

肝郁证实质的实验研究概述

张晓龙

(南京中医药大学, 江苏南京 210023)

摘要 目前,现代科学对于肝郁证实质的实验研究涉及免疫、生殖、神经内分泌、血液、消化等多系统,但仍未能明确阐释肝郁证的实质。肝郁证的研究,应在中医基本理论的指导下,充分利用现代科技手段,方有可能取得突破,推动临床诊断和治疗更好地向前发展。

关键词 肝郁证 实验研究 综述

中图分类号 R256.49

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2014)12-0087-03

中医学认为,肝主疏泄,体阴用阳,喜条达而恶抑郁。当下社会、家庭生活压力增大,使肝气郁结证型发病率日益增高,成为最常见的中医证型之一^[1]。而肝气郁结又常作为气滞、痰浊、水饮、湿热、血瘀、气火等病理因素生成的先决条件,从而使疾病变证丛生,为临床治疗带来很大困难。为此,对肝郁证实质的研究也成为了日益迫切的一项课题,然而中医肝郁证的概念是抽象的,它仅是一组临床症状的概括,而且大多以病人主观不适为表现,故要探求肝郁证的实质是一项艰巨的任务。为此部分学者努力寻找与肝郁证有关的微观改变,现将肝郁证实质的实验研究进展概述如下。

1 对免疫系统的影响

严灿等^[2]使用夹尾激怒法制备肝郁证大鼠模型,发现大鼠出现明显的免疫抑制并伴有血浆皮质酮水平升高,提示肝郁证大鼠免疫抑制与下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPAA)兴奋性升高有关。赵益业^[3]使用束缚四肢法制作肝郁证模型,并测定溶血素、脾淋巴细胞转化率、白细胞介素2作为免疫功能评价指标,结果发现三项指标均降低,表明模型动物免疫功能受到抑制。陈松等^[4]使用夹尾激怒结合肾上腺素注射法制作肝郁证模型,观察T、B淋巴细胞活性变化以及血液IgG、IgM的水平,结果发现模型大鼠T、B淋巴细胞转化率显著升高,IgM水平显著降低,提示肝郁证与机体免疫力下降有非常密切的联系。李家邦等^[5-6]运用夹尾激怒结合肾上腺素注射法制作肝郁证模型,观察肝郁证模型大鼠活化的T细胞核因子c mRNA及蛋白质的表达水平,以及柴胡疏肝散对其的干预情况,结果发现肝郁组NF-ATc mRNA及蛋白质表达明显降低,用柴胡疏肝散治疗后,肝郁组NF-ATc mRNA及蛋白质表达上调,基本恢复到正常水平。李艳彦等^[7]联合慢性束缚应激、过度疲劳、饮食失节的方法复制肝郁证模型,观察肝郁大鼠体重、脾和胸腺的重量及脾、胸腺指数,以及血清IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF。结果发现模型大鼠体重及胸腺、脾重量显著减轻,血清IL-1 β 、IL-6、IL-2和TNF发生明显改变,提示该肝郁脾虚证模型存在免疫功能的紊乱。

2 对循环系统的影响

李松滨等^[8]采用夹尾激怒法制备肝郁证大鼠模型,观察模型大鼠血液流变学改变,发现其全血黏度与血浆黏度及细胞聚集指数均明显增高,这与郁怒伤肝、气滞血瘀的理论相吻合。李艳彦等^[9]联合慢性束缚应激、过度疲劳、饮食失节法建立大鼠肝郁脾虚证模型,造模后测定大鼠血液流变学改变和血浆TXB₂、PGF_{1 α} 含量,结果发现肝郁脾虚证大鼠存在血液高黏和血栓易形成状态,恢复期血液高黏同时伴有扩血管因素的加强。提示肝郁脾虚证有血流变的异常和血浆TXA₂-PGI₂的平衡失调。

3 对生殖系统的影响

3.1 性行为 鲁明等^[10]应用夹尾激怒法复制肝郁证模型,观察大鼠交配试验,发现模型大鼠爬背潜伏期缩短,次数增加,但插入、射精潜伏期延长,次数减少,插入与爬背次数比值下降。并制备大鼠脑干及阴茎组织匀浆,发现模型组大鼠脑干NA、5-HT及阴茎NA含量明显升高,提示肝郁证动物模型性行为的改变与中枢及外周单胺类递质的紊乱有关。

