Cyp21a1*、*Cyp11b1* mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)，3 个复方组能改善 LDLR、SRBI、StAR 蛋白下降。**结论** 桂附地黄汤对小鼠阳虚证候有所改善，3 个中药复方对小鼠阴虚证候疗效不显著。3 个中药复方对氢化可的松诱发的肾上腺皮质功能抑制均有缓解作用。

关键词：四君子汤；六味地黄汤；桂附地黄汤；药源性证候；补肾健脾法；肾上腺皮质

中图分类号：R285.5 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2020)02-0334-10
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.013

Effects of method of reinforcing kidney and invigorating spleen on adrenal function of hydrocortisone-induced spleen-kidney deficiency mice

QIAN Hong-liang, PAN Zhi-qiang*, LI Ya, QIAN Yang-yang, FEI Min-hong, FANG Zhao-qin
(Basic Medical School of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of method of reinforcing kidney and invigorating spleen on adrenal function of hydrocortisone-induced spleen-kidney deficiency mice. **METHODS** Sixty ICR mice were randomly divided into normal control group, hydrocortisone group, Sijunzi Decoction group [12.75 g (raw drug)/kg], Liuwei Dihuang Decoction group [12.5 g (raw drug)/kg], Guifu Dihuang Decoction group [13.5 g (raw drug)/kg]. Simultaneously, consecutive administration of hydrocortisone (1.65 mg/kg) was practiced to establish drug-induced syndrome models. Meanwhile, in the groups for Chinese herbal compounds intervention, the corresponding decoction was dosed by gastric gavage. After hydrocortisone gavage cessation, the administration of Chinese herbal compounds went on for another seven days. The body weight of the mice was weighed daily. On the 14th and 21st days, TCM four diagnostic indicators of mice were observed by using the experimental method of syndrome differentiation and treatment of mice. On the 15th and 22nd days, the spleen and thymus indexes were calculated, the levels

收稿日期：2019-04-18
基金项目：国家自然科学基金面上项目 (81473562, 81873212)；上海市科委实验动物专项 (19140905000)
作者简介：钱宏梁 (1992—)，男，硕士生，从事中医证候实验研究。Tel: 18817958363
* 通信作者：潘志强 (1977—)，男，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。Tel: (021) 51322116, E-mail: pzq527@163.com

of serum corticosterone, adrenocorticotrophic hormone, adrenaline and noradrenaline were measured by ELISA, and the expressions of *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp21a1*, *Cyp11b1*, *Cyp11b2*, *Dbh*, *Ddc*, *Pnmt* and *Th* mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the expressions of LDLR, SRB1 and Star protein were detected by Western blot. **RESULTS** After mice were treated with hydrocortisone, the body weight, grasping power, tail temperature, spleen, level of thymus index, serum corticosterone and adrenocorticotrophic hormone levels decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). The mRNA expression of related adrenal steroid hormone synthase (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp21a1*, *Cyp11b1*) ($P<0.05$, $P<0.01$), and expression of related proteins (LDLR, SRBI, STAR) during the conversion of adrenal cholesterol into hormones were inhibited. Compared with the hydrocortisone group, Guifu Dihuang Decoction group was observed with significantly increased grip of mice ($P<0.01$), Sijunzi Decoction group, Liuwei Dihuang Decoction group and Guifu Dihuang Decoction group shared significantly increased serum corticosterone level ($P<0.01$), Sijunzi Decoction group and Guifu Dihuang Decoction groups displayed significantly inhibited expression of *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp21a1* and *Cyp11b1* mRNA ($P<0.05$, $P<0.01$), and the three groups for Chinese herbal compounds intervention demonstrated improvement in LDLR, SRBI and StAR protein expression. **CONCLUSION** To mice models, Guifu Dihuang Decoction improves the syndrome of yang deficiency, but none of the three traditional Chinese medicine compounds displays significant efficacy on yin deficiency syndrome, and all the three traditional Chinese medicine compounds alleviate cortisol-induced adrenal function inhibition.

KEY WORDS: Sijunzi Decoction; Liuwei Dihuang Decoction; Guifu Dihuang Decoction; drug-induced syndrome; method of reinforcing kidney and invigorating spleen; adrenal cortex

中医证候是中医学对疾病辨证论治的基础与核心。一直以来, 中医学术界对证候的发生发展以及其物质基础开展了大量的探索工作。宏观的中医证候与微观世界的物质分子中找到特异性的关联和方向性的变化是中医证候研究的目标。这对于中药以及中药复方改善证候的调控靶点与“证-药-效”的关系都有基础性的作用。随着中西医结合治疗模式在国内普遍开展, 人们发现许多西药在治疗疾病的同时也造成了固定的一系列方向性的新症状或异常体征, 称之为药源性证候^[1]。

氢化可的松是临床常用的糖皮质激素药物, 具有抗炎、免疫抑制、抗毒和抗休克等作用, 因其分子结构最接近生理状态下的可的松, 且不需要在肝脏转化即可发挥较强的药理作用, 在临床被广泛运用。但是, 客观上临床长期较大剂量使用氢化可的松等激素类药物会引起多种不良反应。因此, 本研究选择氢化可的松予以诱发药源性证候。检索文献发现, 中医学术界既往研究认为氢化可的松可以复制肾阴虚证、肾阳虚证, 然而其证候属性因给药剂量及给药时间差异仍具有争议性。此外, 从西医疾病模型分析, 氢化可的松可作为典型的免疫抑制模型^[2-3]。基于课题组前期深入研究发现氢化可的松可诱发小鼠药源性虚证, 证候兼有气虚、阳虚、阴虚, 涉及肾藏象、脾藏象, 本研究

