

消疲怡神口服液对应激大鼠下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴影响的实验研究*

王琳 王天芳 康纯洁 刘晓兰 刘燕 张翠珍 郑君芳

内容提要 目的:探讨消疲怡神口服液抗应激的作用机理。方法:观察了消疲怡神口服液对强制冷水游泳大鼠模型血清单胺类物质、肾上腺抗坏血酸和下丘脑垂体单胺类递质含量及胸腺指数的影响。结果:消疲怡神口服液可以拮抗应激所致血清多巴胺、5-羟色胺含量升高和肾上腺抗坏血酸含量降低,使降低的下丘脑垂体去甲肾上腺素、5-羟色胺含量回升,但对胸腺指数无明显影响。结论:消疲怡神口服液的作用机制与其对机体下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴的调节有关。

关键词 消疲怡神口服液 强制冷水游泳 下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴

Effects of Xiaopi Yishen Oral Liquid on Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Gland-Thymus Axis in Stressed Rats
WANG Lin, WANG Tianfang, KANG Chunjie, et al *Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100029)*

Objective: To investigate the effect of Xiaopi Yishen (XPYS) oral liquid on the rats under repeated forced cold water swimming (RFCWS) stress. **Methods:** The changes of serum monoamine, ascorbic acid levels in adrenal gland, monoamine levels in hypothalamus and hypophysis, and thymus index were determined. **Results:** XPYS lowered the increasing of serum DA, 5-HT, improved the reducing of ascorbic acid in adrenal gland and NE, HVA, 5-HT, 5-HITT in hypothalamus and hypophysis of RFCWS-stressed rats. **Conclusion:** The mechanism of XPYS is in connection with the regulation of hypothalamus-pituitary-adrenal gland-thymus axis.

Key words Xiaopi Yishen oral liquid, repeated forced cold water swimming, hypothalamus-pituitary-adrenal gland-thymus axis

消疲怡神口服液是本室研制的用以治疗慢性疲劳的中药复方。大量临床研究表明,慢性疲劳的产生与精神刺激、不良习惯、过度劳累等多种应激因素有关^[1]。本实验以强制冷水游泳模拟慢性疲劳的发病过程,并以较为公认的抗疲劳、抗应激药物人参皂甙作为阳性对照药物,从应激角度,观察了应激导致动物疲劳时,其下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴的变化情况和药物对该变化的影响,初步探讨慢性疲劳的发病机制,消疲怡神口服液抗应激、抗疲劳的作用机理及其与中医肝脾的关系。

材料与方法

1 动物及分组 2 级 Wistar 雄性大鼠,体重(170±10)g,由北京流行病研究所实验动物中心提供。按体重随机分为 5 组:模型组,人参皂甙组,小剂量消疲怡神口服液组(简称小剂量组),大剂量消

疲怡神口服液组(简称大剂量组),正常对照组,每组动物 15 只。

2 药物与主要试剂 中药复方消疲怡神口服液,由枳壳、黄芪、人参、柴胡等组成。委托北京市永定制药厂加工,批号:960928,规格:每支 10 ml(1 ml 相当于 1 g 生药)。人参皂甙片由中美合资吉林省亚威制药有限公司生产,批号:94032019,规格:每片 0.1 g,每片含人参总皂甙 25 mg。肾上腺素(E),去甲肾上腺素(NE),多巴胺(DA),5-羟色胺(5-HT),高香草酸(HVA),5-羟吲哚乙酸(5-HIAA),3,4-双羟苯乙酸(DOPAC),二羟苄胺(DHBA),刀豆蛋白(ConA)等均为 Sigma 公司产品;YAC-1 细胞株由中国医科大学肿瘤医院免疫研究室提供;³H-TdR 购自中国原子能科学研究院;其余均为国产分析纯。

3 主要仪器 色谱柱:4×150 mm,填料为 Nava-PaK-C 185 μm,中国科学院大连色谱中心填充;流动相:50 mmol/L 柠檬酸-乙酸钠, pH3.5,内含:1.0 mmol/L B8 离子对试剂,4% 甲醇,1.8 mmol/L 二正丁胺,0.3 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠,检测电压: + 0.75 V,

* 国家自然科学基金资助项目(No.39500184);国家中医药管理局资助项目(No.95B109)

北京中医药大学中医诊断学教研室(北京 100029)

流速:1 ml/min。Water 510 高效液相色谱系统(美国 Waters); Water 464 电化学检测器(美国 Waters); 低温高速离心机(德国 Heraeus); 超声粉碎器(英国 MSE); 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂); CO₂ 培养箱(美国 SMT); 液体闪烁计数仪(美国 PTC)。