3.2 子宫、卵巢、性激素水平 于水澜等^[11]使用夹尾激怒法制作肝郁证模型,并设立疏肝健脾活血中药组,应用光镜观察组织学改变并测定子宫重量,观察雌二醇、孕酮的变化,结果发现模型组子宫内膜上皮细胞呈立方型,腺体数量较少,排列不整齐;中药高剂量组与模型组比较,子宫/体重指数增高,雌二醇及孕酮水平明显升高,差异有显著性意义,从数值分析中药高剂量组效果优于中药对照组。

4 对神经内分泌系统的影响

4.1 中枢神经递质 毛海燕等^[12]使用带枷法制备肝郁证模型,造模结束后将大鼠快速断头处死,分离大脑半球、间脑和脑干并制备组织匀浆,检测匀浆中去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺以及5-羟吲哚乙酸。结果显示:造模1周时,DA和NE含量均减少,而4周时5-HT、DA和NE均显著增高。各种递质的变化以DA的变化最为显著,因此,DA可能是引起机体情志变化的主要因素。高萧枫等^[13]应用四肢束缚法复制肝郁

基金项目:江苏省中医药局科技立项项目——柴胡疏肝散对肝郁模型鼠胃肠动力作用及机制研究(LZ13009)

症候模型,造模结束后取脑组织,制备匀浆,荧光分光光度法测脑内 NE、DA 含量。结果显示肝郁证模型组大鼠脑内 NE 与 DA 水平明显下降,逍遥散治疗组大鼠脑内 NE 与 DA 水平明显提升。大鼠脑内 NE 和 DA 水平明显降低可能是肝郁证发生的物质基础。

4.2 对下丘脑-垂体-肾上腺素(HPA)轴的作用 朱清静等^[14-15]使用慢性束缚法制作肝郁证模型,于造模后测定实验大鼠对葡萄糖水的摄取量以及血清 ACTH、皮质酮、 β -内啡肽含量,并在造模后用柴胡舒肝散进行干预。结果发现柴胡疏肝散能增加大鼠对糖水的摄取量,降低应激导致的大鼠促肾上腺皮质激素、 β -EP,使大鼠下丘脑 β -EP 阳性细胞的表达减少。提示肝郁证大鼠 HPA 轴的功能失调,并且疏肝解郁代表方柴胡舒肝散在一定程度上调节了慢性束缚应激模型大鼠的行为表现和功能紊乱。李艳彦等^[16]联用慢性束缚应激、过度疲劳、饮食失节的方法复制肝郁证模型,造模后观察肾上腺、肾上腺指数、下丘脑组织 CRH、血浆 ACTH、血浆 CORT,结果提示造模后的大鼠 HPA 轴功能减低,提示这可能是肝郁证发病的关键。邓青秀等^[17]应用束缚加浸水法复制肝郁证模型,造模后给药组予四逆散干预,检测胃肠激素含量,电镜观察胃肠组织形态,结果发现四逆散能恢复应激刺激对实验大鼠胃肠道组织引起的病理改变且能提高血清中胃泌素、血浆中胃动素和血管活性肠肽的含量,降低血浆中生长抑素的含量。

4.3 对下丘脑-垂体-卵巢(HPO)轴的作用 黄保民等^[18]使用夹尾激怒法复制肝郁证模型,造模后发现模型大鼠下丘脑垂体 NE 减少,DA、5-HT 及 5-HIAA 含量增加,血清 FSH、LH、 E_2 、P 降低,NE、DA、5-HT、5-HIAA 及 T 水平升高,说明心理应激状态下肝郁证雌性大鼠的神经生殖内分泌功能紊乱。并在造模后对给药组予疏肝补肾中药,给药后发现给药组大鼠上述指标均有明显改善,说明疏肝补肾中药有改善应激大鼠 HPO 轴的作用。

