

· 药理 ·

方剂反证在构建病证结合动物模型中的作用 ——以逍遥散反证抑郁症肝郁脾虚证为例

李玉波¹, 于眉², 李君玲³, 郝改梅¹, 梁媛¹, 翟志光¹, 李志更¹, 贾海骅¹, 苗青^{1*}, 王伟^{4*}

(1. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700; 2. 北京航天总医院, 北京 100076;
3. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 4. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的:通过方剂反证寻找病证结合动物模型的证候稳定时间窗,并验证证候的稳定可靠性。方法:采用慢性不可预知温和应激(CUMS)法并通过体质量测量、糖水消耗实验、行为学实验、脑组织5-羟色胺(5-HT)检测建立大鼠抑郁症模型,通过人类临床症状等效转化为大鼠宏观表征等方法来进行大鼠的肝郁脾虚证的证候判别,基于宏观表征动态采集量表用逍遥散反证抑郁症肝郁脾虚证病证结合动物模型的稳定可靠性。结果:大鼠16周龄时,CUMS组(应激8周)大鼠糖水消耗量、旷场实验穿梭次数和活动总距离均明显低于正常组($P<0.05$);免疫组化结果显示,CUMS组大鼠脑组织海马CA2区5-HT含量也明显低于正常组($P<0.05$),说明抑郁症疾病的模型制作成功。CUMS组大鼠肝郁脾虚证出现于14周龄(应激后6周),16周龄(应激后8周)时数量达到最大值占比约70%,往后数量逐渐下降。方剂反证CUMS组14,16,18,20,22周龄大鼠证候积分分别减少66.6%,70.7%,54.8%,50.4%,44.8%,证候疗效分别为有效、显效、有效、有效、有效。结论:CUMS组大鼠14~16周龄即CUMS 6~8周是抑郁症肝郁脾虚证稳定可靠的时间窗。

[关键词] 方剂反证; 病证结合; 动物模型; 抑郁症; 肝郁脾虚

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R2-031;R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0044-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212391

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211015.2138.008.html>

[网络出版日期] 2021-10-18 14:24

Role of Counterevidence from Chinese Medicinal Prescription in Construction of Integrated Disease-syndrome Animal Model: Xiaoyaosan as Counterevidence for Depression of Liver Depression and Spleen Deficiency Syndrome

LI Yu-bo¹, YU Mei², LI Jun-ling³, HAO Gai-mei¹, LIANG Yuan¹, ZHAI Zhi-guang¹,

LI Zhi-geng¹, JIA Hai-hua¹, MIAO Qing^{1*}, WANG Wei^{4*}

(1. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine (TCM),
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China;

3. School of TCM, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

4. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[收稿日期] 20210728(005)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81603417);中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人才(创新类)培养专项(ZZ13-YQ-071);中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(YZ1874)

[第一作者] 李玉波,博士,副研究员,从事情志病、生殖类疾病的中医基础与临床研究,Tel:010-64089032,E-mail:liyubo123456@126.com

[通信作者] *苗青,博士后,助理研究员,从事中医方证基础研究,Tel:010-64089019,E-mail:mmdj2013@126.com;

*王伟,博士,教授,博士生导师,从事中西医结合治疗心血管病、糖尿病并发症的机制与新药研究;心血管病的证治规律研究,Tel:020-39358233,E-mail:wangwei@gzucm.edu.cn