选用六味地黄丸、桂附地黄丸(金匱肾气丸) 2 个经典补肾方剂和四君子汤这个基础益气健脾方剂干预氢化可的松药源性证候模型小鼠, 并从小鼠证候信息、肾上腺皮质与髓质功能予以评价补肾、健脾治法的药效。

1 材料

1.1 动物 雄性 ICR 小鼠, SPF 级, 80 只, 体重(20~22) g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房。动物许可证号 SCXK (沪) 2013-0016。

1.2 药物与试剂 氢化可的松(hydrocortisone 批号 66003632), 白色结晶粉末, 分子量 362.46, 购自国药集团化学试剂有限公司。四君子汤、六味地黄汤、桂附地黄汤分别依据 2015 年版《中国药典》的四君子丸[党参 200 g、白术(炒) 200 g、茯苓 200 g、炙甘草 100 g、生姜 50 g、大枣 100 g]、六味地黄丸[熟地黄 160 g、山茱萸(制) 80 g、牡丹皮 60 g、山药 80 g、茯苓 60 g、泽泻 60 g]、桂附地黄丸[肉桂 20 g、附子(制) 20 g、熟地黄 160 g、酒萸肉 80 g、牡丹皮 60 g、山药 80 g、茯苓 60 g、泽泻 60 g] 的处方进行水煎, 3 个中药复方包含的中药均购自上海中医药大学附属曙光医院中药房, 经上海中医药大学实验中医教研室潘志强教授鉴定均为正品。TRIzol (货号 Scipu003462)、

PrimeScript® RT reagent Kit (货号 RR047 A)、TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) II (货号 RR420 A) 购自日本 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。小鼠皮质酮 ELISA 试剂盒 (货号 501320,批号 0521476) 购自美国 Cayman 公司,促肾上腺皮质激素 (ACTH) ELISA 试剂盒 (货号 M046006,批号 2518) 购自

美国 MDB 公司;小鼠肾上腺素 ELISA 试剂盒 (货号 H096,批号 20190604)、小鼠去甲肾上腺素 ELISA 试剂盒 (货号 H097,批号 20190604) 均购自南京建成生物工程研究所。LDL Receptor 抗体 (货号 ab52818)、SR-BI 抗体 (货号 ab52629)、StAR 抗体 (货号 ab96637) 均购自英国 Abcam 公司。β-actin 抗体 (货号 A5441) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	mRNA 库号	引物序列	长度/bp
<i>β-actin</i>	NM_007393	正向 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' 反向 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'	165
<i>Cyp11a1</i>	NM_019779	正向 5'-ACTTCCGGTACTTGGGCTTT-3' 反向 5'-GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG-3'	201
<i>Cyp11b1</i>	NM_001033229	正向 5'-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3' 反向 5'-GGGTTGATGTCGTGTCAGTG-3'	140
<i>Cyp11b2</i>	NM_009991	正向 5'-CTGAACGCTATATGCCTCAGC-3' 反向 5'-AGTGTCTCCACCTGGAAGGTT-3'	160
<i>Cyp21a1</i>	NM_009995	正向 5'-CTCCGGCTATGACATCCCTA-3' 反向 5'-ACAGCCAAAGGATGCTGTTTC-3'	151
<i>Star</i>	NM_011485	正向 5'-TTGGGCATACTCAACAACCA-3' 反向 5'-GAAACACCTTGCCACATCT-3'	103
<i>Dbh</i>	NM_138942	正向 5'-AATCTGCAGCCTTTGCCTAA -3' 反向 5'-TTCAGCATCTGCCTCTGTTG -3'	123
<i>Ddc</i>	NM_001190448	正向 5'-TGGCTGCTCGGACTAAAGTT -3' 反向 5'-TCCACCAATTAACCCAGCTC -3'	140
<i>Pnmt</i>	NM_008890	正向 5'-TCCTTGGTGTTACGAGGTC -3' 反向 5'-ACACCTGCACCTCCATCTTC -3'	123
<i>Th</i>	NM_009377	正向 5'-CAGCTGGAGGATGTGTCTCA -3' 反向 5'-GGCATGACGGATGTACTGTG -3'	141

1.3 仪器 小鼠四诊设备包括 YLS-13A 型小鼠抓力测定仪 (山东省医学科学院设备站) 用于抓力检测,底部有 5 cm×5 cm 方格 (3 行×5 列=15 格) 的实验笼用于旷场检测,ThermaCAM P30 型红外热像仪器 (美国 Flir 公司) 用于检测体表红外温度。QuantStudio™3 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 (美国 Protein-Simple 公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 小鼠适应性饲养 1 周后,开始实验。随机分为正常对照组、氢化可的松组、四君子汤组、六味地黄汤组、桂附地黄汤组,每组 16 只。其中除正常对照组外各组均灌胃给药1.65 mg/kg氢化可的松进行造模;正常对照组灌胃等体积的灭菌水。四君子汤组按 12.75 g (生药) /kg 剂量灌胃给药

四君子汤 (0.765 g/mL);六味地黄汤组按 12.5 g (生药) /kg 剂量灌胃给药六味地黄汤 (0.75 g/mL);桂附地黄汤组按 13.5 g(生药)/kg 剂量灌胃给药桂附地黄汤 (0.81 g/mL)。从第 1 天同步造模与给药,持续 14 d;第 15 天处死各组半数小鼠,剩余半数小鼠停止造模继续给予中药至 21 d。

2.2 观测四诊指标 分别在实验第 14、21 天,运用本课题组创建的小鼠辨证论治实验方法学采集小鼠四诊信息,主要包括小鼠一般外观表现、体质量、躯体不同部位红外温度、旷场实验小鼠活动度 (在网格中活动 60 s 的跨格数以及前肢离地次数的总和)、小鼠四肢抓力、腋温等表征信息,然后进行计量化辨证。具体参见文献 [4-6]。

