四逆散、逍遥散与四君子汤对慢性应激肝郁模型大鼠行为学影响的研究*

于 琦[1], 金光亮[2]
(1.北京中医药大学研究生, 北京 100029; 2.北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: [目的] 探讨慢性应激大鼠模型的中医证候性质。[方法] SD雄性大鼠40只, 用随机区组设计的方法分为对照组、模型组、四逆散组、逍遥散组和四君子汤组, 观察大鼠体质量、血清皮质酮含量、1%蔗糖水摄取率和强迫游泳中不动时间。[结果] 与对照组比较, 模型组大鼠血清皮质酮含量升高(P<0.01), 1%蔗糖水摄取率降低(P<0.05), 强迫游泳中不动时间延长(P<0.01); 与模型组比较, 四逆散组、逍遥散组的血清皮质酮含量降低(P<0.05), 1%蔗糖水摄取率升高(P<0.01), 强迫游泳中不动时间缩短(P<0.05); 各组大鼠体质量增加未见明显差异(P>0.05)。[结论] 慢性应激大鼠模型属肝郁证与脾虚无关。

关键词: 慢性应激; 肝郁; 四逆散; 逍遥散; 四君子汤; 1%蔗糖水摄取率; 强迫游泳
中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-1519(2007)06-0509-03

证候是中医学现代研究的关键科学问题之一。由于影响证候的因素复杂、范围广泛以及伦理学等方面因素的制约, 使证候发生发展机制的研究很难深入, 发展证候动物模型是摆脱这一困境的重要途径。肝郁证是临床常见的基础性证候, 已有多种肝郁证动物模型制作方法的报导, 如艾叶注射或夹尾急性激怒法、模具限制法等[1], 但这些造模方法均因有明显缺陷, 近年已很少应用。为了克服以前模型的缺陷, 笔者利用慢性应激的方法初步建立了肝郁证大鼠模型[2], 并从临床发病学特点、核心症状和逍遥散的治疗效应等方面, 分析了该模型的合理性[3]。本研究拟观察大鼠强迫游泳中不动时间的变化, 与1%蔗糖水摄取率相结合, 共同模拟肝郁证的核心症状, 并比较疏肝方四逆散、疏肝健脾方逍遥散和健脾方四君子汤对该模型大鼠的行为学效应, 以进一步探讨该模型的中医证候性质。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及仪器 按照《伤剂学》[4]确定方剂的组成和剂量, 其中逍遥散(《太平惠民和剂局方》): 柴胡9 g, 当归9 g, 芍药9 g, 茯苓9 g, 白术9 g, 薄荷3 g, 炙甘草4.5 g, 生姜6 g。四逆散(《伤寒论》): 柴胡6 g, 枳实6 g, 生白芍6 g, 炙甘草6 g。四君子汤(《太平惠民和剂局方》): 人参9 g, 白术9 g, 茯苓9 g, 炙甘草6 g。以上各方用饮用水将中药免煎颗粒(江阴天江药业有限公司)按成人(按60 kg计)1日用量的14倍配制成悬浊液, 其中逍遥散浓度为1.365 kg/L, 四逆散浓度为0.56 kg/L, 四君子汤浓度为0.77 kg/L。蔗糖($C_{12}H_{22}O_{11}$, 分子量342.29), 购自北京化学试剂公司; 皮质酮酶联免疫吸附试验(ELISA)测定试剂盒(批号24110603), 购自美国R&D公司。HY-2调速多用振荡器, 购自江苏金坛金城国胜实验仪器厂。