4 实验方法

4.1 造模及给药方法 Wistar 大鼠购进后, 置于室温(20±2)℃清洁级动物室中, 每笼 5 只, 自由进食饮水, 适应 1~2 天后, 开始造模。每日分别在不同时间令其在冷水(10±1)℃中游泳, 每次 6~9.5 min。正常对照组, 不造模。模型组、正常对照组, 予蒸馏水灌胃, 每天 2 ml; 人参皂甙组, 造模同时予以人参皂甙灌胃, 每天 70 mg/kg; 小剂量组和大剂量组, 以消疲怡神口服液灌胃, 剂量分别为每天 3.5 g/kg 和 7 g/kg, 共 9 天。以上剂量均参考临床剂量及有关文献计算^[2]。

4.2 观察项目及检测方法

4.2.1 血清及下丘脑单胺类含量测定 用高效液相加电化学检测法检测^[3]。颈动脉取血, 3000 r/min 离心 15 min。取 0.25 ml 血清, 加 0.06 mol/L DHBA 25 μl 及 0.1 mol/L 高氯酸 225 μl, 混匀后, 11000 r/min 离心 10 min, 取上清备测。另取大鼠下丘脑和垂体, 置于加有 0.06 mol/L DHBA 20 μl 及 0.1 mol/L 高氯酸 380 μl 的 Eppendorf 管中, 匀浆, 11000 r/min 离心 10 min, 取上清备测。通过高效液相色谱系统(HPLC)加电化学检测器(ECD)检测。

4.2.2 肾上腺抗坏血酸含量测定 采用 2,4-二硝基苯肼比色法^[3]。大鼠断头处死后, 迅速剖取双侧肾上腺, 去除周围附着组织, 称重后加 5% 三氯醋酸 3.5 ml, 匀浆, 离心(低温, 12000 r/min, 10 min), 取上清于试管中, 加 0.3 g 活性炭, 用力振摇, 过滤, 取滤液 0.5 ml 加 5% 三氯醋酸 1 ml, 10% 硫脲 1 滴, 2% 2,4-二硝基苯肼 0.5 ml(空白管最后加入), 摇匀, 60℃水浴 45 min, 冰水充分冷却及有效振摇下滴加 85% 硫酸 3.5 ml, 在分光光度计(波长 540 nm)下测光密度值。于标准曲线上查出样品所含抗坏血酸含量, 再计算 100 mg 肾上腺中含抗坏血酸的量。

抗坏血酸含量(μg/100 mg) = 样品抗坏血酸浓度 × 3.5 / 肾上腺重量 × 100 %

4.2.3 胸腺指数测定 动物称重后, 摘取胸腺组织称重, 计算胸腺指数, 胸腺指数(mg/g) = 胸腺重量 / 动物体重。

4.2.4 T 细胞增殖的测定 各组动物断头处死, 无菌取脾, 剪碎研磨取悬液, 加 Tris-NH₄Cl, 加不完全 RPMI 1640 培养液洗涤两次, 离心(1500 r/min, 5 min)弃上清, 调细胞数至 5 × 10⁶。向 96 孔板中加入脾细胞悬液每孔 200 μl, 再加入 ConA(终浓度为 5 μg/ml)。37℃, 5% CO₂ 条件培养 68 h。每孔掺入³H-TdR 0.5 μCi, 振荡后, 继续培养 4 h, 用多头样品收集器将各孔的细胞吸于玻璃纤维滤纸上, 用生理盐水洗滤 10 次, 自然风干, 放入加有闪烁液的闪烁瓶中, 避光过夜。次日, 用液体闪烁计数仪测样品的每分钟脉冲数(cpm/min)。

5 统计学方法 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

结 果

1 消疲怡神口服液对冷水应激大鼠血清单胺类物质及其代谢产物含量的影响 见表 1。模型组大鼠血清 E、DA、HVA、5-HT 及 5-HIAA 含量比正常组升高, 其中 DA 含量升高尤为显著($P < 0.05$); 消疲怡神口服液可以降低 DA、HVA、5-HT 含量, 并使 5-HIAA 含量升高, 而对 E 含量无明显影响。人参皂甙组血清 5-HIAA 含量较模型组升高, 其余各项指标无明显变化。

