

## · 基础研究 ·

肝郁证雌性大鼠的神经内分泌状态及  
柴胡疏肝散的干预作用

张媛凤 钱 梦 杨宗纯 谢 鸣

**摘要** 目的 探讨肝郁证雌性大鼠的神经内分泌状态及因证治方柴胡疏肝散的干预作用。方法 Wistar 雌性大鼠随机分为正常对照,模型组,柴胡疏肝散大、小剂量组共 4 组,每组 10 只。慢性束缚法复制肝郁证模型,连续 4 周。2 个中药干预组大鼠在造模第 2 周末,分别按 1.26 g/(kg·d) 和 0.31 g/(kg·d) 剂量给予柴胡疏肝散灌胃,每日 1 次,连续 2 周;模型组和正常对照组大鼠给予等量蒸馏水。采用放射免疫法测定下丘脑组织促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促甲状腺释放激素(TRH)、促性腺激素释放激素(GnRH)。采用酶联免疫法测定血浆去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、 $\beta$ 内啡肽( $\beta$ -EP);采用放射免疫法测定血清促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT),促甲状腺素(TSH)、三碘甲状腺原氨酸(T3)、甲状腺素(T4),卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、泌乳素(PRL)、孕酮(P)、雌二醇( $E_2$ )、睾酮(T)。结果 与正常组比较,模型组大鼠血浆 5-HT、DA、NE 降低,血浆 E、 $\beta$ -EP 升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );下丘脑组织 CRH、TRH,血清 ACTH、CORT、T3、T4 均升高,血清 TSH 降低( $P < 0.01$ );下丘脑组织 GnRH,血清 FSH、LH、PRL、P、T、 $E_2$  均升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较,柴胡疏肝散大剂量组血浆 5-HT、NE 升高,E、 $\beta$ -EP 降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),下丘脑组织 CRH,血清 ACTH、CORT 降低( $P < 0.01$ ),下丘脑组织 TRH,血清 T3、T4 降低,TSH 升高( $P < 0.01$ ),下丘脑组织 GnRH,血清 FSH、LH、PRL、P、T 均降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );柴胡疏肝散小剂量组大鼠下丘脑 CRH,血浆  $\beta$ -EP 和血清 ACTH、T4、FSH、LH、PRL、P、 $E_2$  均降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),血浆 DA 升高( $P < 0.01$ )。结论 慢性束缚法雌性肝郁模型大鼠存在神经内分泌功能的失调,表现为下丘脑-垂体-肾上腺皮质/甲状腺/性腺轴的功能亢进,并伴有下丘脑和(或)垂体的负反馈调节障碍。柴胡疏肝散对该模型大鼠神经-内分泌轴的异常具有一定的调节作用,其大剂量作用优于小剂量。

**关键词** 雌鼠;肝郁证;下丘脑-垂体-肾上腺/甲状腺/性腺轴;柴胡疏肝散

### Changes of Neuroendocrine Function in Female Rats with Gan Depression Syndrome and Intervention of Chaihu Shugan Powder

ZHANG Yuan-feng, QIAN Meng, YANG Zong-chun, and XIE Ming

Department of Formulary, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)

**ABSTRACT Objective** To observe the changes of neuroendocrine function in female rats with Gan depression syndrome (GDS), and intervention of Chaihu Shugan Powder (CHSGP). **Methods** Female Wistar rats were randomly divided into the normal control group (C), GDS model group (M), high dose CHSGP group (H), and low dose CHSGP group (L), 10 in each group. Chronic restraint stress was used to duplicate GDS model for 4 successive weeks. At the end of the 2nd week of modeling, rats in the H group and L group were administered with CHSGP at the daily dose of 1.26 g/kg and 0.31 g/kg by gastrogavage, once per day for 2 successive weeks. The indicators such as corticotropin releasing hormone (CRH), thyrotrophic-releasing hormone (TRH), and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) were determined using ra-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173193)

作者单位:北京中医药大学中医学方剂学系(北京 100029)