1.2 动物分组及处理 雄性SD大鼠40只(SPF级), 体质量190~210 g [北京维通利华实验动物公司提供, 许可证号编号: SCXK(京)2002-0003], 正常光照条件, 自由摄取食水, 驯养1周并进行1%蔗糖水摄取训练。禁水24 h后, 于第2天清晨8:00~9:00测定1 h的1%蔗糖水摄取量, 计算摄取率, 随后采用区组随机设计的方法, 按1%蔗糖水摄取率划分区组, 再按随机数字表法随机分为5组, 每组8只。正常对照组(简称对照组): 群养, 灌胃饮用水, 10 mL/(kg·d)。慢性应激模型组(简称模型组): 孤养, 灌胃饮用水, 10 mL/(kg·d), 并按程序施加造模刺激。慢性应激加四君子汤组(简称四君子汤组): 每日灌胃0.77 kg/L四君子汤悬浊液10 mL/kg体质量, 并按程序施加造模刺激。慢性应激加四逆散组(简称四逆散组): 每日灌胃0.56 kg/L四逆散悬浊液, 10 mL/kg体质量, 并按程序施加造模刺激。慢性应激加逍遥散组(简称逍遥散组): 每日灌胃1.365 kg/L逍遥散悬浊液, 10 mL/kg体质量, 并按程序施加造模刺激。普通饲料与饮用水在允许时可自由摄取。各组处理均为21 d, 每3 d测定1次大鼠体质量, 以调整灌胃药量。

1.3 造模方法 按照笔者以前方法[2]进行。刺激方法包括: 夹尾1 min, 水平振荡160次/min, 30 min, 4 ℃冰水游泳5 min, 禁水24 h, 禁食24 h, 昼夜颠倒24 h, 45 ℃热环境5 min。上述刺激1种/d, 每种刺激

* 基金项目: 北京中医药大学"211工程"建设子项目(2001-02)。
作者简介: 于 琦(1981-), 女, 博士, 主要从事中医情志疾病的研究工作。

各3次,随机安排,使动物不能预知次日的刺激。刺激时间共3周。

1.4 血清皮质酮测定 于末次刺激后次日,断头取血,4℃放置3 h后,4℃离心15 min(4 000×g),分离血清,-40℃保存备测。检测按试剂盒说明书操作。

1.5 1%蔗糖水摄取率测定 根据文献[5]方法操作。在正式实验前,先对大鼠进行1%蔗糖水摄取训练,即先用1%蔗糖水和饮用水同时喂养48 h,然后断水24 h,于次日清晨8:00~9:00同时给大鼠自由饮用1%蔗糖水和饮用水共1 h,分别记录摄取量,根据下列公式计算1%蔗糖水摄取率,并在实验的第7、14、21天各重复测量1次。

1.6 强迫游泳中不动时间测定 根据文献[6]的方法进行。于末次应激24 h后,先进行适应性强迫游泳15 min,即将大鼠放入内径20 cm、高60 cm的圆形透明玻璃缸中,缸中加温度(25±1)℃的温水,深约25 cm,使大鼠在水中不能以后爪支撑身体、前爪攀附于缸壁,取出后用毛巾擦干放回笼中。每缸水仅使用1只大鼠。24 h后再同样将大鼠放入水中,累计记录5 min内大鼠在水中停止挣扎、呈漂浮状态的时间。每只大鼠进行1次实验,由两人同时观察记录,取平均值作为各大鼠强迫游泳不动时间的数据。

1.7 数据处理和统计方法 实验数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,利用SPSS13.0统计软件包进行One-Way ANOVA检验,组间两两比较用q检验,以$P<0.05$为差异有显著性。

2 结果

2.1 体质量变化 在处理21 d后,各组大鼠体质量均有增加,但增加量未见显著性差异($P>0.05$)。见表1。

2.2 大鼠血清皮质酮的变化 处理21 d后,模型组大鼠血清皮质酮含量明显高于对照组,差异有显著性($P<0.01$);四逆散组、逍遥散组大鼠血清皮质酮含量均低于模型组,差异有显著性($P<0.05$);四君子汤组与模型组相比较,无显著性差异($P>0.05$);四逆散、逍遥散组之间及其与对照组比较均无显著性差异。见表1。

2.3 1%蔗糖水摄取率变化 处理21 d后,模型组大鼠1%蔗糖水摄取率明显低于对照组,有显著性差异($P<0.01$);四逆散组、逍遥散组明显高于模型组,有显著性差异($P<0.01$);四君子汤组与模型组比较,差异无显著性($P>0.05$);四逆散组、逍遥散组之间及其与对照组比较差异均无显著性($P>0.05$)。见表2。

