

# 肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质的变化\*

李艳彦 谢鸣 陈禹 王洪海

(北京中医药大学国家重点学科方剂学学科 北京 100029)

**摘要** 目的:探讨复合造模法复制肝郁脾虚证大鼠模型的HPA轴变化及特点。方法:大鼠采用慢性束缚+过度疲劳+饮食失节法,连续三周,自然恢复一周。观察造模期间各不同时间点大鼠肾上腺重量及指数、下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)及皮质酮(CORT)的变化。结果:与正常组比较,模型大鼠肾上腺重量第一周显著增加( $P < 0.001$ ),第三、四周显著减低( $P < 0.001$ 和 $P < 0.01$ ),其肾上腺指数在实验各周均显著高于正常组( $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ );下丘脑CRH第三周显著低于正常组( $P < 0.05$ ),第四周回升并显著高于正常组( $P < 0.05$ );血浆ACTH在第一、三、四周均显著降低( $P < 0.05$ );血浆CORT第一周显著降低( $P < 0.05$ ),第二周有所回复,第三、四周仍显著降低( $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$ )。结论:该肝郁脾虚证大鼠模型存在HPA轴的功能减低,垂体对上位激素调节的反应能力减低可能是该模型的一个重要的生物学特征。

**关键词:** 肝郁脾虚证; 动物模型; 大鼠; HPA轴; 复合造模法

## Study on Change of Hypothalamus- pituitary- adrenal Axis(HPAA) in TCM's Syndrome Model of GYPX

LI Yan-yan, XIE Ming, CHEN Yu, WANG Hong-hai

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the change of Hypothalamus- pituitary- adrenal axis(HPAA) in the TCM's syndrome model of GYPX(stagnation of liver- qi and deficiency of spleen- qi) made by a new compound method. **Methods:** Chronic astringing, excess fatigue and out of constant diet were adopted towards the rats for three weeks running and then the rats were restored naturally for one week. The changes of the weight and index of rats' adrenal gland and the levels of Corticotropin- releasing Hormone(CRH) in hypothalamus, Adrenocorticotrophic Hormone(ACTH) and Corticotrophin(CORT) in plasma were observed at different time during making model. **Results:** Compared with relevant normal group, the weight of the model rats' adrenal gland increased significantly at the 1st week( $P < 0.001$ ) and decreased at the 3rd and 4th week ( $P < 0.001$  and  $P < 0.01$ ), but the index of adrenal gland increased significantly during the 4 weeks ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ); CRH in hypothalamus decreased significantly at the 3rd week( $P < 0.05$ ), and brought back and increased significantly at 4th week( $P < 0.05$ ); ACTH in plasma decreased significantly at the 1st, 3rd and 4th week( $P < 0.05$ ); CORT in plasma decreased significant in the 1st week( $P < 0.05$ ), went back a little at 2nd week and decreased again at 3rd and 4th week( $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ ). **Conclusion:** The functions of HPAA of the rats' in GYPX model were reduced. The lower reactive ability of pituitary to the adjustment of superior hormone may be the important biologic character of this model.

**Key words:** Syndrome of liver- qi stagnation and spleen- qi deficiency; Animal model; Rats; HPAA; A compound method of establishing model

根据中医病因发病学原理,作者在参考目前肝郁证模型的慢性束缚应激法<sup>[1]</sup>和脾虚证模型的过度劳累加饥饱失常法<sup>[2,3]</sup>的基础上,探索用慢性束缚应激+过度疲劳+饮食失节的复合方法成功复制出类肝郁脾虚证的大鼠模型。本文研究了该模型复制中HPA轴(下丘脑-垂体-肾上腺皮质)的变化及其特点。

## 1 材料

### 1.1 动物

健康雄性Wistar大鼠,体重 $220 \pm 10g$ ,级别SPF/ VAF,动物许可证号为SCXK(京)2002-0003,由北京维通利华实验动物中心提供。所有动物提前一周购入,5只/笼。光照节律12L:12D(6:00~18:00),室温 $19 \pm 2^\circ C$ ,保持安静。

