

## · 基础研究 ·

# 柴疏四君汤对肝郁、脾虚和肝郁脾虚模型大鼠性腺轴的影响

李 聪 谢 鸣 赵荣华 王帮众 么元超

**摘要** **目的** 探查肝郁、脾虚、肝郁脾虚证模型大鼠性腺功能的变化和柴疏四君汤对其影响。**方法** 大鼠按照随机数字表法分为正常对照、肝郁模型、肝郁给药、脾虚模型、脾虚给药、肝郁脾虚模型、肝郁脾虚给药组,共 7 组,每组 10 只。肝郁模型、脾虚模型、肝郁脾虚模型组及各相应给药组大鼠分别采用慢性束缚、饮食失节 + 过度疲劳、慢性束缚 + 饮食失节 + 过度疲劳的方法,连续造模 4 周。于造模第 15 天,各给药组分别予柴疏四君汤 3.57 g/(kg·d)灌胃,各模型组和正常对照组给予等量蒸馏水,连续 14 天。检测各组大鼠血中的促性腺激素释放激素(GnRH)、促卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E<sub>2</sub>)、睾酮(T)。**结果** 与正常对照组比较,肝郁、脾虚及肝郁脾虚模型组 GnRH、T、E<sub>2</sub>、FSH 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),肝郁模型组 LH 升高( $P < 0.05$ ),肝郁脾虚模型组 LH 降低( $P < 0.01$ )。与肝郁模型组比较,脾虚模型组 T、FSH、LH 降低, E<sub>2</sub> 升高( $P < 0.05$ ),肝郁脾虚模型组 FSH 和 LH 亦降低( $P < 0.05$ );与脾虚模型组比较,肝郁脾虚模型组 T 升高( $P < 0.05$ ),FSH 降低( $P < 0.05$ )。分别与相应模型组比较,肝郁给药组 FSH 降低( $P < 0.01$ )和 LH 升高( $P < 0.05$ ),脾虚给药组 T 升高, E<sub>2</sub> 和 LH 降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),肝郁脾虚给药组 T 降低( $P < 0.01$ ), GnRH、E<sub>2</sub>、FSH、LH 升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 中医肝郁、脾虚、肝郁脾虚 3 证模型均存在不同程度的性腺轴功能异常。柴疏四君汤对 3 证均有不同程度的调节作用,其中对肝郁脾虚证的性腺轴功能具有较为全面的改善作用。该结果为中医疏肝健脾方与肝郁脾虚证具有较高的关联性提供了一定的实验证据。

**关键词** 肝郁;脾虚;肝郁脾虚;证候模型;大鼠;性腺轴;柴疏四君汤

Effect of Chaishu Sijun Decoction on the Gonad Axis of Gan-qi Stagnation, Pi Deficiency, and Gan-qi Stagnation Pi Deficiency Model Rats LI Cong, XIE Ming, ZHAO Rong-hua, WANG Bang-zhong, and YAO Yuan-chao *Department of Chinese Medical Formulae, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029), China*

**ABSTRACT** **Objective** To observe changes of gonad functions of Gan-qi stagnation (GS), Pi deficiency (PD), Gan-qi stagnation Pi deficiency (GSPD) model rats, and the effect of Chaishu Sijun Decoction (CSD) on them. **Methods** Rats were randomly divided into 7 groups according to random digit table, i.e., the normal control group, the GS model group, the GS medication group, the PD model group, the PD medication group, the GSPD model group, and the GSPD medication group, 10 in each group. Rats in the GS model group, the PD model group, and the GSPD model group were treated with chronic restraint, improper diet + excessive fatigue, chronic restraint + improper diet + excessive fatigue. The model was established for 4 successive weeks. Starting from the 15th day of modeling, CSD at the daily dose of 3.57 g/kg was given by gastrogavage to them for 14 successive days. Equal volume of distilled water was given by gastrogavage to rats in each model group and the normal control group for 14 successive days. The blood contents of gonadotrophin releasing hormone (GnRH), follicular stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E<sub>2</sub>), and testosterone (T) were detected in rats of each group. Re-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173193)

作者单位:北京中医药大学基础医学院方剂教研室(北京 100029)