2 消疲怡神口服液对冷水应激大鼠肾上腺抗坏血酸含量的影响 见表 2。冷水应激大鼠肾上腺抗坏血酸含量比正常组明显下降($P < 0.05$); 人参皂甙组肾上腺中抗坏血酸含量比模型组升高, 两者比较, 有统计学意义($P < 0.05$); 大、小剂量组肾上腺中抗坏血酸含量亦升高, 其中大剂量组与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 E、DA、HVA、5-HT 及 5-HIAA 含量的变化比较 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	E	DA	HVA	5-HT	5-HIAA
正常对照	10	35.8 ± 12.9	380 ± 281 [*]	70.3 ± 33.0	140 ± 93	42.7 ± 17.4
模 型	9	52.6 ± 19.8	853 ± 456	81.0 ± 25.4	183 ± 133	51.7 ± 33.2
人参皂甙	13	52.1 ± 30.9	780 ± 400	76.1 ± 34.8	156 ± 80	92.8 ± 28.4 [*]
小剂量	11	46.9 ± 25.9	401 ± 208 [*] [△]	56.9 ± 18.5 [*]	124 ± 84	73.0 ± 37.6
大剂量	13	60.7 ± 20.1	554 ± 297 [*] [△]	66.0 ± 17.4	114 ± 82	70.6 ± 28.2

注: 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与人参皂甙组比较, [△] $P < 0.05$

表 2 各组大鼠肾上腺抗坏血酸含量的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	剂量(g/kg)	抗坏血酸($\mu\text{g}/100\text{mg}$ 组织)
正常对照	13		439 $\pm$ 35 [*]
模 型	12		394 $\pm$ 51
人参皂甙	13	0.07	442 $\pm$ 36 [*]
小剂量	13	3.5	442 $\pm$ 84
大剂量	14	7	472 $\pm$ 118 [*]

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$

3 消疲怡神口服液对冷水应激大鼠下丘脑垂体单胺类递质含量的影响 见表 3。模型大鼠下丘脑垂体 NE、DA、5-HT 含量均降低,其中 NE、5-HT 含量与正常组比较,有显著性差异($P < 0.05$);人参皂甙组和大、小剂量组 NE 含量比模型组明显升高,($P < 0.05$);人参皂甙组和大、小剂量组 5-HT 含量高于模型组,其中人参皂甙组与小剂量组与模型组均有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);模型组、人参皂甙组与大、小剂量组的 DA 含量没有明显差异。

表 3 各组大鼠下丘脑垂体 NE、DA、5-HT 含量的变化比较 ($\mu\text{g}/\text{L}$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	NE	DA	5-HT
正常对照	12	9045 $\pm$ 1293 [*]	1961 $\pm$ 1535	1383 $\pm$ 260 [*]
模 型	11	7082 $\pm$ 1033	1445 $\pm$ 566	1076 $\pm$ 149
人参皂甙	13	9878 $\pm$ 2227 [*]	1475 $\pm$ 541	1403 $\pm$ 285 [*]
小剂量	11	9431 $\pm$ 2023 [*]	1414 $\pm$ 229	1470 $\pm$ 185 ^{**}
大剂量	14	8626 $\pm$ 3225 [*]	1250 $\pm$ 462	1259 $\pm$ 342

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

4 消疲怡神口服液对冷水应激大鼠胸腺指数和 T 细胞增殖的影响 见表 4。各组胸腺指数无明显变化。模型组 T 细胞增殖能力下降,消疲怡神口服液和人参皂甙可显著提高应激大鼠 T 细胞增殖能力。其中小剂量组 T 细胞增殖能力明显高于人参皂甙组($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠胸腺指数和 T 细胞增殖的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量(g/kg)	胸腺指数	T 细胞(cpm/min)
正常对照		2.08 $\pm$ 0.55(13)	1558 $\pm$ 503(8)
模 型		1.98 $\pm$ 0.39(10)	1012 $\pm$ 133(8)
人参皂甙	0.07	1.82 $\pm$ 0.46(14)	3206 $\pm$ 840(8) ^{** ^ ^}
小剂量	3.5	1.91 $\pm$ 0.44(14)	4254 $\pm$ 929(8) ^{** ^ ^ ^}
大剂量	7	2.03 $\pm$ 0.55(15)	2744 $\pm$ 725(8) ^{* ^ ^}

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与模型组比较,^{^ ^} $P < 0.01$;与人参皂甙组比较,[^] $P < 0.05$;() 内为鼠数

