

经前期综合征肝气郁证猕猴模型评价指标

高冬梅* 乔明琦* 张惠云* 王海军*

摘要 目的:探索经前期综合征(PMS)肝气郁证猕猴模型评价指标。方法:拟定复制肝气郁证猕猴模型的造模方法进行试验。模型评价指标采用表情行为定性与血清单胺类神经递质水平毛细管电泳检测。结果:模型具有稳定性和重现性,受试猕猴月经前呈现近似该病证的临床表现,血清中单胺类神经递质含量发生变化。结论:借助《雌性实验猕猴情绪评价量表》,确立 PMS 肝气郁证猕猴模型宏观、微观评价指标。

主题词 经前期综合征/血液 肝气郁结/血液

Evaluation for Indexes of Rhesus Monkey Model of Stagnation of Liver-Qi of Premenstrual Syndrome

Gao Dongmei, Qiao Mingqi, Zhang Huiyun, et al.

(Shandong University of TCM, Jinan 250014)

Objective: To probe into indexes of evaluating rhesus monkey model of stagnation of liver-Qi of premenstrual syndrome(PMS).

Methods: Rhesus monkey model of stagnation of liver-Qi of premenstrual syndrome was developed and qualitative analysis of expression and behaviors, and serum monoaminergic neurotransmitters examined with capillary electrophoresis were used as indexes of evaluating the model. **Results:** The model had stability and reiteration. Rhesus monkey in premenstrual phase showed similar clinical manifestations of this disease, with serum level of monoaminergic neurotransmitters changed. **Conclusion:** Macroscopic and microscopic indexes for evaluating rhesus monkey model of stagnation of liver-Qi of premenstrual syndrome can be established by means of Emotion Scale of Female Experimental Rhesus Monkey.

Key Words Premenstrual syndrome/blood; Stagnation of the liver-Qi/blood

经前期综合征(PMS)是指反复发生在经前,影响妇女日常生活和工作,涉及身体和精神两方面的证候群^[1]。其主要特征是月经来潮后症状自行消失。PMS 肝气郁证的研究及其治疗新药的开发均有赖于动物模型的建立。本研究在“肝气逆、肝气郁两证大鼠实验研究”^[2]和“经前期综合征肝气逆证大鼠猕猴模型探索”的基础上,选用灵长类动物猕猴作为研究对象模拟 PMS 肝气郁证。灵长类动物猕猴有与人类相似的生理特点,因此是模拟 PMS 肝气郁证的理想动物^[3,4]。目前国内外尚少见类似的报道,故而我们确定了造模方法及技术参数,建立了《雌性实验猕猴情绪评价量表》,同时进行微观指标检测与宏观表情行为量化观察,形成了一套较为系统稳定的造模方法与评价指标^[5,6]。

1 材料

1.1 动物:猕猴属恒河猴,由中科院苏州实验动物有限公司提供。许可证号:SYXK(苏)2002-0032。筛选标准:青年低地位 10 只,雌性,6~8 岁,体重 4~5kg,月经正常的猕猴作为受试对象进行分组造模研究。青年低地位猕猴判定依据:将 23 只猕猴分笼,每笼 2~3 只。经过 5~7 天较量,猕猴即可分出地位高低,地位最低的猕猴为低地位猕猴。

1.2 动物及试剂:苯甲酸雌二醇(上海第九制药厂,批号 941101222);经前舒颗粒成分:当归、白芍(炒)、牡丹皮、香附、陈皮、郁金、砂仁、人参、甘草,每袋 6g,每日 2 次。具有疏肝解郁、理气止痛的功效,用于 PMS 肝气郁结,脾运失调证(北京岐黄制药有限公司,国药准字 Z20040094)。

1.3 仪器:数码摄像机 NV-MX7D(松下);监视器 SP-309;照相机;视频采集卡 DM-4101(新加坡);计算机;刻录机 ACER8×4×32;毛细管电泳仪 PH3D(美国惠普);LB4-自动平衡微量离心机(北京医用离心机厂)。

2 方法

2.1 造模及分组(包括技术条件)

