

· 证的研究 ·

肝气郁证模型大鼠下丘脑单胺类神经递质分析

张惠云 乔明琦 孙 丽

(山东中医药大学科技处, 济南市长清大学科技园大学路 4655 号, 250355)

[摘要] **目的** 探讨肝气郁证模型大鼠发病的微观机制。**方法** 捆绑法造模制作肝气郁证模型大鼠, 采用反相离子高效液相色谱(RP-IP-HPLC)测定大鼠造模后下丘脑中去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、多巴胺(DA)及 5-羟色胺(5-HT) 4 种神经递质含量变化。**结果** 肝气郁证模型大鼠下丘脑中 E、DA、5-HT 水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), NE 水平显著降低($P < 0.01$), 且用药后均得到明显改善。**结论** 肝气郁证与下丘脑中 NE、E、DA、5-HT 关系密切。
[关键词] 肝气郁证; 下丘脑; 单胺类神经递质; 高效液相色谱

Analysis on the Monoamine Neurotransmitters in Hypothalamus of Rat Models of Liver-qi Stagnation Syndrome

ZHANG Hui-yun, QIAO Ming-qi, SUN Li

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)

ABSTRACT **Objective** To study the mechanism of liver-qi stagnation syndrome of rat models. **Methods** The binding method was used to make rat models of liver-qi stagnation syndrome and the quantitative changes of hypothalamus norepinephrine (NE), epinephrine (E), dopamine (DA), and 5-hydroxytryptamine (5-HT) before and after modeling were determined with reversed phase ion pair (RP-IP)-HPLC. **Results** The level of E, DA and 5-HT was remarkably increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) while NE decreased significantly ($P < 0.01$), and they were all improved after medication. **Conclusion** The liver-qi stagnation syndrome is closely related with level of hypothalamus NE, E, DA and 5-HT.

Key Words Liver-qi stagnation syndrome; Hypothalamus; Monoamine neurotransmitters; High performance liquid chromatography (HPLC)

单胺类神经递质是参与情绪活动、消化功能和疼痛机制的重要生化物质, 神经递质的测定能够反映机体植物神经功能^[1]。该类神经递质在下丘脑部位含量很高, 作用活跃; 下丘脑是自主神经系统的整合中枢, 在维持机体内环境稳定和决定情绪、行为反应等方面起着重要作用^[2]。因此我们选择检测该部位单胺类神经递质含量变化, 并给予中药干预, 探讨肝气郁证发病的微观机制。

1 材料与方法

1.1 材料

动物: SPF 级健康未孕雌性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 180~220g, 山东中医药大学实验动物中心提供, 许可证号: 鲁动质 D20021024。

药物及试剂: 经前舒颗粒由白芍(炒) 500g, 当归 500g, 柴胡 333g, 白术(炒) 500g, 牡丹皮 333g, 香附 500g, 陈皮 500g, 郁金 500g, 砂仁 333g, 人参 333g, 甘

草 166g 组成; 方中白术、当归、牡丹皮、香附、陈皮、郁金、砂仁提取挥发油, 药渣与柴胡、甘草水煎, 人参、白芍采用乙醇提取, 合并滤液, 浓缩成浸膏, 与挥发油包封物制粒; 以芍药苷为指标成分拟定本品 1g 含芍药苷($C_{23}H_{28}O_{11}$) 不得小于 5mg (秦皇岛药业集团公司, 批号: 040513); 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(Sigma 公司), 乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2 , 上海试剂厂, 分析纯), 十二烷基磺酸钠(SDS, 上海试剂一厂, 分析纯)。

仪器: 岛津 LC-6A 高效液相色谱仪, 高速冷冻离心机, RF-535 荧光检测器, C-R4A 数据处理装置等。

1.2 方法

1.2.1 分组造模及用药 将大鼠随机分为 3 组: 正常对照组、肝气郁模型组、肝气郁用药组, 各 10 只。

肝气郁证模型制作参照文献方法^[3,4]。造模同时肝气郁用药组给予经前舒颗粒灌胃, 20g/kg 体重(浓度 1:1, 含生药材 1g/ml, 相当于人临床 5 倍剂量); 肝气郁模型组大鼠给予同体积常水; 正常对照组大鼠不予任何刺激, 给同体积常水, 常规饲养。