通讯作者:谢 鸣, Tel: 13621175596, E-mail: xieming603@263.net

DOI: 10.7661/CJIM.2014.06.0694

sults Compared with the normal control group, there was statistical difference in GnRH, T,  $E_2$ , and FSH in the GS, PD, and GSPD model groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The content of LH was elevated in the GS model group ( $P < 0.05$ ) and declined in the GSPD model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the GS model group, the contents of FSH, LH, and T decreased and  $E_2$  increased in the PD model group (all  $P < 0.05$ ); the contents of FSH and LH also declined in the GSPD model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the PD model group, the T content increased and FSH decreased in the GSPD model group (all  $P < 0.05$ ). Compared with each corresponding model group, the FSH content decreased ( $P < 0.01$ ) and LH increased in the GS medication group; the T content increased,  $E_2$  and LH decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in the PD medication group; the T content decreased ( $P < 0.01$ ), GnRH,  $E_2$ , FSH, and LH increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in the GSPD medication group. Conclusions There exist different degrees of abnormal function of the gonad axis in the GS, PD, and GSPD models. CSD had certain regulatory effect on the 3 syndromes. Of them, it showed a more comprehensive role in improving the gonad function axis. Results of this experiment had provided the experimental evidence for higher correlation between CSD and GSPD syndrome.

**KEYWORDS** Gan-qi stagnation; Pi deficiency; Gan-qi stagnation Pi deficiency syndrome; syndrome model; gonad axis; Chaishu Sijun Decoction

肝郁、脾虚和肝郁脾虚证是中医临床常见的 3 个证型,其中肝郁脾虚证是肝郁与脾虚的复合证。柴疏四君汤是柴胡疏肝散与四君子汤的合方,具有疏肝健脾的功用。根据药—方—证—效之间的关系和中医方证关联的原理<sup>[1]</sup>,当同一疏肝健脾方作用于肝郁、脾虚、肝郁脾虚 3 个不同证候时则具有不同的效应,其中应以对肝郁脾虚证具有更好的疗效,但目前尚缺乏实证意义上的论证。本实验根据中医饮食劳倦伤脾、束缚受制致郁的发病学经验,比较同步实验条件下由关联模型复制法诱导的中医肝郁、脾虚和肝郁脾虚 3 个证候模型大鼠性腺轴功能的变化及柴疏四君汤对其影响。

## 材料与方法

1 动物 Wistar 大鼠 120 只,雄性,体重  $(240 \pm 10)$ g,级别 SPF / VAF,由北京斯贝福实验动物中心提供,动物许可证号为 SCXK(京)2013-0004。

2 药物 柴疏四君汤为柴胡疏肝散和四君子汤的合方:由柴胡 4 g 陈皮 4 g 川芎 3 g 香附 3 g 枳壳 3 g 芍药 3 g 人参 4 g 白术 3 g 茯苓 3 g 炙甘草 2 g 组成,北京同仁堂药业股份有限公司提供(批号:20120220),经北京中医药大学张媛教授鉴定均为正品。采用常规水煎提取的方法,制成颗粒(0.52 g 柴疏四君汤颗粒相当于 1 g 生药材)。使用前以蒸馏水配制成浓度为 12.87% 的口服液。

3 试剂及仪器 促性腺激素释放激素(GnRH)、促卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇( $E_2$ )、睾酮(T)放射免疫分析试剂盒,由北京华英生物技术研究所提供。低温离心机(DDL25 型),上海安亭

科学仪器厂生产。TD25-WS48 孔多管架自动平衡离心机:长沙湘仪离心机仪器有限公司。r-911 全自动计数仪:中国科技大学实业总公司。

自制大鼠束缚器:为有机玻璃制成的圆筒状结构,主筒长 25 cm,筒口外径 7 cm,内径 5 cm,前端置有一直径小于主筒、可前后调节的带有透气孔、便于大鼠头伸进的有机玻璃前罩,后端为前后间距可调的开关闸门。塑料钢化桶,高 60 cm,桶口径 50 cm,执行标准:QWHC02-2002,温岭大溪宏程塑料制品厂生产。

## 4 造模方法与分组

4.1 分组 所有动物购入后适应性饲养 1 周。大鼠按随机数字表法分为正常对照组、肝郁模型组、肝郁给药组、脾虚模型组、脾虚给药组、肝郁脾虚模型组和肝郁脾虚给药组共 7 组,每组 10 只。