2.3 取材 在实验第 15、22 天,称定小鼠体质量,每组处死 8 只小鼠。①取血,分离血清,ELISA 试剂盒检测皮质酮与 ACTH 水平;②脾脏、

胸腺，称取脏器质量后计算脏器指数，脾脏指数=脾脏质量（mg）/体质量（g），胸腺指数=胸腺质量（mg）/体质量（g）；③取肾上腺组织，抽提总RNA，检测与 *Star*、*Cyp11a1*、*Cyp21a1*、*Cyp11b1*、*Cyp11b2* mRNA 表达；④取肾上腺组织，抽提总蛋白，检测 LDLR、SRBI、StAR 蛋白表达。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 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 μL，反应条件为 37 ℃、15 min，85 ℃、5 s，4 ℃；PCR 扩增反应体系为 20 μL，反应程序为 95 ℃、3 min，95 ℃、5 s，60 ℃、30 s，40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析，以正常组作为对照，以 β-actin 的 mRNA Ct 均值作为内参组。 $\Delta Ct = Ct_{目的mRNA} - Ct_{内参mRNA}$ （其中，Ct 值为扩增 *n* 个循环 mRNA 的荧光数值）， $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{实验组} - \Delta Ct_{对照组}$ ，目的 mRNA 相对表达量 = 2^{-ΔΔCt}。

2.5 ELISA 检测血清激素水平 用血清样本，依据 ELISA 试剂盒说明书进行操作，检测血清皮质酮、促肾上腺皮质激素、肾上腺素以及去甲肾上腺素水平。

2.6 Western blot 检测蛋白表达 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

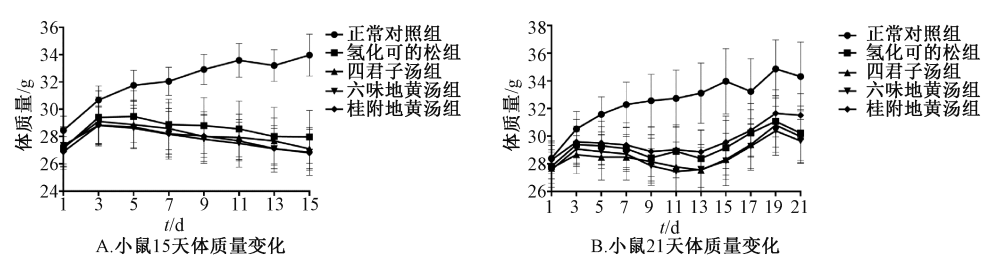
性处理，分别执行聚丙烯凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗涤、二抗孵育、再洗涤、显影等实验流程，其中，一抗浓度内参 β-actin 以 1：20 000 稀释，LDLR 抗体以 1：5 000 稀释，SRBI、StAR 抗体均以 1：2 000 稀释。以 β-actin 为内参对照，分析蛋白相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 GraphPad. Prism 7.0 软件进行统计分析，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 *t* 检验，以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠四诊指标变化

3.1.1 小鼠体质量动态变化（阴盛衰程度） 实验开始时，小鼠体质量在 28 g 左右。实验过程中正常对照组小鼠体质量平稳增长。与正常对照组比较，氢化可的松造模的 4 组小鼠体质量均出现下降。在造模给予中药同步的 14 d 中，氢化可的松造模的 4 组小鼠体质量均低于正常对照组；在停止氢化可的松造模继续给予中药 7 d 中（15 至 21 d），氢化可的松组与各中药组小鼠体质量均有所增长，但仍低于正常对照组。见图 1。



注：与正常对照组比较，* *P* < 0.05，** *P* < 0.01。

图 1 小鼠体质量变化（*n* = 8）

Fig. 1 Changes of body weight of mice (*n* = 8)

3.1.2 小鼠旷场活动度以及抓力（气盛衰程度） 在造模给予中药同步的 14 d 后，与正常对照组比较，氢化可的松组小鼠旷场活动度出现降低趋势；氢化可的松组小鼠抓力低于正常对照组（*P* < 0.01），见表 2。在停止氢化可的松造模继续给予中药 7 d 后，与正常对照组比较，氢化可的松组小鼠抓力仍下降（*P* < 0.01）；与氢化可的松组比较，各中药组小鼠旷场活动度均有上升趋势，但差异无统计学意义，而桂附地黄汤组小鼠抓力显著上升（*P* < 0.01），见表 3。

3.1.3 小鼠不同部位红外温度与腋温（阳盛衰程

度） 在造模给予中药同步的 14 d 后和在停止氢化可的松造模继续给予中药 7 d 后，与正常对照组比较，氢化可的松组小鼠腋温未出现变化。在造模给予中药同步的 14 d 后，与正常对照组比较，氢化可的松小鼠的头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度均有一定的下降趋势，其中尾部最低温度下降（*P* < 0.05）。在停止氢化可的松造模继续给予中药 7 d 后，与正常对照组比较，氢化可的松小鼠的头部最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度均有一定的下降趋势，其中头部最高温度下降（*P* < 0.05）。见表 2~3。

表 2 中药复方对氢化可的松模型小鼠中医四诊指标的影响 (14 d, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 2 Effects of Chinese herbal compounds on levels of TCM four diagnostic indexes in hydrocortisone model mice (14 d, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	抓力/g	旷场活动度	腋温/℃	头部最高温度/℃	躯干平均温度/℃	尾部最低温度/℃
正常对照组	127.2±17.7	55.8±11.2	36.9±0.5	33.5±0.6	27.2±0.6	24.1±0.4
氢化可的松	93.8±19.2**	40.9±14.6	37.2±0.5	33.2±0.8	26.6±0.6	23.2±0.5*
四君子汤组	112.0±25.8	39.4±6.7	37.2±0.5	32.9±0.5	26.5±0.7	23.1±0.7
六味地黄汤	113.2±20.6	32.8±16.6	36.9±0.4	32.9±0.6	26.0±0.4	22.9±0.2
桂附地黄汤	116.1±16.7	44.8±13.0	37.8±0.3	33.1±0.8	26.7±0.6	23.4±0.7