### 1.2 造模用束缚筒

自制束缚筒为有机玻璃制成的圆筒状结构,主筒长25厘米,筒口外径7厘米,内径5厘米;前端置有一直径小于主筒的、可以前后调节的带有透气孔、便于大鼠头伸进的有机玻璃前罩,后端为可调的开关闸门。

### 1.3 试剂

CRH-RIA试剂盒由解放军总医院东亚放免研究所提供;ACTH-RIA试剂盒、CORT-RIA试剂盒由北京海科锐生物技术中心提供。

### 1.4 主要仪器

低温离心机(DDL-5型),上海安亭科学仪器厂产;SN-695B型智能放免 $\gamma$ 测量仪,上海核所日环光电仪器有限公司产。

\* 基金项目:本课题为国家211项目基金资助课题

作者简介:李艳彦,山西太原人,北京中医药大学2003级在读博士。E-mail: lyy1002@163.com

通讯作者:谢鸣,医学博士,北京中医药大学国家重点学科教授, E-mail: xieming603@263.net

(收稿日期:2006-03-28 接受日期:2006-04-15)

## 2 方法

### 2.1 制模方法

采用慢性束缚应激+ 过度疲劳+ 饮食失节的方法。实验前全部动物进行预游泳, 剔除游泳时间少于 10 分钟、大于 20 分钟的大鼠。

造模: 合格造模大鼠于每天上午 8:00 置于束缚盒中限制 3 小时, 下午 2:00 置于盛有温水(22±1℃)的大塑料桶中游泳 10 分钟。隔日喂食(隔日禁食, 隔日足量给食), 连续 3 周。自然恢复阶段: 于造模第 22 天开始, 停止上述造模因素, 自然饲养条件下观察。

### 2.2 分组处理

大鼠随机分为正常组和肝郁脾虚模型组(以下简称模型组), 每组 40 只。模型组动物按上述制模方法给予处理, 正常组动物不添加任何刺激, 自然饲养。于造模的第一、二、三、四周的前一天下午 8 点, 分别从两组中随机抽取大鼠 10 只, 禁食, 第二天大鼠断头取血 4ml 置于加入 0.3M EDTA·2Na 40μl 和抑肽酶 40μl 抗凝剂的试管中, 4℃, 3000rpm 15min, 取血浆, 待测 ACTH、CORT; 分离下丘脑, 称重后置于煮沸的生理盐水(1ml)中继续煮沸 3min, 再加 1N 的冰醋酸 0.5ml 于匀浆器中匀浆提取, 再用 1N NaOH 0.5ml 中和, 3000rpm 30min, 取上清液贮存于 -20℃ 以下待测 CRH。打开腹腔小心剥离肾上腺, 用滤纸吸去肾上腺上附带血液, 用电子天平称重。

### 2.3 指标观测

体重、肾上腺重量及肾上腺指数(组织重量/体重): 称量记录;

下丘脑 CRH、血浆 ACTH、CORT: 放免法, 按试剂盒说明操作。

### 2.4 数据统计学处理

所得数据均以士 S 表示, 用 SPSS 11.5 软件统计处理。先采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行检验, 后经多组间比较, 采用 Student-Newman-Keuls 检验。

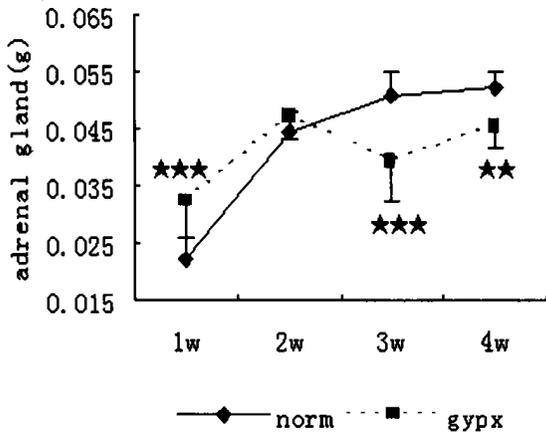


图 2-1 二组大鼠肾上腺重量的变化

Fig 2-1 Changes of weight of adrenal gland of GYPX rats on different time points

\*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001, compared with the relevant normal group(n= 10, each group);

图 2 不同造模时间大鼠肾上腺、肾上腺指数的变化

Figure 2 The changes of weight and index of the rats' adrenal glands at different making model time.

