

调肝、补肾、健脾方药对慢性心理应激大鼠单胺类神经递质影响的比较研究*

严 灿^{1△} 徐志伟¹ 李 艳¹ 史亚飞¹ 邓中炎¹ 潘 毅¹ 谭炳炎²

内容提要 目的 观察慢性心理应激反应大鼠血浆和下丘脑多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)的变化及调肝、补肾、健脾方药对其影响。方法 Wistar 大鼠按体重随机分为 6 组,即对照组(C)、模型组(M)、调肝中药(加味四逆散)组(C1)、人参总皂甙组(C2)、补肾中药(肾气丸)组(C3)、健脾中药(四君子汤)组(C4)。采用束缚限制活动空间的方法造成慢性心理应激大鼠模型,所有药物灌胃给药。采用电化学高效液相色谱分析方法检测血浆和下丘脑 DA、5-HT、E、NE 含量。结果 应激大鼠血浆和下丘脑 DA、5-HT 含量明显降低(均 $P < 0.01$),血浆 NE、E 含量明显升高(均 $P < 0.01$),而下丘脑 NE 含量无明显变化。血浆 5-HT/NE、5-HT/E 及下丘脑 5-HT/NE 均明显降低(均 $P < 0.01$)。加味四逆散可以升高应激大鼠下丘脑和血浆中 DA、5-HT 含量(均 $P < 0.01$),并能降低血浆中 NE、E 含量(均 $P < 0.01$),升高下丘脑和血浆 5-HT/NE 以及血浆 5-HT/E ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。肾气丸、四君子汤及人参总皂甙虽然对有些指标有影响,但对心理应激的整体调节作用不如加味四逆散。结论 加味四逆散对慢性心理应激大鼠血浆和下丘脑单胺类神经递质的代谢紊乱均有良好的调节作用,调肝、补肾、健脾治法方药中以调肝治法方药的综合作用最为显著。

关键词 心理应激 单胺类神经递质 高效液相色谱分析 调肝 补肾 健脾

Comparative Study on Effects of Liver-regulating, Kidney-tonifying and Spleen-invigorating Recipes on Monoamine Neurotransmitter in Plasma and Hypothalamus of Rats with Chronic Psychological Stress YAN Can, XU Zhi-wei, LI Yan, et al *Department of Basic Theory of TCM, Guangzhou University of TCM, Guangzhou (510405)*

Objective: To observe the changes of monoamine neurotransmitters including 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), epinephrine (E) and nor-adrenalin (NE) in plasma and hypothalamus of rats with chronic psychological stress and the effects of Liver-regulating, Kidney-tonifying and Spleen-invigorating recipes on them. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into 6 groups according to their body weight, the control group (C), the model group (M), the Liver-regulating group (treated with Jiawei Sinisan decoction), the total ginsenoside group, the Kidney-tonifying group (treated with Shenqiwan decoction) and the Spleen-invigorating group (treated with Sijunzi decoction). The rat model of chronic psychological stress was established by bandaging and confining activity space. All the drugs were given through gastrogavage. The contents of monoamine neurotransmitters were detected by HPLC. **Results:** Levels of DA, 5-HT in hypothalamus and plasma lowered in the model rats significantly ($P < 0.01$), levels of NE and E in plasma increased significantly ($P < 0.01$) but that of NE in hypothalamus changed insignificantly, the 5-HT/NE and 5-HT/E in plasma and 5-HT/NE in hypothalamus lowered significantly ($P < 0.01$). Jiawei Sinisan could improve these changes significantly ($P < 0.01$). Although the other 3 treatments showed somewhat influence on these criteria, the comprehensive effects of them was inferior to that of Jiawei Sinisan. **Conclusion:** Liver-regulating therapy with Jiawei Sinisan showed good regulatory effects on monoamine neurotransmitter metabolism in plasma and hypothalamus, which shows better effect than that of the other two (Kidney-tonifying and Spleen-invigorating).