[Abstract] Objective: To seed for stable time window of the integrated disease-syndrome animal model based on the counterevidence from Chinese medicinal prescriptions, and to verify syndrome stability and reliability. **Method:** A model of depression was established by exposing rats to chronic unpredictable mild stress (CUMS), followed by body weight measurement, sugar water test, behavioral test, and brain 5-hydroxytryptamine (5-HT) detection. The identification of liver depression and spleen deficiency syndrome was conducted after the equivalent transformation of human clinical symptoms into macroscopic representations of rats. Based on the dynamically collected macroscopic representation scale, Xiaoyaosan was used to reversely verify the stability and reliability of the integrated disease-syndrome animal model of depression due to liver depression and spleen deficiency. **Result:** The sugar water consumption and the number of crossings and the total movement distance in the open field test of 16-week-old rats in the CUMS (eight weeks of CUMS) group were significantly lower than those in the normal group ($P<0.05$). According to the immunohistochemical results, the 5-HT content in hippocampal area CA2 of rats in the CUMS group was also significantly lowered as compared with that in the normal group ($P<0.05$), which indicated that depression was successfully modeled. The liver depression and spleen deficiency syndrome was present in 14-week-old rats (six weeks after CUMS) of the CUMS group, and the number of rats experiencing the liver depression and spleen deficiency syndrome reached the peak in the 16th week (eight weeks after CUMS), accounting for 70% of the total number. Thereafter, the number decreased gradually. The syndrome scores of the 14-, 16-, 18-, 20-, and 22-week-old rats in the Xiaoyaosan group were reduced by 66.6%, 70.7%, 54.8%, 50.4%, and 44.8%, which were graded as effective, marked effective, effective, effective, and effective, respectively. **Conclusion:** The age of 14-16 weeks (six to eight weeks after CUMS) is considered the stable and reliable time window for depression due to liver depression and spleen deficiency.

[Keywords] counterevidence from Chinese medicinal prescription; integrated disease-syndrome; animal model; depression; liver depression and spleen deficiency

病证结合动物模型是在疾病模型下依据动物的症状和体征来筛选出相应证候的一种复合动物模型。当前,病证结合动物模型的制作方法^[1]主要有两种,一种是同时或先后^[2-5]施加“病”的因素和“证”的因素;一种是只施加“病”的因素,然后根据症状辨证论治得出证候^[6]。“十二五”规划教材《中医基础理论》中写到“证候是疾病过程中一定阶段的病位、病因、病性、病势及机体抗病能力的强弱等本质有机联系的反应状态。”由此可以看出,证候的重点在于“疾病过程中一定阶段”,因此,一种造模方法更符合真实的证候状态。由此也引发出病证结合动物模型的评价问题,目前评价的方法主要有两种:正向评价和反向评价。正向评价包括从动物模型的宏观体征及行为表现来判定^[7-9],从一些与证候相关的理化指标判定^[10]等,反向评价包括从中药药物的反证法来判定^[11-12]等。正向评价存在一定的主观性与模糊性^[13],反向评价的实质是“以方测证”^[14-15],评价中两者往往结合使用。

然而,课题组前期研究发现,病证结合动物模型中的证候是存在“真实时间窗”的,即证候是会随

着疾病的进程而发生变化的,在发生明确变化前通过正向评价仍然为该证候,但是反向评价却发现该证候已不稳定,因此,研究证候是否稳定可靠是决定病证结合动物模型质量的关键。本研究以抑郁症肝郁脾虚证为例,采用方剂反证来评价动物证候模型的稳定可靠性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 本实验需重复6次,共需420只大鼠,每一次实验的动物及分组为SPF级6周龄SD雄性大鼠70只,体质量(200±10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产合格证号SCXK(京)2016-0011。饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心清洁级动物房饲养,饲养温度(24±2)℃,湿度45%~60%,12/12h昼夜规律喂养。所有大鼠先常规饲养2周,然后随机分为CUMS组(60只)和正常组(10只)2组。动物实验严格遵照中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验伦理规定(伦理委员会审查编号2017-043)。

1.2 试剂与仪器 逍遥散配方为柴胡15g,当归

15 g,白芍 15 g,白术 15 g,茯苓 15 g,生姜 15 g,薄荷 6 g,炙甘草 6 g。根据配方中每味药的剂量,委托北京康仁堂药业有限公司[药品生产(经营)许可证号为京 20150032;药品生产质量管理规范(GMP),药品经营质量管理规范(GSP)证书编号为BJ20130042]按 2015 年版《中华人民共和国药典》四部通则 0104 颗粒剂的标准,将该处方制作成“全成分”混悬颗粒,生产批号 17019101。此中药配方颗粒由康仁堂质量总监周晓艳药师鉴定,符合 2015 年版《中华人民共和国药典》相关规定。