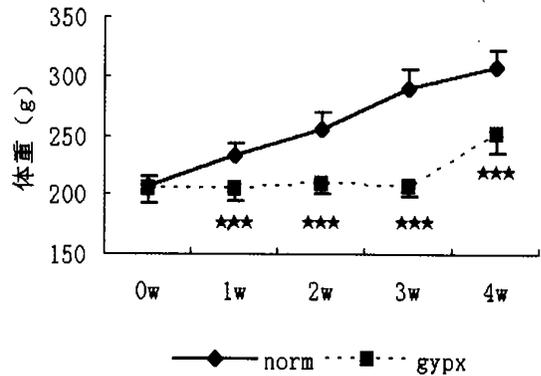
### 3.3 不同造模时间大鼠下丘脑 CRH、血浆 ACTH、CORT 的变化

结果见图 3。从图 3-1 中可以看出, 正常对照组大鼠下

## 3 结果

### 3.1 不同造模时间大鼠体重的变化

结果见图 1。从图 1 中可以看出, 正常组大鼠体重随着观察时间的延长而不断增加, 模型组大鼠体重在造模期间无明显变化, 自然恢复第四周显著增加。与正常对照组比较, 模型组大鼠体重实验观察的四个时间点均显著降低(P< 0.001)。



\*\*\*P< 0.001, compared with the relevant normal group(n= 10).

图 1 不同造模时间大鼠体重的变化

Figure 1 The changes of the rats' weight at different making model.

### 3.2 不同造模时间大鼠肾上腺重量及指数的变化

结果见图 2。从图 2-1 中可以看出, 正常对照组大鼠肾上腺重量在第二、三周显著增加, 第四周趋于平稳。与正常对照组比较, 模型组大鼠肾上腺重量在造模第一周即见显著升高(P< 0.001), 第二周与正常组接近(P> 0.05), 第三、四周显著低于正常组(P< 0.001 和 P< 0.01)。从图 2-2 中可以看出, 正常对照组和模型组大鼠的肾上腺指数均在第二周升高, 第三、四周恢复。与正常对照组比较, 模型组大鼠肾上腺指数在实验期间各观察点均显著升高(P< 0.01 和 P< 0.05)。

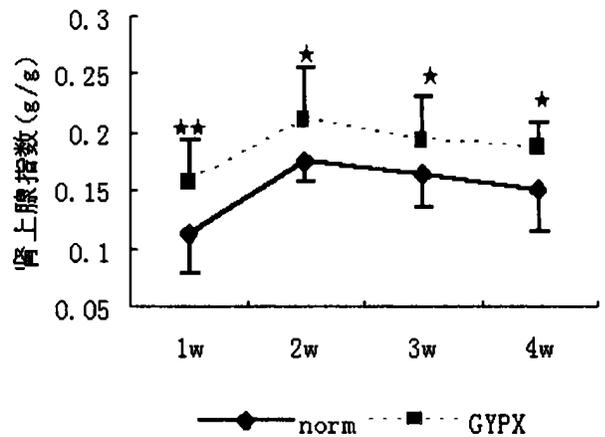


图 2-2 二组大鼠肾上腺指数的变化

Fig 2-2 Changes of index of adrenal gland of GYPX rats on different time points

周没有变化,第四周有所升高;模型组大鼠血浆 ACTH 变化趋势同正常组,但一、三、四周显著低于正常组( $P < 0.05$ )。从图 3-3 中可以看出,正常对照组血浆 CORT 于第二周下降,第三

周回升,第四周继续升高;模型组大鼠血浆 CORT 在实验各周变化不大,但第一、三、四周显著低于正常组( $P < 0.05$  和  $P < 0.001$ )。