4.2 动物模型的制备 正式实验前全部动物进行预游泳,剔除游泳时间  $< 10$  min 或  $> 20$  min 的大鼠。肝郁证、脾虚证和肝郁脾虚证大鼠模型的制备分别采用慢性束缚应激法<sup>[2]</sup>、过度疲劳 + 饮食失节法<sup>[3]</sup>和慢性束缚应激 + 过度疲劳 + 饮食失节法<sup>[4]</sup>。除正常对照组不加任何刺激,自然饲养,其余 6 组按上述制模方法处理,连续 28 天。

4.3 给药方法 于造模第 15 天,各给药组大鼠分别给予柴疏四君汤灌胃,按成人 70 kg 体重折算日给药量为  $3.57$  g/(kg · d)<sup>[5]</sup>,1 天 1 次;各模型组和正常对照组给予等量蒸馏水,连续 14 天。

## 5 检测指标与方法

5.1 标本采集 实验第 29 天(禁食不禁水 12 h)各组大鼠用 10% 水合氯醛按  $0.35$  mL/100 g

腹腔注射麻醉,迅速打开腹腔,腹主动脉取血 6 mL,将血在室温下 2 500 r/min 离心 15 min,取血清,置于冰箱 -20 ℃ 保存。

5.2 检测指标 血清 GnRH、FSH、LH、E<sub>2</sub>、T 含量均按放免试剂盒操作说明书测定。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据符合正态分布,采用单因素方差分析;多组间比较,采用 LSD 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1 肝郁、脾虚、肝郁脾虚证模型大鼠性腺轴激素水平比较(表 1) 与正常对照组比较,肝郁、脾虚及肝郁脾虚模型组 GnRH、T、E<sub>2</sub>、FSH 差异均有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ ),肝郁模型组 LH 升高( $P < 0.05$ ),肝郁脾虚模型组 LH 降低( $P < 0.01$ )。与肝郁模型组比较,脾虚模型组 T、FSH、LH 降低,E<sub>2</sub> 升高( $P < 0.05$ ),肝郁脾虚模型组 FSH 和 LH 亦降低( $P < 0.05$ );与脾虚模型组比较,肝郁脾虚模型组 T 升高( $P < 0.05$ ),FSH 降低( $P < 0.05$ )。

2 柴疏四君汤对肝郁、脾虚、肝郁脾虚证模型大鼠性腺轴的影响

2.1 肝郁证模型组与给药组大鼠性腺轴激素水平

比较(表 2) 与肝郁模型组比较,肝郁给药组大鼠血清 FSH 降低( $P < 0.01$ )、LH 升高( $P < 0.05$ ),两组 GnRH、E<sub>2</sub> 和 T 水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2.2 脾虚证模型组及给药组大鼠性腺轴激素水平比较(表 3) 与脾虚组比较,脾虚给药组大鼠血清 E<sub>2</sub> 和 LH 均降低、T 升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),两组 GnRH 和 FSH 比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2.3 肝郁脾虚证模型组和给药组大鼠性腺轴激素水平比较(表 4) 与肝郁脾虚模型组比较,肝郁脾虚给药组大鼠血清 GnRH、E<sub>2</sub>、FSH 和 LH 均升高,T 降低,两组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

### 讨 论

肝主疏泄,与人体情志密切相关,情志因素可通过大脑皮质干扰下丘脑—垂体—性腺轴功能导致排卵障碍及内分泌紊乱造成不孕<sup>[6]</sup>;脾为后天之本,化生气血以充养脏腑,脾虚亦能引起性激素水平的异常变化<sup>[7]</sup>,提示中医肝郁、脾虚与性腺功能关联。本研究以中医学肝、脾与性腺轴功能关联为切入点,在比较肝郁、脾虚及肝郁脾虚 3 证模型大鼠下丘脑—垂体—性腺轴的功能状态的基础上,从“同方异证”的角度,考察疏肝健脾方(柴疏四君汤)对此 3 证性腺轴激素变化的影响。

表 1 3 证模型组大鼠血清性腺轴调节激素水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	GnRH (ng/L)	T (μg/L)	E <sub>2</sub> (ng/L)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)
正常对照	10	52.46 ± 1.19	0.88 ± 0.17	57.27 ± 1.50	7.84 ± 0.31	9.84 ± 0.27
肝郁模型	10	44.46 ± 1.69*	1.68 ± 0.17*	48.16 ± 2.97**	9.43 ± 1.50**	10.71 ± 0.42*
脾虚模型	10	44.44 ± 1.65*	0.19 ± 0.03* <sup>△</sup>	67.28 ± 2.74** <sup>△</sup>	5.80 ± 0.38** <sup>△</sup>	9.30 ± 0.12 <sup>△</sup>
肝郁脾虚	10	46.13 ± 1.50*	1.79 ± 0.35** <sup>▲</sup>	36.61 ± 2.67** <sup>▲</sup>	5.76 ± 0.33** <sup>▲</sup>	8.02 ± 0.27** <sup>▲</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与肝郁模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与脾虚模型组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$

