中图分类号 论文编号

学科分类号 密 级



**Shanxi University of Chinese Medicine**

硕士学位论文

肝郁脾虚证动物模型的实验研究

**Animal models of spleen deficiency stomach experimental study**

|  |
| --- |
| 研 究 Th 姓 名：郭建丽 |
| 导师姓名、职称：冯玛莉 教授 主任医师 |
| 学科、专业名称：中 医 临 床 基 础 |
| 研 究 方 向：经 典 方 证 的 临 床 及 实 验 研 究 |
| 申请学位类 型： 科学学位 |

二 O 年 月 日

**ft西中医学院学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是个人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经特别加以注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明并致谢。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的声明**

本人完全了解ft西中医学院有关保留使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门机构送交论文的复印件和电子版，允许被查阅和借阅。本人授权ft西中医学院可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复印手段保存和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文作者签名： 论文导师签名：年 月 日

# 中文摘要

目的**：**

通过造模思路与方法的探索，建立和复制符合中医证候特点的肝郁脾虚模型并初步探讨肝郁证模型评价体系。

方法：

1.肝郁脾虚证动物模型制备：（1）复制肝郁脾虚证动物模型；①利血平肝郁脾虚证动物模型制备；②四氯化碳（CCl4）复制肝郁脾虚模型制备；（2）创建复合情志刺激大鼠肝郁脾虚模型。

2. 肝郁脾虚相关指标测试

（1）肝郁脾虚动物症候表现

眼睛状态、日常理毛、皮毛变化、对外界刺激的反应、大便性状、挣扎时的表现、精神状态。

（2）客观指标测定

①精神行为学指标的测试：摄食、体重、蔗糖水偏嗜度；高架十字迷宫；强迫游泳实验；自主活动测试；②血液学指标检测：动物血球仪测定血红蛋白含量和血小板计数；③免疫器官指数：剖取脾脏、胸腺，称重，计算脾脏、胸腺指数（mg/g）；

④脑组织单胺类神经递质变化：采用荧光分光光度法测定脑组织中多巴胺（简称DA）、

5-羟色胺（简称5-HT）。

（3）经典疏肝方剂对抗效应验证模型成败

用疏肝健脾经典名方逍遥丸与清泻肝火经典名方龙胆泻肝丸进行对抗研究。

结果：

1．利血平所致肝郁脾虚模型

肝郁脾虚动物症候表现、体重、摄食、蔗糖偏爱度%、自主活动、胸腺指数和脾脏指数显著低于空白对照组，强迫游泳不动时间延长显著高于空白对照组；大鼠所用时间短，小鼠养殖成本低，好操作，所耗时间较长，行为表现没有大鼠显著。

2．CCl4组致肝郁脾虚模型

肝郁脾虚动物症候表现、体重、摄食、蔗糖偏爱度%、自主活动、胸腺指数和脾脏指数、强迫游泳不动时间与空白对照组相比未见明显差异。

3．情志刺激致大鼠肝郁脾虚证模型

模型对照组大鼠体重增长、糖水消耗量、水平运动和垂直运动显著低于空白对照组、水中静止时间显著高于空白对照组，血红蛋白、血小板减少、胸腺指数和脾脏指数、5-HT和DA含量显著低于空白对照组；疏肝健脾方逍遥丸组体重增长、糖水消耗量、水平运动和垂直运动、血红蛋白、血小板减少、胸腺指数和脾脏指数、5-HT和

DA含量显著高于模型对照组，水中静止时间显著低于模型对照组。

结论：

1．利血平成功复制肝郁脾虚模型；利血平致大鼠肝郁脾虚模型，是研究肝郁脾虚模型行为学较好的选择；

2．CCl4复制肝郁脾虚模型不理想；

3．自创复合情志法成功创立符合中医证候特点的大鼠肝郁脾虚模型。

关键词： 肝郁脾虚； 模型； 指标评价体系

**Objective**：

**Abstract**

By making a mold ideas and methods of exploration, and copy in line with TCM syndromes of stagnation and spleen deficiency model of hepatic depression syndrome model to evaluate the system.

**Methods：**

1. Preparation of a stagnation and spleen deficiency syndrome animal model: (1) copy stagnation and spleen deficiency syndrome animal model; the①reserpine stagnation and spleen deficiency syndrome animal model preparation;②The carbon tetrachloride (CCl4)

To copy the stagnation and spleen deficiency model preparation; (2) to create a composite emotional stimulation rat model of liver depression and spleen.

2. The spleen deficiency stomach relevant index test

（1）The spleen deficiency stomach sickness animals performance

Eyes state, daily Richard wool fur change, to the outside stimulation reaction, defecate character, struggled, performance, mental state.

（2）The objective index determination

①the spirit behavior index test: feeding, weight, sucrose water partial eosinophilic degree; Elevated the maze; Forced swimming experiment; 'activity test;②the hematology index test: animal blood analyzer to measure hemoglobin content and platelet count; ③

Immune organs index: Dissected spleen, thymus, weighing, calculation of the spleen, thymus index (mg / g);④the brain tissue monoamine neural transmitter change: using

Fluorescence spectrophotometry in brain Dopamine (hereinafter referred to as the Dopamine DA), serotonin ( referred to 5-HT).

（3）ShuGan classic formula against effect validation model success or failure

ShuGan invigorating spleen with classic square free and unfettered pill and clear suffered diarrhoea classic square a tonic liver pills against diarrhea

**Results：**

1. The spleen deficiency caused by reserpine biaoben huanji model

Behavior performance, weight, feeding, sucrose preference degrees, independent activities, the thymus % index and spleen index significantly lower than the control group,

Forced swimming fixed time extend significantly higher than the control group; The short time rats, mice breeding low cost and good operation, a long time lost, behavior no rat significant.

2. CCl4 group to the spleen deficiency stomach model

Behavior performance, weight, feeding, sucrose preference degrees, independent activities, the thymus % index and spleen index, fixed time forced swimming with blank compared with controls, did not see the obvious difference.

3. Gentle disposition stimulate rats induced spleen deficiency stomach model

**Conclusion：**

1. The reserpine copied successfully the spleen deficiency stomach model; Reserpine rats induced the spleen deficiency stomach model, is the study of the spleen deficiency stomach model good behavior choice;
2. CCl4 copy the spleen deficiency stomach model failure;
3. A gentle disposition method was successful with compound of TCM syndrome features of the spleen deficiency stomach rat model.

Model control group rats weight gain, sugar water consumption, level sports and vertical movement significantly lower than the control group, the water still blank time significantly higher than the control group blank, hemoglobin, thrombocytopenia, the thymus and spleen index, index of 5-HT and DA content significantly lower than blank control; ShuGan spleen party free and unfettered pill group weight gain, sugar water consumption, level sports and vertical movement, the hemoglobin, thrombocytopenia, the thymus and spleen index, index of 5-HT and DA content was significantly higher than the control group model, the water static time significantly lower than model control group.

**KEy words:** Stagnation and spleen deficiency**;** Model**;** Index evaluation system

主要符号表

|  |  |
| --- | --- |
| 英文缩写 | 中文全称 |
| 0Pen-Field DA  5-HT OE CE OT% OE% | 旷场试验多巴胺 5-羟色胺  开臂次数闭臂次数  开臂时间百分比开臂次数百分比 |

目 录

[中文摘要](#_Toc686723499) 2

[结论：](#_Toc686723500) 3

**[Abstract](#_Toc686723501)** 3

[主要符号表](#_Toc686723502) 4

[前言](#_Toc686723503) 5

[第一部分 中医肝郁脾虚证动物模型理论研究](#_Toc686723504) 5

**[1](#_Toc686723505)** [中医肝郁脾虚证文化探源](#_Toc686723505) 5

**[1.1](#_Toc686723506)** [中医肝、脾关系理论阐述](#_Toc686723506) 5

**[1.3](#_Toc686723507)** [张仲景对肝郁脾虚病因病机、证候、治疗的论述](#_Toc686723507) 5

**[2](#_Toc686723508)** [中医肝郁证动物模型造模思路](#_Toc686723508) 6

**[2.1](#_Toc686723509)** [以经典著作《金匮要略》理论为指导，建立肝郁证候动物模型](#_Toc686723509) 6

**[2.2](#_Toc686723510)** [运用中医的思维来对实验动物进行中医证候的研究](#_Toc686723510) 6

**[2.3](#_Toc686723511)** [建立符合中医肝郁脾虚证候的客观指标](#_Toc686723511) 6

**[2.4](#_Toc686723512)** [应用经典方药检验客观评价指标的准确性、论证模型的成败](#_Toc686723512) 6

[第二部分 药物法复制肝郁脾虚证动物模型的实验研究](#_Toc686723513) 6

**[1](#_Toc686723514)** [利血平致肝郁脾虚动物模型](#_Toc686723514) 6

**[1.1](#_Toc686723515)** [材料](#_Toc686723515) 6

**[1.2](#_Toc686723516)** [方法](#_Toc686723516) 6

**[1.3](#_Toc686723517)** [结果](#_Toc686723517) 7

**[1.4](#_Toc686723518)** [讨论](#_Toc686723518) 10

**[1.5](#_Toc686723519)** [小结](#_Toc686723519) 10

**[2](#_Toc686723520)****[CCl4](#_Toc686723520)**[致肝郁脾虚动物模型](#_Toc686723520) 10

**[2.1](#_Toc686723521)** [材料](#_Toc686723521) 10

**[2.2](#_Toc686723522)** [方法](#_Toc686723522) 10

**[2.3](#_Toc686723523)** [结果](#_Toc686723523) 10

**[2.4](#_Toc686723524)** [讨论](#_Toc686723524) 13

**[2.5](#_Toc686723525)** [结论](#_Toc686723525) 13

[第三部分 情志刺激法致肝郁脾虚证动物模型的实验研究](#_Toc686723526) 14

**[1](#_Toc686723527)** [材料](#_Toc686723527) 14

**[2](#_Toc686723528)** [方法](#_Toc686723528) 14

**[2.1](#_Toc686723529)** [自创复合病因大鼠造模法](#_Toc686723529) 14

**[2.2](#_Toc686723530)** [分组与给药](#_Toc686723530) 14

**[3](#_Toc686723531)** [结果](#_Toc686723531) 14

**[4](#_Toc686723532)** [讨论](#_Toc686723532) 15

**[5](#_Toc686723533)** [结论](#_Toc686723533) 16

[结论](#_Toc686723534) 16

[1 大、小鼠利血平模型组均可以成功复制肝郁脾虚模型。](#_Toc686723535) 16

[2 大、小鼠CCL4模型组复制肝郁脾虚模型不理想。](#_Toc686723536) 16

[3 自创复合情志法成功创立符合中医中医理论证候特点的大鼠肝郁脾虚模型。除通过上面的方法验证外，还有血液学指标检测：血红蛋白含量和血小板计数；](#_Toc686723537) 16