Key words psychological stress, monoamine neurotransmitter, high performance liquid chromatography, Liver-regulating, Kidney-tonifying, Spleen-invigorating

* 国家自然科学基金(No. 3000217)及广东省自然科学基金(No. 000359)资助项目

1. 广州中医药大学中医基础理论教研室(广州 510405) 2. 中山大学中山医学院

△博士研究生

近年来,各种应激原以不同形式不同程度地影响着人群的生存质量,慢性心理应激对机体所造成的身心损害越来越引起人们的重视。我们采用束缚限制活动空间的方法造成慢性心理应激大鼠模型,观察应激大鼠血浆和下丘脑单胺类神经递质的变化以及调肝、补肾、健脾治法对其的影响,并在此基础上,比较不同治法方药的治疗效应。现将实验结果报告如下。

材料与方法

1 实验动物及分组 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 180~220g,由第一军医大学实验动物中心提供。所有大鼠正常饮食,在光-暗周期为 12h,温度(20±2)℃,安静环境下饲养 7 天。按体重随机分为 6 组(每组 10 只):对照组(简称 C),不给任何刺激。模型组(简称 M),给予束缚制动刺激,不予中药。调肝中药组(简称 C1),束缚制动刺激前给予加味四逆散。人参总皂甙组(简称 C2),束缚制动刺激前给予人参总皂甙。补肾中药组(简称 C3),束缚制动刺激前给予肾气丸。健脾中药组(简称 C4),束缚制动刺激前给予四君子汤。

2 药物 加味四逆散组成及剂量:柴胡 5g 白芍 15g 枳壳 6g 枸杞子 15g 山栀子 5g 干地黄 18g 石决明 30g。肾气丸组成及剂量:干地黄 30g 淮山药 15g 山茱萸 15g 泽泻 10g 茯苓 10g 牡丹皮 10g 桂枝 4g 附子 4g。四君子汤组成及剂量:党参 20g 白术 15g 茯苓 15g 炙甘草 6g。以上中药由本校第一附属医院药房提供,经药剂科鉴定均为纯正药材,按成年人 70kg 体重剂量的 10 倍分别水煎浓缩至含生药 1.35g/ml、1.4g/ml、0.8g/ml,高压灭菌,4℃冰箱保存备用。人参总皂甙由长春白求恩医科大学提供,配制成水溶液 7mg/ml。

3 试剂及仪器 去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)标准品均为 Sigma 公司产品。缓冲液:3mmol/L 庚烷磺酸钠,100mmol/L 醋酸钠,85mmol/L 柠檬酸,0.2mmol/L EDTA。缓冲液调至 pH 为 4.0。高效液相色谱仪为 Waters 公司 510 高压泵(美国),7125 进样器,HP 1049A 电化学检测器,Hiqsil C18 色谱柱(日本),4.6mm×150mm 粒度 5μm。流动相:缓冲液:甲醇=90:10(v/v)。检测器电极:玻璃碳电极。检测电压:0.7V。高压泵流速:1ml/min N2000 色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程研究所提供)。

4 实验方法

4.1 慢性心理应激反应模型的制作 将造模大鼠置于自制的束缚制动筒内(由大鼠固定仪改制而成),通过移动插片而逐步缩小大鼠的活动空间,调节到其不产生强烈反抗的紧张程度,每日束缚制动 1 次,每日开始时间及束缚制动时间不同,第 1 天为 4h,其后每次增加 30~60min,连续 2 周。造模大鼠在制动期间禁食、禁水。造模结束后在动物清醒、安静状态下进行实验。

4.2 给药方法 C1、C2、C3、C4 组分别在束缚制动刺激前给予加味四逆散、人参总皂甙、肾气丸及四君子汤各 2ml 灌胃,C 组及 M 组以等量生理盐水灌服。各组动物均于造模前 1h 给药,1h 后将 M 组、C1 组、C2 组、C3 组、C4 组大鼠分别置于束缚制动筒内开始造模。

4.3 检测项目及方法 实验动物断头取血,4℃放置 4h,4000r/min 4℃离心 15min,取上清,加入等体积的 0.1mol/L 高氯酸(内含 0.1% 半胱氨酸),振摇混合 30s(涡流振荡器),再加一滴浓高氯酸(原液),冰上振荡 1.5min,18 000r/min 4℃离心 20min,取上清液 100~200μl 进样分析。断头取血的同时,快速在冰盘上分离出下丘脑,电子天平称重,冷冻,加 0.1mol/L 高氯酸(内含 0.1% 半胱氨酸)1ml,冰浴中磨成匀浆(20μl/mg),18 000r/min 4℃离心 20min,取上清液 25~100μl 进样分析。以样品峰的保留时间与标准物保留时间对照定性。以 DHBA 为内标物,以样品峰面积与内标峰面积的比值进行定量分析。