2.1.1 造模方法:猕猴模型稳定性试验拟定 3 种方法造模,均在黄体期。(1)肌肉注射苯甲酸雌二醇法:按 0.167mg/kg 量给予,每两天注射 1 次,连续 3 次,共注射猕猴 3 只,各 1 个月经周期,观察表情行为变化。(2)挤压刺激 3 小时/天,连续 5 天法:将低地位猕猴赶入压缩笼,每天上、下午各挤压 1.5 小时,连续挤压 5 天,间隔时间猕猴仍在压缩笼中,观察表情行为变化。(3)挤压刺激 7 小时/天,连续 7 天法:方法同上,时间增加,即每日连续挤压 7 小时,连续 7 天,观察表情行为变化。

2.1.2 分组:稳定性研究分组:选取 20 只猕猴采用上

基金项目:国家科技部项目(2000DEB20043)

* 山东中医药大学,济南市经十路 53 号(250014)

收稿日期:2005-03-10;修回日期:2005-05-30

述(3)法组与(2)法组黄体期(即上次月经周期第15天)开始造模,将其赶入压缩笼进行挤压,两种方法均分为模型组、非模型组,其中(3)法组与(2)法组模型猕猴数分别为6只、2只,非模型猕猴数4只、8只。

重现性研究分组:选取20只猕猴先后进行两次同样方法的造模,间隔时间为两个月,第1次设为“探索组”,第2次设为“重复组”。取黄体期开始造模,将其赶入压缩笼进行挤压刺激,每日7小时,并给予激惹刺激。

稳定性和重复性研究均用监视仪监视猕猴造模前后表情行为变化,期间进行录像拍照,造模7天后将猕猴放出压缩笼。

受试猕猴微观指标检测分组:10只低地位正常猕猴(正常组)在造模后,有7只出现了典型的肝气郁证异常(造模组),对其进行检测,随后给药(给药组)。

2.1.3 造模的技术条件

2.1.3.1 猴舍和饲养条件:猴舍分为户外和户内上下两层,上层猴笼长约2.4m,宽1.5m,高约1.8m;下层猴笼长约2.0m,宽1.5m,高约2.4m,其旁有挤压笼,与下层猴笼有小插门隔开,猴笼两侧各有约1.5m的走廊。采用分组同笼饲养,每笼2~3只。饲养员每日在10时和15时给猕猴进食。饲料为济南动物园野生动物研究所配制。

2.1.3.2 对猕猴的要求:选择地位较低,性格内向,体质较弱,月经正常的雌性猕猴造模研制PMS肝气郁证猕猴模型。

2.1.3.3 模型设施的要求:压缩笼长1.2m,宽0.8m,高1.0m,配有压缩门。

2.1.3.4 造模挤压条件:选择黄体期挤压,即在猕猴月经前15天,性皮肤最红肿时期的排卵期开始挤压。每天挤压7小时,挤压刺激强度以猕猴稍能活动为度,连续挤压7天,解除挤压时猕猴仍在压缩笼中。

2.2 宏观表情行为评价:采用PMS表现判定指标、PMS肝气郁证判定指标和《雌性实验猕猴愤怒和抑郁情绪评价量表》三者相结合的方法评价。

2.3 微观指标检测:血清中单胺类神经递质[肾上腺素(E)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)]含量采用毛细管电泳检测。

2.4 模型评价标准:模型评价方法主要采用《雌性实验猕猴情绪评价量表》(《雌性实验猕猴愤怒和抑郁情绪评价量表》)对猕猴情绪进行评价,抑郁常模分值为 (1.625 ± 1.2158) 。对比重复组和探索组之间造模后的情绪变化,如果两组情绪抑郁积分值均超出常模范围,则认为猕猴表情行为达到了肝气郁证宏观判定要求。