表 2 肝郁模型组及给药组大鼠性腺轴激素水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	GnRH (ng/L)	T (μg/L)	E <sub>2</sub> (ng/L)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)
肝郁模型	10	44.46 ± 1.69	1.68 ± 0.17	48.16 ± 2.97	9.43 ± 1.50	10.71 ± 0.42
肝郁给药	10	44.35 ± 1.13	1.87 ± 0.36	42.57 ± 0.84	6.50 ± 0.28**	11.59 ± 0.22*

注:与肝郁模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

表 3 脾虚模型组及给药组大鼠性腺轴激素水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	GnRH (ng/L)	T (μg/L)	E <sub>2</sub> (ng/L)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)
脾虚模型	10	44.44 ± 1.65	0.19 ± 0.03	67.28 ± 2.74	5.80 ± 0.38	9.30 ± 0.12
脾虚给药	10	40.78 ± 0.83	0.86 ± 0.16*	41.95 ± 0.78**	5.53 ± 0.36	8.02 ± 0.17*

注:与脾虚模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

表 4 肝郁脾虚模型组及给药组大鼠性腺轴激素水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	GnRH (ng/L)	T (μg/L)	E <sub>2</sub> (ng/L)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)
肝郁脾虚模型	10	46.13 ± 1.50	1.79 ± 0.35	36.61 ± 2.67	5.76 ± 0.33	8.02 ± 0.27
肝郁脾虚给药	10	50.53 ± 1.00*	0.85 ± 0.66**	42.27 ± 1.12*	6.90 ± 0.20*	9.43 ± 0.22**

注:与肝郁脾虚模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

哺乳动物的下丘脑、垂体和性腺分泌的激素在功能上相互作用,构成一个完整的神经内分泌生殖调节体系,即下丘脑—垂体—性腺轴,在生殖活动中起着主要的调节作用。雄性体内,下丘脑分泌 GnRH, GnRH 调节垂体分泌促性腺激素 LH 和 FSH<sup>[8]</sup>。在 LH 和 FSH 的作用下,睾丸分泌雄性激素 T 和产生精子, T 在 FSH 作用下可转变为 E<sub>2</sub>。T 与适量的 E<sub>2</sub> 作用于靶细胞产生生物效应。机体通过下丘脑—垂体—性腺轴的 E 负反馈作用来调节内分泌激素,以使外周激素的水平保持相对稳定,维持男性的正常生殖功能<sup>[9]</sup>。一方面下丘脑分泌的 GnRH 调控垂体 FSH 和 LH 的释放,进而影响睾丸的功能;另一方面当血中 T 或 E<sub>2</sub> 过高时,又可反馈作用于下丘脑、垂体,抑制其 GnRH、LH 的分泌<sup>[10]</sup>。另外, E<sub>2</sub> 浓度过高时也可通过睾丸局部的负反馈作用引起 T 合成减少。

本实验观察到,肝郁、脾虚、肝郁脾虚 3 证模型的大鼠均表现出不同程度血清 GnRH 降低,其中肝郁证 FSH 和 LH 均明显升高,脾虚证 FSH 和 LH 降低,肝郁脾虚证 FSH 和 LH 降低更甚。脾虚证在血 T 显著降低的同时伴有 E<sub>2</sub> 升高,与既往研究观察到的口服大黄煎液所致的脾虚模型大鼠血中 E<sub>2</sub> 和 T 的变化结果一致<sup>[11]</sup>,提示脾虚证存在 E<sub>2</sub>/T 分泌的失调,推测局部大量 T 转化为 E<sub>2</sub> 从而反馈性引起 T 合成的抑制。肝郁和肝郁脾虚证均见血清 T 升高和 E<sub>2</sub> 降低,但肝郁脾虚证的 E<sub>2</sub> 降低更为明显。本研究结果表明,3 证均存在不同程度的性腺轴功能异常,其中肝郁证睾丸功能降低并伴有腺垂体代偿性的亢进,脾虚证和肝郁脾虚证均伴有腺垂体反馈性调节障碍及睾丸 T/E<sub>2</sub> 的代谢失调,肝郁脾虚证的腺垂体功能损伤更为明显。