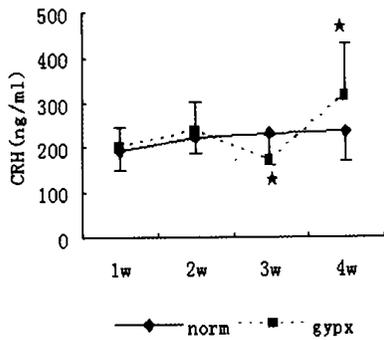


图 3-1 二组大鼠下丘脑 CRH 的变化

Fig 3-1 Changes of the CRH contents in hypothalamus of GYPX rats

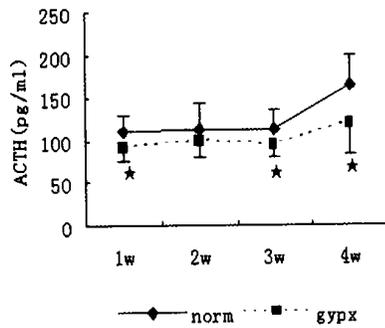


图 3-2 二组大鼠血浆 ACTH 的变化

Fig 3-2 Changes of the ACTH contents in plasma of GYPX rats

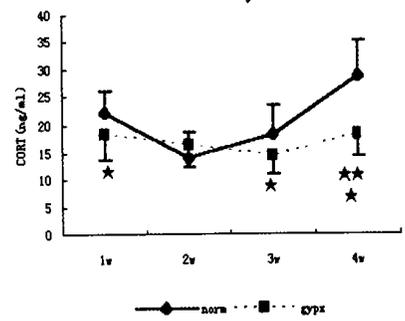


图 3-3 二组大鼠血浆 CORT 的变化

Fig 3-3 Changes of the CORT contents in plasma of GYPX rats

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , compared with the relevant normal group( $n = 10$ , each group);

图 3 不同造模时间大鼠 HPA 轴的变化

Figure 3 The changes of HPA axis of the rats at different making model time

### 4 讨论

我们曾根据中医发病学理论,运用复合因素造模法(慢性束缚应激+过度疲劳+饮食失节)复制出肝郁脾虚证大鼠模型。不少研究表明,肝郁脾虚证可能涉及到包括现代消化、神经、内分泌、免疫等多系统功能的异常<sup>[4]</sup>。为进一步了解该肝郁脾虚证大鼠模型的生物学特点,本文对模型复制中的大鼠 HPA 轴的变化进行了观察。

在正常生理状态下,肾上腺分泌的 GC 对下丘脑-垂体-肾上腺轴有负反馈抑制作用,但在慢性应激条件下,作为应激反应引爆激素的下丘脑 CRH 分泌过多,过量的 CRH 进一步导致垂体 ACTH 的分泌增多,最终造成 GC 分泌过多,过量的 GC 使 HPA 轴的负反馈机制失调,导致下丘脑 CRH、垂体 ACTH、肾上腺 GC 持续升高,表现为 HPA 轴功能持续亢进<sup>[5]</sup>。引起机体出现抑郁症、学习和记忆障碍、应激性精神紊乱、免疫力低下等等多系统的功能紊乱。本实验采用束缚加饮食失节和运动疲劳的复合方法处理大鼠三周,发现复制三周的模型大鼠肾上腺重量显著减轻,下丘脑 CRH、血浆 ACTH、CORT 均显著低于正常组,提示该法复制的肝郁脾虚证模型大鼠的 HPA 轴呈功能减低状态。这一结果不仅与通常单一束缚法复制肝郁模型所观察到的血浆 ACTH 明显增加<sup>[6-8]</sup>不同,也与利用不可预知的多种应激随机组合方法建立的肝郁模型大鼠血浆 ACTH 显著升高<sup>[9]</sup>等结果表现出的 HPA 轴的呈功能亢进状态不同。结果也提示不同的应激因子引起的应激效应不同,且有复合应激因子共同作用的效应机制可能比较复杂。

下丘脑、腺垂体、肾上腺皮质三者形成一个自动调节系统,血中 GC 浓度的变化可对下丘脑分泌的 CRH 和腺垂体分泌的 ACTH 具有负反馈调节作用,当血中 GC 和垂体 ACTH 浓