讨 论

机体在各种应激状态下,多出现以交感神经—肾上腺髓质和下丘脑—垂体—肾上腺皮质反应为主的变化,使血清儿茶酚胺和肾上腺糖皮质激素含量上升,这常常被视为应激的标志。结果显示,强制冷水游泳使大鼠血清中单胺类物质含量普遍出现升高趋势,消疲

怡神口服液可降低 5-HT、DA 及其代谢产物高香草酸含量,并使 5-HT 代谢产物 5-HIAA 含量升高,提示其抗应激作用可能与抑制外周 DA 的合成与代谢,促进 5-HT 分解有关。人参皂甙能增加模型大鼠血清 5-HIAA 含量,但对 DA、HVA、5-HT 无明显影响。肾上腺抗坏血酸含量与肾上腺皮质功能活跃、合成释放肾上腺皮质激素密切相关,被作为反映肾上腺皮质功能的经典指标。结果表明,强制冷水游泳可明显降低大鼠肾上腺抗坏血酸含量,表明此时肾上腺功能活跃,皮质酮合成增加。消疲怡神口服液和人参皂甙可以有效逆转这一变化,提示两药可以抑制应激情况下肾上腺皮质功能的过度活跃,减少肾上腺皮质激素的合成,减轻应激所致的不良影响。

消疲怡神口服液可部分或全部逆转强制冷水游泳所致大鼠血清中单胺类物质和肾上腺抗坏血酸含量的变化,表明该药具有确切的抗应激作用。而在应激状态下,上述变化还要受中枢神经递质、调质及其受体的调节。目前具体机理仍不十分清楚。有研究表明,NE 在控制 CRF-ACTH 分泌方面起抑制作用, β 受体阻滞剂普萘洛尔能明显提高机体对胰岛素应激的 HPA 反应,表明 NE 可能是通过 β 受体来抑制 HPA 轴的⁽⁴⁾。5-HT 对 HPA 轴的调节作用,目前尚存在争议。有实验表明,下丘脑的 5-HT 能神经终端来自中脑缝际核细胞团,5-HT 在 CRF-ACTH 分泌的昼夜周期性方面起作用,其能刺激下丘脑神经元分泌 CRF 进入门脉垂体血液中。另有研究表明,5-HT 能抑制应激的 ACTH 反应⁽⁴⁾。消疲怡神口服液能有效逆转强制冷水游泳所致下丘脑垂体单胺类递质含量的下降,提示通过促进下丘脑垂体单胺类递质代谢,抑制下丘脑—垂体—肾上腺轴,从而调节外周单胺类递质和糖皮质激素含量变化可能是其抗应激的机制之一。但其具体机理尚待进一步研究。

研究表明,机体免疫功能紊乱是应激的重要变化之一。胸腺作为中枢免疫器官,其功能主要包括 T 细胞分化、成熟和分泌胸腺激素。本结果显示,各组间胸腺指数无明显差异。但模型大鼠 T 细胞的增殖能力下降,消疲怡神口服液和人参皂甙可有效逆转这一变化,提示两药对应激大鼠的免疫功能有一定的增强作用。结果还表明,小剂量消疲怡神口服液对 T 细胞增殖的促进作用要强于人参皂甙。

研究表明,胸腺功能要受神经、激素等的调节,同时它也对神经、内分泌系统有反向调节作用。消疲怡神口服液可部分或全部逆转由强制冷水游泳所致大鼠肾上腺糖皮质激素合成增加和血清中单胺类神经物质

浓度提高,并可使下丘脑垂体中下降的单胺类递质含量得以回升。提示该药对胸腺的作用可能与其对下丘脑—垂体—肾上腺轴的调节有关。此外在抗应激过程中,消疲怡神口服液对下丘脑—垂体—肾上腺轴的调节作用是否也受其对胸腺等免疫器官调节的影响,这些问题都有待于进一步深入探讨。

消疲怡神口服液是以补气理气、调理肝脾为组方原则的中药复方。主要药物包括枳壳、黄芪、柴胡、人参等。本次研究显示,该药能调节冷水应激所致大鼠下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴的异常变化。这提示中医肝脾与西医的下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴之间有一定的关系。此外,本次结果还提示,消疲怡神口服液对下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴的影响要强于人参皂甙。

总之,本课题初步研究了冷水应激对大鼠下丘脑

—垂体—肾上腺—胸腺轴的影响,及以补气理气、调理肝脾为组方原则的消疲怡神口服液对该变化的调节作用,证明了此药的抗应激作用,并为进一步探讨慢性疲劳的病理机制,寻找有效防治的药物和方法以及研究中医肝脾的实质提供了一定的依据。

参 考 文 献

1. Cleare AJ, Wessely SC. Chronic fatigue syndrome: a stress disorder? Br J Hosp Med 1996;55(9): 571—574.
2. 王子健,杨光华,钱锦康,等.人参地上部分总皂甙适应原性作用的初步研究.药学通报 1982;17(8): 5—9.
3. 陈奇.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1993: 741,789.
4. 丁寿根.应激过程中下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴的调控机理.国外医学军事医学分册 1994;11(1): 9—14.