1.2.2 组织取材 分别于造模第 5 天, 将大鼠断头处

死。取脑置于液氮罐内速冻 1~2 分钟取出,在冰浴玻片上取出下丘脑,精确称量后移至玻璃匀浆器中,加入预冷的 0.1mol/L 高氯酸(含 0.05% EDTA-Na₂) 1ml,于冰浴上充分研磨,0~2℃制成匀浆,离心(20 000 转/分钟,30 分钟),取上清液 0~4℃冷藏备用。

1.2.3 溶液的制备^[5] 标准对照液制备:分别精密称取 NE、E、DA、5-HT 标准品适量,用流动相溶解并稀释成 50 μg/ml 的标准储备液。分别将储备液稀释成 NE: 0.1、0.25、1、2、3 μg/ml; E: 0.1、0.5、1.5、3、4.5 μg/ml; DA: 0.2、1、2、4、5 μg/ml; 5-HT: 0.5、1、1.5、2、3 μg/ml,作为各组分的标准品对照液。供试液制备:取 1.2.2 中已制备的上清液 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得供试液,取 20 μl 上机检测。

1.2.4 色谱条件^[6] 色谱柱:CLC-ODS 柱;流动相:pH2.5 离子对试剂(SDS 0.15g, EDTA-Na₂ 0.028g, 硫酸 0.22ml, 甲醇 400ml, 蒸馏水定容至 1000ml);流速:1.2ml/min;柱温 40℃;检测波长:荧光激发波长 285nm, 发射波长 313nm。

1.2.5 统计学方法 采用 SAS 8.1 统计软件进行统计,各组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 标准曲线制备

2.1.1 线性关系考察 测定各组分的标准对照液,各对照液色谱峰面积 A 对浓度 C 作线性回归, NE、E、DA、5-HT 的回归方程分别为: C = 1313.34A + 505.00, *r* = 0.9995; C = 1524.37A + 79.32, *r* = 0.9995; C = 774.60A + 356.00, *r* = 0.9995; C = 620.01A + 103.35, *r* = 0.9990。结果表明,4 种标准对照液线性回归方程的回归系数介于 0.9995~0.9990 之间,线性范围分别为 0.1~3 μg/ml、0.1~4.5 μg/ml、0.2~5 μg/ml、0.5~3 μg/ml,线性关系良好。

2.1.2 回收率及精密度试验 取处理后的样品 1 份分成 5 份,其中 4 份分别添加已知量的 4 种标准对照液,另外 1 份加入等量的流动相作对照。分别测出 NE、E、DA、5-HT 在样品中的含量,再根据对照分别计算出 4 种物质的回收率和精密度(RSD)。4 种物质的平均回收率(*n* = 5) 分别为 96.8%、98.2%、96.4%、103.7%, RSD 分别为 1.28%、1.27%、1.19%、

1.25%。

2.1.3 进样精密度试验 对已知浓度的样品溶液,在同样条件下进样 5 次,各组分峰面积的 RSD 分别为 2.1%、1.7%、1.4%、2.6%,介于 1.4%~2.6%之间,表明本方法精密度良好。

2.2 样品含量测定

受试大鼠下丘脑中单胺类神经递质含量测定显示(见附表),与正常对照组比较,肝气郁模型组大鼠下丘脑中 E、DA、5-HT 显著升高,NE 显著降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01);与肝气郁模型组比较,用药后 E、DA、5-HT 显著降低(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),NE 显著升高(*P* < 0.01),4 种神经递质含量均显著改善。

3 讨论

机体中枢内 NE 能神经元系统与 5-HT 能神经元系统在调节机体机能活动中常呈现对立统一关系。5-HT 对中枢以抑制为主,NE 则以兴奋为主,两者含量改变则分别引起情绪激动、急躁易怒与情绪低沉、抑郁寡欢。脑内的 DA 既是 NE 的前体,又是一种独立的神经递质,在结构和功能上与 NE 有密切联系,在中枢神经系统中主要起着调控情绪的作用^[8]。