通信作者:谢 鸣, Tel: 010-64286992, E-mail: xieming603@263.net

DOI: 10.7661/j.cjim.20190828.314

dioimmunoassay. Contents of plasma noradrenalin (NE), epinephrine (E), 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), and  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ -EP) were determined using ELISA. Contents of serum adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone (CORT), thyroid stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T3), thyroxine (T4), follicle-stimulating hormone (FSH), luteotropic hormone (LH), prolactin (PRL), progesterone (P), estradiol ( $E_2$ ), and testosterone (T) were determined using radioimmunoassay. **Results**

Compared with the C group, plasma contents of 5-HT, DA, and NE decreased, and plasma contents of E and  $\beta$ -EP increased in the M group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). CRH and TRH contents in hypothalamus, serum levels of ACTH, CORT, T3, and T4 all increased, serum TSH level decreased in the M group ( $P < 0.01$ ). GnRH content in hypothalamus, serum levels of FSH, LH, PRL, P, T, and  $E_2$  all increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the M group, plasma contents of 5-HT and NE increased, plasma contents of E and  $\beta$ -EP decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); CRH content in hypothalamus, serum levels of ACTH and CORT decreased ( $P < 0.01$ ); TRH content in hypothalamus, serum levels of T3 and T4 decreased, and TSH increased ( $P < 0.01$ ); GnRH content in hypothalamus, serum levels of FSH, LH, PRL, P, and T all decreased in the H group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). CRH content in hypothalamus, plasma  $\beta$ -EP content, serum levels of ACTH, T4, FSH, LH, PRL, P, and  $E_2$  all decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), plasma DA content increased ( $P < 0.01$ ) in the L group.

**Conclusions** Neuroendocrine dysfunction existed in chronic restraint stress induced female GDS model rats, manifested as hyperfunction of hypothalamic-pituitary-adrenal/thyroid/ovaries (HPA-HPT-HPO) axes with negative feedback dysregulation of hypothalamus/pituitary gland. CHSGP had certain regulation of abnormal neuro-endocrinal axis, and high dose CHSGP showed superior effects to low dose CHSGP.

**KEYWORDS** female rats; Gan depression syndrome; hypothalamic-pituitary-adrenal/thyroid/ovaries axis; Chaihu Shugan Powder

肝郁证是中医临床,特别是女性患者常见的证候之一。现代中医学认为肝郁证是在抑郁、焦虑、悲痛等负面情绪心理应激状态下,以高级神经中枢调节机制紊乱为前提出现的神经-内分泌、免疫、循环、消化、生殖等多个系统的某些病理改变<sup>[1,2]</sup>。流行病学调查显示,女性抑郁病患病率明显高于男性<sup>[3,4]</sup>;临床研究也发现,中医内科肝郁证患者分布存在性别差异,肝郁证以女性多见<sup>[5]</sup>。由于男女有异,生理有别,肝郁证的中医临床发病及表现常因性别而有所不同。

本实验拟在复制雌性肝郁大鼠模型的基础上,探讨其神经-内分泌系统的变化及柴胡疏肝散的干预作用,为了解女性肝郁证的现代神经-内分泌学特点提供实验依据。

### 材料与方

1 动物 健康性成熟未孕 Wistar 雌鼠 55 只,9 周龄,级别 SPF/VAF,体重 ( $210 \pm 10$ )g,动物合格证号 SCXK(京)2012-0001,北京维通利华实验动物中心提供。所有动物在相对湿度 ( $50 \pm 5$ )%、温度  $20 \sim 25$  °C、光照节律 12L:12D(6:00-18:00)的环境常规饲养。本实验经过中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会审查(No. 20162019)。

2 药物 柴胡疏肝散:柴胡 6 g 陈皮 6 g 川

芎 5 g 香附 5 g 枳壳 5 g 芍药 5 g 炙甘草 3 g。以上药物由北京同仁堂药业股份有限公司提供。用水提醇沉法出膏率 10%,按照 1:1 加入糊精,制成颗粒。每克颗粒含 5 g 生药。使用前用蒸馏水配制成 12.6% 和 3.1% 浓度的口服液。

3 试剂和仪器 去甲肾上腺素(noradrenalin, NE)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)、肾上腺素(epinephrine, E)、 $\beta$ 内啡肽( $\beta$ -endorphin,  $\beta$ -EP)酶联免疫检测试剂盒,均由北京瑞格博生物技术有限公司提供(批号:20170520)。