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 中药复方对氢化可的松模型小鼠中医四诊指标的影响 (21 d, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 3 Effects of Chinese herbal compounds on levels of TCM four diagnostic indexes in hydrocortisone model mice (21 d, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	抓力/g	旷场活动度	腋温/℃	头部最高温度/℃	躯干平均温度/℃	尾部最低温度/℃
正常对照组	146.6±17.3	56.3±20.5	38.1±0.4	34.9±0.8	28.1±0.3	24.4±0.5
氢化可的松	93.4±18.7**	44.1±15.5	37.9±0.4	34.2±0.4*	27.3±0.3	23.8±0.4
四君子汤组	102.9±27.1	59.0±15.9	37.8±0.5	33.7±0.8	26.5±0.8	23.4±0.5
六味地黄汤	92.7±21.6	52.9±11.0	37.8±0.6	33.9±0.5	27.1±0.4	23.6±0.4
桂附地黄汤	130.5±22.7 ^{##}	44.6±7.7	37.8±0.4	34.3±0.9	26.8±0.7	23.8±0.8

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与氢化可的松组比较,^{##} $P<0.01$ 。

3.2 小鼠脏器指数

3.2.1 脾脏指数 在造模给予中药同步的 14 d 后,与正常对照组比较,氢化可的松小鼠脾脏指数出现下降 ($P<0.01$)。与氢化可的松组比较,3 个中药复方组小鼠脾脏指数有略微提高,但差异无统计学意义。在停止氢化可的松造模继续给予中药 7 d 后,氢化可的松组小鼠脾脏指数仍然低于正常对照组 ($P<0.01$);与氢化可的松组比较,六味地黄汤组与桂附地黄汤脾脏指数有略微提高但差异无统计学意义。见图 2。

3.2.2 胸腺指数 在造模给予中药同步的 14 d 后,与正常对照组比较,氢化可的松组小鼠胸腺指数下降 ($P<0.01$)。在停止氢化可的松造模继续中药给予中药 7 d 后,与正常对照组比较,氢化可的松组小鼠胸腺指数未出现下降。见图 2。

3.3 肾上腺类固醇激素相关指标

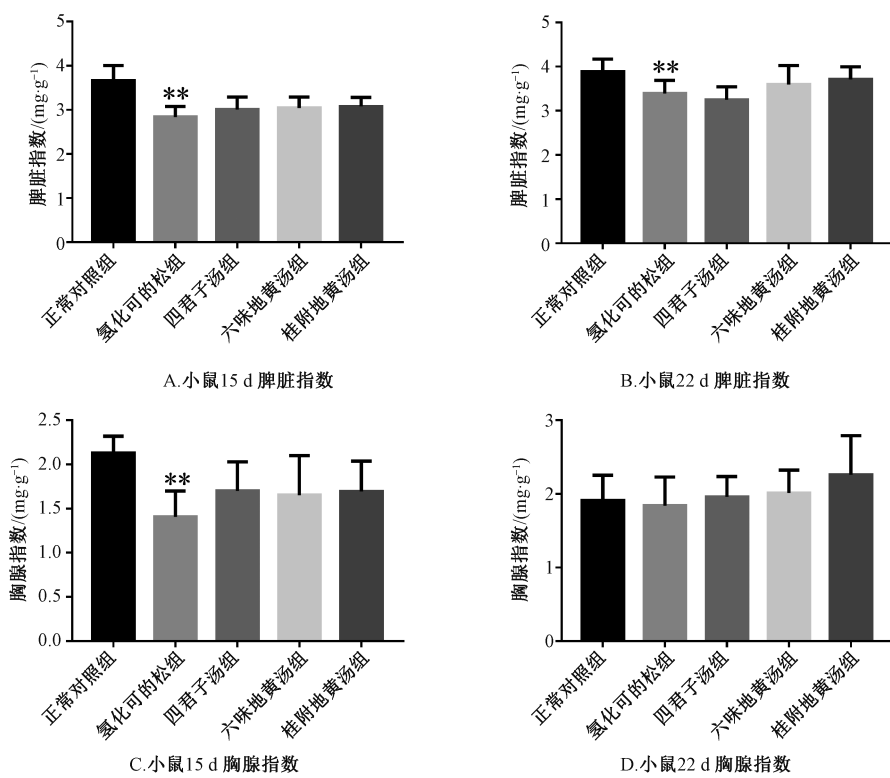
3.3.1 血清皮质酮与促肾上腺皮质激素水平 造模给予中药同步的 14 d 后,与正常对照组比较,氢化可的松组血清皮质酮下降 ($P<0.01$);与氢化可的松组比较,四君子汤组、六味地黄汤组、桂附地黄汤组血清皮质酮上升 ($P<0.05$, $P<0.01$)。在停止氢化可的松造模 7 d 后,与正常对照组比较,氢化可的松组血清皮质酮下降 ($P<0.01$);与氢化可的松组比较,桂附地黄汤组血清皮质酮上升 ($P<0.01$)。见图 3。

造模给予中药同步的 14 d 后,与正常对照组

比较,氢化可的松组血清促肾上腺皮质激素下降 ($P<0.05$);与氢化可的松组比较,桂附地黄汤组血清促肾上腺皮质激素上升 ($P<0.05$)。在停止氢化可的松造模 7 d 后,各组血清促肾上腺皮质激素差异均不明显。见图 3。