4.4 对海马内基因表达的影响 字立甲等^[19]应用慢性应激刺激法复制肝郁证模型,并对海马内差异表达明显的片段进行生物信息学分析。结果发现代表 GSK3b 与 St3gal5 的这两个基因转录产物差异表达,提示这两个基因产物可能与肝郁证的发生、发展相关。杜雅薇等^[20]运用模具束缚结合孤养的方法制备肝气郁结证候动物模型,并检测大鼠脑海马 PDE4A、PDE4B 及 PDE4D 表达以及柴胡舒肝散干预后的影响。结果显示模型组大鼠脑海马该三组基因的 mRNA 表达较正常组降低,而柴胡疏肝散组的表达较模型组升高。提示可通过上调大鼠脑海马 PDE 及其亚型的 mRNA 的表达来治疗肝郁证。于琦等^[21]应用慢性应激刺激制作肝郁证模型,用 RT-PCR 方法检测海马 5-HT1AR mRNA 表达,结果显示肝郁模型大鼠海马 5-HT1AR mRNA 表达降低,四逆散和逍遥散可以对抗这种降低,这项发现一方面进一步支持该模型为肝郁模型的推论,并提示肝郁证发生、发展机制及疏肝方剂的作用原理可能与海马 5-HT1AR 基因表达变化密切相关。

4.5 对外侧膝状体 NMDAR1 基因表达的影响 苏娜娜等^[22]应用慢性应激刺激制作肝郁证模型,并运用原位杂交法检测实验大鼠外侧膝状体中 NMDAR1 基因表达情况。结果发现模型组大鼠该基因表达面积、平均光密度、积分光密度均显著增高。提示肝郁是导致外侧膝状体损伤的重要因素,这为从肝论治视路疾病提供了理论依据。

5 对消化系统的影响

毛海燕等^[23]采用带枷造模法制作肝郁证模型,造模 4 周后发现造模大鼠血清胃动素增多而胃泌素显著减少,提示情志刺激可引起大鼠的消化功能紊乱。杜雅薇等^[24]采用模具束缚结合孤养的方法制备肝郁证模型,并观察肝郁证模型大鼠行为学改变以及血清胃泌素和血浆胃动素含量的影响,并应用柴胡舒肝散对造模大鼠进行干预。结果发现柴胡疏肝散可缩短肝郁证大鼠的强迫游泳中不动时间,升高血清 GAS 和血浆 MTL 的水平。提示柴胡舒肝散可改善肝气郁结所致胃肠道动力不足。

6 肝组织的过氧化损伤

刘建鸿等^[25]使用带枷单笼喂养法复制肝郁证模型,造模后取大鼠肝组织并制备匀浆,检测活性氧、丙二醛水平。结果显示肝脏组织内 OFR、MDA 水平增高,说明肝脏组织有明显过氧化损伤。吕志平^[26]应用束缚四肢法复制肝郁证模型,结果显示肝郁模型大鼠过氧化作用增强,消除自由基能力下降,肝细胞受损。提示脂质过氧化增强、肝细胞的破坏可能是肝郁证重要的病理基础。

7 其他

徐舒等^[27-28]采用慢性束缚的方法造成肝郁证模型,并使用代谢组学的分析方法,将对照组与模型组对比,结果显示血浆中葡萄糖和肌酸的含量明显偏高,而 3-羟基丁酸、谷氨酰胺、磷脂酰胆碱、磷酸胆碱和不饱和脂肪酸的含量明显偏低,这些小分子物质组的不同有可能代表肝郁证的物质基础。

8 结语

肝主疏泄,是调整人体气机最主要的脏腑之一,肝气郁结,常常导致郁火、痰浊、湿热、瘀血、食积等病理因素的生成,使疾病变生,给治疗带来麻烦。《丹溪心法·六郁》有云:“气血冲和,万病不生,一有怫郁,诸病生焉。故人生诸病,多生于郁。”可见肝气郁结在许多疾病的发生发展中具有举足轻重的作用,所以探求肝郁证的实质是解决许多临床问题的重要切入点。