2.5 给药方法:将造模猕猴赶入压缩笼中,固定头部,用药匙给药,温开水调匀经前舒颗粒,药量为1.5g/kg,上午10时给药,连续给药5天。

2.6 造模猕猴取血时间和方法:在经前期3~5天后肢静脉取血4ml,以3000转/分离心20分钟,取血清冷藏送检。

2.7 统计学方法:《雌性实验猕猴愤怒和抑郁情绪评价量表》统计采用logistic回归,模型稳定性与重现性统计采用 χ^2 检验,猕猴血清中单胺类神经递质水平统计采用 t 检验,以上统计处理均选用SAS 8.1系统软件。

3 结果

3.1 模型的稳定性和重现性:按拟定的3种方法造模,前两种方法未出现PMS肝气郁证或此证临床表现不明显,只有第3种方法猕猴出现了典型的类似于PMS肝气郁证的表现。

(3)法组和(2)法组间造模效果比较:经统计分析,差异无显著性($P>0.05$)。说明在黄体期对猕猴进行挤压刺激能够较成功的复制出PMS肝气郁证猕猴模型,并且具有稳定性。

探索组与重复组间造模效果比较:经统计分析,差异无显著性($P>0.05$),即出现PMS肝气郁证的几率相等。选用低地位猕猴更有利于肝气郁证模型的成功复制,重复性好;同时在重复造模过程中发现,对于肝气郁证模型,每天挤压7个小时,连续挤压7天,出现了明显的肝气郁症状。同时验证了第3种造模方法的科学性。

3.2 受试猕猴宏观表现及体征变化:受试猕猴与造模前相比,均表现出不同程度的表情、行为等变化。具有经前呈现症状,经后症状消失的特征。造模猕猴表现出眼睑迟钝、低眉俯首、毛发蓬乱、体态畏缩、独处、进食居后等行为表现。部分猕猴有月经迟后的表现。其情

附表 各组猕猴血清中单胺类神经递质水平比较($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	猴数	E	5-HT	DA	NE
正常组	10	$2.515 \pm 1.595^{**}$	0.985 ± 0.111	0.468 ± 0.263	$0.372 \pm 0.144^{**}$
造模组	7	7.780 ± 3.308	2.882 ± 1.111	0.786 ± 0.481	5.686 ± 2.630
给药组	7	$1.722 \pm 0.643^{**}$	1.780 ± 0.111	0.753 ± 0.166	$1.340 \pm 0.440^{**}$

与造模组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

绪评价通过《雌性实验猕猴愤怒和抑郁情绪评价量表》检验。综合二者表明,猕猴模型呈现 PMS 肝气郁证的某些临床特点。

3.3 受试猕猴微观指标变化:采用每天挤压刺激 7 小时,连续 7 天的造模方法,对其进行检测。附表示,受试猕猴血清中单胺类神经递质发生改变,造模组 5-HT、E、NE 含量均显著升高;用药后 E、NE 改善较明显,5-HT 有所改善,提示这些指标与 PMS 肝气郁证发病机制有关。

4 讨论

中医学认为,肝气郁证是由于肝气不足,疏泄不及所致。由于历史原因,中医藏象学说在其形成过程中孕育了重功能、轻实体、重宏观、轻微观等特点。因此,肝藏象目前存在着微观研究的严重不足,对于肝如何疏泄不及导致肝气郁证,是中医藏象理论亟待探索的重大问题。中医藏象学说研究的切入点是寻找与证候发生有关的病理性变化,进而推断出可能的生理基础。借助于该模型,通过对某些指标正常与造模的比较、用药前后的比较观察,能够发现临床无法认识的若干科学事实,可探索肝疏泄失常的具体机制,从而上升为新的科学假说,丰富和深化肝主疏泄理论。

目前已有的动物模型和病证结合模型大多缺乏评价指标,带有极大的主观性,这直接影响模型的可信度,造成在此基础上所进行试验结果的偏差性^[7]。

本研究成果通过不断调整造模刺激强度、时间、改进造模装置等,探索出了可经重复、稳定性强的造模技术条件,提供了造模条件稳定、可经重复的该病证猕猴模型的技术资料及录像资料。其造模刺激强度、时间主要是通过连续不间断录像监控,模型猕猴出现动眼迟钝、低眉俯首、毛发蓬乱、体态畏缩、独处、进食居后等行为表现。其中,部分猕猴有月经迟后的表现。同时建立了猕猴模型表情行为评价量表,该量表的建立可为实验猕猴造模前后表情行为的判定提供客观衡量标准。