[结语](#_Toc686723538) 16

**[1](#_Toc686723539)** [肝郁证动物模型研究的必要性](#_Toc686723539) 16

**[2](#_Toc686723540)** [本课题肝郁证动物模型制备评价指标初探](#_Toc686723540) 16

[参考文献](#_Toc686723541) 17

[参考文献](#_Toc686723542) 19

[作者简介](#_Toc686723543) 20

前**言**

随着社会的发展，竞争的激烈，人们精神压力的增大，由情志所伤的内因导致的失眠、焦虑、抑郁等精神疾患的发病率不断上升。由于肝、脾在人体生理活动和精神心理活动中发挥重要作用，故情志最易损伤肝、脾，由于肝常郁，脾常虚，故从肝郁脾虚立论来研究情志所伤是内因引起的精神疾病。辨证论治是中医治疗疾病的核心，证是患者就诊时疾病的病机，是机体在疾病发展某一阶段的病理概括，既包括了病变的部位、性质以及邪正关系，又反映了病症发展过程中某一阶段的病理变化本质。肝[郁脾虚证是指肝失疏泄，脾失健运](http://baike.baidu.com/view/657861.htm)而表现以胸胁胀痛、腹胀、便溏等为主症的证候，又称肝脾不和证。临床表现：胸胁胀满窜痛，善太息，情志抑郁，纳呆腹胀，便溏不爽，肠鸣矢气，或腹痛欲泻，泻后痛减。

目前肝郁模型制备方法：（1）药物造模：①CCl4注射法肝郁脾虚模型[1]②艾叶注射法肝郁脾虚模型[2]③肾上腺素皮下注射法[3]④利血平注射法肝郁脾虚模型[4-5]；（2）情志造模法：①夹尾法急性激怒致肝郁证模型[6] ②捆绑式肝郁证动物模型[7] ③模具激怒肝郁模型[8] ；（3）复合造模法：①药物加情志刺激法[9-10] ②复合情志造模法[11-14]通过对上述中医肝郁证动物模型的探讨，我们不难发现这些模型与中医肝郁证的临床发病特点仍有较大差异，而且未建立一个合理的中医学特有的评价标准。肝郁脾虚证动物模型以及相关的实验研究较少：检索相关肝郁脾虚证型相关论文的中医药治疗研究，大部分多集中于临床报道[15]，仍以经验医学为主，实验研究远滞后于临床研究[16]，限制了现有治疗水平的提高，本研究则偏重实验研究，侧重从实验角度将此经验加以验证并作进一步的深入研究。目前尚无一种公认的确切且特效的肝郁脾虚证候动物模型的制备方法。特别是考虑在中国现有的医疗条件和技术支持的背景下，并不是十分适合临床实际。所以，综合分析，中医药从肝论治类方治疗诸如失眠、焦虑等心身疾患必将发挥更加巨大的优势。

本课题前期制备肝郁化火模型，初探肝郁脾虚模型的思路，这次沿用中医的思维来对实验动物进行中医症候的研究符合中医病因病机、更接近中医病证的实验动物模型制备方法，建立和制备中医肝郁证动物模型，来探索肝郁脾虚证动物精神行为的改变，为肝郁脾虚证临床、实验研究提供基础方法。同时初步建立肝郁脾虚证客观评价指标，揭示中医经典证型肝郁脾虚的本质。对研究“肝郁证”的本质、中医药疏肝机理，以及评价从肝论治心理因素引起的失眠、焦虑、抑郁等精神疾患的有效性提供科学方法。

# 第一部分 中医肝郁脾虚证动物模型理论研究

## **1** 中医肝郁脾虚证文化探源

《金匮要略・脏腑经络先后病脉证第一》阐述了疾病发生的学说：“一者经络受邪入脏腑，二者四肢九窍，血脉相传，壅塞不通为外皮肤所中也，三者房室、金刃、虫兽所伤”。后世陈无择在此基础上又认为六淫邪气所触为外因，五脏情志所感为内因，饮食、房室、跌仆、金刃所伤为不内外因。这是导致疾病发生的三因学说。但随着现代生活节奏的加快，人们精神压力的增大，内因逐渐演变为疾病发生最常见的因素。由内因导致的失眠、焦虑、抑郁等精神疾患的发病率不断上升。《灵枢・百病始生篇》：

“内伤于忧怒，则气上逆，气上逆则六腑不通，温气不行，凝血蕴里而不散，津液涩渗，着而不去，而积皆成矣”。《素问・举痛论》曰：“百病生于气也”。皆表明疾病的发生与情志因素密切相关。

### **1.1** 中医肝、脾关系理论阐述

肝的主要生理功能：主疏泄、调情志。情志活动以气血运行通畅为基础，肝气疏泄能调畅气机，促血运行，故调畅情志。脾的主要生理功能：主运化，脾为后天之本，气血生化之源，是情志活动的物质基础。肝、脾两脏在生理上关系密切。肝主疏泄，有协助脾的运化功能，脾主运化，气机调畅，有助于肝气的疏泄。脾胃为人体气机升降的枢纽，而脾升胃降则有赖于肝的疏泄功能。在发生病变时，两者相互影响。肝失疏泄，气机不利，致脾失健运，称为木横侮土；脾失健运气滞于中，湿阻于内，亦影响肝气的疏泄，而为脾病及肝称为土壅侮木。

其次，在血液的生成与运行方面，肝藏血，脾统血。而脾为气血生化之源，脾气健运，气血生化有源，则肝血充足。肝血充足则肝体阴用阳之性正常发挥，肝疏泄有常，致肝气条达，助脾运化。

肝郁脾虚证临床症见：两胁疼痛，善太息，情志抑郁，倦怠乏力，不思饮食、腹胀，便秘，最终导致消瘦。舌苔薄白或腻，脉弦。

肝失疏泄，经气郁滞，不通则痛故两胁疼痛；太息则气郁得达，不舒得解，故喜太息为快；气机郁结不畅，故情志抑郁；脾气不运，导致脾气不升，胃气不降故不思饮食、腹胀、便秘；脾为气血生化之源，脾失健运，则倦怠乏力，长期不思饮食则导致机体消瘦。本证寒热现象不显，故仍见白苔，弦脉是肝失柔和之征。

**1.2关于肝郁脾虚病因病机的论述**

中医理论肝主疏泄、调畅情志，肝气郁结则情志疾患遂生，从肝论治情志不畅引发失眠、焦虑、抑郁等精神疾患，具有个体化治疗、整体调节的优势。《灵枢・病传篇》曰：“病变发于肝，三日而之脾”。可见肝、脾在情志疾病中的关系密切。肝郁脾虚证是情志疾病最常见的类型。“见肝之病，知肝传脾，当先实脾”的治未病的思想，在治疗肝郁脾虚所致的疾病首先要固护脾气，再配合疏肝的方法综合治疗。现代医学多应用中枢抑制药物短期疗效缓解，长期应用毒副作用较大，而且目前肝郁的动物模型以及相关的实验研究较少，与中医理论不完全吻合，难以用于情志疾患的研究。

运用中医的思维来对实验动物进行中医症候的研究符合中医病因病机、更接近中医病证的实验动物模型制备方法，建立和制备中医“肝郁”证动物模型，对研究“肝郁证”的本质、中医药疏肝机理，以及评价从肝论治心理因素引起的失眠、焦虑、抑郁等精神疾患的有效性提供科学方法。

### **1.3** 张仲景对肝郁脾虚病因病机、证候、治疗的论述

在《金匮要略・脏腑经络先后病脉证第一》曰：“夫治未病者，见肝之病，知肝传脾，当先实脾，四季脾旺不受邪，即勿补之。中工不晓相传，见肝之病，不解实脾，惟治肝也”，说明人是有机整体，脏腑之间联系密切，一脏有病，可影响它脏，治疗时必须照顾整体，治疗未病之脏腑，以防止疾病传变，体现了仲景对整体肝脾相关理论的重视。继而他又指出治肝补脾之法：“夫肝之病，补用酸，助用焦苦，益用甘味之药调之。酸入肝，焦苦入心，甘入脾，此治肝补脾之要妙也”。

仲景在临证时注重调理肝、脾，在其诊疗疾病的过程中都体现了肝、脾相关的思想。《金匮要略・脏腑经先后病脉证并治》曰：“脾实，则肝自愈”，其治法多采取泻肝实脾，或培土荣木之法。其认为肝实及脾，脾虚亦及肝，在治疗上无论肝、脾哪脏先病，均需注意肝、脾同调，在治肝之时，兼调理脾胃；治脾胃之时，亦须疏泄肝气。若肝脾同病，肝脾病情并重之证，必肝脾并举。

下面列举仲景临证时对调理肝、脾理论的应用。①肝先病影响到脾。《伤寒论》第147条曰：“伤寒五六日，已发汗而复下之，胸胁满微结，小便不利，渴而不呕，但头汗出，往来寒热，心烦者，此为未解也，柴胡桂枝干姜汤主之。”本条主要论述少阳病兼水饮内结的证治。柴胡桂枝干姜汤证，有胸胁满微结、心烦等肝气郁结的症状，又有小便不利、渴而不呕的脾虚水饮内停症状，方用柴胡、黄芩清解少阳之热、疏理少阳气机，同时用桂枝、干姜温通脾阳散寒、温化水饮。使枢机和解，水饮温化而愈。《伤寒论》第378条曰：“干呕，吐涎沫，头痛者，吴茱萸汤主之。”本条论述肝寒犯胃，浊阴上逆的证治。吴茱萸汤证，有头痛等肝经不舒症状，有干呕，吐涎沫

胃中虚寒的症状。方用吴茱萸暖肝温胃、降逆止呕，生姜散寒止呕，人参、大枣补脾益气，使肝脾和谐而愈。②脾先病影响到肝。《伤寒论》第102条曰：“伤寒二、三日，心中悸而烦者，小建中汤主之。”本条论述了伤寒里虚，心中悸而烦的证治。该方重用饴糖甘温补中，配以甘草、大枣补益脾胃，中焦得复则气血生化有源，倍用芍药配甘草、大枣以养血和营，缓急止痛。以方测证，小建中汤证是因中焦虚寒致肝经失柔，所致腹痛、心中悸而烦者等郁结之征。该证温中补虚、调和气血而愈。如《金匮要略・腹满寒疝宿食病脉证治篇》中提到：“趺阳脉微弦，法当腹满”，趺阳脉微，为中焦脾胃阳气不足；脉弦，则主寒、痛、主肝失疏泄。该条文提示本证的病机为脾胃阳虚，厥阴肝寒之气上逆。治法当“以温药服之”，方用建中汤之属。其方理如上所述。