促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH,批号:20161111)、肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH,批号:20161118)放免测定试剂盒、皮质酮/肾上腺酮(corticosterone, CORT,批号:20161116)、促甲状腺释放激素(thyrotrophic-releasing hormone, TRH,批号:20161118)、促甲状腺素(thyroid stimulating hormone, TSH,批号:20161121)、三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T3,批号:20161111)、甲状腺素(thyroxine, T4,批号:20161111)、促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH,批号:20161119)、卵泡刺激素(follicle-stim-

ulating hormone, FSH, 批号: 20161111); 泌乳素 (prolactin, PRL, 批号: 20161111)、黄体生成素 (luteotropic hormone, LH, 批号: 20161111)、雌二醇 (estradiol, E<sub>2</sub>, 批号: 20161113)、睾酮 (testosterone, T, 批号: 20161115)、孕酮 (progesterone, P, 批号: 20161117) 放免测定试剂盒, 均由北京华英生物技术研究所提供。

低温离心机: DDL25, 上海安亭科学仪器厂生产; 自动平衡离心机: TD25-WS, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; 全自动放免计数仪: XH-6020, 西安核仪器厂生产; 全自动酶标仪: STAT FAX 2100, Awareness Technology Inc. USA。

4 分组、造模及给药方法 健康雌性 Wistar 大鼠 55 只, 正常适应性喂养 1 周, 连续 5 天做阴道涂片观察雌鼠动情周期, 筛除动情周期不正常的大鼠, 剩余 40 只随机分为正常对照组 (正常组) 10 只, 模型组 30 只。模型组大鼠按慢性束缚造模方法<sup>[6]</sup>复制肝郁证模型, 正常组不予处理。造模第 2 周末 (造模第 14 天), 模型大鼠随机分为肝郁模型组、柴胡疏肝散大剂量组 (柴胡大组) 和柴胡疏肝散小剂量组 (柴胡小组) 共 3 组, 每组 10 只。其中柴胡大组和柴胡小组分别按 1.26 g/kg 和 0.31 g/kg (按成人 70 kg 剂量折算成 2 倍和 0.5 倍) 给予柴胡疏肝散药液灌胃, 每日 1 次; 肝郁模型组和正常组大鼠给予等量蒸馏水, 连续 2 周。

5 指标测定及方法 各组于造模实验第 28~30 天行阴道涂片观察, 选择动情前期/动情间期的大鼠, 禁食禁水 12 h, 腹腔巴比妥麻醉, 腹主动脉取血, 分离血清或血浆; 低温下迅速取下丘脑, 剪碎, 按照下丘脑组织重量 (g): 生理盐水 (mL) 为 1:9 的比例, 于匀浆管中 (插入冰水混合物器皿) 充分研磨匀浆。下丘脑组织 CRH、TRH、GnRH 采用放射免疫法测定。血浆 NE、E、5-HT、DA、β-EP 采用酶联免疫法测定; 血清 ACTH、CORT、TSH、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、FSH、LH、PRL、P、E<sub>2</sub>、T 采放射免疫法测定。

6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件处理, 各组指标数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分

析 (One-Way ANOVA), 用 SNK 法检验; 非正态分布资料采用非参数统计分析。所有图表均用 GraphPad Prism 6 软件制作。P<0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

1 各组大鼠血浆单胺类递质水平比较 (表 1) 与正常组比较, 模型组大鼠血浆 5-HT、DA、NE 降低, E 升高 (P<0.05, P<0.01)。与模型组比较, 柴胡大组血浆 5-HT 和 NE 升高, E 降低 (P<0.05, P<0.01); 柴胡小组血浆 DA 升高 (P<0.05)。与柴胡小组比较, 柴胡大组血浆 5-HT 和 NE 升高, E、DA 降低 (P<0.05, P<0.01)。

2 各组大鼠下丘脑 CRH 和血清 ACTH、CORT、血浆 β-EP 水平比较 (表 2) 与正常组比较, 模型组下丘脑 CRH、血清 ACTH 和 CORT、血浆 β-EP 均升高 (P<0.01)。与模型组比较, 柴胡大组下丘脑 CRH、血清 ACTH 和 CORT、血浆 β-EP 均降低 (P<0.01); 柴胡小组下丘脑 CRH 和血清 ACTH、血浆 β-EP 均降低 (P<0.05, P<0.01)。与柴胡小组比较, 柴胡大组下丘脑 CRH 和血清 CORT、血浆 β-EP 均降低 (P<0.05, P<0.01)。