一抗小鼠抗大鼠 5-羟色胺(5-HT)单克隆抗体由(美国 Santa Cruz 公司,批号 J2017-2553);二抗为通用型二抗,免疫组化检测试剂盒[基因科技(上海)有限公司,批号分别为 G2017-6694, G2017-7568];苏木素、伊红染液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20170352,20170867)。

3-18K 型 4 °C 离心机(美国 Sigma 公司);Value Plus 型 -80 °C 超低温冰箱(美国 Thermo 公司);4 °C 冰箱(中国海尔集团公司);Image-Pro Plus Version 5.0 型图像分析仪(美国 IPP 公司);Casmitch 型比色卡(日本 BEAR Medic 公司);旷场实验箱,采用国际通用标准订制旷场实验箱高为 40 cm,底边长为 80 cm,内壁均匀涂黑,场箱底面平均分为 25 个 16 cm×16 cm 的小方格,正上方 2.5 m 处固定摄像头(视野覆盖整个旷场箱);EthoVision 3.1 型动物行为记录分析系统(荷兰 Noldus 公司)。

1.3 抑郁症疾病模型制备

1.3.1 慢性不可预知温和应激(CUMS)抑郁模型制备 CUMS 所采用的应激方式有禁食禁水 24 h/次,鼠笼倾斜 30°8 h 或过夜/次,潮湿饲养 8 h 或过夜/次,4 °C 冰水游泳 5 min/次,45 °C 热烘 5 min/次,束缚 2 h/次,夹尾 1 min/次(使用止血钳夹在距离大鼠尾根 1 cm 处,使大鼠发出哀叫即可),36 V 电击 1 min 间隔 30 s 共 30 次/次,采用随机数字表法每日随机予 3 种应激。从大鼠 8 周龄开始,持续 14 周。

1.3.2 糖水消耗实验 各组大鼠从 6 周龄开始,每 2 周进行 1 次实验。实验前禁食、禁水 24 h;然后,每笼放置 2 只装有 1% 蔗糖水的小瓶(100 mL),24 h 后换为每只大鼠 100 mL 蔗糖水和 100 mL 纯水,1 h 后取走此 2 瓶并称质量,计算糖水消耗量(mL)。

1.3.3 行为学测定 旷场实验:实验装置由旷场反应箱和记录分析系统两部分组成。大鼠旷场反应箱高 35 cm,底边为正方形,边长 100 cm,内壁涂黑,底面平均分为 25 个 4 cm×4 cm 小方格,旷场正上方

2 m 处架一数码摄像头,其视野可覆盖整个旷场内部。实验时将大鼠放置于清洁敞箱中央,用小动物行为记录分析系统(Smart 1.0, Panlab 公司)录像,每次录像时间为 3 min,然后计算大鼠穿格次数和活动总距离。各组大鼠从 8 周龄开始,每间隔 4 周予旷场实验 1 次。

1.3.4 取材处理 本实验需重复 6 次,在其中 1 次实验中,对 8 周龄(CUMS 组尚未开始应激)和 12 周龄(CUMS 组应激后 4 周)眼眶取血 3 mL。16 周龄(CUMS 组应激后 8 周)时经 10% 水合氯醛麻醉,腹腔取血 5 mL,然后直接在冰上迅速取出全脑,置入 4% 多聚甲醛中,固定 48 h 后石蜡包埋,截面为前凶后 3.80 mm,对耳线 5.20 mm。