度降低时,下丘脑分泌 CRH 抑制作用解除而合成与分泌加强。本实验中观察到停止造模一周内,模型大鼠的上述指标均有一定程度的恢复,其中下丘脑 CRH 显著高于对照组,可能是对下丘脑对血浆 ACTH、CORT 降低的反馈性反应的结果;但此时的血浆 ACTH、CORT 仍明显低于对照组,反映了模型大鼠 HPA 轴中的垂体和肾上腺皮质对下丘脑 CRH 反应的迟滞,提示该模型中存在 HPA 轴调节功能的异常,垂对上位激素调节的反应能力减低可能是该模型的一个重要的生物学特征。已知免疫因子参与 HPA 轴的功能调节,如 IL-1、IL-6、TNF 均能激活或诱导下丘脑-垂体-肾上腺合成和释放 CRH、ACTH、CORT<sup>[10]</sup>。我们曾观察到该模型组血清 IL-1、IL-6、TNF 含量均较对照组降低(另文发表),推测该模型中存在内分泌-免疫的整体低下状态,而有关免疫因子的降低与 HPA 轴的功能降低密切相关。

值得提出的是,本实验中的模型大鼠肾上腺指数第一至第四周均高于对照组,这似与赵歆<sup>[11]</sup>等曾观察到的慢性束缚应激大鼠的肾上腺指数显著增加的结果一致,但本实验中大鼠的肾上腺重量在造模第一周增加,第三、四周显著降低,这显然与观察期间的模型组大鼠体重停止增加而正常组大鼠持续增长有关。进一步结合垂体 ACTH 和血浆 CORT 的变化情况,提示模型复制中肾上腺皮质功能先亢进后又转入抑制;结果还提示非正常生长条件下的肾上腺指数变化的意义可能不及其重量变化。

综上,采用慢性束缚+过度疲劳+饮食失节法复制肝郁脾虚证模型,连续造模三周,模型大鼠体重、肾上腺重量及指数、下丘脑 CRH、血浆 ACTH、CORT 发生显著变化,自然恢复一周后上述指标未见明显恢复。结果表明,该肝郁脾虚证模型大鼠存在 HPA 轴功能的降低及调节功能的紊乱。

(下转第 15 页)

## 2.5 LMC 对 A549 肺癌细胞周期的影响

与空白组相比, 100 $\mu$ mol/L 的 LMC 可显著地将 A549 肺癌细胞阻断在 G2/M 期, 并呈一定的剂量依赖性。如图 3 所示。

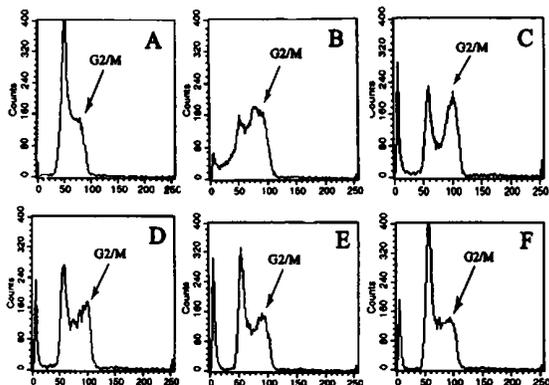


图 3 LMC 对 A549 肺癌细胞周期的影响。A: 空白; B: OPT, 40 $\mu$ mol/L; C: C: LMC, 100 $\mu$ mol/L; D: LMC, 50 $\mu$ mol/L; E: LMC, 25 $\mu$ mol/L; F: LMC, 12.5 $\mu$ mol/L; G2/M 期占总周期的百分比: A: 8.94%, B: 36.43%, C: 48.16%, D: 21.15%, E: 20.31%, F: 15.72%。

Fig. 3. Effect of LMC on A549 human lung cancer cells. A: control; B: OPT, 40 $\mu$ mol/L; C: LMC, 100 $\mu$ mol/L; D: LMC, 50 $\mu$ mol/L; E: LMC, 25 $\mu$ mol/L; F: LMC, 12.5 $\mu$ mol/L; The percentage of G2/M, A: 8.94%, B: 36.43%, C: 48.16%, D: 21.15%, E: 20.31%, F: 15.72%。