表1 各组大鼠体质量增加量与血清皮质酮比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of body weight gain and serum corticosterone in rats of each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量增加量(g)	血清皮质酮含量(nmol/L)
对照组	8	90±3	62±9
模型组	8	85±2	94±20**
四逆散组	8	88±4	67±7*
逍遥散组	8	85±0	65±23*
四君子汤组	8	82±7	79±29

注:与对照组比较,**$P<0.01$;与模型组比较,*$P<0.05$。

2.4 强迫游泳中不动时间的变化 处理21 d后,模型组大鼠强迫游泳实验不动时间明显高于对照组,有显著性差异($P<0.01$);四逆散组、逍遥散组大鼠均低于模型组,差异有显著性($P<0.05$);四君子汤组与模型组相比较,无显著性差异($P>0.05$);四逆散组、逍遥散组之间及其与对照组比较无显著差异($P>0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠1%蔗糖水摄取率与强迫游泳中不动时间比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of 1% sucrose taking rate and forced swimming test in rats of each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	1%蔗糖水摄取率(%)	强迫游泳中不动时间(s)
对照组	8	60±3	53±25
模型组	8	30±21**	150±63**
四逆散组	8	63±20*	97±32△
逍遥散组	8	64±9*	81±35△
四君子汤组	8	40±5	150±54

注:与对照组比较,**$P<0.01$;与模型组比较,*$P<0.01$;与模型组比较,△$P<0.05$。

3 讨论

借鉴国外慢性不可预知应激制作抑郁症动物模型的方法,使用多种不同应激条件(包括冰水游泳、热环境、断食、断水、昼夜颠倒等)随机组合起来的慢性应激程序,来模拟临床上情志异常引发肝郁证的过程,并以1%蔗糖水摄取量的减少来模拟肝郁证临床症状中兴趣或愉快感减少的核心症状,结合逍遥散的效应,初步建立了肝郁证大鼠模型[2-3]。本研究中模型组大鼠1%蔗糖水摄取率减少、逍遥散可有效对抗的观测结果与前述的研究相同,证明这一模型具有良好的再现性。

下丘脑—垂体—肾上腺轴(HPA)的功能亢进是应激状态的基本特征[7]。在本研究中,模型组大鼠

血清皮质酮浓度显著高于正常组，说明本研究的应激方案明显升高 HPA 轴活性，有明确的应激效应。同时，具有疏肝作用的四逆散和逍遥散可以明显抑制应激刺激引发的血清皮质酮浓度升高，而健脾方剂四君子汤则无此效应，提示了疏肝方剂具有对抗应激引起的 HPA 功能亢进的作用，这可能是其治疗机制的一个环节。

为了更全面地模拟肝郁证的临床症状，本研究在 1%蔗糖水摄取率的基础上，又观察了大鼠强迫游泳不动时间变化。一般认为，在强迫游泳实验中将动物没于温水中，造成一种不良环境，动物本能地逃避这一环境。但是受到慢性应激刺激的动物，表现为面临不良环境时主动逃避的行为减少，表现为在水中停止挣扎，处于漂浮不动的时间增加，反映动物逃避不良环境的欲望减退，此状态被称为‘行为绝望’[8]。笔者认为，这种心理状态与人类肝郁证常见的抑郁、沉默寡言以及‘喜叹息’等症状所反映的‘无助感’的类似。研究结果显示，应激处理 21 d 后，与对照组相比，模型组大鼠在强迫游泳中不动时间显著性延长，而四逆散和逍遥散均能有效地对抗，与 1%蔗糖水摄取率减少的变化趋势一致。强迫游泳中不动时间延长所反映的‘行为绝望’与 1%蔗糖水摄取率减少所反映‘快感缺失’结合起来，可更全面地模拟人类肝郁证心理层面的核心症状。