1.3.5 免疫组织化学法检测脑组织和小肠组织中 5-HT 的表达 将备用石蜡切片预热后脱蜡、梯度乙醇脱水,微波修复 6 min 后,待切片冷却至室温后浸入 0.3% H₂O₂ 封闭液 15 min,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 5 min×3 次,分别滴加 5-HT 一抗(1:1 000),置湿盒中 4 °C 孵育过夜;滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:200)置于湿盒中室温孵育 1 h, DAB 显色,苏木素复染,脱水透明后封片。阴性组用 PBS 代替一抗进行孵育,其余步骤同前。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析,每只大鼠选 1 张脑切片,在 200 倍光镜下随机选取海马周围 6 个不重叠视野,分析指标为平均积分吸光度 IA。

1.4 肝郁脾虚证候模型的建立

1.4.1 证候属性判别 根据《中药新药临床研究指导原则(2002 版)》^[16],将抑郁症临床症状等效转化为大鼠宏观表征,以实现临床证候和大鼠证候的一致性。肝郁脾虚证临床证候诊断标准为具备主证 3 项(胃脘或胁肋胀痛必备)或主证 2 项(胃脘或胁肋胀痛必备),次证 2 项,大鼠证候判别采用相同的标准(抓取反抗激烈必备)。抑郁症临床症状等效转化大鼠宏观表征见表 1。

1.4.2 舌色 RGB 值采集 干预开始后,每 2 周采集 1 次大鼠舌、爪部位的图像。拍摄在暗室内完成,采用日光灯顶棚照明方式,具体过程为由 1 名实验员一手抓持清醒状态下大鼠并固定其头颈部,另一手持比色卡,然后由另一名实验员用照相机拍摄。拍摄时尽量保证大鼠舌、爪与比色卡处于同一水平面,拍摄速度尽量迅速均匀,以避免抓持过久导致舌、爪出现瘀血现象。

图像分析方法:采用 Adobe Photoshop 7.0 对图像进行分析,首先按照 Casmitch 比色卡说明书,对

表1 抑郁症临床症状等效转化大鼠宏观表征

Table 1 Macro characterization of rats with equivalent transformation of clinical symptoms of depression

项目	主证	次证
临床四诊信息	①胃脘或胁肋胀痛、腹胀;②食少纳呆;③便溏不爽	①情绪抑郁或急躁易怒,善太息;②肠鸣矢气、腹痛即泄,泻后痛减;③舌苔白或腻
大鼠宏观表征	①抓取反抗激烈;②体质量增长缓慢、糖水偏嗜程度降低;③大便稀溏	①行为学评价;②拉尾排便次数增加;③舌色RGB值中R值变化不明显或舌体多津

注:RGB指光学三原色,R.红,G.:绿,B.蓝。

所有图像进行归一化处理,然后设定色阶,黑色为L:22,a:0,b:0(L表示黑白,a表示红绿,b表示黄蓝);白色为L:93,a:0,b:0;灰色为L:58,a:0,b:0。分析每张图片时,首先将黑、白、灰色阶值设为图片标准比色卡中的阶值,然后用矩形工具,根据比色卡上的尺寸选取爪部和舌体面积大小固定的位置,最后应用“直方图”工具,计算选定区域的R,G,B值,并计算 $r[r=R/(R+G+B)]$, $g[g=G/(R+G+B)]$, $b[b=B/(R+G+B)]$ 的值。最后将数据录入Excel表格作进一步的统计分析。

1.5 方剂反证抑郁症肝郁脾虚证病证结合动物模型的稳定可靠性

1.5.1 给药方式及途径 人(60 kg)与大鼠(0.2 kg)间用药剂量折算系数为6.25,按照成人(60 kg)每天的用药剂量(柴胡15 g,当归15 g,白芍15 g,白术15 g,茯苓15 g,生姜15 g,薄荷6 g,炙甘草6 g)转化为1 kg大鼠1 d的原始剂量为柴胡1.562 5 g,当归1.562 5 g,白芍1.562 5 g,白术1.562 5 g,茯苓1.562 5 g,生姜1.562 5 g,薄荷0.625 g,炙甘草0.625 g。根据每味中药免煎颗粒剂量与原始剂量之间的换算关系,按照每只大鼠体质量分别称取柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷、炙甘草免煎颗粒若干,混合后用4 mL无菌水溶解。