3.3.2 肾上腺类固醇激素合成酶相关 mRNA 表达 在造模给予中药同步的 14 d 后,与正常对照组比较,氢化可的松组小鼠肾上腺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)、11 β -羟化酶 2 (Cyp11b2) mRNA 下调 ($P<0.05$, $P<0.01$);与氢化可的松组比较,四君子汤组小鼠肾上腺 Star、Cyp11a1、Cyp11b1、Cyp21a1 mRNA 上调 ($P<0.01$),六味地黄汤组小鼠肾上腺 Star mRNA 上调 ($P<0.05$),桂附地黄汤组小鼠肾上腺 Star、Cyp21a1、Cyp11b1 mRNA 上调 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 4。

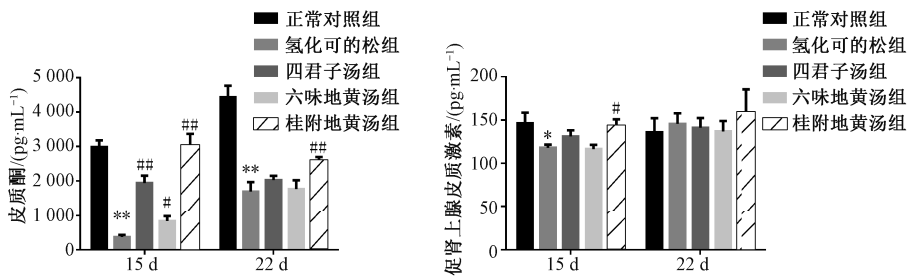
在停止氢化可的松造模 7 d 后,与正常对照组比较,氢化可的松组小鼠肾上腺 Star、Cyp11a1、Cyp21a1、Cyp11b1 mRNA 下调 ($P<0.01$),而 Cyp11b2 mRNA 表达未出现下降,这些 mRNA 表达相对在停止造模前均有所上升;与氢化可的松组比较,四君子汤组小鼠肾上腺 Cyp11b2 mRNA 上调 ($P<0.01$),六味地黄汤组小鼠肾上腺 Cyp11b2 mRNA 上调 ($P<0.05$)。与氢化可的松组比较,桂附地黄汤组小鼠肾上腺 Star、Cyp11a1、Cyp21a1、



注：与正常对照组比较，** $P<0.01$ 。

图 2 小鼠脾脏与胸腺指数 (n=8)

Fig. 2 Levels of indexes of spleen and thymus in mice (n=8)



注：与正常对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与氢化可的松组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 3 血清皮质酮与促肾上腺皮质激素水平 (n=8)

Fig. 3 Serum levels of corticosterone and ACTH (n=8)

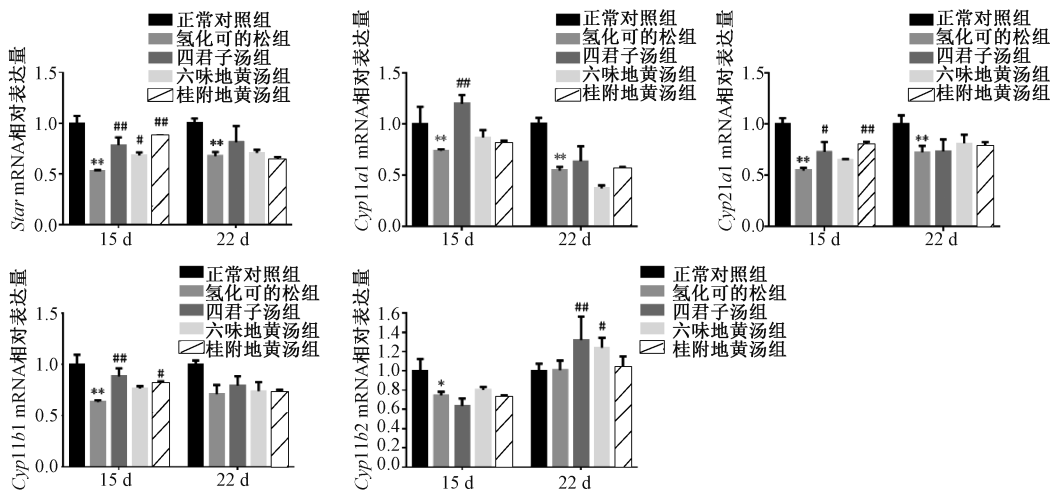
Cyp11b1、Cyp11b2 mRNA 表达差异无显著性。见图 4。

3.3.3 肾上腺类固醇激素合成相关蛋白表达 在造模给予中药同步的 14 d 后，与正常对照组比较，氢化可的松组小鼠肾上腺 LDLR、SRBI、StAR 蛋白表达均有所下降，而四君子汤、六味地黄汤、桂附地黄汤 3 个中药复方对 LDLR、SRBI、StAR 蛋白表达的下降均有改善作用，其中四君子汤促进 SRBI 和 StAR 的表达最显著，桂附地黄汤对 StAR 蛋白有促进作用。在停止氢化可的松造模 7 d 后，氢化可的松组小鼠肾上腺 LDLR、SRBI 以及 StAR

蛋白表达有所恢复。四君子汤、六味地黄汤、桂附地黄汤 3 个中药复方的小鼠 LDLR、SRBI、StAR 蛋白表达均高于氢化可的松组。见图 5。

3.4 肾上腺素相关指标

3.4.1 血清肾上腺素、去甲肾上腺素水平 造模给予中药同步的 14 d 后，与正常对照组比较，氢化可的松组血清肾上腺素显著上升 ($P<0.05$)，各组血清去甲肾上腺素差异均不明显；在停止氢化可的松造模继续中药给予中药 7 d 后，各组血清肾上腺素差异均不明显，与氢化可的松组比较，桂附地黄汤组血清肾上腺素显著下降 ($P<0.05$)。见图 6。