由此可见，肝、脾关系密切，肝郁脾虚证是肝郁证中常见的证型。

## **2** 中医肝郁证动物模型造模思路

### **2.1** 以经典著作《金匮要略》理论为指导，建立肝郁证候动物模型

随着社会的发展，疾病的结构也发生了很大的变化。生物性致病因子所引发的疾病的发生率不断下降，以源于社会应激的心理因素和情绪反应为主要病因或主要致病机制的慢性心身疾病的发病率则不断上升，现代医学认为，不同的情绪会引起不同的病理反应。中医理论中，肝脏与情志的关系最为密切．肝失疏泄则导致情志抑郁不疏由此导致多种疾病的发生。肝郁证病率高、危害性大。肝郁证是一种患病率高、严重危害人类身心健康、具有高自杀风险的精神疾病。随着社会竞争的增加，肝郁证的发病率呈逐年上升趋势，重视对该病的研究已非常重要。

中医肝郁脾虚证以中医经典著作《金匮要略》理论为指导，来建立肝郁证候动物模型。

### **2.2** 运用中医的思维来对实验动物进行中医证候的研究

符合人致肝郁证的病因病机，采用类似人致病病因刺激，旨在建立符合中医病因病机，建立和复制中医“肝郁”证动物模型，对研究“证”的本质及中医药治疗机理，指导中药新药开发有重大意义，方便我省医务人员探讨证候的发生发展机制。模拟郁怒伤肝，饮食不节伤脾等致病因素诱发类似肝郁脾虚证的病理和症状，建立符合中医病因病机和证候特点的肝郁实验动物模型。

《内经》云：“怒伤肝，久则郁”，“侮而轻之”。《金匮要略》中的百合病和妇人脏躁证皆是精神失常，同是情志之病。以情志因素为重点，更能接近社会生活中病人的情况的一种造模方法，建立理想的证候动物模型，具有很大的现实意义。本试验通过药物、情志两大方面进行造模研究。

采用模拟致病因素法，体现中医肝郁证模型制备方法。“动物模型是自然疾病的映射”、实验动物的地位就是：能满足人道主义抽象化的要求，代替人体试验（自然疾病观察调查），这一原则经大胆假设深入研究，小心求证并经预初试验，设计一种更接近自然发病的造模方法，探讨肝郁动物模型，为今后多角度试验打下一定基础，动物模型更接近生活中病人实际情况。可以产生巨大的社会和经济效益，也是本课题的科学价值得以体现。

### **2.3** 建立符合中医肝郁脾虚证候的客观指标

证候是中医所特有的一种名称。证，即证候，是指疾病发展过程中某一个阶段的病理属性的概括。中医将人体分为阴阳气血，又将病因分为风寒暑湿燥热痰及虚实等。证型就是由不同的病因引起阴阳气血的不同变化导致人体的不同疾病状态。证候是辨证的基础，它既包括四诊所得，又包括内外因致病因素，全面又具体的反映了疾病的特征、性质和这个阶段的主要症结。中医疾病表现出来的现象非常复杂，从哲学高度说，现象是本质的反映，有现象的存在，必然有其内在本质的约定，如何对疾病表现出来的复杂现象进行选择、分析和利用，从而找出证侯的内在科学病理变化。研究者们开始转向对证候的客观化研究，试图寻找特异性指标的改变来揭示证候的本质，实现由主观辨证向客观辨证过渡的进程。近代及现代医学进展是伴随整个生物界在理性基础上不断发展的一体化进程而取得的，人与动物的模拟—医学动物模型还只是这一进程的初级阶段。因此，中医动物模型的意义，不仅在于它是一种现代形式的“比类取象”，更重要的是它使整个生物科学成为中医学发展的基础。肝郁脾虚证就是中医脏腑中常见的证侯之一，研究动物肝郁脾虚的实验室表现，以建立肝郁脾虚证的评价指标。

### **2.4** 应用经典方药检验客观评价指标的准确性、论证模型的成败

综上所述，以经典著作《金匮要略》理论为指导，模拟现代人的情志不遂致病的病因病机，采用慢性束缚加饮食失节、孤养的方法创制，通过公认的实验性肝郁脾虚症状、体征和相关指标的测试，并设疏肝健脾经方逍遥丸、疏肝泻火方龙胆泻肝丸为对照，佐证肝郁脾虚模型制备成功。建立肝郁模型评价体系为研究肝郁证病理、从肝

辨证论治以及疏肝药的研发提供基础研究，为临床疾病的客观化提供诊断依据。

通过经典方法创制肝郁证的模型，通过观察和运用现代仪器设备检测，形成一套反映肝郁证的指标，论证肝郁证动物模型指标缺乏评判标准，采用经典疏肝方剂的对抗效应，从核心症状、精神行为学药理研究、和动物品系等方面讨论郁证脾虚动物模型的合理性。

# 第二部分 药物法复制肝郁脾虚证动物模型的实验研究

## **1** 利血平致肝郁脾虚动物模型

利血平是中枢神经镇静剂之一，它主要影响节后交感神经末梢递质去甲肾上腺素的贮存和释放，并能降低脑内和外周神经递质中单胺类递质的含量，从而降低交感肾上腺神经的功能，使副交感神经功能相对或绝对亢进。利血平所致肝郁脾虚证模型是较经典的方法之一[17]，但使用的鼠种各有所异。为此，本研究通过对大、小鼠注射利血平，利用其不同的行为学表现来寻找和建立利血平致肝郁脾虚模型较为合适的鼠种。

### **1.1** 材料

1.1.1试剂利血平注射液：天津金耀氨基酸有限公司，批号国药准字

H12020905,1mg/（ml·支）。蔗糖由ft西中医院中心实验室提供，临用时配成1%蔗糖水溶液。

1.2.2动物小鼠，昆明种，体重(20±2) g，清洁级；大鼠，SD种，体重(200±20) g，清洁级，ft西省中医药研究院实验动物室提供，实验动物生产许可证编号为SCXK（晋）2010-002，实验动物使用许可证编号为SYXK（晋）2010-002。实验前在ft西省中医药研究院实验中心喂养1周，自由进食和饮水，排除环境因素对行为的影响。

1.1.3仪器电子天平：BP-310S，德国赛多利斯天平有限公司；小鼠自主活动测试仪：ZZ-6，成都泰盟科技有限公司；大鼠行为观察敞箱（自制）：为正方形敞箱，边长100cm，高40cm，底部划有25个20cm×20cm的正方形小格；交直流电子秤：ACS-A-JJ，中航第一集团太原航空仪表有限公司；大鼠游泳桶、止血钳、纱布等由ft西省中医院中心实验室提供。

### **1.2** 方法

1.2.1分组与造模分别取大、小鼠，雌雄各半，随机分为利血平肝郁脾虚模型组（简称利血平模型组）和空白对照组，每组各10只，利血平模型组小鼠腹腔注射利血平

0.1mg/kg，，每天1次，连续14天[17] ，第15天后测试；利血平模型组大鼠腹腔注射利血平4mg/kg，每天1次，共2次，48h后测试[17]，空白对照组同上法注射同量生理盐水。

1.2.2观测指标

（1）肝郁脾虚相关证候表现：包括眼睛状态、理毛、皮毛变化、对外界刺激的反应、大便性状、挣扎时表现、精神状态。在造模期间，每日上、下午（定点）观察模型各一次，观察时间为15min或每次给药前仔细观察15min。以上各项为观察项目，

有此项表现：明显记2分，轻微记1分，无此表现着记0分，当总成绩达到8分以上时，造模可能成功，需要进行下一步检测。

（2）精神行为学指标测试

①实验鼠的体重、摄食，糖水偏爱率测试。参照文献[18]体重与摄食：因为脾虚运化功能失常，所以摄食明显减少，体重较正常组相比，增长缓慢。体重和摄食量的测定：每周一、周四于清晨8: 00时加食物至50g，次日8: 00称食物余重，同时称动物体重，计算24h的摄食量(摄食量=食物总量-食物余量/体重×100%) [13]。糖水偏爱率：液体消耗实验中糖水的消耗量和糖水偏好百分比作为衡量对奖赏的敏感缺乏和快感消失的客观有效的指标。与测摄食的时间可同时进行。实验前，在隔噪音，安静的房间内，给大鼠两瓶水，一瓶为1%的蔗糖水，一瓶为自来水，并称重，24h后，再次称重，计算动物的总液体消耗、糖水消耗、普通水消耗、糖水偏爱(糖水偏爱=糖水消耗/总液体消耗×100%) [13]。

②旷场实验（Open-field teat）测试。参照文献[19]大鼠旷场试验测试：将大鼠置入敞箱中央格，以动物穿越底面方格1格为水平活动得分（三爪以上跨入，记为1分），以直立次数为垂直活动得分（两前肢离地或攀附墙壁1cm以上，记为1分），测定动物

5min内得分，自主活动以水平活动加垂直活动得分为准。测试实验鼠的水平运动和垂直运动。小鼠自主活动用小鼠自主活动测试仪测试其水平运动与垂直运动。

③强迫游泳实验测试。参照文献[20]大鼠强迫游泳实验，用高42com，直径23com水深30com的透明桶盛温度为（24±2）℃水，先强迫游泳15 min，24h后把大鼠放入同样环境的水中，记录其5min中内攀爬（四肢攀抓桶壁）、游泳（四肢有规律的水平划动）、静止（四肢静止使身体漂浮于水面，使耳朵和鼻子露出水面的行为）的时间。小鼠强迫游泳实验，在高20cm，直径15cm，水深10cm水温为（23±2）℃的大玻璃杯中进行测试，时间为6min，记录后4min的不动时间，每测完一只即换水。

（3）免疫器官指数：剖取脾脏、胸腺，称重，计算脾脏、胸腺指数（mg/g）。

1.2.3统计学方法数据分析采用SPSS13.0软件处理，计量资料以均数加减标准差

（*x*±s）表示，多组间数据采用方差分析，两两比较采用LSD-*t*检验。

### **1.3** 结果

1.3.1肝郁脾虚相关证候表现

大鼠利血平模型组与空白对照组相比出现明显的倦怠、眯眼、倦卧，长时间不进行日常理毛，对外界的声音刺激反应迟钝，眼角有轻微的破损，个别鼻腔有出血现象，皮毛不泽甚者稀疏。小鼠利血平模型组同空白对照组相比有眯眼现象，其它反应不如