结果显示,肝气郁模型组大鼠下丘脑中 NE 含量明显低于正常对照组(*P* < 0.01);而 5-HT 含量较正常对照组大鼠明显升高(*P* < 0.05),提示其中枢活动以抑制为主。肝气郁模型组大鼠 DA 含量比正常对照组大鼠显著升高(*P* < 0.01),中枢内 DA 能神经元系统与 NE 能神经元系统相互拮抗,DA 含量升高进一步抑制 NE 活性,加重抑郁形成,可能是肝气郁证其情志抑郁的微观机制之一。E 作为神经递质在脑内含量很低^[6],正常对照组大鼠 E 未能检出,肝气郁模型组大鼠 E 含量升高。服用经前舒颗粒后,肝气郁用药组各组分均得到改善。表明经前舒颗粒可以降低下丘脑中 E、DA、5-HT 含量,上调 NE 含量,提示经前舒颗粒治疗肝气郁证可能是通过降低大鼠下丘脑中 E、DA、5-HT 含量,提高 NE 含量实现的。

肝主疏泄,疏泄失常是肝病的主要病机,肝失疏泄包括疏泄太过和疏泄不及两个方面。疏泄太过产生肝气逆证;疏泄不及产生肝气郁证。肝气逆证多由精神刺激,以致疏泄太过,肝脏气机不和,横逆或上逆为患。肝

附表 各组大鼠下丘脑中 4 种单胺类神经递质含量的比较(10⁻⁹ g/g 湿重, *x* ± *s*)

组别	鼠数	NE	E	DA	5-HT
正常对照组	10	1245.13 ± 68.36	—	252.01 ± 16.51	1001.42 ± 91.08
肝气郁模型组	10	849.13 ± 83.36*	3879.82 ± 362.51	4583.70 ± 424.59*	2312.71 ± 236.37*
肝气郁用药组	10	1390.01 ± 228.58 [△]	2444.39 ± 212.17 [△]	4133.39 ± 391.04* [△]	1943.80 ± 184.46* ^{△△}

与正常对照组比较,**P* < 0.01;与肝气郁模型组比较,[△]*P* < 0.05,^{△△}*P* < 0.01

气郁证是由情志郁结,以致疏泄不及,气机郁滞,其主要临床表现为抑郁寡欢、胸闷、时太息等。情志异常涉及多种神经递质,检测造模大鼠下丘脑中 NE、E、DA、5-HT 等 4 种神经递质的含量,有助于从神经递质的相互联系、相互影响的角度阐明大鼠模型的微观机制,为揭示肝疏泄失常机制提供实验依据。

参考文献

[1]徐建阳,覃菁,陈慧依,等.中医肝郁证的动物模型研究.广州中医药大学学报,2004,21(1):73~76.
[2]邓小华,蔡维君,杜亚政,等.大鼠下丘脑前区神经元内雌激素受体的表达——免疫组织化学研究.中国组织化学与细胞化学杂志,2001,10(4):383~386.

[3]乔明琦,张惠云,陈雨振,等.肝郁证动物模型研究的理论思考.中国医药学报,1997,12(5):298~300.
[4]吕志平.“肝郁”大鼠血浆 TXA₂、PGE₂ 水平与肝微循环变化及逍遥散作用.中国微循环,2000,4(3):160~161.
[5]文江平,唐爱国.高效液相色谱法快速测定血清中的芳香族氨基酸.色谱,2003,21(2):155~157.
[6]吴栩,王海军,高冬梅,等.肝气逆证模型大鼠下丘脑中单胺类神经递质变化研究.山东中医药大学学报,2005,29(4):304~305.
[7]毛海燕,叶林,叶向荣.肝郁证大鼠中枢神经递质变化的观察.福建中医药,2002,33(2):17~18.