本实验需重复6次,其中5次实验对CUMS组肝郁脾虚证大鼠分别在14周龄(应激6周),16周龄(应激8周),18周龄(应激10周),20周龄(应激12周),22周龄(应激14周)予逍遥散灌胃。

1.5.2 填写宏观表征动态采集量表 根据《中药新药临床研究指导原则(2002版)》^[16]中肝郁脾虚证证候疗效判定标准,制订抑郁症肝郁脾虚证大鼠宏观表征采集量表,聘请3名专人对抑郁症肝郁脾虚证每1只大鼠进行一般状态(精神状态、活动度等)、舌(舌体、舌色等)、耳、爪(血管数量等)、毛(颜色、润泽度等)、大小便(颜色等)等多项症状体征进行判别(量表详见附录),并进行证候积分,整个过程采用分数盲法,即判别者背靠背且不知道每项对应的

积分。证候疗效判定标准为①临床痊愈:肝郁脾虚证的临床症状、体征消失或基本消失,证候积分减少 $\geq 95\%$;②显效:肝郁脾虚证的临床症状、体征明显改善,证候积分减少 $\geq 70\%$;③有效:肝郁脾虚证的临床症状、体征均有好转,证候积分减少 $\geq 30\%$;④无效:肝郁脾虚证的临床症状、体征均无明显改善,甚或加重,证候积分减少不足30%。

1.6 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件对数据进行分析,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示,两因素析因设计资料采用方差分析(ANOVA)和最小显著性差异法(LSD), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑郁症疾病模型

2.1.1 对体质量的影响 8周龄和10周龄两组大鼠体质量差异无统计学意义。与正常组比较,CUMS组大鼠从第14周龄体质量开始明显降低($P<0.05$),并一直持续至16周龄($P<0.05$)。见表3。

2.1.2 对糖水消耗的影响 8~10周龄时两组大鼠大鼠蔗糖水消耗量差异无统计学意义。与正常组比较,CUMS组大鼠从第12周龄开始蔗糖水消耗量明显降低,并一直持续至16周龄($P<0.05$)。见表4。

2.1.3 对行为学的影响 旷场实验结果显示,8周龄时CUMS组大鼠穿格次数和活动总距离与正常组比较差异无统计学意义;从第12周龄开始,CUMS组大鼠穿格次数和活动总距离明显低于正常组($P<0.05$)。见表5。

2.1.4 对舌体R值的影响 正常组大鼠各时间点舌体R值差异无统计学意义。与正常组比较,CUMS组大鼠舌体R值在10周龄(应激2周)明显升高($P<0.05$),12周龄(应激4周)舌体R值有所下降,但是仍高于正常组($P<0.05$),14周龄(应激6周)舌体R值下降至正常水平,与正常组比较差异无统计学意义,一直持续至16周龄(应激8周)。见表6。