大鼠利血平模型组明显。具体观测指标见表1。

表1 实验鼠肝郁脾虚相关证候表现

| 组别 | 眼睛 | 毛色、理毛 | 外界刺激反应 | 大便质量 | 挣扎力度 | 精神状态 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 空白对照 | 活动灵敏有神 | 皮毛光泽度好理毛频繁 | 灵 敏 警觉度高 | 色暗，颗粒饱满，量多 | 有力 | 好 |
| 利血平模型 | 眯小无神 | 皮毛不泽、稀疏理毛活动少 | 迟钝 | 色浅，质软甚者稀溏， 颗粒变小，量少 | 无力 | 萎 靡 困倦嗜睡 |

1.3.2摄食、体重、蔗糖偏爱度百分比

大鼠利血平模型组与空白对照组相比体重、摄食、蔗糖偏爱度%降低，表示造模成功。*P*<0.01，统计学有显著意义。结果见表2-1。

虚重爱

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 2-1 肝郁脾 | 大鼠摄食、体 | 、1%蔗糖偏 | 度百分比（ *x* ±s ） |
| 组别 | 摄食 | 体重 | 蔗糖偏爱度百分比 |
| 空白对照 | 34±6.8 | 392±70 | 0.491±0.066 1 |
| 利血平模型 | 10±4.4 \*\*\* | 277±69 \*\* | 0.593±0.126 \*\* |

注：与对照组比较：\* *P* <0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

小鼠利血平模型组与空白对照组相比体重、摄食、蔗糖偏爱度%降低，表示造模成功。*P*<0.05，统计学有意义。结果见表2-2。

虚体

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 2-2 肝郁脾 | 小鼠摄食、 | 重、1%蔗糖偏 | 爱度百分比（ *x* ±s ） |
| 组别 | 摄食 | 体重 | 蔗糖偏爱度百分比 |
| 空白对照 | 5.2±1.03 | 34±4.7 | 0.707±0.08 26 |
| 利血平模型 | 3.1±1.85\* | 27±7.4\* | 0.859±0.117\* |

1.3.3自主活动

注：与对照组比较：\* *P* <0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

脾鼠

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 3-1 肝郁 | 虚大鼠模型大 | 自主活动（ *x* | ±s ） |
| 组别 | 水平运动 | 垂直运动 |  |
| 空白对照 | 41±7.6 | 13±2. 5 |  |
| 利血平模型 | 29±5.5\*\*\* | 8.6±2.2\*\* |  |

注：与对照组比较：\* *P* <0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

大鼠利血平模型组与空白对照组相比自主活动降低，表示造模成功。垂直活动

（*P*<0.01），水平活动（*P*<0.001）统计学有显著意义。结果见表3-1。

小鼠利血平模型组与空白对照组相比自主活动降低，表示造模成功。*P*<0.05，统计学有意义。结果见表3-2。

脾鼠

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 表 3-2 肝郁 | 虚小鼠模型小 | 自主活动（ | *x* | ±s ） |
| 组别 | 水平运动 | 垂直运动 |  |  |
| 空白对照 | 6.7±5.0 | 56±17 |  |  |
| 利血平模型 | 1.84±1. 90\* | 7.5±7.4\* |  |  |

注：与对照组比较：\* *P* <0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

1.3.4实验鼠强迫游泳时间

大鼠利血平模型组与空白对照组相比强迫游泳的时间延长，表示造模成功。

*P*<0.01，统计学有显著意义。结果见表4-1。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 4-1 肝 | 郁脾虚大鼠 | 强迫游泳实验( | *x* ±s ) |
| 组别 |  | 强迫游泳(s) |  |
|  | 游泳 | 攀爬 | 静止 |
| 空白对照 | 157±2 8 | 108±25 | 78±20 |
| 利血平模型 | 83±20\*\* | 79±2 4\*\* | 130±17 \*\* |

注：与对照组比较：\* *P* <0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

小鼠利血平模型组与空白对照组相比强迫游泳游泳不动时间延长，表示造模成功。*P*<0.05，统计学有意义。结果见表4-2。

表虚）

|  |  |
| --- | --- |
| 4-2 肝郁脾 | 小鼠强迫游泳实验（ *x* ±s |
| 组别 | 强迫游泳试验不动时间比较(s) |
| 空白对照 | 68±25 |
| 利血平模型 | 177±28\* |

注：与对照组比较：\* *P* <0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

1.3.5实验鼠免疫器官的变化

大小鼠利血平组与对照组比较脾脏指数、胸腺指数均降低，表示造模成功。大鼠利血平与对照组相比更加显著。结果见表5。

表5 肝郁脾虚免疫器官指标（x±s ）

| 组别 | 脾脏指数  大鼠 小鼠 | 胸腺指数  大鼠 | 小鼠 |
| --- | --- | --- | --- |
| 空白对照 | 0.282±0.13 1 0.0634±0.0207 | 0.261±0.54 4 | 0.204±0.112 |
| 利血平模型 | 0.138±0.0321\*\* 0.0236±0.0211\* | 0.123±0.026\*\* | 0.138±0.337\*\* |

### **1.4** 讨论

注：与对照组比较：\* *P* <0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

从上述结果可以看出利血平注射液可以快速成功的复制肝郁脾虚的模型，而且其肝郁脾虚表现比较显著。

体重和摄食水平是反应实验鼠脾虚的指标。蔗糖偏爱度%降低反应了对奖赏的敏感缺乏和快感消失，自主活动减少这种状态与人类肝郁证常见的缺乏动力、沉默寡言、生活兴趣减退等类似，强迫游泳不动时间增加，即逃避不良环境的欲望减退，类似与肝郁证常见的“无助感”。脾脏指数和胸腺指数可以反应机体免疫力的大小。这些都是检测肝郁脾虚的经典指标，通过经典指标验证利血平致肝郁脾虚模型成功与否，通过经典复制方法和检测指标，观察肝郁脾虚的行为学表现。

文献[5]上叙述大鼠利血平48h形成肝郁脾虚模型，但在实验过程中据观察12h即有肝郁脾虚的表现，48h时症状最明显，是否可以说有表现即成模，那仅需12h。在剖检大鼠时发现，腹腔都有出血，怀疑利血平导致大鼠腹腔广泛少量的出血。

小鼠便于操作和饲养，成本低，需要的饲养空间也很小，适宜大量生产繁殖，可在短时间内提供大量动物，但用小鼠造肝郁脾虚的模型所耗时间较长，行为表现和实验室指标也没有大鼠显著。大鼠，对情绪反应敏感，可在短时间复制成肝郁脾虚的模型，且容易操作，是研究肝郁药物模型的首选实验动物。

### **1.5** 小结

本实验成功复制了利血平导致肝郁脾虚的模型。用利血平致大鼠肝郁脾虚模型，是研究肝郁脾虚模型行为学较好的选择。

## **2** **CCl4**致肝郁脾虚动物模型

### **2.1** 材料

2.1.1动物与试剂昆明种小鼠，体重(20±2) g，清洁级，SD种大鼠，体重(200±20) g，清洁级，ft西省中医药研究院实验动物室提供，实验动物生产许可证编号为SCXK

（晋）2010-002，实验动物使用许可证编号为SYXK（晋）2010-002。实验前在ft西省中医药研究院实验中心喂养1周，自由进食和饮水，排除环境因素对行为的影响。

CCl4溶液：北京化工厂，批号国药准字Z19970120。蔗糖由ft西中医院中心实验室提供，临用时配成1%蔗糖水溶液。

2.1.2仪器交直流电子秤：ACS-A-JJ，中航第一集团太原航空仪表有限公司；电子天平：BP-310S，德国赛多利斯天平有限公司；小鼠自主活动测试仪：ZZ-6，成都泰盟科技有限公司；大鼠行为观察敞箱（自制）：为正方形敞箱，边长100cm，高40cm，底部划有25个20cm×20cm的正方形小格；大鼠游泳桶止血钳、纱布等由ft西省中医院中心实验室提供。

### **2.2** 方法

2.2.1分组与造模实验鼠雌雄各半，将其随机分为实验组和对照组，每组各10只，

CCl4模型组小鼠，于第1、6天皮下注射10%CCl4花生油溶液，剂量为0.1ml/10kg于第八天处死取材。CCl4模型组组大鼠，于第1、4天皮下注射10%CCl4花生油溶液，剂量为

0.5ml/100kg于第六天处死取材[22]，对照组同上法注射同量注射用水。

2.2.2观测指标：

（1）肝郁脾虚相关证候表现：包括眼睛状态、理毛、皮毛变化、对外界刺激的反应、大便性状、挣扎时表现、精神状态。

（2）精神行为学指标测试：体重、摄食，参照文献[18]来计算实验鼠的糖水偏爱率。参照文献[19]旷场实验（Open-field teat）中，测试实验鼠的水平运动和垂直运动。参照文献[20]在强迫游泳实验中，记录动物的不动时间。具体测法如前文所述。

（3）免疫器官指数：剖取脾脏、胸腺，称重，计算脾脏、胸腺指数（mg/g）。

2.2.3统计学方法数据分析采用SPSS13.0软件处理，计量资料以均数加减标准差

（*x*±s）来表示，多组间数据采用方差分析，两两比较采用LSD-*t*检验。

### **2.3** 结果

2.3.1肝郁脾虚相关证候表现

大鼠CCl4模型组与空白对照组相比未出现明显的区别。具体观测指标见表6。

表6 实验鼠肝郁脾虚相关证候表现

| 组别 | 眼睛 | 毛色、理毛 | 外界刺激反应 | 大便质量 | 挣扎力度 | 精神状态 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 空白对照 | 活动灵敏有神 | 皮毛光泽度好理毛频繁 | 灵 敏 警觉度高 | 色暗，颗粒饱满，量多 | 有力 | 好 |
| CCl4 模型 | 活动稍迟少神 | 皮毛光泽度好理毛频繁 | 较灵敏 | 色暗，颗粒较饱满，量中等 | 较有力 | 较好 |

2.3.2实验鼠摄食、体重、1%蔗糖偏爱度

大小鼠CCl4组与对照组相比无明显差异。结果见表7。

表7 肝郁脾虚实验鼠摄食、体重、1%蔗糖偏爱度%（x±s ）

| 组别 | 大鼠 | 摄食 | 小鼠 | 大鼠 | 体重  小鼠 | 1%蔗糖偏爱度%  大鼠 小鼠 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 空白对照 | 34.±6.8 |  | 5.2±1.03 | 392±70 | 34±4.7 | 0.495±0.063 0.714±0.181 |
| CCl4模型 | 35±3.14 |  | 4.9±1.53 | 393±69 | 33±6.0 | 0.484±0.035 0.698±0.143 |

2.3.3实验鼠的自主活动

大小鼠CCl4组与对照组比较未见明显区别。结果见表8。

表8 肝郁脾虚实验鼠模型制作过程中自主活动（*x*±s ）

水平运动垂直运动

| 组别 | 大鼠 | 小鼠 | 大鼠 | 小鼠 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 空白对照 | 40±7.8 | 6.6±2.3 | 13±3.0 | 56±14 |
| CCl4模型 | 41±5.7 | 6.8±1.38 | 14±2.7 | 56±12 |