3 各组大鼠下丘脑 TRH 和血清 TSH、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 水平比较 (表 3) 与正常组比较, 模型组下丘脑 TRH 和血清 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 均升高, 血清 TSH 降低 (P<0.01)。与模型组比较, 柴胡大组下丘脑 TRH、血中 T<sub>3</sub> 和 T<sub>4</sub> 均降低, TSH 升高 (P<0.01); 柴胡小组血清 T<sub>4</sub> 降低 (P<0.01)。与柴胡小组比较, 柴胡大组下丘脑 TRH 和血清 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 均降低, TSH 升高 (P<0.05, P<0.01)。

4 各组大鼠下丘脑 GnRH 和血清性激素水平比较 (表 4) 与正常组比较, 模型组下丘脑 GnRH, 血清 FSH、LH、PRL、P、T、E<sub>2</sub> 均升高 (P<0.05, P<0.01)。与模型组比较, 柴胡大组下丘脑 GnRH, 血清 FSH、LH、PRL、P、T 均降低 (P<0.05, P<0.01), E<sub>2</sub> 呈降低趋势 (P>0.05); 柴胡小组下丘脑 GnRH、T 呈降低趋势 (P>0.05), 血清 FSH、LH、PRL、P、E<sub>2</sub> 均降低 (P<0.01)。与柴胡小组比较, 柴胡大组下丘脑 GnRH 和血清 FSH 均降低 (P<0.01), 血清 P、T、E<sub>2</sub>、LH 和 PRL 差异无统计学意义 (P>0.05)。

表 1 各组大鼠血浆单胺类递质水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	5-HT (ng/mL)	NE (ng/L)	E (ng/L)	DA (ng/mL)
正常	10	20.67±1.84	232.53±34.54	110.42±16.18	126.36±17.87
模型	10	17.47±1.71	140.15±40.98**	144.93±10.18**	106.30±18.43*
柴胡大	10	21.57±4.10 <sup>△△▲▲</sup>	239.33±30.75 <sup>△△▲▲</sup>	112.38±11.47 <sup>△▲▲</sup>	107.21±17.76 <sup>▲</sup>
柴胡小	10	15.93±2.86	180.38±15.00	142.08±16.03	128.19±18.75 <sup>△</sup>

注: 与正常组比较, \* P<0.05, \*\* P<0.01; 与模型组比较, <sup>△</sup> P<0.05, <sup>△△</sup> P<0.01; 与柴胡小组比较, <sup>▲</sup> P<0.05, <sup>▲▲</sup> P<0.01

表 2 各组大鼠下丘脑 CRH 和血清 ACTH、CORT、血浆 β-EP 水平比较 (x̄±s)

组别	n	CRH (ng/mg)	ACTH (pg/mL)	CORT (ng/mL)	β-EP (ng/L)
正常	10	1.32±0.24	23.28±2.60	266.64±32.60	113.61±11.07
模型	10	2.25±0.33*	39.48±7.97*	358.02±35.25*	156.43±22.59*
柴胡大	10	1.53±0.29 <sup>△△△</sup>	26.47±5.98 <sup>△△</sup>	269.08±58.47 <sup>△△△△</sup>	114.57±10.46 <sup>△△△△</sup>
柴胡小	10	1.84±0.32 <sup>△</sup>	31.53±4.99 <sup>△△</sup>	349.63±27.76	141.31±11.07 <sup>△△</sup>

注:与正常组比较,\*P<0.01;与模型组比较,△P<0.05,△△P<0.01;与柴胡小组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01

表 3 各组大鼠下丘脑 TRH 和血清 TSH、T3、T4 水平比较 (x̄±s)

组别	n	TRH (pg/mg)	TSH (μIU/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (ng/mL)
正常	10	2.25±0.38	6.27±0.62	1.06±0.06	41.63±3.69
模型	10	4.05±0.47*	4.52±0.58*	1.21±0.02*	49.83±2.48*
柴胡大	10	2.51±0.37 <sup>△△△</sup>	6.18±0.62 <sup>△△△</sup>	1.12±0.03 <sup>△△</sup>	41.17±4.36 <sup>△△</sup>
柴胡小	10	3.78±0.37	5.47±0.36	1.18±0.08	44.72±2.50 <sup>△</sup>