2.1.5 对脑组织中5-HT表达的影响 16周龄CUMS组大鼠脑组织海马CA2区5-HT IA为

表2 抑郁症大鼠宏观表征采集量表

Table 2 Macro characterization collection scale of depression rats

项目		评分		
状态	精神状态	神疲(2分)	正常(1分)	兴奋(0分)
	活动度	减少(2分)	正常(1分)	增加(0分)
	抓取反抗	基本无反抗(0分)	有轻微反抗(1分)	反抗剧烈攻击咬人(2分)
	是否扎堆	各自爬卧(2分)	两三只聚在一起(1分)	全部聚拢在一起(0分)
舌	舌体	瘦(0分)	适中(1分)	胖大(2分)
	舌色	暗红(1分)	淡红(2分)	鲜红(0分)
	润泽度	少津干燥(0分)	润(1分)	湿滑(2分)
唇	唇色	暗红(1分)	淡红(2分)	鲜红(0分)
耳	瘀点	无(0分)	有,需仔细辨认(1分)	明显,一见即得(2分)
	肉眼见血管数量	无(2分)	有1~2个(1分)	有3个以上(0分)
毛	颜色	白(0分)	白中少有黄色(1分)	满目皆黄色(2分)
	润泽度	干枯(2分)	柔顺(1分)	湿滑(0分)
	竖起	无竖起(0分)	颈部竖起(1分)	全身竖起(2分)
爪	颜色	暗红(1分)	淡红(2分)	鲜红(0分)
	润泽度	干涩或脱屑(2分)	适中(1分)	湿润(0分)
	肉眼见血管数量	无(2分)	有1~2个(1分)	有3个以上(0分)
尾	角化	无角化(0分)	轻度角化(1分)	中度角化(2分)
小便	每次尿量	少(2分)	中等(1分)	多(0分)
	尿的频率	减少(0分)	无明显变化(1分)	增加(2分)
大便	硬度	成型,硬(0分)	成型,松软(1分)	不成型(2分)
	颜色	淡黄色(2分)	深黄色(1分)	褐色(0分)
	拉尾排便率	减少(0分)	无明显变化(1分)	增加(2分)

表3 CUMS造模对两组大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of CUMS modeling on body mass in two groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

g

组别	n	8周龄(应激前)	10周龄(应激2周)	12周龄(应激4周)	14周龄(应激6周)	16周龄(应激8周)
正常	10	378.28±24.48	431.48±31.21	495.01±25.43	548.09±33.84	588.17±45.33
CUMS	60	375.65±25.10	420.01±34.25	469.22±32.98	493.93±30.78 ¹⁾	507.21±44.02 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05(图4~7同)。

表4 CUMS造模对两组大鼠蔗糖水消耗量的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of CUMS modeling on sucrose water consumption in two groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

mL

组别	n	8周龄(应激前)	10周龄(应激2周)	12周龄(应激4周)	14周龄(应激6周)	16周龄(应激8周)
正常	10	90.83±3.87	84.40±6.91	87.16±11.74	85.32±14.73	88.07±10.93
CUMS	60	89.01±2.89	79.98±9.36	67.89±10.22 ¹⁾	47.71±13.14 ¹⁾	28.44±8.89 ¹⁾

表5 CUMS造模对两组大鼠行为学的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of CUMS modeling on behavior in two groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	大鼠穿格次数/次/3 min			大鼠活动总距离/mm·(3 min) ⁻¹		
		8周龄	12周龄	16周龄	8周龄	12周龄	16周龄
正常	10	71.83±6.68	73.50±7.34	69.83±6.34	1 635.21±130.87	1 208.27±120.42	883.15±74.07
CUMS	60	76.08±6.34	17.17±2.98 ¹⁾	6.75±2.38 ¹⁾	1 611.25±105.51	371.82±26.95 ¹⁾	238.01±33.77 ¹⁾

表6 CUMS造模对两组大鼠舌体R值的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effect of CUMS modeling on R value of tongue in two groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

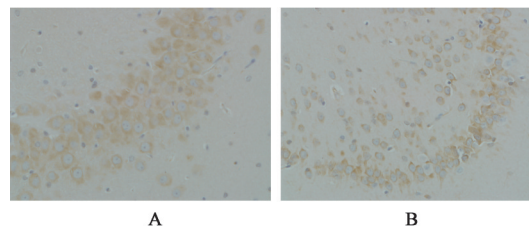
组别	n	8周龄(应激前)	10周龄(应激2周)	12周龄(应激4周)	14周龄(应激6周)	16周龄(应激8周)
正常	10	86.10±13.25	88.65±11.56	84.21±14.74	87.62±12.20	82.47±18.10
CUMS	60	88.79±15.91	117.51±22.36 ¹⁾	96.67±24.54 ¹⁾	87.44±11.49	80.12±12.93