2.3.4实验鼠的强迫游泳实验

大小鼠CCl4组与对照组比较不动间延长未见明显延长。结果见表9-1、9-2。

大实

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 9-1 | 肝郁脾虚 | 鼠强迫游泳 | 验（ *x* ±s ） |
| 组别 |  | 强迫游泳 |  |
|  | 游泳 | 攀爬 | 静止 |
| 空白对照 | 76±1 8 | 106±25 | 104±39 |
| CCl4模型 | 83±20 | 113±17 | 101±20 |

表虚）

|  |  |
| --- | --- |
| 9-2 肝郁脾 | 小鼠强迫游泳实验（ *x* ±s |
| 组别 | 强迫游泳试验不动时间比较(s) |
| 空白对照 | 68±23 |
| CCl4模型 | 67±26 |

2.3.5实验鼠的免疫器官的变化

大小鼠CCl4组与对照组比较未见明显差异。结果见表10。

表10 肝郁脾虚免疫器官指标（*x*±s ）

脾脏指数胸腺指数

| 组别 | 大鼠 | 小鼠 | 大鼠 | 小鼠 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 空白对照 | 0.302±0.12 3 | 0.0623±0.0213 | 0.268±0.04 1 | 0.232±0.113 |
| CCl4模型 | 0.291±0.235 | 0.0556±0.0157 | 0.245±0.017 | 0.187±0.094 |

### **2.4** 讨论

注：与对照组比较：\* *P* <0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

本次试验应用CCl4对实验鼠进行为期7d的造模，通过观测一般行为表现、精神行为指标及免疫器官指标，认为模型失败，肝郁脾虚证动物模型制备检验程序为：先进行一般行为学以及摄食、自主活动等基本指标检测。中医理论言“有诸内，必形之于诸外”。如果反应行为学的这些指标均无意义，可以认为模型失败，为了证实猜想的正确性，继续测免疫指标仍无统计学意义。此次试验失败的原因分析如下：查文献得知用CCl4复制肝郁脾虚模型成功率仅有60%左右，回忆在实验过程中CCl4溶液吸收不好，存在渗出现象。后来改皮下注射后停留一到两分钟，渗液现象减少，但造模仍未成功。CCl4组中有些实验鼠非但未出现肝郁脾虚的症状甚至出现了狂躁、易激惹等肝郁化火的现象。原因有待于进一步研究。

### **2.5** 结论

CCl4组复制肝郁脾虚模型不理想。

# 第三部分 情志刺激法致肝郁脾虚证动物模型的实验研究

肝郁脾虚证是中医脏腑最常见的病理证候之一。肝郁脾虚证的基本病变是肝失疏泄，脾失健运，主要表现为：精神抑郁，情绪不宁、胸胁胀闷或易怒善哭、脘闷嗳气，不思饮食，大便不调为特征的一类临床病证，其形成多与现代抑郁、焦虑、悲痛等负面情绪心理应激状态有关。与以往实验采用的方法不同[22]，本实验模拟现代人的情志不遂致病的病因病机，采用慢性束缚加饮食失节孤养的方法创制，通过公认的实验性肝郁脾虚症状、体征和相关指标的测试，并设疏肝健脾经方逍遥丸、疏肝泻火方龙胆泻肝丸为对照，佐证肝郁脾虚模型制备成功，为研究肝郁证病理、从肝辨证论治以及疏肝药的研发提供基础研究。

## **1** 材料

1.1**动物**大鼠，SD种，体重(200±20) g，清洁级，ft西省中医药研究院实验动物室提供，实验动物生产许可证编号为SCXK（晋）2010-002。实验动物使用许可证编号为SYXK（晋）2010-002。

1.2**药物**逍遥丸：国药准字Z14020866，ft西杨文水制药有限公司，批号：101220；药物组成北柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、炙甘草、生姜、薄荷，功用疏肝健脾；龙胆泻肝丸：国药准字Z14020092，ft西华康药业有限公司，批号：10101511；药物组成龙胆草、柴胡、生甘草、黄芩、炒栀子、木通、车前子、当归、生地黄、泽泻，功用疏肝泻火；用时研细，以蒸馏水配制成20%的混悬液。蔗糖由ft西中医院中心实验室提供，临用时配成1%蔗糖水溶液。

1.3**仪器**动物血球计数仪：ABC，法国ABX；高架十字迷宫：PM-200，成都泰盟科技有限公司；电子天平：BP-310S，德国赛多利斯天平有限公司；交直流电子秤：ACS-A-JJ，中航第一集团太原航空仪表有限公司；小鼠自主活动测试仪：ZZ-6，成都泰盟科技有限公司；大鼠行为观察敞箱（自制）：为正方形敞箱，边长100cm，高40cm，底部划有25个20cm×20cm的正方形小格低速离心机：KDC-1044，科大创新股份有限公司中佳分公司；5-HT，DA神经递质试剂盒：sigma公司；酶标仪：Specha Max M5，美国Molecular Devices公司；大鼠游泳桶止血钳、纱布等由ft西省中医院中心实验室提供。

## **2** 方法

### **2.1** 自创复合病因大鼠造模法

将造模大鼠放入自制的钢丝网笼中，令其身躯及四肢不能自由活动，空白对照组

5只一笼合养，模型对照组、逍遥丸组、龙胆泻肝丸组，实验鼠均每笼一只孤养，每

日束缚6h，从9: 00am～3: 00pm。每周给大鼠不定时的禁食两次，造模时间3w。

### **2.2** 分组与给药

实验鼠雌雄各半，将其随机分为空白对照组、模型对照组、逍遥丸组、龙胆泻肝丸组，每组各10只。灌胃量为0.2ml/kg，给药量为4g/kg·d，自模型制备后给药，每日一次，连续3w。

**2.3观测指标**

2.3.1肝郁脾虚相关证候表现：包括眼睛状态、日常理毛、皮毛变化、对外界刺激的反应、大便性状、挣扎时的表现、精神状态，根据上述表现：明显记3分，介于明显与轻微间记2分，轻微记1分，没有记0分。具体方法参照前文。

2.3.2精神行为学指标测试：摄食、体重、蔗糖水偏嗜度：给大鼠两瓶水，一瓶为1%

的蔗糖水，一瓶为自来水，并称重，24h后，再次称重，计算大鼠糖水偏爱（糖水偏爱

=糖水消耗/总液体消耗×100%）[18]。高架十字迷宫测试[22]：用仪器来进行测量（八臂迷宫测试系统：RM-200，成都泰盟科技有限公司）。强迫游泳实验[23]：用桶盛水，记录大鼠5min中内攀爬、游泳、静止的时间。自主活动实验[24]：自制开野箱，观察5min内大鼠的活动情况（水平穿格数和站立次数）。具体操作方法及相关指标参照前文所述。

2.3.3血液学指标检测：动物血球仪测定血红蛋白含量和血小板计数。

2.3.4免疫器官指数：剖取脾脏、胸腺，称重，计算脾脏、胸腺指数（mg/g）。

2.3.5脑组织单胺类神经递质变化：大鼠断头，取脑组织，制备10%组织匀浆，离心

2000rpm。荧光分光光度法测定脑组织中DA、5-HT的含量。

**2.4统计学方法**

实验数据*x*±*s*表示，应用SPSS13.0统计软件进行统计学处理，多组间数据采用方差分析，两两比较采用LSD-*t*检验。

## **3** 结果

**3.1肝郁脾虚相关证候表现**

空白对照组与模型对照组相比显著增高，表示造模成功。逍遥丸组与模型对照组比较显著增高，说明逍遥丸对肝郁脾虚模型起到很好的治疗作用，同时也间接说明肝郁脾虚模型造模成功。龙胆泻肝丸对肝郁脾虚模型可以起到一定作用，但疗效不显著，同时也说明该动物模型非肝郁化火型，结果见表11。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表11肝郁脾虚 | 相关证候表现（ | *x* | ±s |
| 组别 | 外观行为评分 |  |  |
| 空白对照模型对照逍遥丸  龙胆泻肝丸 | 2.8±0.41 4\*\*  0.836±0.41 1  2.5±0.55 3\*\*  1.33±0.52 5 |  |  |

）

注：与模型对照组比较：\**P* <0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

**3.2精神行为学变化**

空白对照组与模型对照组相比增高，表示造模成功。逍遥丸组与模型对照组比较增高，说明逍遥丸对肝郁脾虚模型能起到治疗作用，龙胆泻肝丸组与模型对照组比较无显著性差异。结果见表12、13。

虚s ）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 12 肝郁脾 | 大鼠摄食、体重、蔗糖偏爱度百分比（ | *x* | ± |
| 组别 | 摄食 体重 蔗糖偏爱度(%) |  |  |
| 空白对照模型对照逍遥丸  龙胆泻肝丸 | 34±5.8 \* 386±80 \* 88±3.9 \*\*  20±4.4 300±7 1 96±1.7  28±6.0 \* 375±6 8\* 90±2.2 \*  25±5. 5 347±8 2 93±.13 |  |  |

注：与模型对照组比较：\**P* <0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 13 肝 | 郁脾虚大鼠高架十字迷宫 | 、自主活动、强迫游 | 测试（ *x* ±s ） |
| 组别 | 高架十字迷宫 | 自主活动 | 强迫游泳 |
|  | OE+CE OT% OE% | 水平运动 垂直运动 | 游泳 攀爬 静止 |
| 空白对照模型对照逍遥丸  龙胆泻肝丸 | 28±6.3 \*\* 25±9.4 \*\* 29±9.3 \*  19±9.7 16±9.6 11±9.3  23±7.9\* 21±12\* 21±12\*  21±3.2 19±3.6 19±3.6 | 41±7.6 4\* 13±2.5 5\*  28±5.5 5 8.6±2.3 2  36±4.6 3\* 12±1.7 4\*  33±5.5 4 10.5±3.0 1 | 109±32 \*\* 157±27 \*\* 48±19 \*\*  73±17 108±25 104±39  87±17 \* 119±42 \* 79±25 \*  83±19 130±17 78±20 |

泳

注：与模型对照组比较：\**P* <0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

**3.3血液学指标和免疫器官的变化**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 表 | 14 肝郁脾虚大鼠血液学、免 | 器官指标（ *x* ±s ） |
| 组别 | 血液学 | 免疫器官 |
|  | 血红蛋白(g/dl) 血小板(103/mm3) | 脾脏指数 胸腺指数 |
| 空白对照模型对照逍遥丸  龙胆泻肝 | 12±1.72 \* 787±130 \*  7.3±1.03 315±55  9.9±3.92 \* 644±105 \*  7.9±0.90 2 358±74 | 0.140±0.27 2 \* 0.873±0.29 6\*  0.175±0.711 0.143±0.69 6  0.176±0.7 13\* 0.141±0.69 2\*  0.173±0.46 6 0.103±0.23 4 |

