

# 柴胡疏肝散对肝郁证大鼠血清 MOT 以及 ICC-DMP 细胞的影响

张晓龙, 孙丽霞\*, 张茜, 汤皓  
(南京中医药大学, 南京 210046)

**[摘要]** **目的:**研究柴胡疏肝散对肝郁证模型大鼠血清胃动素(MOT)以及胃肠道 Cajal 间质细胞深肌丛(ICC-DMP)的影响。**方法:**选取 50 只清洁级 SD 大鼠,随机分为正常组、造模组、柴胡疏肝散高、低剂量组(21.0, 10.5 g·kg<sup>-1</sup>, ig)、吗丁啉组(10 mg·kg<sup>-1</sup>, ig),每组 10 只。除空白组,其余 4 组均采用慢性应激刺激造模法进行为期 3 周的造模。造模后,按各组剂量每天 10 mL·kg<sup>-1</sup> ig 给药 2 周,空白组及造模组均 ig 给以等体积生理盐水。观察体重及强迫游泳不动时间的改变,酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血清 MOT 的水平,并在电镜下观察 ICC-DMP 的变化。**结果:**与正常组比较,造模后模型组大鼠体重均明显减轻;强迫游泳不动时间明显延长( $P < 0.05$ );MOT 分泌明显减少( $P < 0.05$ )。给药后,与模型组比较,柴胡疏肝散能显著减少强迫游泳不动时间( $P < 0.05$ );显著升高血清 MOT 水平( $P < 0.05$ ),电镜观察 ICC-DMP,其结构和功能也有明显改善。**结论:**柴胡疏肝散具有促进胃肠道动力作用,其机制可能与其调节肝郁大鼠血浆 MOT 的水平以及调节 ICC-DMP 数量及功能有关。

**[关键词]** 柴胡疏肝散;慢性不可预知应激;肝郁证;胃动素;Cajal 间质细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0163-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200163

## Effect of Chaihu Shugan San on Serum MOT and ICC-DMP in Rat with Liver Depression Syndrome

ZHANG Xiao-long, SUN Li-xia\*, ZHANG Qian, TANG Hao (Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Chaihu Shugan San (CHSGS) on serum motilin (MOT) and interstitial cells of Cajal-deep muscular plexus (ICC-DMP) in model rats with liver depression syndrome. **Method:** All 50 SD rats were randomly divided into 5 groups: normal group, model group, the high and low dose groups of CHSGS (21.0, 10.5 g·kg<sup>-1</sup>, ig), and domperidone group (10 mg·kg<sup>-1</sup>, ig), 10 rats in each group. The rats in rest 4 groups except normal group received modeling for 3 weeks by chronic unpredicted mild stress (CUMS). In the next 2 weeks after stimulus, each group was treated with gavage intervention daily 10 mL·kg<sup>-1</sup>. The normal and the model group received ig normal saline (NS) of the same volume. The changes of weight and ethological indexes of immobility time in forced swimming test were observed before and after the administration of CHSGS. Serum MOT levels were detected by using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and ICC-DMP changes were observed under electron microscopy. **Result:** Compared with the normal group, the rats in model group had an obvious weight loss after modeling; immobility time was prolonged ( $P < 0.05$ ); serum MOT levels were decreased ( $P < 0.05$ ). After administration, compared with model group, CHSGS could reduce the immobility time in forced swimming test ( $P < 0.05$ ), significantly increase serum MOT levels ( $P < 0.05$ ), and significantly improve the structure and function of ICC-DMP under electron microscope. **Conclusion:** CHSGS has

**[收稿日期]** 20150126(003)

**[基金项目]** 江苏省中医药局科技项目(LZ13009)

**[第一作者]** 张晓龙,硕士生,从事中医内科肝脏病研究, Tel:18251887470, E-mail:326310506@qq.com

**[通讯作者]** \*孙丽霞,博士,副教授,硕士研究生导师,副主任中医师,从事中医药治疗肝胆疾病研究, Tel:13951984344, E-mail:zynk@163.com

the effect of promoting gastrointestinal motility, and the mechanism may be associated with regulating serum MOT levels, as well as quantity and function of ICC-DMP in rats with liver depression syndrome.