5 统计学方法 所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计软件进行方差分析和 *t* 检验。

结 果

1 调肝、补肾、健脾方药对慢性心理应激大鼠血浆 DA、E、NE、5-HT 的影响 见表 1。模型组大鼠造模后血浆 DA、5-HT 含量明显低于对照组($P < 0.01$),而 NE、E 含量则明显高于对照组($P < 0.01$)。加味四逆散能明显升高血浆 DA 和 5-HT 含量($P < 0.01$),降低血浆 NE 和 E 含量($P < 0.01$)。人参总皂甙能显著升高血浆 DA 含量($P < 0.01$),但与加味四逆散比较差异无显著性($P > 0.05$)。人参总皂甙对于应激大鼠血浆 E、5-HT 虽有调整作用,但效果不及加味四逆散,两组比较差异有显著性($P < 0.05$)。加味四逆散可明显降低应激大鼠血浆 NE 含量($P < 0.01$),但人参总皂甙却上调了 NE。肾气丸虽然对 4 项单胺类递质含量均有升高作用,但其所升高的幅度都相当大,并

超过了对照组和模型组水平。此外,肾气丸对升高的 NE 和 E 不但没有降低反而升高。四君子汤对应激大鼠血浆 DA 含量不但没有升高反而降低,对血浆 NE 不但没有降低反而升高,对 5-HT 和 E 的含量虽有调整作用,但与加味四逆散比较差异无显著性($P > 0.05$)。由此可见,对于慢性心理应激大鼠的血浆中单胺类神经递质的调节,加味四逆散明显优于肾气丸、四君子汤和人参总皂甙。

表 1 调肝、补肾、健脾方药对慢性心理应激大鼠血浆 DA、E、NE、5-HT 的影响 (ng/ml $\bar{x} \pm s$)

组别 _n	DA	E	NE	5-HT
C	10219.56 ± 123.2	173.54 ± 69.41	2893.36 ± 88.96	2379.42 ± 641.21
M	8 141.15 ± 38.48*	990.12 ± 697.90*	3407.74 ± 45.70*	1967.00 ± 740.74*
C1	8 312.85 ± 81.60 [△]	521.80 ± 362.70 [△]	2982.80 ± 65.77 [△]	2418.75 ± 659.13 [△]
C2	8 287.07 ± 17.20 [△]	815.16 ± 25.38 [▲]	4781.58 ± 66.38	1474.11 ± 334.44 [▲]
C3	8 235.00 ± 20.54	1612.80 ± 412.84	4126.10 ± 1023.36	2857.10 ± 353.34
C4	8 134.05 ± 75.73	5416.24 ± 833.98	5740.34 ± 1150.01	2393.66 ± 1330.17

注:与 C 组比较,* $P < 0.01$;与 M 组比较,[△] $P < 0.01$;与 C1 组比较,[▲] $P < 0.05$

2 调肝、补肾、健脾方药对慢性心理应激大鼠下丘脑 DA、NE、5-HT 的影响 见表 2。造模后模型组大鼠下丘脑 DA 和 5-HT 含量明显降低($P < 0.05$),NE 含量无明显变化($P > 0.05$)。加味四逆散对应激大鼠下丘脑中 DA 和 5-HT 含量均有明显升高作用($P < 0.01$)。人参总皂甙对 5-HT 含量几乎没有影响,对 DA 含量虽有升高作用,但无统计学意义($P > 0.05$)。肾气丸可明显升高应激大鼠下丘脑 5-HT 及 DA 含量($P < 0.05$),但与加味四逆散比较差异无显著性($P > 0.05$)。肾气丸对 NE 虽然有一定的调节作用,但无统计学意义($P > 0.05$)。四君子汤对 DA 和 NE 有明显调节作用($P < 0.05$),但与加味四逆散比较差异无显著性($P > 0.05$);在升高 5-HT 方面,加味四逆散明显优于四君子汤。由此可见,对于中枢神经递质的调节,加味四逆散综合调节作用明显优于其他 3 组。

表 2 调肝、补肾、健脾方药对慢性心理应激大鼠下丘脑 DA、NE、5-HT 的影响 (ng/mg 湿重, $\bar{x} \pm s$)