注：与正常对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与氢化可的松组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 4 肾上腺类固醇激素合成酶相关 mRNA 表达 (n=8)

Fig. 4 Adrenal steroid hormone synthase-related mRNA expression (n=8)

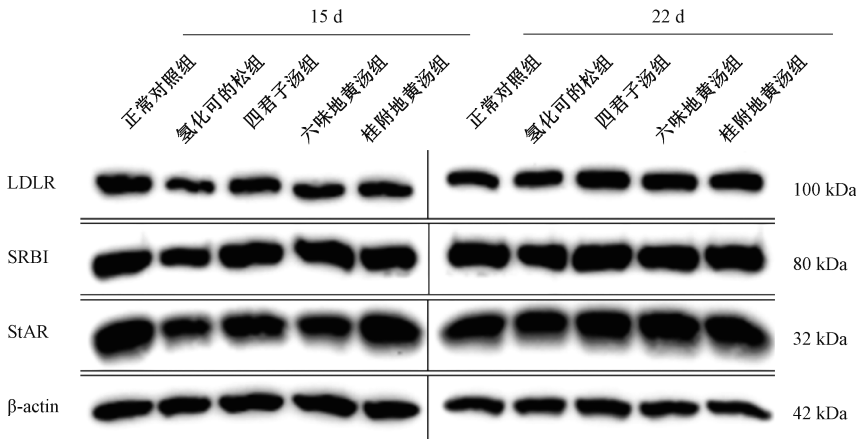
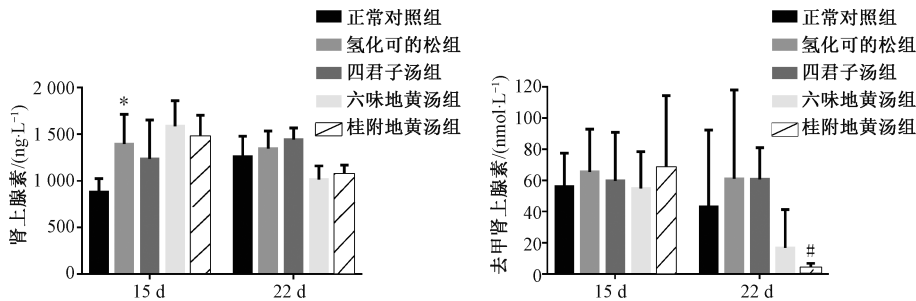


图 5 肾上腺类固醇激素合成相关蛋白表达

Fig. 5 The protein expressions associated with adrenal steroid hormone synthesis



注：与正常对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与氢化可的松组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 6 血清肾上腺素与去甲肾上腺素水平 (n=8)

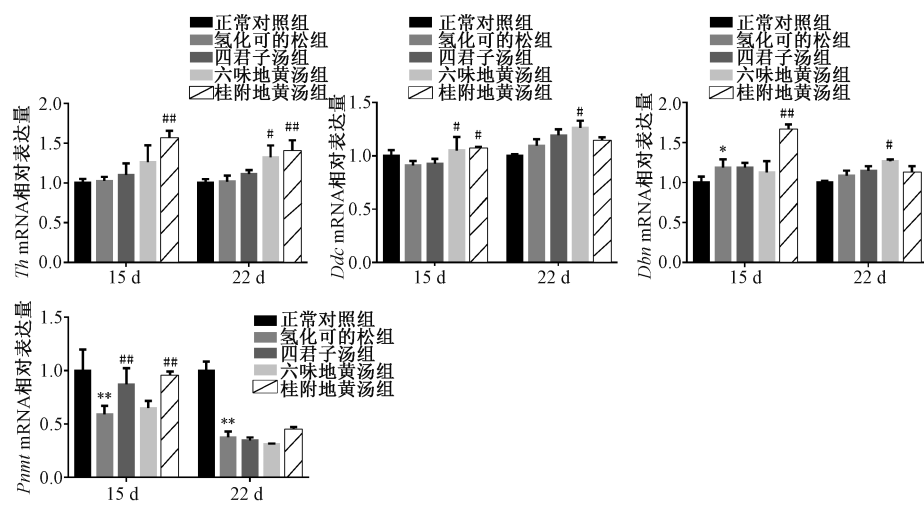
Fig. 6 Serum levels of adrenaline and noradrenaline (n=8)

3.4.2 肾上腺素合成酶相关 mRNA 表达 在造模给予中药同步的 14 天后，与正常对照组比较，氢化可的松组小鼠肾上腺多巴胺 β -羟化酶 (Dbh) mRNA 上调 ($P<0.05$)，苯乙胺-N-甲基转移酶

(Pnmt) mRNA 下调 ($P<0.01$)。与氢化可的松组比较，四君子汤组小鼠肾上腺 Pnmt mRNA 上调 ($P<0.01$)，六味地黄汤组小鼠肾上腺多巴胺脱羧酶 (Ddc) mRNA 上调 ($P<0.05$)，桂附地黄汤组

小鼠肾上腺酪氨酸羟化酶 (*Th*)、*Ddc*、*Dbh* 和 *Pnmt* mRNA 均上调 ($P<0.05$, $P<0.01$)。在停止氢化可的松造模继续给予中药 7 d 后,与正常对照组比较,氢化可的松组小鼠肾上腺 *Pnmt* mRNA 下

调 ($P<0.01$)。与氢化可的松组比较,六味地黄汤组小鼠肾上腺 *Th*、*Ddc* 和 *Dbh* mRNA 均下调 ($P<0.05$, $P<0.01$),桂附地黄汤组小鼠肾上腺 *Th* mRNA 上调 ($P<0.01$)。见图 7。