[Key words] Chaihu Shugan San; chronic unpredicted mild stress; liver depression; motilin; interstitial cells of Cajal

柴胡疏肝散为疏肝理气之代表方剂,具有疏肝解郁,行气止痛之功,主要用于治疗肝气郁滞证。临床发现该方具有改善肝郁证患者食欲以及调节胃肠道功能的作用。胃肠道功能主要受各种胃肠激素的调控,血清胃动素(MOT)是其中较为重要的一种<sup>[1]</sup>。另外,cajal间质细胞(ICC)作为胃肠慢波活动的起搏器和传导者<sup>[2]</sup>,一直是人们研究胃肠道疾病的热点。前期国内学者对柴胡疏肝散的研究,主要集中在中枢抗抑郁作用,以及一些胃肠激素的改变。如杜紫薇<sup>[3]</sup>等发现柴胡疏肝散可上调肝郁大鼠脑海马磷酸二酯酶4及其亚型的mRNA表达而起到保护受损神经元,改善大脑功能,缓解肝郁症状;李生强<sup>[4]</sup>等发现柴胡疏肝散可显著降低血清皮质酮、促肾上腺皮质激素释放肽;李雪萍<sup>[5]</sup>等发现,柴胡疏肝散可增加大鼠活性炭推进速率,上调结肠水通道蛋白3,升高血浆中胃泌素,P物质等胃肠激素水平,改善便秘模型大鼠症状。本研究采用大鼠慢性不可预知应激模型,观察柴胡疏肝散对模型大鼠行为学指标,结合胃肠激素MOT含量及Cajal间质细胞深肌丛(ICC-DMP)的改变,探讨该方作用机制,以期为柴胡疏肝散在临床治疗胃肠道动力障碍性疾病提供实验基础,为“肝主疏泄促进脾胃运化”的理论提供依据。

## 1 材料

1.1 动物 清洁级SD大鼠50只,体重210~230g,雌雄各半,由南京中医药大学动物中心提供,合格证号SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物和试剂 柴胡疏肝散(柴胡12g,香附9g,枳实9g,陈皮12g,川芎9g,赤芍9g,炙甘草3g,生药购于江苏省药材公司)经冷水浸泡药材半小时,常规两煎,头煎1.5h,二煎1h,将2次水煎液混合并过滤,经水浴蒸发浓缩成质量浓度为2.1g·mL<sup>-1</sup>(生药量)的药液冷藏备用。吗丁啉混悬液1g·L<sup>-1</sup>(西安杨森制药有限公司,国药准字H10910084)。大鼠胃肠动素酶联免疫分析试剂盒(均购自南京市建邺区三林教学用品经营部,产品编号ISC10330EIA-2643R)。

1.3 仪器 S-3000N型扫描电镜(日本HITACHI公司),ELX800型酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

## 2 方法

2.1 造模与给药 将50只大鼠正常饲养、自由饮食,适应性饲养1周后,随机分为5组:正常组、模型组、吗丁啉组和柴胡疏肝散高、低剂量组,每组10只。除正常组正常喂养外,其余4组造模。参照文献方法<sup>[6]</sup>,采用不可预知的慢性应激刺激方法造模,断食、水24h;冰水游泳5min;45℃热环境5min;60次/min水平震荡30min;夹尾刺激1min;24h明暗颠倒;上述刺激每日1种,每种刺激各3次,随机安排,使动物不能预知次日的刺激。造模3周。

第4周起,每天按10mL·kg<sup>-1</sup>进行ig给药。正常组和模型组两组大鼠均给予蒸馏水,柴胡疏肝散高、低剂量组(21.0,10.5g·kg<sup>-1</sup>,ig),吗丁啉组给予吗丁啉混悬液(10mg·kg<sup>-1</sup>,ig),共14d。