注:与正常组比较,\*P<0.01;与模型组比较,△P<0.01;与柴胡小组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01

表 4 各组大鼠下丘脑 GnRH 和血清性激素水平比较 (x̄±s)

组别	n	GnRH (pg/mg)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	PRL (μIU/mL)	P (ng/mL)	T (ng/mL)	E <sub>2</sub> (pg/mL)
正常	10	5.18±0.70	2.84±0.46	7.34±1.09	135.80±15.28	2.10±0.40	0.62±0.17	23.93±3.88
模型	10	7.04±0.64**	5.66±1.36**	13.45±3.72**	206.58±58.98**	3.20±0.68**	0.83±0.20*	31.55±3.01**
柴胡大	10	5.56±0.78 <sup>△△△</sup>	3.29±0.18 <sup>△△△</sup>	7.07±2.21 <sup>△△</sup>	134.92±21.60 <sup>△△</sup>	2.26±0.28 <sup>△△</sup>	0.62±0.18 <sup>△</sup>	29.63±3.41
柴胡小	10	6.49±0.28	4.44±1.00 <sup>△△</sup>	5.96±1.73 <sup>△△</sup>	137.45±14.02 <sup>△△</sup>	2.47±0.49 <sup>△△</sup>	0.70±0.28	25.81±6.68 <sup>△△</sup>

注:与正常组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01;与模型组比较,△P<0.05,△△P<0.01;与柴胡小组比较,▲P<0.01

### 讨 论

下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA 轴) 主要参与应激反应的调节,同时还参与诸如消化、免疫、情绪、生殖以及能量贮存和消耗等多种生理活动。由下丘脑分泌的 CRH,调控垂体 ACTH 的分泌,作用于肾上腺皮质分泌 CORT,发挥生理调节作用。下丘脑-垂体-甲状腺轴 (hypothalamus-pituitary-thyroid axis, HPT 轴) 主要是调控甲状腺功能,参与新陈代谢、生长发育及中枢神经系统兴奋性的调节。下丘脑通过其分泌的 TRH 调控垂体合成及释放 TSH,同时参与中枢神经系统对诸如觉醒、运动及情感等方面的调节<sup>[7]</sup>,即当机体受到情感刺激或处于应激状态时,TRH 分泌加强,HPT 轴激活,促进外周甲状腺释放 T3 和 T4,引起血中 T3、T4 的升高。由下丘脑-垂体-卵巢构成的性腺调节轴 (hypothalamus-pituitary-ovaries axis, HPO 轴) 主要是参与性腺功能的调节,下丘脑通过分泌 GnRH 调节垂体 FSH 和 LH 的释放,FSH 和 LH 共同作用于卵巢组织,协同维持女性月经周期和黄体的生成,控制性腺发育和性激素的分泌。在上述三轴中,由甲状腺皮质/甲状腺/卵巢或睾丸组织分泌的肾上腺皮质/甲状腺素/雌或雄激素对上位的下丘脑和垂体均有反馈性调节作用。

神经内分泌的调节借助下丘脑与内分泌系统建立起神经-内分泌之间的联系,在 HPA/T/O 各轴的功能活动中,不仅各轴自身有其特定上下调节机制,而且轴与轴之间也通过神经-内分泌因子相互联系。如下丘脑 TRH 除了兴奋 TSH 之外还能促进垂体 PRL 释放;而交感-肾上腺髓质系统在参与提高机体警觉性和应变能力的同时,也协同 HPA 轴参与“应激”反应,其中 E 与 NE 可作用于垂体,促进阿黑皮素原分解为 ACTH 和 β-EP。激素还可以通过受体间串语 (cross-talk) 来表达激素间的拮抗作用。引起 CRH 或 ACTH 增多的因子有 5-TH 或内啡肽等,抑制 ACTH 分泌的因子有 NE、DA 等<sup>[8]</sup>。