196.78±44.10,正常组IA为497.49±149.56,CUMS组明显低于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1。

2.2 肝郁脾虚证候模型

2.2.1 证候判别结果 CUMS组大鼠肝郁脾虚证出现于14周龄(应激后6周),16周龄(应激后8周)时数量达到最大值,往后数量逐渐下降。见表7。

2.2.2 方剂反证抑郁症肝郁脾虚证病证结合动物模型的稳定可靠性 研究结果显示,CUMS组14,16,18,20,22周龄大鼠证候积分分别减少66.6%,70.7%,54.8%,50.4%,44.8%,按照《中药新药临床研



注:A.空白组;B.CUMS组

图1 对两组大鼠海马CA2区5-HT表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 1 Effect on expression of 5-HT in hippocampal CA2 region in two groups of rats (IHC, ×200)

究指导原则(2002版)》,证候疗效分别为有效、显效、有效、有效、有效。见表8。

表7 两组大鼠证候判别结果

Table 7 Discrimination results of traditional Chinese medicine syndromes in two groups of rats

组别	n	12周龄	14周龄	16周龄	18周龄	20周龄	22周龄
正常	10	-	-	-	-	-	-
CUMS	60	-	21.0%肝郁脾虚证	70.0%肝郁脾虚证	66.7%肝郁脾虚证	53.3%肝郁脾虚证	48.3%肝郁脾虚证

注:“-”表示未出现肝气郁结证、脾气虚证和肝郁脾虚证。

表8 两组大鼠宏观表征采集量表积分结果($\bar{x}\pm s$)

Table 8 Integration results of macro characterization collection scale of two groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	时间	方剂反证前	方剂反证后
CUMS	12	14周龄	38.99±5.01	13.01±9.57
		16周龄	38.37±5.56	11.25±9.20
		18周龄	42.87±12.52	19.36±10.44
		20周龄	40.33±7.59	20.01±11.98
		22周龄	39.60±11.75	21.85±10.96

注:CUMS组干预前(n=60)宏观表征采集量表积分为(2.86±0.56)分

3 讨论

大鼠16周龄时,CUMS组(应激8周)大鼠糖水消耗量、旷场实验穿格次数和活动总距离均明显低于正常组;免疫组化结果显示,CUMS组大鼠脑组织海马CA2区5-HT含量也明显低于正常组,说明抑郁症疾病的模型制作成功。

大鼠证候属性判别是存在主观性系统误差的,方剂反证的目的就是为了减少这种系统误差。从实验结果来看,CUMS组14周龄大鼠证候积分虽然不足70%,但是已经很接近70%显效的标准,16周龄时是显效,到18周龄时明显低于70%了,课题组

将显效作为证候稳定可靠的标准,因此课题组认为CUMS组大鼠14~16周龄即CUMS6-8周是抑郁症肝郁脾虚证稳定可靠的时间窗。CUMS组14周龄大鼠只有21.4%出现肝郁脾虚证,这也反映出病证结合动物模型的稳定可靠性与符合证候判别大鼠的数量无关。

逍遥散是宋代《太平惠民和剂局方》名方,脱胎于张仲景四逆散、当归芍药散之法。其源流概括为渊源于汉代,成方于宋代,充实于明清,发展于现代。逍遥散为肝郁血虚,脾失健运之证而设。本方既有柴胡疏肝解郁,又有当归、白芍养血柔肝,尤其

当归之芳香可以行气,味甘可以缓急,更是肝郁血虚之要药,白术、茯苓健脾去湿,使运化有权,气血有源。炙甘草益气补中,缓肝之急,虽为佐使之品,却有襄赞之功,生姜烧过,温胃和中之力益专,薄荷少许,助柴胡疏肝郁而生之热,如此配伍既补肝体,又助肝用,气血兼顾,肝脾并治,立法全面,用药周到,故为调和肝脾之名方^[17-18]。