2.2 行为学指标的测定 强迫游泳不动时间:参照文献方法<sup>[7]</sup>,将大鼠禁食16h后放入内径20cm,高50cm圆桶中,每桶1只。水深25cm,水温(25±1)℃,大鼠在水中不能以后爪支撑身体,也不能以前爪攀附于缸壁。每桶水只使用1次。实验第1天,每只大鼠预游泳15min,随后取出并擦干放入笼中。24h后再次将大鼠放入水中,连续观察3min,累计大鼠在水中停止挣扎、呈漂浮状态的时间。每只大鼠分别于造模前、后测定该指标。

2.3 体重测定 在实验期间,每周测定大鼠体重的变化,并做好记录。

2.4 血清MOT含量测定 分别于造模前、造模后、给药后各采集血清1次,采集前空腹24h,眼眶球后静脉采血,分别置于含30μL的10%EDTA和30μL抑肽酶混合均匀的离心试管中,低温高速离心3500r·min<sup>-1</sup>,分离血浆和血清,用ELISA法测定MOT,操作步骤参照药盒说明书的方法。

2.5 小肠组织电镜检测 参考文献<sup>[8]</sup>方法,处死大鼠后,打开腹腔,将含有2%戊二醛,4.5%蔗糖和1mmol·L<sup>-1</sup>CaCl<sub>2</sub>的0.1mol·L<sup>-1</sup>PB固定液(pH7.4)注入腹腔以及两端结扎的10cm长的上段小肠。在5min的初次固定后,取出距离幽门1cm的上段8cm的小肠组织,沿系膜缘剖开去除内容物,放入上述固定液中室温下固定2h。超薄切片,铀-铅双染色,电镜观测ICC-DMP的超微结构。

**2.6 统计学处理** 用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间资料采用单因素方差分析,用 LSD 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠一般情况** 与正常组比较,造模后,各组大鼠体重均明显减轻,并出现神疲倦怠,精神紧张,易激怒,抗拒抓捕,毛发凌乱,食欲下降,大便量

少等表现;给药后,给药组大鼠体重逐渐恢复,活动增多,进食量增加,毛发光泽整齐。

**3.2 各组大鼠强迫游泳不动时间的变化** 与正常组比较,造模后大鼠强迫游泳不动时间明显延长 ( $P < 0.05$ )。治疗后,柴胡疏肝散高、低剂量组不动时间均显著短于模型组 ( $P < 0.05$ ),而吗丁啉无此作用。见表 1。

表 1 柴胡疏肝散对肝郁证模型大鼠强迫游泳不动时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Influence of Chaihu Shugan San (CHSGS) on immobility time of liver depression animal model in forced swimming test ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	强迫游泳不动时间/s			
		第 0 周末	第 3 周末	第 4 周末	第 5 周末
正常	-	44 ± 6	25 ± 7	38 ± 23	45 ± 9
模型	-	42 ± 5	73 ± 20 <sup>1)</sup>	69 ± 21 <sup>1)</sup>	70 ± 9 <sup>1)</sup>
柴胡疏肝散	21.0	40 ± 9	58 ± 21	61 ± 20	28 ± 9 <sup>2)</sup>
	10.5	42 ± 11	63 ± 23	69 ± 17	28 ± 9 <sup>2)</sup>
吗丁啉	0.01	41 ± 8	65 ± 17	74 ± 22	64 ± 13

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 2 同)。

**3.3 各组大鼠血清 MOT 含量的变化** 造模前后对比,造模各组 MOT 分泌明显减少 ( $P < 0.05$ ),至第 5 周末,模型组 MOT 分泌与正常组比较差异无统计学意义;而柴胡疏肝散 2 个剂量组,吗丁啉给药组 MOT 水平均高于模型组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