疫

注：正常大鼠血红蛋白的参考值范围9.0~15.0，血小板参考值范围300~999。注：与模型对照组比较：\**P* <0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

空白对照组与模型对照组相比增高，表示造模成功。逍遥丸组与模型对照组比较增高，说明逍遥丸对肝郁脾虚模型能起到治疗作用，龙胆泻肝丸组与模型对照组比较无显著性差异。结果见表14。

**3.4脑组织单胺类神经递质变化**

空白对照组与模型对照组相比显著增高，表示造模成功。逍遥丸组与模型对照组比较增高，说明逍遥丸对肝郁脾虚模型能起到治疗作用，龙胆泻肝丸组与模型对照组比较5-HT增高，DA无明显差异。结果见表15。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表 15 肝 | 郁脾虚大鼠的单胺类神经递质( | *x* | ±s ） |
| 组别 | **5-HT (μg/g)** DA **(μg/g)** |  |  |
| 空白对照模型对照逍遥丸  龙胆泻肝丸 | 0.935±0.07 15\*\* 6.58±0.55 5\*\*  0.672±0.12 4 5.41±0.37 3  0.862±0.23 4\* 6.12±0.29 7\*  0.805±0.02 78\* 5.84±0.46 2 |  |  |

## **4** 讨论

注：与模型对照组比较：\**P* <0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\**P*<0.001

采用慢性束缚加饮食失节孤养的方法创立肝郁脾虚模型生动的模拟了现代人压力大、易饮食失节、孤处致抑郁，较符合中医的病因病机。

在一般外观行为中描述肝郁脾虚大鼠表现，与人在肝郁脾虚时少动、懒言、善太息、饮食减少、体重减轻、便秘等症状很相似。

在精神行为学测试中，模型对照组与空白对照组相比，肝郁证实验鼠1%蔗糖消耗量明显减少，反应了对奖赏的敏感缺乏和快感消失。在高架十字迷宫(EPM)中，肝郁证实验鼠进入开放臂进入次数比（OE%）和开放臂停留时间时间比（OT%），开放臂和封闭臂总的进入次数(OE+CE)显著降低，反应了动物运动能力降低。在旷场实验

（Open-field teat）中，肝郁证实验鼠水平运动的活动度及垂直运动的好奇程度均明显减少，表明其中枢神经系统抑郁状态，这种状态与人类肝郁证常见的缺乏动力、沉默寡言、生活兴趣减退等类似[25]。在强迫游泳实验中，肝郁证实验鼠的静止时间增加，即逃避不良环境的欲望减退，类似与肝郁证常见的“无助感”[26]。

在血液学指标检测中，因为脾为全身的气血生化之源，脾统血，脾虚会导致血红蛋白减少，血小板数目减少。

在免疫器官测量中，脾和胸腺在维持机体免疫功能上发挥着重要作用。脾脏指数

和胸腺指数可以反应机体免疫力的大小，肝郁脾虚模型对照组的胸腺指数和脾脏指数明显低于空白对照组。

在生化指标测试中，单胺类神经递质假说在中医肝郁证侯动物模型的发病机制中占有重要地位，本研究发现肝郁脾虚证可以导致大鼠脑组织5-HT、DA和NE水平明显低于正常对照组。体内的单胺类神经递质DA和5-HT是一类调节机体生理活动的重要物质，这些物质在体内的含量可反映神经系统功能变化。DA是兴奋及开心的信息传递物质。肝郁证大鼠脑内DA水平明显降低。5-HT是调节情绪及行为的重要活性物质，5-HT降低则呈现情绪低落、忧郁、焦虑状态。5-HT又是参与调节胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质, 5-HT在胃肠系统分布丰富，约占体内总量的90%, 5-HT与其特异性受体相结合对消化系统调节起着重要作用，5-HT降低则表现为食欲不振，体重减轻，乏力。

逍遥丸始载于《太平惠民和剂局方》，是治疗肝郁脾虚证经典方，具有疏肝健脾的功效。方中柴胡疏肝解郁，使肝气得以条达；当归、白芍养血柔肝：白术、茯苓健脾胃、助运化：薄荷助疏散条达：煨生姜降逆和中，且能辛散达郁；甘草益气和中。诸药共奏疏肝解郁，健脾和营之功。现代医学认为逍遥丸具有保肝、抗焦虑、抗抑郁、镇静、调节内分泌和平衡激素水平等多种作用。并有大量研究发现证明逍遥丸可以调节5-HT、DA单胺类神经递质改善临床症状。表明逍遥丸可以明显改善肝郁模型组大鼠的症状、体征；提高肝郁大鼠血浆中5-HT、DA含量。这说明逍遥丸确实对肝郁脾虚证有着良好的治疗效果。从一个方面验证了慢性束缚加饮食失节孤养成功创立了肝郁脾虚证大鼠模型。龙胆泻肝丸是治疗肝郁化火的经典方，具有疏肝泻火的作用，疏肝对肝郁证起到一定的作用，但对脾虚治疗无明显效果，从另一方面佐证该证型是肝郁脾虚模型而非肝郁化火模型，其结果具有较强的说服力。

## **5** 结论

本研究立足于发病学、临床表现和治疗效应，初步建立了基本符合中医理论的肝郁脾虚证大鼠模型。慢性束缚加饮食失节孤养模拟情志病因建立肝郁脾虚模型，其指标改变符合肝郁脾虚模型症状体征，疏肝健脾方逍遥丸改善模型大鼠症状体征，疏肝泻火方龙胆泻肝丸有一定的作用，表明肝郁脾虚模型。肝郁脾虚的指标，将为肝郁脾虚证型进一步开发提供科学依据，为临床提供帮助。

结**论**

本实验应用利血平、CCL4复制肝郁脾虚模型；自创复合情志法创立大鼠肝郁脾虚模型。通过本次实验得出结论如下：

## 1 大、小鼠利血平模型组均可以成功复制肝郁脾虚模型。

通过观察肝郁脾虚动物症候表现，检测肝郁脾虚的客观指标①精神行为学指标的测试：摄食、体重、蔗糖水偏嗜度；强迫游泳实验；自主活动测试；②血液学指标检测；免疫器官指数测定；来确定模型的合理性。其中实验鼠的毛色、理毛活动、大便性状、挣扎时的表现、精神状态、摄食、体重均与人倦怠乏力、纳呆、便溏或便秘、精神差相似，反应了肝郁脾虚模型中脾虚表现；实验鼠眼睛状态、对外界刺激的反应、蔗糖水偏爱度、自主活动测试、强迫游泳实验均与人郁闷不舒、对外界失去信心，缺乏探索能力、沉默寡言、生活兴趣减退相似，反应了肝郁脾虚中肝郁表现。综上所述，利血平致大鼠肝郁脾虚模型，是研究肝郁脾虚模型行为学较好的选择。

## 2 大、小鼠CCL4模型组复制肝郁脾虚模型不理想。

究其原因，CCL4模型组与空白对照组比较没有明显的差异，CCL4模型组肝郁脾虚动物症候表现在的毛色、理毛活动、大便性状方面与空白对照组无差异，肝郁脾虚的客观指标表现摄食、体重、蔗糖水偏爱度、自主活动测试、强迫游泳实验方面统计学无意义。其反应肝郁脾虚的关键指标均无意义，故认定CCL4模型组复制肝郁脾虚模型没有成功，其复制肝郁脾虚的合理性需要进一步验证。

## 3 自创复合情志法成功创立符合中医中医理论证候特点的大鼠肝郁脾虚模型。除通过上面的方法验证外，还有血液学指标检测：血红蛋白含量和血小板计数；

脑组织单胺类神经递质变化：用荧光分光光度法测定脑组织中DA、5-HT的含量。这两个指标能间接反应大鼠肝郁脾虚的指标。脾为全身的气血生化之源，脾统血，脾虚会导致血红蛋白减少，血小板数目减少。单胺类神经递质DA和5-HT是一类调节机体生理活动的重要物质，这些物质在体内的含量可反映神经系统功能变化，反应情志的变化可靠的指标之一。同时用疏肝健脾方逍遥丸和疏肝泻火方龙胆泻丸对抗效应验证模型，其中疏肝健脾方逍遥丸可改善模型大鼠肝郁脾虚症状体征，疏肝泻火方龙胆泻肝丸有一定的作用，佐证了该模型为肝郁脾虚模型。

结**语**

该课题为ft西省科技厅动物专项项目：中医肝郁证动物模型制备的一部分。

## **1** 肝郁证动物模型研究的必要性

证候的发生离不开致病因素的作用，但证候的形成是多因素共同作用的结果。以往动物模型多采用单一因素造模，忽视了人和动物的根本区别。中医证侯造模方法基本分为以下三类，比如：：1、单一精神刺激方法造模2、用单独药物造模3、物理方法造模，从上述造模方法看，其可靠性极为可疑，一是精神刺激没有考虑到人与低等动物的差异，人的精神活动有极为复杂的社会内容，而动物仅为条件反射，至多能形成表象，其结果是郁、是怒、是惊、是恐无法判断能否与人相同，同一刺激也未出现同一证型，惊则气乱、恐则气下、忧思伤脾、郁怒伤肝，在动物身上如何做出区别呢？另外，用药物或物理方法造模也显示出对中医概念理解肤浅的局限。风寒湿痹多为变态反应病，并不是风吹、冷冻能造出来的，它有复杂的内在根据，阴虚完全可以是体质问题，仅吃热药只能造成阳亢积热，无法确知是否阴虚。中医的湿证，虚证并不一定有过风寒和湿冷的实际接触。可想而知，这种模型能与中医证候不对应。

查阅黄国均主编的《医药实验动物模型制作与应用》中医证侯模型有心气虚、脾气虚、脾不统血证、肾阴虚证、肾阳虚证、胃寒证等，查阅陈奇主编《中药药理研究方法学》中医证侯动物模型有阳虚、阴虚、气血、血虚、脾虚、肾虚、厥脱证动物模型，李仪奎主编的《中药药理实验方法学》中医证侯模型有肾虚、血瘀、热毒证等病理模型，却都未见肝郁证动物模型的制备，本论文研究肝郁证动物模型制备，可以在一定程度上为中医证侯的客观化科研研究提供肝郁证动物的制备方法。