本研究对比了经典的疏肝方剂四逆散、疏肝健脾方剂逍遥散和健脾方剂四君子汤的效应。结果显示，具有疏肝作用的四逆散和逍遥散均可明显改善慢性应激引起的血清皮质酮含量升高、1%蔗糖水摄取率减少和强迫游泳中不动时间延长，仅有健脾而无疏肝作用的四君子汤则无此效应，说明该模型属于肝郁证的可能性较大，而与脾虚证无关。当然，其他类型方剂对此模型的效应尚需进一步研究。

在本研究中，各处理组大鼠体质量增加量未见到显著性差异，说明本研究中慢性应激刺激未能影响大鼠体质量，与以往研究结果有别[2]。在一些文献中，慢性应激刺激对动物体质量影响的结果不一致[9-10]，提示体质量变化不能确定是由慢性应激引起。在肝郁证的多个诊断标准中，也没有体质量减少，提示体质量变化对于本模型而言，意义不大。

参考文献：

[1] 任 路，李 浩.关于肝郁证动物模型研究现状及存在问题的思考[J]. 中医药学报，2006，34(4)：44-46.
[2] 金光亮，南 睿，郭霞珍. 慢性应激肝郁证大鼠模型的建立[J]. 北京中医药大学学报，2003，26(2)：18-21.
[3] 金光亮，王胜兰.关于建立肝郁证动物模型的思考[J].山东中医药大学学报，2004，28(6)：408-409.
[4] 段富津. 方剂学[J]. 上海：上海科学技术出版社，1995：20-30.
[5] Stathis Bekris, Katerina Antoniou, Spyros Daskas, et al. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains[J]. Behavioural Brain Research, 2005, 161：45-59.
[6] 赵志宇，王卫星，郭洪祝，等.甘草苷对慢性应激抑郁模型大鼠的抗抑郁作用[J]. 中国临床康复，2006，10(27)：69-72.
[7] Makara GB, Merql Z, Zelena D. The role of vasopressin in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation during stress: an assessment of the evidence[J]. Ann NY Acad Sci, 2004, 1018: 151-161.
[8] West CH, Weiss JM. Effects of antidepressant drugs on rats bred for low activity in the swim test [J]. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 1998, 61: 67-79.
[9] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10 year review and evaluation [J]. Psychopharmacology, 1997, 134(4):319-329.
[10] Martin JV, Edwards E, Johnson JO, et al. Monoamine receptors in animal model of affective disorder [J]. Journal of Neuro chemistry, 1990, 55: 1142-1148.

（收稿日期：2007-07-06）

Effect of Powder Sini, Xiaoyao and Decoction of Sijunzi on behavior of stressed rats with chronic stagnation of liver-qi

YU Qi, JIN Guang-liang
(Beijing University of TCM, Beijing 100029, China)

Abstract: [Objective] To study the effects of Powder Sini, Xiaoyao and Decoction of Sijunzi on stagnation of liver-qi in rats with chronic unpredictable mild stress(CUMS) and explore the TCM syndrome characteristic of chronic stress rats. [Methods] Male Sprague-Dawley rats were exposed to an unpredictable sequence of mild stressors for 21 days and treated with Sini Powder, Xiaoyao Powder and Decoction of Sijunzi. Body weight, forced swimming test and fluid consumption were investigated during the whole procedure. Serum corticosterone was measured by ELISA. [Results] Rats exposed to CUMS showed decreased sucrose preference and increased time in forced swimming test, increased content of serum corticosterone($P<0.01$). Regulating Liver and Spleen, Xiaoyao Powder could prevent theses changes ($P<0.01$), but Decoction of Sijunzi had no effects($P>0.05$). [Conclusions] The model investigated in this chronic stressed rats belongs to liver stagnation syndrome and does not relate to spleen deficiency.

Key words chronic unpredictable mild stress; liver depression; regulating Liver and Spleen; Xiaoyao Powder and Decoction of Sijunzi; sucrose taking rate; forced swimming test