组别 _n	DA	NE	5-HT
C	10 0.7550 ± 0.5005	2.35 ± 0.19	0.50 ± 0.22
M	8 0.3589 ± 0.1968*	2.50 ± 0.68	0.23 ± 0.14*
C1	8 0.4888 ± 0.2086 ^{△△}	2.31 ± 0.30	0.40 ± 0.01 ^{△△}
C2	8 0.3925 ± 0.1257	2.60 ± 0.29	0.25 ± 0.06
C3	8 0.4417 ± 0.1341 [△]	2.31 ± 0.51	0.33 ± 0.26 [△]
C4	8 0.5050 ± 0.1099 [△]	2.06 ± 0.55 [△]	0.25 ± 0.14

注:与 C 组比较,* $P < 0.05$;与 M 组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

3 调肝、补肾、健脾方药对慢性心理应激大鼠血浆 5-HT/NE、5-HT/E 及下丘脑 5-HT/NE 的影响 见表 3。模型组大鼠血浆 5-HT/NE、5-HT/E 及下丘

脑 5-HT/NE 均明显下降(均 $P < 0.01$)。加味四逆散可以升高下丘脑和血浆 5-HT/NE 以及血浆 5-HT/E ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。人参总皂甙对于血浆 5-HT/NE 和 5-HT/E 均无正向调节作用,相反却下调;对下丘脑 5-HT/NE 虽有升高作用,但无统计学意义($P > 0.05$)。肾气丸虽能升高血浆和下丘脑的 5-HT/NE,但与模型组比较,无统计学意义。对血浆中 5-HT/E 虽有下调趋势,但无统计学意义($P > 0.05$)。四君子汤对血浆中 5-HT/E 虽然有升高作用,但不如加味四逆散。此外,四君子汤对下丘脑 5-HT/NE 有上调趋势,但与 M 组相比无统计学意义,对血浆 5-HT/NE 比值则有下调趋势($P < 0.05$)。由此可见,加味四逆散的综合调节作用明显优于其他用药 3 组。

表 3 调肝、补肾、健脾方药对慢性心理应激大鼠血浆 5-HT/NE、5-HT/E 及下丘脑 5-HT/NE 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别 _n	血浆 5-HT/NE	血浆 5-HT/E	下丘脑 5-HT/NE
C	10 0.82 ± 0.23	13.75 ± 2.40	0.21 ± 0.03
M	8 0.58 ± 0.04*	1.98 ± 0.36*	0.09 ± 0.02*
C1	8 0.91 ± 0.03 [△]	5.21 ± 1.10 ^{△△}	0.17 ± 0.09 ^{△△}
C2	8 0.31 ± 0.02	1.81 ± 0.56	0.10 ± 0.04
C3	8 0.69 ± 0.23	1.77 ± 0.76	0.14 ± 0.04
C4	8 0.42 ± 0.97	3.90 ± 0.11 [△]	0.12 ± 0.06

注:与 C 组比较,* $P < 0.01$;与 M 组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

讨 论

本实验利用自制的束缚制动器来限制大鼠的活动空间,同时,为了避免动物对造模方法产生习惯性,我们采用造模时间不固定并且每天延长造模时间,从而造成慢性心理应激反应大鼠模型。采用高效液相色谱检测器检测慢性心理应激大鼠血浆和下丘脑中单胺类递质含量,我们发现,应激大鼠下丘脑和血浆中 5-HT 和 DA 含量均明显降低;血浆中 NE 和 E 含量显著升高,下丘脑 NE 却几乎无改变。5-HT 在调节机体的情绪方面具有相当重要的作用,5-HT 含量减少的原因可能是在应激状态下,下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进,增高的皮质酮通过诱导肝脏色氨酸吡咯化酶,降解血浆色氨酸,终致中枢色氨酸不足和 5-HT 合成低下⁽¹⁾。在本实验中,连续 2 周的反复心理应激可使大鼠体内 5-HT 长期释放,这也可以导致 5-HT 的耗竭⁽²⁾。精神活动异常与中枢神经系统的 5-HT 和 NE 相互作用的关系越来越受到关注,特别是 5-HT 和 NE 之间的非平衡状态与精神异常的关系已初步建立⁽³⁾。本实验研究结果发现,慢性心理应激大鼠血浆 5-HT/NE、5-HT/E 以及下丘脑 5-HT/NE 均明显下降,说明心理应激可使大鼠神经递质间的平衡失调,本实验方