(收稿日期:2006-10-16;修回日期:2007-01-06)

[编辑:李长今]

三伏天穴位贴敷治疗过敏性鼻炎 60 例

葛仪方¹ 譙凤英²

(1. 天津中医药大学,天津市玉泉路 88 号,300193; 2. 天津中医药大学第一附属医院耳鼻喉科,300193)

过敏性鼻炎是指以突然和反复发作的鼻痒、打喷嚏、流清涕、鼻塞等为主要特征的鼻病,属于中医学“鼻鼽”范畴。现将天津中医药大学第一附属医院耳鼻喉科采用中药敷贴治疗过敏性鼻炎的效果报道如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

全部病例来源于本院耳鼻喉科门诊患者,随机分为 2 组,治疗组 60 例,年龄 20~45 岁;对照组 60 例,年龄 21~46 岁。两组中男性 58 例,女性 62 例,平均年龄均为 31.7 岁,病程 1~22 年,两组性别、年龄、病程经统计学分析,差异无显著性意义 ($P>0.05$),具有可比性。

1.2 诊断标准

参考中华医学会《变应性鼻炎诊断标准及疗效评定标准》:表现为突然和反复发作的鼻痒、打喷嚏、流清涕、鼻塞等为主要症状。体征为鼻黏膜苍白、水肿,鼻腔有较多水样分泌物。有季节性反复发作或常年性反复发作病史。

2 治疗方法

(1) 治疗组:将白芥子、延胡索、细辛、甘遂、黄芩按 2:2:1:1:1 比例制成糊状。穴位:膏肓、大椎、风门、肺俞、百劳、脾俞、肾俞。操作:将上述药物研成细末混合备用,三伏天穴位贴敷,用时以姜汁调成糊状,取一分硬币大小置于专用敷贴中央贴在上述穴位上。贴药后皮肤有微微发痒、灼痛感,切勿即去,一般敷贴 2~6 小时。贴药时间可视患者情况而定。如发痒、灼痛感不甚明显者则可敷贴较长时间,但最长不超过 8 小时;如发痒、灼痛感非常明显者则应适当缩短敷贴时间。10 天贴 1 次,3 次为 1 个疗程。上述穴位每次选取 7 个,轮换选用。除大椎穴外,其余穴位均取双侧。注意事项:敷贴部位若起水泡,嘱咐

患者不要弄破,以免感染。如果水泡较大,消毒后用注射器从下部穿刺吸液,再涂以本院制剂地榆油,消炎止痛。贴药部位 10 小时内不宜冷热水刺激。禁食生冷、辛辣、油腻的食物及鱼虾等发物。

对照组:内服本院鼻敏康汤剂(辛夷 10g,生黄芪 25g,党参 10g,防风 10g,白术 10g,柴胡 10g,五味子 10g,诃子 10g,细辛 3g,炙甘草 10g,稀莪草 10g)每日 1 剂,水煎 2 次,早晚各服 1 次。以 10 次为 1 个疗程。疗程间休息 3 日再进行下一个疗程。

3 疗效观察

3.1 疗效标准

参照变应性鼻炎病情分级标准及疗效评定标准。

3.2 治疗结果

治疗组 60 例,显效 46 例,有效 10 例,无效 4 例,总有效率为 93.3%;对照组 60 例,分别为 24 例、24 例、12 例、80%。治疗组疗效明显优于对照组 ($P<0.05$)。

4 讨论

中医治疗本病主要以祛风散寒,宣通鼻窍,补益脾肺,温肾纳气为主。肺为阴脏,背属阳,因此,取背部俞穴治疗呼吸系统疾病。大椎属督脉,为三阳督脉之会,可提升诸经之阳气,它是预防感冒之要穴,可以降低嗜酸性粒细胞。风门、肺俞、百劳有祛风宣肺通窍之功;膏肓穴补益虚损,调理肺气。脾俞、肾俞健脾补肾,益气升阳。共奏调和营卫,疏通经脉,调畅气机,振奋诸阳。敷贴药中,白芥子温肺化痰,利气散结;细辛祛风散寒,通窍止痛,温肺化饮;延胡索活血行气止痛;甘遂泻水逐饮,消肿散结;黄芩苦寒佐制以上诸药大辛大热之性,并可引以上诸药入肺经。故临床上采用三伏贴敷上述穴位与辛窜温通的中药双重作用,共奏温经散寒,开鼻窍,调气血,扶正祛邪之功效。

(收稿日期:2007-10-16)

[编辑:黄健]