(收稿:1999-01-04 修回:1999-05-05)

生大黄粉神阙贴敷治疗中风便秘 75 例

伦 新

便秘是中风病的常见伴随症状之一,对中风转归具有较大的影响。近年来我们对 75 例中风便秘采用生大黄粉加白酒神阙穴贴敷进行治疗,收到了满意效果,现报道如下。

临床资料 150 例均系我院针灸病区 1995~1998 年的住院患者,头颅 CT 检查,出血性中风者 58 例,缺血性中风者 74 例,混合性中风者 18 例;既往有便秘史者 25 例。随机分两组,治疗组 75 例,男 49 例,女 26 例;年龄 31~82 岁,平均 56.5 岁;病程 3~150 天;缺血性中风 37 例,出血性中风 29 例,混合性中风 9 例。原有病变:高血压病 59 例,高血脂 57 例,冠心病 21 例,糖尿病 23 例。对照组 75 例,男 48 例,女 27 例;年龄 30~80 岁,平均 55 岁;病程 4~150 天。缺血性中风 37 例,出血性中风 29 例,混合性中风 9 例。原有病变:高血压病 56 例,高血脂 60 例,冠心病 20 例,糖尿病 20 例。两组情况比较无显著性意义,具有可比性。参照国家中医药管理局《中医病证诊断疗效标准》,所有患者均符合:(1)有中风病史;(2)排便时间延长,3 天以上 1 次,粪便干燥坚硬;(3)排除肠道器质性疾病。

治疗方法 治疗组均采用生大黄粉 3g,用 50~60 度白酒调成糊状,贴敷于神阙穴,外用敷料胶布(胶布过敏者用绷带)固定,每天于局部用 50~60 度白酒约 5ml 加湿 1 次,3 天换药 1 次,5 次为 1 个疗程。对照组给予苁蓉通便口服液(甘肃省天水制药厂,每支 10ml),每次 1 支,每天 2 次,清晨及睡前服用。两组均常规治疗中风。

结 果

1 疗效判断标准 根据《中医病证诊断疗效标准》评定疗

效,2 天以内排便 1 次,便质转润,解时通畅,短期无复发为显效;3 天以内排便,便质转润,排便欠畅为好转;症状无改善为无效。

2 治疗结果 治疗组 75 例中显效 55 例,好转 14 例,无效 6 例,总有效率为 92.0%。对照组 75 例中,显效 22 例,好转 28 例,无效 25 例,总有效率 66.7%。经统计学处理($\chi^2 = 14.68, P < 0.01$),治疗组有效率明显高于对照组。

3 治疗组疗效与病种的关系 缺血性中风 37 例,显效 29 例,好转 7 例,无效 1 例;出血性中风 29 例,显效 23 例,好转 5 例,无效 1 例;混合性中风 9 例,显效 3 例,好转 2 例,无效 4 例。经统计学处理(多组 R 值的均数检验, $\chi^2 = 1.04, P > 0.05$),生大黄粉神阙贴敷治疗上述中风诸类型之间的便秘的疗效无显著性差异。

讨 论 中风多发生于中老年人,其全身脏腑机能减退,胃肠蠕动减弱,而出现便秘症状。中医学认为,脐为先天之结蒂,后天之气舍,介于中、下焦之间,又是肾间动气之处,故神阙穴与脾、胃、肾的关系最为密切。刺激该穴,能通过脐部的经络循行速达病所,起到疏通经络,调达脏腑,润肠通便的作用。临床对于便秘处理,通常采用口服缓泻剂或外用开塞露,但前者易给患者带来胃肠不适,后者使用时,对于老年患者甚为不便。生大黄粉穴位贴敷则克服了以上不足,并收到满意通便效果。其机理可能是穴位刺激,药物局部吸收双重作用。此法不仅给药途径便捷,起效快,连续贴敷多次未见副作用及局部破溃,且可避免部分患者合并腹痛、恶心呕吐而不能口服的困难。

(收稿:1999-08-09 修回:1999-10-25)