## 3 讨论

钒是许多生物有机体所必需的微量元素。近年来一些钒配合物证明具有抗癌活性<sup>[6]</sup>, 但确切机制仍不十分清楚, 因此也影响了高效低毒的钒配合物的研究开发。

我们的实验结果表明, 钒配合物 LMC 对不同来源的肿瘤

细胞株 BEL-740、A549 和 HeLa 均具有较强的抑制生长能力, 而对正常肝细胞几乎无影响, 表明其发挥作用的选择性较强, 流式细胞仪检测还发现 100 $\mu$ mol/L 的 LMC 能显著地将细胞周期阻断于 G2-M 期, 表明 LMC 对细胞生长还具有周期抑制性。

我们的研究还发现, LMC 对 Topo- I 有较强的抑制作用。Topo- I 是一种单链的核酸内切酶和连接酶, 喜树碱的衍生物 OPT 是典型的 Topo- I 抑制剂。实验中发现 LMC 对 Topo- I 具有明显的抑制作用, 且作用强于 OPT, 其深入的分子机制值得进一步研究。

综合我们的研究表明, 钒配合物 LMC 具有抑制肿瘤细胞的作用, 其机制与有较强的 Topo- I 抑制作用有关。该研究为 LMC 进一步开发成新的非铂类抗肿瘤药物奠定了基础, 其新的作用机制也为金属配合物的抗肿瘤研究提供了新视野。

## 参考文献

- [1] Krishnan P, Bastow KF. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives alaphalone and beta-lapachone [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 47(3): 187~98
- [2] POMMIER Y. Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors [J]. *Biochimie*, 1998, 80(3): 255~70
- [3] Beachesne B, Bonner M, Brunon J. Sensitivity to epoxide of human malignant glioma cell lines [J]. *Cancer Radiother*, 1999, 3(1): 57~64
- [4] J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔. 上册. 第三册. 北京. 分子克隆实验指南[M]. 科学出版社, 2003: 32~36
- [5] 蒋超, 卿晨, 蒙凌华, 等. 灵芝提取物对 DNA 拓扑异构酶的抑制作用及诱导 K562 细胞凋亡[J]. *癌症*, 1999, 18(6): 661~67
- [6] Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, 42(3): 249~65

(上接第 12 页)

## 参考文献

- [1] 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[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2004, 12(4): 220
- [2] 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[J]. *湖北中医杂志*, 2003, 25(11): 7
- [3] 周永生, 樊雅莉, 陈小野, 等. 观察脾气虚证动物模型规范化的初步研究<sup>4/4</sup>部分免疫功能方面[J]. *实验动物科学与管理*, 2003, 20(2): 1
- [4] 罗国钧, 罗海琳. 慢性肝病肝郁脾虚证的研究进展[J]. *山西中医*, 2001, 17(3): 57
- [5] 王子梅. ACTH 激素分泌调节新进展[J]. *国外医学内分泌学分册*, 1994, 14(4): 171
- [6] Zachariassen RD. Phenylethanolamino- N-methyl transference acting in

the avian adrenal following immobilization or adreno- corticotropin[J]. *Endocrinol*, 1974, 23:193

- [7] Bousquet WF, Miya TS. Modification of stress response in histamine depleted rats[J]. *Brain. Res. J. Pharmacol*, 1996, 27: 177
- [8] Kwenqsky, Mikulazl. Adrenal and urinary catecholamine in rats during adaptation to repeated immobilization stress[J]. *Endo- crinol*, 1970, 87: 738
- [9] 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
- [10] 路翠艳, 潘芳. 应激反应中 HPA 轴的中枢调控和免疫调节[J]. *中国行为医学科学*, 2003, 12(3): 353
- [11] 赵歆, 陈家旭, 杨建新, 等. 疏肝中药复方对慢性束缚应激大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节[J]. *实验动物科学与管理*, 2003, 20(2): 6