为了确定逍遥散反证抑郁症肝郁脾虚证的特异性,课题组前期研究还使用了柴胡疏肝散反证了抑郁症肝郁脾虚证,并与逍遥散对比,发现使用柴胡疏肝散方剂反证前后大鼠宏观表征采集量表积分的差值显著低于使用逍遥散时,且具有统计学意义^[19],其疗效无显著,只有有效和无效,说明柴胡疏肝散对改善抑郁症肝郁脾虚证的疗效低于逍遥散。

综上所述,逍遥散方剂反证肝郁脾虚证是合适的,但是,并不是所有的证候都能有相应的经典方剂去反证,这是方剂反证在病证结合动物模型应用的局限性。对于现存且公认的经典方剂和对应证候应该努力去挖掘,充分利用经典方剂去反证证候的稳定可靠性。稳定可靠的证候时间窗是病证结合动物模型制备成功的关键,有利于后续中医药研究的开展。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 钟森杰,李静,李琳,等. 病证结合动物模型研究思路述评[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(8): 141-144.
- [2] 黄越燕. 病证结合动物模型的研究现状与思考[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(10): 1459-1462.
- [3] 曾梅艳,宋厚盼,陈小娟,等. 基于方证对应理论探讨脾胃虚寒型DU病证结合大鼠模型构建及模型评价的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(10): 2540-2544.
- [4] 肖青青,高静,柏丁兮,等. 基于“病证结合”理论探讨广泛性焦虑心阴亏虚证大鼠模型的构建与评价[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(4): 832-837.
- [5] 徐攀,许海顺,陈京,等. 慢性心力衰竭心阳虚证大鼠模型的建立与评价研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(8): 1957-1960.
- [6] 梁茂新,范颖. 中医证和病证结合动物模型研制的利

- 弊与症结[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(7): 1656-1664.
- [7] 买鹏宇,徐楠,朱闽,等. 前列消汤对EAP湿热证模型前列腺内NF- κ B表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(8): 128-132, 271-272.
- [8] 曾梅艳,宋厚盼,陈小娟,等. 基于以方测证理论探讨脾胃虚寒型十二指肠溃疡实验模型的构建及模型评价研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(1): 183-188.
- [9] 史大卓,陈可冀. 冠心病及急性心肌梗死中医临床辨证标准及防治指南[M]. 北京:人民卫生出版社, 2014.
- [10] 郭文鹤,黄娜娜,张晓亮,等. 动脉粥样硬化(气滞血瘀证)病证结合大鼠模型的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 32-41.
- [11] 郭春荣,施旻昱,庄怡娴,等. 基于以方测证的肾阳虚哮喘大鼠模型建立与评价研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4715-4718.
- [12] 李依洁,苏晓兰,杨晨,等. 脾肾阳虚型肠易激综合征大鼠模型的建立与评价[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(8): 950-954.
- [13] 赵慧辉,郭书文,王伟. 病证结合动物模型判定标准的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(6): 365-367, 373.
- [14] 卢林竹,胡志希,李琳,等. “以方测证”法在动物模型研究中的运用[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(5): 570-573.
- [15] 李涵,孙杨,张晓雨,等. 以证统病——中医临床思维的回归与创新[J]. 世界中医药, 2019, 14(10): 2552-2556, 2562.
- [16] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002: 361-364.
- [17] 蓝敏敏,张铮,郑于林,等. 逍遥散对肝郁脾虚型抑郁症大鼠模型行为学和学习记忆的影响[J/OL]. 辽宁中医杂志, 2021, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1128.R.20210705.1044.004.html>.
- [18] 王冰,陈红凤. 逍遥萎贝汤加减配合中医情志疗法治疗乳腺增生的疗效[J]. 世界中医药, 2020, 15(16): 2466-2469.
- [19] 李玉波. 抑郁症肝郁脾虚证大鼠模型的建立及其生物学基础研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.

[责任编辑 王鑫]