有研究显示,雌性大鼠束缚 4 周表现出了中医肝郁证的特点<sup>[9]</sup>。本实验观察到,束缚 4 周的雌性大鼠在动情间期-前期段内的下丘脑 CRH、TRH、GnRH 和血清 ACTH 和 LH、FSH 及 CORT、T3、T4、P、T、E<sub>2</sub> 均明显升高,血清 TSH 降低,表明该模型存在 HPA/T/O 轴的功能亢进,其中肾上腺皮质/性腺二轴的功能亢进伴有下丘脑-垂体的负反馈失调,而 HPT 轴中主要涉及下丘脑的负反馈失调。结果提示由慢性应激引起的中医肝郁证可能存在广泛的神经-内分泌系统的调节异常,且不同轴调节异常所涉及的层面有所不同。

β-EP 主要由垂体分泌,与 ACTH 来源于同一前体阿片促黑皮质激素原,参与对其他内分泌腺轴的调

节。研究显示,应激刺激下的 HPA 轴过度表达可以激活  $\beta$ -EP 的合成与分泌,发挥对 HPA 轴的抑制作用<sup>[10]</sup>。 $\beta$ -EP 增高还可对抗过多的甲状腺素对机体的伤害<sup>[11]</sup>,且可直接抑制 GnRH 释放或通过提高 NE 的浓度来抑制 GnRH 的分泌,参与月经周期的调节。有研究发现,女性排卵前期和排卵期存在  $\beta$ -EP 增高现象,下丘脑和垂体门静脉中  $\beta$ -EP 含量随着大鼠动情周期变化而波动<sup>[12]</sup>。本实验中的模型雌性大鼠 HPA-HPO-HPT 轴均呈现亢进状态,且动情间期血浆  $\beta$ -EP 呈显著升高,推测肝郁状态下的  $\beta$ -EP 的升高可能是三轴功能亢进引起的反应性调节结果,其调节意义有待进一步研究。

PRL 由垂体前叶分泌,并受下丘脑泌乳素释放因子和抑制因子双重调控,其释放因子主要有 GnRH/TRH,抑制因子为 DA。PRL 过高时可通过刺激内源性阿片的产生抑制 GnRH 分泌,使 LH 减少,并抑制雌激素对下丘脑正反馈作用,影响排卵<sup>[13]</sup>。高浓度 PRL 能直接渗入卵巢的卵泡,通过某种机制引起雌激素不足和雄激素相对过多的状态,进一步影响卵泡的发育成熟及排出<sup>[14]</sup>。因此血中 PRL 的异常升高常与女性月经失调、多囊卵巢综合征、闭经及不孕等密切相关。之前的研究曾观察到,临床肝郁证患者<sup>[15]</sup>和实验肝郁证雌性大鼠<sup>[16]</sup>的血清 PRL 均呈显著性升高,本研究也观察到,束缚法诱导的肝郁证雌性大鼠不仅出现血中 PRL 的显著升高,而且伴有动情周期的紊乱<sup>[9]</sup>,提示高 PRL 可能是肝郁证女性月经周期紊乱的重要机制之一。

根据该模型大鼠 PRL 升高的同时还伴有下丘脑 GnRH 和 TRH 明显升高和 DA 明显降低,推测其可能是导致垂体分泌 PRL 的主要原因;同时伴有 LH、FSH 和  $E_2$ 、P 升高,则提示肝郁状态下的下丘脑对高 PRL 引起的负反馈调控机制受损。

当发生应激反应时,肾上腺皮质和髓质分别发挥重要作用。此时血液中 ACTH 和糖皮质激素水平的升高可以诱发髓质分泌 E、NE 及肾上腺皮质分泌 CORT。一些研究发现,用捆绑法连续造模 5 天的雌性 SD 大鼠的下丘脑 NE 明显降低,DA、E、5-HT 含量均明显升高<sup>[17]</sup>;慢性束缚法连续 3 周(束缚 3 h/天)所致围绝经期综合征肝郁证模型雌性大鼠海马区 5-HT 和 NE 明显降低,血清 CRH、ACTH、CORT 含量均明显升高<sup>[18,19]</sup>。本次实验也观察到,束缚 4 周的雌性大鼠不仅出现上述变化,同时还出现血清 DA 降低和 E 升高,提示雌性肝郁证大鼠存在单胺类递质代谢的障碍。