注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与氢化可的松组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图 7 肾上腺素合成酶相关 mRNA 表达 ($n=8$)

Fig. 7 Adrenergic synthase-related mRNA expression ($n=8$)

4 讨论

4.1 四君子汤、六味地黄汤、桂附地黄汤的功效及其现代研究 四君子汤是基础性益气健脾中药复方,包括人参、白术、茯苓、炙甘草,其主要化学成分是皂苷、黄酮类、多糖类等。现代药理研究发现四君子汤具有调节胃肠功能、提高机体免疫力、抗肿瘤、抗疲劳及抗衰老等作用。研究表明,四君子煎汤可以通过影响 JAK-STAT 信号通路来提高大鼠的免疫机能^[7];雷波等^[8]发现四君子汤能够明显增加自然杀伤细胞活性和血清转化生长因子- β 水平并减少血清干扰素- γ ,可以明显增强 CFS 大鼠的免疫力。

六味地黄丸(汤)是经典的滋阴补肾中药复方,由茯苓、牡丹皮、泽泻、山药、山萸肉、熟地黄组成,主要功效是滋阴降火、补益肝肾。现代药理研究发现六味地黄丸具有调节机体免疫系统、促皮质激素、耐缺氧、疲劳、抗低温、降低血脂抗动脉硬化等作用。马健等^[9]发现六味地黄汤增加动物免疫器官的清除自由基能力,避免受到自由基攻击;马渊等^[10]发现六味地黄丸对 CORT 所致的 HPO 轴功能紊乱具有改善作用;蒋宁等^[11]发现六味地黄丸及其各组分可不同程度地调节 SAMP8 的神经内分泌免疫调节网络紊乱。

桂附地黄汤(即金匮肾气丸)是经典的补肾

中药复方,由干地黄、薯蓣、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮、桂枝、附子组成,主要功效为温补肾气、化气行水。现代药理研究发现桂附地黄汤具有改善下丘脑-垂体-靶腺轴的功能紊乱、抗氧化、衰老、应激、调节免疫等作用。许翠萍等^[12]发现金匮肾气丸对肾阳虚模型小鼠特征如自主活动减少、倦怠倦缩、耐寒能力下降等有一定的改善作用,并对促肾上腺皮质激素、促皮质素释放激素、皮质酮有明显改善作用,证实金匮肾气丸可调节下丘脑-垂体肾上腺轴;周智兴等^[13]发现金匮肾气丸组可以明显提高大鼠胸腺指数及 T、B 淋巴细胞增殖能力并使干扰素- γ 水平明显升高。

4.2 3个中药复方对中医四诊指标的影响 根据本课题组前期研究氢化可的松药理作用强大,本实验选择较低剂量的氢化可的松进行造模,中医四诊方面相关指标如从旷场活动度、腋温和红外温度差异无统计学意义,但是造模后有下降的趋势。中医四诊方面评价,体质量是中医“阴”盛衰程度的重要评价指标,体质量下降提示了机体物质基础的减少。在小鼠日饮水量稳定的情况下氢化可的松显著抑制体质量的生长造成体质量下降,使得机体出现类似中医的阴虚见证。依据数据显示,氢化可的松造模情况下同步给予 3 个中药复方,对中医阴虚证候均没有出现显著的效果。在氢化可的松停止造

模后，桂附地黄汤对中医阴虚证候有一定程度的效果但不显著。

小鼠旷场活动度和抓力一定程度反映机体的“气”的盛衰程度。依据数据显示，氢化可的松造成了小鼠一定程度的“气虚”见证，桂附地黄汤对此有一定的改善，四君子汤和六味地黄汤对氢化可的松引起小鼠“气虚证”效果不明显。

体温可以最直观的体现机体的阳热程度。依据数据显示，氢化可的松造成了小鼠机体一定程度的“阳虚”见证。从最高温度、躯干平均温度、尾部最低温度这几个指标看，四君子汤和六味地黄汤对于小鼠的“阳虚”见证疗效不显著，桂附地黄汤在与氢化可的松共同作用是造成小鼠“阳热”。对氢化可的松造成小鼠的“阳虚证”有一定的改善作用。

4.3 3 个中药复方对脏器以及分子指标的影响 从脏器变化与相关分子指标变化来看，氢化可的松显著降低小鼠脾脏指数，氢化可的松造模与给予中药复方同步 14 d，3 个中药复方均无改善脾脏抑制效应。在停止氢化可的松造模继续给予中药 7 d 后，六味地黄汤和桂附地黄汤对小鼠脾脏均有一定改善。氢化可的松显著降低小鼠胸腺指数，氢化可的松造模与给予中药复方同步 14 d，四君子汤、六味地黄汤和桂附地黄汤对胸腺萎缩有一定改善作用。在停止氢化可的松造模 7 d 后，氢化可的松小鼠胸腺基本恢复。

STAR、*Cyp11a1*、*Cyp21a1*、*Cyp11b1* 和 *Cyp11b2* 是肾上腺皮质细胞胆固醇转化为肾上腺类固醇激素过程中的一些重要酶。从肾上腺类固醇激素相关基因表达与血清皮质酮、促肾上腺皮质激素来看，氢化可的松显著抑制了肾上腺皮质功能。在造模给予中药同步的 14 d 后，四君子汤、六味地黄汤、桂附地黄汤 3 个中药复方对被抑制的腺皮质功能抑制均具有一定纠正作用，其中四君子汤、桂附地黄汤效果较为显著。在停止氢化可的松造模继续给予中药 7 d 后，氢化可的松组小鼠肾上腺皮质激素合成酶相关基因表达有所有恢复，3 个中药复方效果相对不及造模给予中药同步时显著。