法所造成的应激大鼠有抑郁状态的存在。

人参皂甙虽然可以增强机体的免疫功能和抗应激能力,但对慢性心理应激大鼠血浆及下丘脑 5-HT 的调节不如加味四逆散。肾气丸、四君子汤对血浆 5-HT、5-HT/E 血浆和下丘脑 5-HT/NE 的调节无规律性,基本无统计学意义。

DA 系统主要参与调控精神活动。以前有研究表明,在反复长期遭受心理应激的情况下,大量的 DA 被耗竭,最终导致其含量明显下降^(4,5),这与本实验结果一致。NE、E 均参与应激反应,并反映出一定的情绪状态。本实验结果发现血浆 NE、E 明显升高,这与交感神经兴奋有关,但中枢 NE 含量却无明显变化,这似乎说明限制大鼠空间活动范围这种应激方法不会刺激中枢产生更多的 NE,但这尚需要作进一步研究。此外,由于 E 在中枢的含量很微小,而且限于实验条件,本次实验没有检测到。加味四逆散可显著降低血浆 NE 和 E,从而对交感神经功能亢进有良好的调整作用,由此,对应激大鼠的不良情绪变化亦有积极的调节作用。人参皂甙对应激大鼠血浆中升高的 NE 非但没有降低,反而进一步升高,其机制还有待于进一步探讨。肾气丸对本实验方法所造成的心理应激大鼠的单胺类神经递质代谢紊乱无正向调节作用。此外,四君子汤上调了血浆 DA 和 NE,下调血浆 E,但与加味四逆散比较差异无显著性。

综合以上实验结果可以看出,对采用束缚制动方法所造成的慢性心理应激反应,调肝、补肾、健脾治法中以调肝治法的综合调治作用最为显著。依据中医方—证—效理论,本实验结果亦初步提示,反复慢性束缚制动方法所造成的心理应激反应其主要病位在肝,病理机制为肝失疏泄,但这一结论尚须结合其他神经内分泌学、行为学等指标的检测作进一步论证。

参 考 文 献

1. Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM. Awakening the sleeping giant: anatomy and plasticity of the brain serotonergic system. *J Clin Psychiatry* 1991; 52(Suppl):4—16.
2. Richardson Morton KD, Van-de Kar LD, Brownfield MS. Stress-induced renin and corticosterone secretion is mediated by catecholaminergic nerve terminals in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1990; 51(3):320—327.
3. Aston Jones G. Potent interactions between NE and 5-HT system. *Biol Psychiatry* 1994; 35:621.
4. Gresch PJ, Sved AF, Zigmond MJ, et al. Finlay-JM Stress-induced sensitization of dopamine and norepinephrine efflux in medial prefrontal cortex of the rat. *J Neurochem* 1994; 63(2):575—583.
5. 万选才 杨天祝,徐成焘等主编. 现代神经生物学. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:119—160.

(收稿 2001-12-12 修回 2002-04-20)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

- 名誉总编 季钟朴
- 总 编 辑 陈可冀
- 副总编辑 沈自尹 肖培根 陈维养(常务)
- 顾 问 吴咸中 辛育龄 关幼波 邓铁涛 尚天裕 王永炎 侯 灿
- 编辑委员 马必生 王一涛 王书臣 王今达 王宁生 王 阶 王学美 王 佩 王宝恩
- 王硕仁 王雪苔 尹光耀 史大卓 史载祥 刘干中 刘建勋 刘耕陶 刘猷枋
- 危北海 匡调元 朱 兵 吕爱平 吕维柏 齐清会 孙 燕 李 恩 李乃卿
- 李大金 李玉光 李连达 李廷谦 李国贤 李国栋 李鸣真 李顺成 李恩宽
- 杨任民 杨秀伟 时毓民 陈士奎 陈小野 陈冬燕 陈香美 吴伟康 陆付耳
- 张大钊 张之南 张永祥 张伯礼 张国玺 张亭栋 张荣华 张家庆 张梓荆
- 林求诚 林志彬 林瑞超 郁仁存 周文泉 周 俊 周霭祥 金益强 赵伟康
- 唐由之 顾振纶 郭赛珊 徐治鸿 梁晓春 黄晓愚 曹小定 葛秦生 谢宗万
- 谢竹藩 董福慧 曾晓春 雷 燕 蔡定芳 裴正学 黎磊石 廖家桢 廖福龙
- 戴瑞鸿