有研究提示,慢性束缚 4 周的肝郁证模型雄性大鼠血清 T3、T4 降低,TSH 升高<sup>[20]</sup>。本次实验观察到,慢性束缚 4 周的肝郁证模型雌性大鼠血清 T3、T4 升高,TSH 降低,下丘脑 TRH 升高。表明肝郁模型大鼠的确存在 HPT 轴功能异常,但因雌雄性别而出现不同的反应态,即雄性的轴功能抑制,雌性的轴功能亢进。根据 HPT 轴调节机制,血中异常升高的 T3 和 T4 本应引起上位垂体和下丘脑的负反馈调节,但该模型大鼠虽出现 TSH 降低,而 TRH 却持续升高,推测模型大鼠 HPT 轴调节异常可能主要涉及到下丘脑的负反馈调节机制受损。

有研究发现,采用束缚法束缚 1 周(3 次/日,2 h/次)的 SD 雌性大鼠血清  $E_2$ 、P、 $\beta$ -EP 升高<sup>[21]</sup>;而将旷场实验得分相近、动情行为规则且活跃的 Wistar 大鼠束缚 2 周后,其血清  $E_2$ 、P 均降低<sup>[22]</sup>。提示束缚时间可能影响到大鼠性腺激素水平的变化。另有研究观察到心理应激(声-光-电复合刺激)状态下的雌鼠卵巢卵泡刺激素受体(follicle stimulating hormone receptor,FSHR)升高、黄体生成素受体(luteinizing hormone receptor,LHR)下降<sup>[23]</sup>,以及动情周期紊乱、血清  $E_2$ 、P 水平、肾上腺抗坏血酸含量明显降低<sup>[24]</sup>,提示应激会导致雌鼠性腺激素紊乱。本实验观察到,束缚应激 4 周的 Wistar 雌性大鼠在动情前期及间期,下丘脑 GnRH 升高,血清 LH、FSH、P、T、 $E_2$  均明显升高,表明该模型大鼠 HPO 轴功能亢进,其中下丘脑和垂体对血中异常升高的性激素的负反馈作用反应较弱,而 GnRH-FSH/LH 的高水平持续分泌可使动情周期停滞于间期,与之前对该模型大鼠阴道涂片的观察结果<sup>[9]</sup>基本一致。

本研究结果显示,柴胡疏肝散大剂量组能显著升高模型大鼠异常降低的血清 5-HT 和 NE,降低异常升高的下丘脑 CRH 和血清 ACTH、CORT 及 E;小剂量组能升高模型异常降低的血清 DA,降低异常升高的下丘脑 CRH 和血清 ACTH,但对血中 5-HT、NE、E 及 CORT 均无明显影响;大剂量组可明显降低模型大鼠血中异常升高的 TRH,升高其异常降低的 TSH 和 T3、T4,但小剂量组作用不明显;大、小剂量组对 HPO 轴均有一定调节作用,其中大剂量组降低 GnRH 和 FSH 明显优于小剂量组;大、小剂量组均有不同程度地降低模型大鼠异常升高的  $\beta$ -EP 及 PRL,其中大剂量组降低  $\beta$ -EP 的作用优于小剂量组。结果表明,柴胡疏肝散对雌性肝郁模型大鼠 HPO 轴功能均有一定的调节作用,其大剂量作用优于小剂量。

柴胡疏肝散是中医治疗肝郁证的代表方,之前研究曾观察到该方不仅对雄性大鼠肝郁证的多系统具有

调节作用<sup>[25-27]</sup>,而且对雌性肝郁证大鼠的外观行为表征和伴随的动情周期紊乱均有一定的改善作用<sup>[9]</sup>。本次实验观察到,该方对肝郁证模型雌性大鼠的神经-内分泌系统异常也有明显的调节作用,提示中医因证方药对特定证候具有较为广泛的调节作用,且其效应与性别关系不大。该结果为中医临床同证异病用药提供了一定的现代生物学角度的理解。