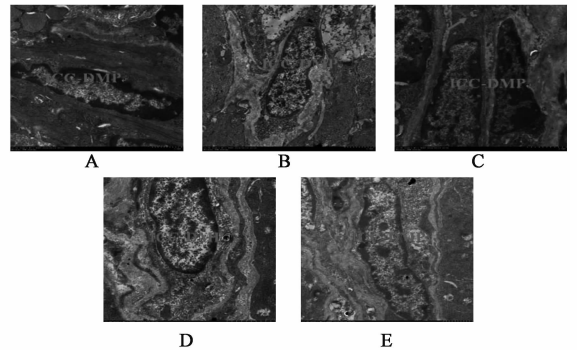
表 2 柴胡疏肝散对肝郁模型大鼠血清 MOT 浓度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Influence of CHSGS powder on levels of serum MOT of liver depression animal model ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	MOT/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$		
		第 0 周末	第 3 周末	第 5 周末
正常	-	35 ± 13	37 ± 9	36 ± 4
模型	-	33 ± 10	14 ± 5 <sup>1)</sup>	33 ± 13
柴胡疏肝散	21.0	33 ± 11	12 ± 10	80 ± 28 <sup>2)</sup>
	10.5	35 ± 9	15 ± 9	114 ± 35 <sup>2)</sup>
吗丁啉	0.01	34 ± 11	13 ± 4	79 ± 17 <sup>2)</sup>

**3.4 小肠组织超微结构观测** 正常大鼠小肠 ICC-DMP 超微结构透射电镜观察显示 ICC-DMP 主要分布于肌层,细胞梭形,胞质较少,胞质内见丰富的糖原颗粒及少量线粒体,未见肌丝,细胞核杆状,异染色质丰富,细胞间未见细胞连接。模型组 ICC-DMP 总体数目减少,与平滑肌细胞及神经纤维末梢有缝隙连接;细胞呈多边形,胞质少,线粒体扩张、脊断裂,粗面内质网扩张,细胞核内常染色质丰富。经高

剂量柴胡疏肝散治疗 14 d 后,ICC-DMP 数量明显增加,细胞呈梭形,胞质稀少,胞质内糖原颗粒丰富,部分内质网扩张,细胞核杆状,异染色质丰富,部分线粒体肿胀,但明显少于造模组。低剂量柴胡疏肝散治疗后大鼠小肠 ICC-DMP 结构改善及数量恢复虽不及高剂量组,但已有好转趋势。吗丁啉组 ICC-DMP 结构改善尚不明显。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 柴胡舒肝散 21.0  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;D. 柴胡舒肝散 10.5  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;E. 吗丁啉 10  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组

图 1 柴胡疏肝散对肝郁模型大鼠小肠 ICC-DMP 超微结构的影响 (铀铅双染,标尺 2  $\mu\text{m}$ )

Fig.1 Influence of Chaihu Shugan San(CHSGS) on ultrastructure of small intestine ICC-DMP in rat model of liver depression syndrome (uranium lead double staining, scaleplate 2  $\mu\text{m}$ )

### 4 讨论

本实验运用慢性不可预知刺激造模方法复制肝

郁证模型,这是一种符合中医理论的较科学的造模方法<sup>[9]</sup>。肝郁证的主要病因是情志异常,其本质是不良生活事件所形成的心理应激,两者内涵基本一致<sup>[9]</sup>。该方法运用多种刺激综合干预,从各个方面改变大鼠的生活习性,符合了肝郁证的发病机制,并且从大鼠的行为学表现、以及实验室指标的改变来看,造模后大鼠出现进食量减少、体重下降( $P < 0.05$ )、倦怠嗜睡、大便时溏、毛发杂乱等症状,并且强迫游泳不动时间明显延长( $P < 0.05$ ),说明造模是成功的。

目前对于肝郁证与胃肠道动力不足的关系多从胃肠激素<sup>[5,10-12]</sup>等的角度来研究。胃肠激素中,MOT可以使胃产生明显的收缩运动和小肠明显的分节运动<sup>[13]</sup>,是研究胃肠运动的主要激素之一。ICC作为胃肠慢波的起搏者及传播者,在功能性消化不良发病过程中的作用日益引起人们的注意,其数量、分布和功能的异常可能是胃肠道动力不良疾病的重要病因<sup>[14]</sup>。结合本次实验结果,笔者发现造模后,模型鼠血清MOT的含量下降( $P < 0.05$ );小肠ICC-DMP电镜观察显示该细胞的形态结构有明显改变,数量减少,证明肝郁证所引起的胃肠道动力不足与血清MOT及ICC形态功能的改变具有相关性。