综上所述,现代科学对于肝郁证实质的实验研究涉及多个系统、多个方面,包括:免疫系统、生殖系统、神经系统、血液系统、消化系统等,虽然进行了多年的研究,并且发现了许多可能成为肝郁证本质的物质,如激素、cAMP、cGMP、神经递质、细胞因子等,但仍未能明确阐释肝郁证的实质。笔者认为,目前对于肝郁证实质的研究尚存在以下几方面的不足:(1)判定肝郁证的指标较多,且特异性和敏感性均不高,例如肝郁患者存在血液流变学改变,而这种改变又是血瘀证的重要指征,这样的指标对肝气郁结证而言就缺乏特异性。(2)肝郁证的动物模型尚缺乏统一性,并且一些造模结果与肝郁证的实质不够统一。在对于肝郁证的研究过程中,必须要有一种为大众公认的造模方法,即所谓标准化动物模型,这样的研究结果才有可比性。(3)中医讲究方证结合,以方测证,以方验证。目前绝大部分对于肝郁证候的研究仅局限于该证型本身,而很少有以方验证的环节。笔者认为应在肝气郁结证的研究中,加入药物的干预研究,通过观察治疗前、中、后症状的改变以及实验指标的动态变化,分析证-效-指标的相关关系,从而筛选出较为符合肝郁证实质的指标,为中医辨证治疗肝气郁结证的作用机理、作用部位、作用靶点提供依据。(4)肝气郁结证作为肝郁证的核心证候,其实在发生和发展中并不是单纯的,如前所述,在临床上,肝郁证的变化纷繁复

杂,病人的表现也不尽相同,所以从肝郁证这个较大的范畴中去寻求其真谛,往往很难找到其共性的机制。所以对于肝郁证的研究,除了应考虑到肝气郁结之本证外,还应当作一些细分,如兼有血瘀者,可以从血液系统探求其本质;如兼有火郁者,可以从神经系统探求其本质;如兼有性功能障碍或不孕者,可以从生殖系统探求本质;如兼有脾虚者,可尝试从消化系统探求其本质……共性寓于个性之中,要善于从个性之中去发现共性,从而达到“殊途同归”的效果。不论是人还是动物,都应考虑到个体差异,同样的造模方法,对于不同的个体,也会出现不同的表现,根据中医理论,应时刻不忘辨证论治的精神,既然“有是证,用是药”,那就应该“有是症,辨是证”,有的放矢,有条不紊,才能真正弄清中医各证型的本质。总而言之,对于肝郁证的研究而言,应在中医基本理论的指导下,充分利用现代科技手段,方有可能取得突破,推动临床诊断和治疗更好地向前发展。