**利益冲突:** 无。

#### 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 杨宗纯,谢鸣.基于肝郁证研究对中医证候现代内涵探查的思考[J].中华中医药杂志,2017,32(7):2853-2858.
- [3] Mohammadi MR, Davidian H, Noorbala AA, et al. An epidemiological survey of psychiatric disorders in Iran [J]. Clin Pract Epidemiol Mental Health, 2005, 1(1): 1-8.
- [4] Parker GB, Brotchie HL. From diathesis to dimorphism: the biology of gender differences in depression [J]. J Nerv Mental Dis, 2004, 192(3): 210-216.
- [5] 郑吉民,罗仁,陈健,等.试探肝郁证的临床规律[J].中医杂志,1989,35(10):39-40.
- [6] 严灿,徐志伟,吴丽丽,等.建立中医情志致病动物模型的思考[J].中国临床康复,2006,10(3):155-157.
- [7] Gutiérrezmariscal M, De GP, Lópezrubalcava C, et al. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety [J]. Psychoneuroendocrinology, 2008, 33(2): 198-213.
- [8] 廖二元主编.内分泌代谢病学[M].人民卫生出版社,2012:607-608.
- [9] 张媛凤,钱梦,刘碧原,等.肝郁证雌性大鼠的动情期变化及柴胡疏肝散的防治作用[J].北京中医药大学学报,2018,41(2):102-109.
- [10] 娄涛,武小玉.应激干预训练对大鼠血清β-内啡肽和行为学的影响[J].中国现代医学杂志,2007,17(17):2066-2068.
- [11] 秦丽娟,卫红霞.β-内啡肽与女性生殖内分泌[J].山西医科大学学报,2007,38(4):361-363.
- [12] 杨鉴冰,李小花.β-内啡肽与女性生殖内分泌的关系探讨[J].陕西中医学院学报,2004,27(3):9-11.
- [13] 王雄,陈永刚,吴金虎.泌乳素的研究进展[J].医学综述,2012,18(1):6-10.
- [14] 王颖,胡志平,李美芝,等.高催乳素血症与多囊卵巢综合征临床表型关系探讨[J].中华医学杂志,2009,89(37):2599-2603.
- [15] 文哲双,王志忠,朱毅.肝郁患者血清T、E<sub>2</sub>、PRL检测及其临床意义[J].湖北中医药大学学报,2000,2(2):27-29.
- [16] 丁朝荣.中药对抑郁症雌鼠症状和性激素及神经递质的干预作用[J].实用医药杂志,2012,29(5):441-443.
- [17] 乔明琦,张惠云,陈雨振,等.肝郁证动物模型研究的理论思考[J].中国医药学报,1997,12(5):42-44.
- [18] 陈淑娇,李灿东,廖凌虹,等.柴胡疏肝散对围绝经期综合征肝郁证大鼠海马雌激素受体和神经递质的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(5):1232-1236.
- [19] 李生强,陈淑娇,梁文娜,等.柴胡疏肝散对围绝经期综合征肝郁证大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节作用[J].康复学报,2013,23(6):27-29.
- [20] 赵荣华,谢鸣,李聪,等.肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的变化及柴疏四君子汤的作用[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(4):119-123.
- [21] 陈淑涛.肝郁型经前期综合征的临床观察及实验结果分析[D].成都:成都中医药大学,2004.
- [22] 张惠云,魏盛,孙鹏,等.经前期综合征肝气逆、郁病证结合模型大鼠外周血和不同脑区性激素及其调节激素含量变化的实验研究[J].世界科学技术中医药现代化,2010,12(1):51-54.
- [23] 柯江维,王建红,段荣.心理应激大鼠卵巢促卵泡刺激素及黄体生成素受体的变化[J].天津医药,2007,35(6):430-431.
- [24] 王建红,王敏璋,伍庆华,等.心理应激大鼠卵巢内分泌功能降低模型的实验研究[J].中国比较医学杂志,2002,12(4):204-206.
- [25] 陈禹.柴胡疏肝散、四君子汤、柴疏四君子汤作用于肝郁证模型的生物学基础[D].北京:北京中医药大学,2006.
- [26] 王桐生,谢鸣,张艳霞,等.肝郁模型大鼠行为学与脑单胺递质的变化及柴胡的干预作用[J].中华中医药杂志,2008,23(10):934-937.
- [27] 李聪.肝郁证模型大鼠高泌乳素及神经-内分泌-免疫机制和相关方药的作用[D].北京:北京中医药大学,2017.

(收稿:2018-08-04 在线:2020-04-09)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