通常认为,中医学肝郁脾虚是肝郁和脾虚的复合证。本实验观察到,肝郁证、脾虚证、肝郁脾虚证 3 证模型大鼠均见血清 GnRH 降低,但肝郁脾虚证血中 T 升高、E<sub>2</sub> 降低,与脾虚证该指标的变化完全相反;FSH 和 LH 均降低,则又与肝郁证该指标的变化完全相反,提示肝郁脾虚证的病理内涵并不完全是肝郁证和脾虚证的相加。

本实验观察到,柴疏四君汤对肝郁模型大鼠血中降低的 GnRH 无明显影响,虽能降低其血中升高的 FSH,但降低太过使之明显低于正常,同时还加重了其血中 LH、T 的升高和 E<sub>2</sub> 的降低;对脾虚模型大鼠血中降低的 GnRH 无明显影响,虽能升高其血中降低的 T 和降低其升高的 E<sub>2</sub>,但却加重了其 FSH 和 LH 的降低;对肝郁脾虚模型大鼠,既能升高其血中降低的 GnRH、FSH、LH,还能升高/降低其血中降低的 E<sub>2</sub> 和升

高的 T。结果显示同一柴疏四君汤对 3 个证候模型性腺轴功能的干预效应明显不同,表明中医方剂的效用因证而异。本结果还提示,柴疏四君汤对脾虚证和肝郁脾虚证的睾丸功能损伤均有一定防治作用,但对肝郁证的睾丸功能恢复不利;本方对肝郁脾虚证的丘脑—垂体—性腺轴的功能具有综合调节作用,但对肝郁证和脾虚证的丘脑—垂体功能可能有加重其损伤的作用。

结合肝郁、脾虚、肝郁脾虚 3 证模型的性腺轴的异常变化及综合方药对 3 证的干预效应可以看出,柴疏四君汤对肝郁脾虚证的性腺轴功能具有较为全面的改善作用,对脾虚证有部分改善作用,对肝郁证不仅改善作用不明显,甚或有加重其损伤的作用。依据“方剂疗效的大小或优劣取决于其与病证的关联程度”<sup>[1]</sup>,推论疏肝健脾方与肝郁脾虚证之间具有较高的关联性。本研究为中医辨证用方的经验和“方证相关”的理论提供了一定的实验依据。

#### 参 考 文 献

- [1] 谢鸣.“方证相关”逻辑命题及其意义[J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(2): 11-12.
- [2] 陈禹,谢鸣,李艳彦,等. 束缚法复制大鼠肝郁证模型的实验研究[EB/OL]. (2006-06-23) [2013-03-18]. <http://www.paper.edu.cn>.
- [3] 王洪海,谢鸣. 复合因素致脾虚证模型大鼠血中胃肠激素含量的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(10): 31-35.
- [4] 李艳彦,谢鸣,陈禹,等. 一种运用复合病因造模法复制大鼠肝郁脾虚证模型的研究[J]. 中国中医基础理论医学杂志, 2006, 12(6): 439-440.
- [5] 任亮,付小六主编. 药理学实验指导[M]. 上海:第二军医大学出版社, 2007: 18-19.
- [6] 罗丽兰主编. 不孕不育[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998: 437-438.
- [7] 李志强,陈津岩,陈芝喜. 补中益气丸对脾虚证大鼠性激素水平的影响[J]. 河北中医杂志, 2009, 31(10): 1545-1548.
- [8] 王一涵,田秀娥,江中良,等. GnRH 及其类似物在动物繁殖中的应用概述[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(3): 89-92.
- [9] 张志雄主编. 生理学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006: 197-198.
- [10] Kauppila M, Viikari J, Irjala K, et al. The hypothalamus-pituitary-gonad axis and testicular function in male patients after treatment for haematological malignancies[J]. J Intern Med, 1999, 246(1): 122-123.
- [11] 李志强,陈津岩,何赞厚,等. 四君子汤对脾虚证大鼠性激素和环核苷酸水平的影响[J]. 实用中医药杂志, 2008, 24(10): 619-620.

(收稿:2013-07-29 修回:2014-02-21)