9 参考文献

- [1] 滕晶,王玉来,刘子旺.肝气郁结证的研究总结与未来发展探讨.中华中医药学刊,2006,24(12):2220
- [2] 严灿,高敏.肝郁证免疫功能改变机制的临床与实验研究.中医研究,1995,8(6):18
- [3] 赵益业.肝郁证的免疫学探讨.山东中医药大学学报,1997,21(1):28
- [4] 陈松,李家邦,朱双罗,等.肝郁证T、B淋巴细胞活性改变及疏肝治疗影响的实验研究.湖南中医药大学学报,2001,21(2):7
- [5] 李家邦,杨冬花,蒋荣鑫,等.NF-ATc在肝气郁结、脾气虚证模型大鼠的表达以及柴胡疏肝散、四君子汤的干预作用.中国现代医学杂志,2005,15(10):1515
- [6] 杨冬花,李家邦,郑爱华,等.肝气郁结证模型大鼠T细胞增殖能力改变与分子机制研究.浙江中医杂志,2006,41(3):164
- [7] 李艳彦,谢鸣,陈禹,等.肝郁脾虚证大鼠模型复制中的免疫系统变化.中华中医药杂志,2006,21(7):428
- [8] 李松滨,杨丽珍,李宝龙.调肝汤对肝郁模型大鼠血液流变学的影响.首届中国中医药实验动物科技交流会论文集汇编.2002:41
- [9] 李艳彦,谢鸣,王洪海,等.肝郁脾虚证模型大鼠血流变及TXB₂、PGF_{1α}的变化.现代生物医学进展,2007,7(1):15
- [10] 鲁明,温建余,祝丽霞,等.肝郁证大鼠单胺类递质变化与性行为关系的实验研究.中国男科学杂志,2002,16(3):205
- [11] 于水澜,郑杨,杨丽珍.疏肝健脾活血法对肝郁大鼠影响的实验研究.时珍国医国药,2008,19(6):1363
- [12] 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
- [13] 高萧枫,秦雪梅,王明军.逍遥散和柴胡对慢性束缚应激肝郁模型大鼠脑内单胺类神经递质的影响.中药药理与临床,2005,21(2):6
- [14] 朱清静,罗欣拉,熊振芳.柴胡疏肝散对慢性束缚应激性肝郁证大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节作用.湖北中医杂志,2003,25(11):7
- [15] 熊振芳,朱清静.柴胡疏肝散对慢性束缚应激性肝郁证大鼠的影响.中国中西医结合消化杂志,2004,12(4):220
- [16] 李艳彦,谢鸣,陈禹,等.肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质的变化.现代生物医学进展,2006,6(4):10
- [17] 邓青秀,彭延娟,彭成,等.四逆散对肝郁证模型大鼠胃肠组织细胞形态及胃肠激素的影响.中国实验方剂学杂志,2007,13(6):33
- [18] 黄保民,王希浩,张关亭.舒肝方对心理应激肝郁大鼠神经内分泌的作用.中成药,2006,28(2):222
- [19] 李立甲,金光亮.肝郁证模型大鼠海马内差异表达片段生物信息学分析.吉林中医药,2012,32(5):507
- [20] 杜雅薇,岳广欣,王蓬文,等.柴胡疏肝散对肝郁证模型大鼠脑海马磷酸二酯酶-4及其亚型表达的影响.中华中医药学刊,2014,32(1):178
- [21] 于琦,金光亮.三种复方对慢性应激肝郁模型大鼠海马5-HT1A受体基因表达的影响.北京中医药,2008,27(1):57
- [22] 苏娜娜,郭承伟.肝郁证大鼠外侧膝状体NMDAR1基因表达的实验研究.山东中医药大学学报,2013,37(4):327
- [23] 毛海燕.肝郁证大鼠肝线粒体膜流动性血浆胃动素及血清胃泌素的变化及意义.福建中医药,2003,34(3):42
- [24] 杜雅薇,王玉来,尹岭,等.柴胡疏肝散对肝郁证模型大鼠行为学及血液GAS、MTL的影响.北京中医药大学学报(中医临床版),2010,17(6):22
- [25] 刘建鸿,姚凝,王淳,等.肝郁证与下丘脑-腺垂体-肾上腺皮质轴和肝组织过氧化损伤的实验研究.中国中西医结合消化杂志,2008,16(5):302
- [26] 吕志平.“肝郁”大鼠的脂质过氧化反应及逍遥散的保护作用.山东中医学院学报,1995,19(3):199
- [27] 徐舒,陈合兵,李洪,等.“肝郁证”大鼠模型的建立及代谢组学的初步研究.中华中医药杂志,2009,24(6):787
- [28] 徐舒,陈合兵,李洪,等.“肝郁证”方证的代谢组学研究.时珍国医国药,2010,21(10):2718

第一作者:张晓龙(1989-),男,硕士研究生,研究方向:中医内科学-肝脏病研究。326310506@qq.com

收稿日期:2014-09-25

编辑:傅如海

习近平见证中澳中医合作协议签署

11月17日,澳大利亚首都堪培拉国会大厦,在国家主席习近平与澳大利亚总理阿博特的共同见证下,北京中医药大学校长徐安龙和西悉尼大学校长格罗夫代表双方所在机构,签署在澳洲建立中医中心的合作协议。

该中心的建立,旨在发挥北京中医药大学中医医疗、教育、科研的优势和西悉尼大学中医药研究澳洲第一的地位作用,建立集中中医医疗服务、教育、研究与文化交流为一体的综合平台,以实现临床医疗与基础科学研究相结合、临床医疗与教育相结合、中医与西医相结合、中西文化相结合,开展临床研究,提供特色鲜明、效果显著的健康服务,培养医学人才,传播中医药文化,探索中医药走向世界的合作模式,展示和输出我国文化软实力,也是落实习近平关于要让世界人民分享中华智慧文明成果讲话精神的重要举措。

(摘自《中国中医药报》)