本课题所制备几种造模方法，基本克服了前述弊端，模拟了肝郁证的发病因素，造成实验动物的肝郁状态，并对此模型的建立和有效性作出初步评价。本研究克服了因药物造模法引起的实质性肝损伤和单一情志造模法某种程度上造成的动物机体直接损伤的缺点，更接近于肝郁证临床的病因和病症，较好的再现了中医肝郁证的临床症状变化特点，为中医药研究治疗肝郁证提供了几种全新的造模方法。肝郁模型研究促进其它证侯模型的研究的发展，其复制方法具有明显的病因模型、综合模型特征，证、病结合模型研制较多，故为其它证侯模型的研究提供了丰富的经验。

中医脏腑不单纯是一个器官，包含着现代医学多个系统的功能，证候本身是一个整体概念，反映多脏器、多系统的生理和病理变化。某一证不会只有某一项指标的异常，某一个指标不可能只反映某一证的特点。不同的疾病，即使出现相同的证候，客

观指标的变化也不可能完全相同，忽视病的差异，片面强调证的同一性，是没有科学根据的。证候的复杂性和整体性决定了某一证候都不可能是单一物质量变的结果，一可能是多项指标异常改变的综合作用，片面地追求单一指标的改变来探寻证候特异性，必然丢失了一些相关指标，远离证候的本质。不同的证候可能在某个指标的改变上出现重合，仅靠单一指标的变化来判定证候类型是有无法做到的。因此本试验进行了多项指标的研究，通过多种指标的综合分析，方能得出肝郁化火或者肝郁脾虚证侯，但是该课题仍需与其它中医证侯模型对比研究，更应该建立病证结合动物模型，但是由于一年的试验时间有限，该课题的余下部部分仍然需要继续探索。

## **2** 本课题肝郁证动物模型制备评价指标初探

本研究探索了三个制备肝郁证侯动物模型的方法，其中一个失败两个成功，验证模型方法：首先进行一般外观行为观察，有意义则进行下一步精神行为学指标测试、血液学指标检测、免疫器官指数测定、脑组织单胺类神经递质变化、经典疏肝方验证。本课题研究所选试验动物均为大、小鼠，因来源方便，且嗅觉、视觉灵敏，做肝郁证动物模型精神行为反应良好，深入研究可选用猫、狗、猴，这些动物自然行为广泛而稳定，且与人类有着类似的情绪反应，为了尽大的克服啮齿类动物与人类的活动差异，大鼠、小鼠的活动在夜间比白天多，上午十点以前下午四点以后比中午左右活动多，我们基本上选择上午十点之前与下午四点之后进行操作。

2.1单胺类神经递质假说在中医肝郁证侯动物模型的发病机制中占有重要地位，本研究发现肝郁脾虚证可以导致大鼠脑组织5-HT、DA和NE水平明显低于正常对照组，这也与临床上多数中医辨证为肝郁脾虚证病人脑内5-HT和NE水平低下相似。可认为该模型的成功。

2.2糖水消耗量在成功造模中均增加，有统计学意义，因此糖水消耗量试验不是特异性指标，但是与文献报道抑郁症患者“快感缺乏试验”中糖水消耗量减低形成对比，因此这个指标可以作为中医肝郁证动物模型与西医抑郁症动物模型的鉴别指标。笔者认为可能与以下影响因素有关：（1）动物种系。有学者就Wistar和SD大鼠对糖水消耗的反应性进行过比较，发现Wistar大鼠更易出现糖水消耗量下降现象（3）实验操作。由于大鼠对喂水瓶有啃咬行为，导致个别糖水消耗测定实验中喂水瓶漏水从而直接影响实验结果，因此确保喂水瓶的密闭性至关重要。本试验仍需进行大鼠种别之间的对比深入研究。

2.3自主活动测试结果，肝郁脾虚大鼠模型或者小鼠模型均出现自主活动减少，表明

其中枢神经系统抑郁状态，这种状态与人类肝郁证常见的缺乏动力、沉默寡言、生活兴趣减退等类似，是区分肝郁脾虚证与肝郁化火证的重要指标。

2.4免疫器官指数是一个测量多种免疫系统疾病的有效指标，当然也可以用来进行本试验，由这个指标可以联想到中医的证可以包括西医的很多疾病，用疏肝健脾法或者疏肝泻火法治疗免疫低下性的疾病（肾上腺、甲状腺、胸腺疾患，脑病，肝病，恶性肿瘤等等）皆可辨证属于肝郁脾虚证或者肝郁化火证而辨证施治。

2.5经典疏肝方验证有效，这是测定一个肝郁证侯动物模型制备是否成功的重要内容，本试验第三部分进行了疏肝经典方验证试验，结果表明逍遥丸对肝郁脾虚证各项指标均有改善作用，而龙胆泻肝丸不能改善肝郁脾虚指标情况，通过经典疏肝方验证试验，确实反证了肝郁脾虚证侯模型制备的成功与失败。

总之，本课题评价指标的建立偏重于精神行为药理学研究，事实上，肝郁证包括很多疾病内容，涉及消化系统、心血管系统、内分泌系统等多各系统，比如①细胞免疫功能：血清白介素2、CD4、CD8、CD3等；②血浆环磷酸腺苷和环磷酸鸟苷含量；

③肾上腺皮质和性腺功能：血清皮质醇，血清雌二醇和皋酮（T）；④能量代谢：血清

乳酸和乳酸脱氢酶(LDH)活性；⑤甲状腺功能：血清总三碘甲腺原氨酸(Tn)；.胸腺、脾脏、肝脏、肾脏、卵巢、肾上腺指数（脏器湿重/体重）。其特异性指标都有待积极探索，同时也提示着建立病证结合动物模型的思路亟待开展。本研究从中医模型制备思路到具体操作，最后进行评价指标的初步建立。初步制备了肝郁脾虚证动物模型。但让有许多不足之处，如中医证候的概念颇为复杂，该模型的特异性、动物性别与品系的适应性、行为变化的发生发展规律、多种经典方剂效应的差异等问题，需要进一步深入研究。

参考文献

[1] 陈国桢, 金益强, 李学文, 等. 肝郁脾虚的理论与实验研究[J]. 湖南医学院学报, 1979, 4(3): 131-143.

[2] 皱移海, 黄韧, 连至诚, 等. 实验动物学[M]. 广州: 暨南大学出版社, 1999, 167: 180. [3] 包祖晓. 焦虑症. 中医证治探讨[J]. 吉林中医药, 2008, 28(3): 169-170.

[4] 王北婴, 李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法[M]. 上海科学技术出版社, 2001, 12(1): 501-502.

[5] 冯飞, 许崇涛. 利血平抑制模型的剂量探讨[N]. 汕头大学医学院学院2007, 20(4): 223-225.

[6] 任路, 李浩. 关于肝郁证动物模型研究现状及存在问题的思考[J]. 中医药学报, 2006, 34(4): 44-46.

[7] 陈小野主编. 实用中医证候动物模型学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 16.

[8] 顾永华, 彭绵. 中医肝郁证研究概况[J]. 成都中医药大学学报, 1987, 10(3): 56.

[9] 苗明三. 实验动物与动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997. 300.

[10] 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研究[J]. 中国中医药学报, 2001, (21): 7.

[11] 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.

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

[13] 于琦. 四逆散、归脾汤与温胆汤对慢性应激肝郁模型大鼠行为学的影响[J], 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 148-150.

[14] 周力, 蒲琴, 申理, 等. 利用不良情志建立肝郁证动物模型初探[J], 中国药理与临床, 2008, 24(3): 114-116.

[15] 须惠仁, 傅湘琦, 向丽华, 等. 肝郁证的动物模型研究-激怒刺激对大鼠血液流变学的影响[J]. 中医杂志, 1991, 32(6): 161.

[16] 聂丹丽, 陈嘉屿, 崔大汇, 等. 胃动灵对肝郁、脾虚大鼠模型胃肠运动影响的实验研究[J]. 陕西中医, 2000, 21(6): 283.

[17] 王北婴, 李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法[M]. 上海科学技术出版社, 2001, 12(1) 501-502.

[18] 张雪琴, 崔跃, 骆渊, 等. 抑郁症的环境应激动物模型的研究[J]. 神经疾病与精神卫生, 2010, 10(1): 100-101.

[19] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价[N]. 北京中医药大学学报, 2008, 6(31): 396-400.

[20] Poraolt RD. Anton G. Blavet N, et a1． Behavioural despair in rats: anLqq model sensitive to antidepressant treatments． Eur J Pharmacol. 1978, 47(4): 379—391．

[21] 于丰彦, 周福生. 肝郁脾虚动物模型的研究概况[J]. 现代消化与介入治疗, 2009, (17): 57-59.

[22] Barbalho CA, Nunes de SouzaRL, Canto de Souza A. Similar anxiolytic——like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for therelease an endogenous benzoazepine inverse agonist in mice exposedto elevated plus-maze test[J]． Brain-Res, 2009, 1267(24): 65-76.

[23] Poraolt RD, Anton G. Blavet N. et a1. Behavioural despair in rats: anLqq model sensitive to antidepressant treatments. Eur J Pharmacol. 1978, 47(4): 379-391.

[24] 叔云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京人民卫生出版社, 1991, 642-643.

[25] 尚向永. 肝郁证候患者的心理研究[J]. 中国健康心理学杂志, 2007, 15(11): 983—984.

[26] 周力, 蒲琴, 申理等. 利用不良情志刺激建立肝郁证动物模型初探[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 114-115.