柴胡疏肝散是临床治肝郁气滞证的代表方之一,始载于明·张介宾《景岳全书·古方八阵》,方中柴胡、枳壳、香附和陈皮疏肝解郁、理气畅中;川芎、白芍和甘草活血定痛、柔肝缓急。该方在临床有较为广泛的应用,可以改善食欲不振、嗝气、恶心或呕吐等脾胃运化功能失健的症状<sup>[15]</sup>。肝主疏泄能协助脾胃的运化功能,其实质可能是参与胃肠动力的调节。本实验研究表明,柴胡疏肝散能明显促进MOT的释放( $P < 0.05$ );一定程度上恢复ICC-DMP的形态改变及数量。并且能明显缩短大鼠的强迫游泳不动时间( $P < 0.05$ ),改善抑郁症状。随着国内外学者对胃肠动力机制研究的深入,MOT已被证实具有中枢、胃肠双重分布的特性,ICC与中枢神经系统之间的相互作用也逐渐被发现,那么该方是否存在除胃肠调节以外的治疗机制,尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 王志刚,刘凤林.胃动素受体的研究进展[J].国外医学:药学分册,2001,28(6):344-347.

[2] Seki K, Komuro T. Immunocytochemical demonstration of the gap junction proteins connexin 43 and connexin 45 in the musculature of the rat small intestine[J]. Cell Tissue Res, 2001, 306(3):417-422.

[3] 杜薇薇,岳广欣,王蓬文,等.柴胡疏肝散对肝郁证模型大鼠海马磷酸二酯酶-4及其亚型表达的影响[J].中华中医药学刊,2014,32(1):178-180.

[4] 李生强,陈淑娇,梁文娜,等.柴胡疏肝散对围绝经期综合征肝郁证大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节作用[J].福建中医药大学学报,2013,23(6):27-29.

[5] 李雪萍,张桢,雷鸣.柴胡疏肝散对便秘模型大鼠便质及肠道蠕动功能的影响[J].吉林中医药,2014,34(3):282-285.

[6] 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):18-21.

[7] 赵志宇,王卫星,郭洪祝,等.甘草苷对慢性应激抑郁模型大鼠的抗抑郁作用[J].中国临床康复,2006,10(27):69-72.

[8] 李毅,齐清会,张栋梁,等.大承气汤对MODS大鼠小肠深部肌间Cajal间质细胞损伤的作用[J].中国中西医结合外科杂志,2008,14(3):230-234.

[9] 金光亮,王胜兰.关于建立肝郁证动物模型的思考[J].山东中医药大学学报,2004,28(6):408-409.

[10] 杜薇薇,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[J].北京中医药大学学报:中医临床版,2010,17(6):22-24.

[11] 李晓红,梁媛,谢宇晴,等.逍遥散对慢性束缚应激肝郁脾虚证模型大鼠SP、VIP基因表达的影[J].中国中医基础医学杂志,2014,20(7):901-931.

[12] 张钰琴,凌江红,梁纲,等.柴胡疏肝散对夹尾应激大鼠脑和胃组织GASR mRNA和CCK-AR mRNA表达的影响[J].时珍国医国药,2010,21(5):1081-1083.

[13] 李景南,钱家鸣.胃肠激素与消化系统疾病[J].中华消化杂志,2005,25(4):253-254.

[14] Kwon J G, Hwang S J, Hennig G W, et al. Changes in the structure and function of ICC networks in ICC hyperplasia and gastrointestinal stromal tumors [J]. Gastroenterology, 2009, 136(2):630-639.

[15] 徐艳.柴胡疏肝散治疗功能性消化不良[J].中国实用医药,2010,5(22):116-117.

[责任编辑 聂淑琴]