低密度脂蛋白受体是一种细胞表面糖蛋白，主要功能是结合低密度脂蛋白或其他含载脂蛋白 B100 及载脂蛋白 E 的脂蛋白，然后内吞入细胞，在胆固醇代谢中起关键作用^[14]。而 B 族 I 型清道夫受体是高密度脂蛋白的受体，能够介导 HDL 胆固醇酯的选择性吸收^[15]。Star 是胆固醇的一种转

运蛋白，主要参与细胞内胆固醇的代谢转化为类固醇激素前体物质^[16]。从以上肾上腺蛋白表达的变化来看，氢化可的松对于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抑制作用，四君子汤对此过程有促进作用且较为明显，六味地黄汤相对来说效果不显著。桂附地黄汤对 Star 蛋白有显著促进，说明可以促进肾上腺皮质激素的合成。

酪氨酸被肾上腺髓质细胞摄取通过 Th 转化为多巴，再经过 Ddc 转化为多巴胺，多巴胺通过 Dbh 在细胞核中形成去甲肾上腺素，然后进一步经的作用，使去甲肾上腺素甲基化形成肾上腺素。氢化可的松对 Pnmt 存在一定抑制作用。从肾上腺素合成相关的 mRNA 表达和血清肾上腺素、去甲肾上腺素的变化综合分析，氢化可的松对小鼠肾上腺髓质功能整体影响不显著。

综上所述，从宏观四诊上看，桂附地黄汤对小鼠阳虚证候有所改善；3 个中药复方对小鼠阴虚证候疗效不显著。从肾上腺皮质功能看，3 个中药复方对氢化可的松诱发的肾上腺皮质功能抑制均有缓解作用，其中四君子汤、桂附地黄汤效果相对显著。

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] 吕颖坚, 黄俊明, 蔡 玫, 等. 环磷酰胺和氢化可的松建立免疫抑制模型方法比较[J]. 卫生研究, 2012, 41(6): 951-955.

[3] 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.

[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.

[5] 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.

[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.

[7] Xiong B, Qian H. Effects of Sijunzi Decoction and Yupingfeng Powder on expression of janus kinase-signal transducer and activator of transcription signal pathway in the brain of spleen-deficiency model rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(1): 78-84.

[8] 雷 波, 刘长征. 四君子汤对慢性疲劳综合征模型大鼠 NK 细胞活性及血清细胞因子水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 195-197.

[9] 马健, 卞慧敏, 龚婕宁, 等. 滋阴代表方对小鼠脑、免疫器官及其SOD、MDA的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(2): 46-48.

[10] 马渊, 周文霞, 程军平, 等. 六味地黄汤对皮质酮所致小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴紊乱的调节作用及其拆方研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(2): 28-32.

[11] 蒋宁, 李思迪, 周文霞, 等. 六味地黄汤及其不同组分对快速老化小鼠神经内分泌免疫调节网络的影响[C] // 中国药理学会第十一次全国学术会议专刊. 济南: 中国药理学与毒理学杂志编辑部, 2011: 86-87.

[12] 许翠萍, 孙静, 朱庆均, 等. 金匱肾气丸对“劳倦过度、房室不节”肾虚模型小鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2009, 33(3): 248-249.

[13] 周智兴, 吴正平, 邓琴. 肾气丸对衰老模型大鼠免疫功能的作用研究[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(24): 4131-4133.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

基于网络药理学研究甘麦大枣汤改善睡眠障碍的作用机制

晏仁义^{1,2}, 陈衬心², 李赫宇², 张东星², 张民^{1*}, 於洪建², 郑艳超²
(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457; 2. 天津益倍生物科技集团有限公司, 天津 300457)

摘要: **目的** 基于网络药理学探索甘麦大枣汤改善睡眠障碍的主要活性成分及作用机制。**方法** 以 OB≥20% 和 DL≥0.18 为筛选条件获取活性成分, 从 TCMS 数据库筛选甘麦大枣汤中各味药的化合物和活性成分相互作用的靶点, 并利用 Cytoscape 软件绘制甘麦大枣汤的 C-T 网络图, 在 DrugBank 数据库中获得与睡眠障碍相关的靶点, 并利用 Cytoscape 软件构建“成分-靶标-通路”网络图, 采用 DAVID 数据库对靶点基因进行 KEGG 分析。**结果** 共获得 127 个化合物, 174 个与睡眠障碍相关的靶点, 这些靶点主要作用于 HIF-1、ErbB、雌激素等 10 条信号通路。**结论** 体现了中药多成分-多靶点-多通路特点, 为进一步开发甘麦大枣汤为基础的功能产品奠定了基础。

关键词: 甘麦大枣汤; 网络药理学; 睡眠障碍

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)02-0343-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.014

The mechanism of Ganmai Dazao Decoction in improving sleep disorders based on network pharmacology

YAN Ren-yi^{1,2}, CHEN Chen-xin², LI He-yu², ZHANG Dong-xing², ZHANG Min^{1*},
YU Hong-jian², ZHENG Yan-chao²
(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Tianjin Ubasio Biotechnology Group Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

KEY WORDS: Ganmai Dazao Decoction; network pharmacology; sleep disorders

睡眠障碍是指在睡眠时间和机会充足的情况下, 发生反复入睡、睡眠维持与巩固、睡眠质量

差等困难, 导致患者日间功能受损。众所周知, 良好的睡眠是人体健康的基石, 缺乏高质量的睡

收稿日期: 2019-06-26

基金项目: 中国博士后科学基金第 65 批面上项目 (2019M651055)

作者简介: 晏仁义 (1982—), 男, 博士, 研究员, 从事植物成分研究与开发工作。E-mail: yanry2009@163.com

* 通信作者: 张民 (1972—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品化学与食品营养。E-mail: zm0102@tust.edu.cn