对 PMS 肝气郁证猕猴模型情绪异常的评价目前尚未有统一的客观衡量标准,借助《雌性实验猕猴愤怒和抑郁情绪评价量表》对造模猕猴表情行为进行评价将弥补这一不足。量表已建立抑郁常模分值,运用此量表对实验猕猴进行情绪评价,其情绪积分在常模范围内为正常,超过常模视为异常。该量表已经做了信度检验和效度估计。

造模猕猴表情行为对 PMS 肝气郁证临床表现的模拟,是 PMS 宏观表现的最主要指标^[8,9],药物治疗后宏、微观指标的变化可作为对猕猴模型评定的一个辅

助依据。因此,PMS 肝气郁证猕猴模型情绪异常是评价动物模型的重要内容。模型除具备经前出现症状,经后消失的特征外,同时尚有肝气郁证主要临床表现。与此相对应,造模猕猴应表现出动眼迟钝、低眉俯首、毛发蓬乱、体态畏缩、独处、进食居后等行为表现,类似肝气郁证“抑郁消沉”临床特点,视为 PMS 肝气郁证^[10,11]。部分猕猴有月经迟后的表现。胸闷、善太息、少腹胀痛等症状无法在猕猴模型宏观方面体现出来,其评价主要通过《雌性实验猕猴愤怒和抑郁情绪评价量表》来完成。本研究由于样本数较少,量表尚有待于进一步完善。

肝气郁为肝疏泄失常始发证,揭示了该证病理机制,为认识肝主疏泄生理机制打开通道^[12]。本研究结果显示,受试猕猴血清中单胺类神经递质改变与肝气郁证发病机制呈现近似一致性,由此为肝气郁证发病机理的深入研究提供了一定的理论依据。据结论所知,血清中 5-HT、E、NE 均可作为研究低地位猕猴 PMS 肝气郁证模型的微观参考指标和病理基础。用经前舒颗粒治疗后,各异常指标均有所改善,说明本模型体现了该病证的病理特点。单胺类神经递质的改变是引起 PMS 情感症状和应激行为反应失常的原因^[1],这与肝气郁证的临床表现有趋同性。单胺类神经递质在猕猴尿中及性激素在血、尿中如何变化,将是今后的研究方向。

参考文献

- 1 张惜阴,戴钟英,于传鑫,等.实用妇产科学.北京:人民卫生出版社,2003:837~858.
- 2 乔明琦.肝气逆、肝气郁两证客观指标实验研究.山东中医学院学报,1992,16(3):23~26.
- 3 乔明琦,张继忠.猕猴模拟经前期综合征肝气逆证变异的可行性探索.中国中医基础医学杂志,1998,4(6):28~31.
- 4 乔明琦,张珍玉.经前期综合征证候分布规律的流行病学调查研究.中国中医基础杂志,1997,3(3):31~33.
- 5 李慧吉,武成.情志医学研究.天津中医,2000,17(6):37~38.
- 6 赵建明,刘雁峰.中医情志量化初探.中医药学报,2000,29(1):4.
- 7 陈小野.中医证候动物模型制备方法概论.上海实验动物科学,1999,19(3):191~193.
- 8 Rapkin AJ, Pollack DB, Raleigh MJ, et al. Menstrual cycle and social behavior in vervet monkeys. Psychoneuroendocrinology, 1995, 20(3): 289~297.
- 9 Svartberg K, Forkman B. Personality traits in the domestic dog (Canis familiaris). Appl Anim Behav Sci, 2002, 79(2): 133~155.
- 10 韩巍,刘震.中医治疗抑郁症的现状.辽宁中医学院学报,2000,2(4):41~43.
- 11 陈家旭.中医“证”研究的回顾与展望.北京中医药大学学报,1998,21(1):40~43.
- 12 乔明琦,张惠云,陈雨振.肝郁证动物模型研究的理论思考.中国医药学报,1997,12(5):42~44.