**中医肝郁证动物模型评价指标评述**

**摘要：**目的：本文综述了与肝郁证动物模型的评价指标有关的研究进展，旨在为进一步明确研究提供指导和思路。方法：主要通过中医肝的生理功能和病理变化、病因病机和肝郁证的临床特点的简述，引出与肝郁有关的指标。结果：从行为学，血液和生化方面来检测。结论：对肝郁证的评价标准还处于模糊状态，有待于进一步深入研究，从而系统全面的来阐释肝郁证评价指标。

关键词**：**肝郁证；模型；评价；指标

随着社会的发展、人类的进步、竞争的激烈，以及社会各方面压力的不断增加，引起人们的情志变化剧烈，导致各类疾病的发生[1]。肝气郁结是情志疾病的基本证，它在情志疾病的各个发展阶段都可能存在，且情志病的很多证候也是由肝气郁结的基础上发展而来的。只要抓住肝气郁结，情志病是完全可以掌握的[2]。对肝郁证的研究一直是中医研究领域的热点，已初步证实肝郁证具有现代病理生理学基础，取得了阶段性成果，认为和机体神经、内分泌、循环、消化、免疫等多系统密切相关[3]。

肝郁模型的建造国内外大多都是采用以下几种方法：1.药物造模：①CCL4注射法肝郁脾虚模型[4]②艾叶注射法肝郁脾虚模型[5]③肾上腺素皮下注射法[6]；2.情志造模法：①夹尾法急性激怒致肝郁证模型[7] ②捆绑式肝郁证动物模型[8] ③模具激怒肝郁模型[9]通过对上述中医肝郁证动物模型的探讨，我们不难发现这些模型与中医肝郁证的临床发病特点仍有较大差异，而且未建立一个合理的中医学特有的评价标准。因此在本课题的研究工作中有必要注意以下几个方面的研究：①肝郁证的病理改变中，怒的一方面显然容易模拟，但抑郁一方面的衡量标准需要进一步加强；②在造模上要注意肝脏损害与肝郁证之间的区别和联系，使模型更加具有说服力；③加强模型在行为学方面的研究及肝郁证的可逆性的研究，缩小模型与临床发病学之间的差异；④建立具有反证功能药物评价标准，即公认的肝郁证治疗方剂对模型动物行为改变对抗性效应的研究。

目前肝郁脾虚证动物模型以及相关的实验研究较少：检索目前相关肝郁脾虚证型相关论文的中医药治疗研究，大部分多集中于临床报道，仍以经验医学为主，实验研究远滞后于临床研究，这对于现有水平的提高十分不利，，实验研究远滞后于临床研究，[10、11]限制了现有治疗水平的提高，本研究则偏重实验研究，侧重从实验角度将此经验加以验证并作进一步的深入研究。总而言之，现在尚无一种公认的确切且特效的肝郁脾虚证候动物模型的制备方法。且对动物肝郁模型的评价指标没有建立统一的

标准，现就中医肝郁证候模型的评价标准目前的研究进行综述。

肝郁证的证侯学特点：肝的主要生理功能主疏泄、调情志。情志活动以气血运行通畅为基础，肝气疏泄能调畅气机，促进血行，故能调畅情志。肝的疏泄功能，能调畅气机，因而能使人心情舒畅。肝的主要病理表现为肝气郁结。中医肝郁证是因情志不舒、气机郁滞所致心情抑郁、情绪不宁、胸胁胀闷或易怒善哭为特征的一类临床病证，其形成多与现代抑郁、焦虑、悲痛等负性情绪心理应激状态有关[12]。具有中医证候特征的肝郁证模型是肝郁证现代研究的重要环节。下面简述肝郁证模型的指标。

1精神行为指标

1.1观察记录造模中肝郁组大、小鼠（体重200±20g的大鼠；体重20～24 g的小鼠），外观行为和一般情况方面的变化。在造模成功的前三天，每日上、下午（定点）观察模型各一次，观察时间为15min或每次给药前仔细观察15min。以下为观察项目，有此项表现：明显记2分，轻微记1分，当总成绩达到8分以上时，造模可能成功，需要进行下一步的检测。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 眼睛 | 日常理毛，皮毛变化 | 对外界刺激的反应 | 大便（色，质，大小） | 挣扎时的表现 | 精神状态 |
| 眯小 | 日常理毛活动减弱，皮毛不泽，甚者稀疏 | 对 外 界 刺 激  （声音、拨弄等）反应迟钝 | 大便色浅，质软甚者稀溏，颗粒变小 | 挣扎时无力且挣扎时间短 | 精神萎靡，困倦嗜睡 |

1.2行为测试指标

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 体重 | 摄食 | 摄水 | 摄糖 | 高架十字迷宫 | 旷场试验 | 强迫游泳实验 | 肛温 |
| 下降 | 减少 | 减少 | 降低 | 开臂闭臂活动均减少 | 水平垂直活动减弱 | 不动时间加长 | 无 变化 |

1.2.1体重与摄食：因为脾虚运化功能失常，所以摄食明显减少，体重较正常组相比，增长缓慢。体重和摄食量的测定：每周一、周四于清晨8: 00时加食物至50g，次日

8: 00称食物余重，同时称动物体重，计算24h的摄食量（摄食量=食物总量-食物余量

/体重×100%) [13]。

1.2.2摄水与摄糖：液体消耗实验中糖水的消耗量和糖水偏好百分比作为衡量对奖赏的敏感缺乏和快感消失的客观有效的指标。与测摄食的时间可同时进行。实验前，在隔噪音，安静的房间内，给大鼠两瓶水，一瓶为1%的蔗糖水，一瓶为自来水，并称重，24h后，再次称重，计算动物的总液体消耗、糖水消耗、普通水消耗、糖水偏爱

（糖水偏爱=糖水消耗/总液体消耗×100%）[13]。

1.2.3高架十字迷宫(EPM)是抗焦虑研究中应用最广泛模型之一，开放臂进入次数比

（OE%）和开放臂停留时间时间比（OT%）是该模型测试中的经典指标[14]，反映的是动物趋近—规避冲突的结果与焦虑程度直接相关。通常抗焦虑药只增加动物对开放臂的探索，使OE％和OT％上升。开放臂和封闭臂总的进入次数(OE+CE)反映了动物总的运动能力，可用来观察药物有无镇静作用及镇静强度。用仪器来进行测量（八臂迷宫测试系统：RM-200，成都泰盟科技有限公司）。

1.2.4旷场实验（Open-field teat）是用来测试中枢神经系统“兴奋”或“抑郁”状态的经典实验方法，故本研究采用方法连续观察了肝郁证造模期间大鼠的行为学变化[15]。在

Open一fieId实验中，反映动物的活动度的水平运动及反映动物的好奇程度的垂直运动均明显减少[16]，这种状态与人类肝郁证常见的缺乏动力、沉默寡言、生活兴趣减退等类似[17]。大鼠自制开野箱，长宽各90cm，高35cm，无盖，内划分为25个相同的小格。小鼠自制开野箱，高20m、长45cm、宽45m，上面敞开，底面分成面积相等的25块，操作者握住实验鼠尾根部1/3处，轻轻将实验鼠放入旷场箱的正中格内开始同步录像、计时。观察5min内实验鼠的活动情况。取出实验鼠后，用毛巾蘸清水及低浓度的酒精彻底擦拭箱底，并等待其挥发扩散，避免留有气味而干扰下一只实验鼠的观察结果。观察如下指标：1、水平穿格数：三爪以上跨入临格是次数。2、站立次数：两前肢向上抬起离开箱底面或攀附在侧壁上，以后腿支撑使身体竖立的次数。3、理毛修饰次数：前肢向上抬举，抓痒、洗脸、舔足的次数。4、粪便次数。中央格停留时间反映动物的认知能力，穿越格子数反映动物的兴奋性和探究性，理毛修饰反映了动物对环境警觉性的高低，粪便次数反映动物的紧张程度[18]。

1.2.5强迫游泳实验也称行为绝望实验或Porsoh实验。在强迫游泳实验中，动物静止时间增加，即动物逃避不良环境的欲望减退，类似与肝郁证常见的“无助感”[19]。做大鼠强迫游泳实验时，将大鼠置于水深15～18 cm的圆柱形透明容器（泳池）中，进行15

min“前游泳”。“前游泳”对大鼠而苦是一种不可逃避的应激。造成“抑郁反应”[20]。用高

42com，直径23com水深30com的透明桶盛温度为（24±2）℃水，先强迫游泳15 min，

24h后把大鼠放入同样环境的水中，记录其5min中内攀爬（四肢攀抓桶壁）、游泳（四肢有规律的水平划动）、静止（四肢静止使身体漂浮于水面，使耳朵和鼻子露出水面的行为）的时间。做小鼠强迫游泳实验时，实验前24 h进行15 min的游泳训练，且水深为10 cm为宜[21]。在高20cm，直径15cm，水深10cm水温为（23±2）℃的大玻璃杯中进行测试，时间为6min，记录后4min的不动时间，每测完一只即换水。

1.2.6肛温的测量方法：将体温计探头的末端涂凡士林后，大鼠插入直肠2—3 cm[22]、小鼠插入1cm，测前要等实验鼠排便后，一手固定其头背部，一手将温度计蘸少许石

蜡插入实验鼠肛门（实验鼠♂侧肛温时要避开其阴囊，因为阴囊温度比肛温低），等待1分钟后读数并记录。

1.2.7悬尾实验(tail suspension test, TST)悬尾实验由Steruetal在1985年提出[23]，通过使实验鼠处于行为绝望状态，分析其活动。具体方法是从笼中取出实验鼠，用胶带实验鼠尾尖2 cm处粘贴，在粘贴处打一个小孔，实验鼠被悬吊在一个与应变计量器相连的一牵引钩上吊6 min，计算机系统处理应变计量器上显示的外力值。自动收集和分析每个实验鼠的运动。每个实验鼠完全不动被认为是一种挣扎无助状态的反应，实验鼠完全不动时确定一个阈限值，这个阈限值以下的时间表明不动的时间。悬尾实验具有简单，快速，敏感等特点，主要用于抗抑郁药物的研究和初选[24]。

2、血液学指标

2.1血常规因为脾为气血生化之源，脾虚会导致血红蛋白减少，血小板数目减少。

2.2血浆T细胞亚群的检测是从亚细胞水平上反映机体细胞免疫功能的重要指标。T细胞借助其相互拮抗作用调节着免疫应答过程。以保持免疫功能的平衡.一旦这种衡紊乱，即可导致免疫功能紊乱及一系列病理变化。T细胞亚群的测定：抗体包被法[25]。白细胞介素I (Interleukin2, IL - 2)是目前免疫学研究的活跃领域.主要由活化的辅助性T淋巴细胞分泌的一种可溶性淋巴因子，该因子一方面促进单核巨噬细胞分泌白细胞介素I.另一方面可使静止的T细胞表达IL一2受体.后者与IL-2结合后导致淋巴细胞

DNA合成能力增强，细胞发生增殖，同时分泌其它的淋巴细胞因子因引起B细胞的免疫应答等[25]。IL-2介导特异性血清免疫，血浆白细胞介素II(IL-2)的检测方法：取血，

3000rpm离心，分离血浆，用ELISA检测试剂盒测定血浆IL-2[26]。血浆皮质醇（cortisol。

COR）、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、促肾上腺皮质激素释放激素(cortieotrophin releasing hormone．CRH)及下丘脑CRH含量变化。肾上腺皮质激素的过度释放.对免疫功能产生抑制作用.这是应激抑制免疫功能的主要途径之一

[25]. 末次给药后30 min，腹腔注射l0％水合氯醛麻醉动物，腹主动脉取血；迅速分离下丘脑，称质量后于煮沸的9.0 g\l氯化钠注射液中煮沸3 min，按试剂盒说明书匀浆，3 000 r／min低温离心30 min，分离上清液。采用放射免疫法分别测定各组动物血浆及下丘脑COR、ACTH、CRH含量[27]。

2.3血流变肝郁与血瘀是郁证中两个紧密相关的病理过程。肝在生理上的特性和功能，决定了其在病理上对瘀血产生必然联系和影响[28]。全血粘度、血浆粘度及红细胞聚集指数、微循环障碍是肝郁气滞证患者常见的病理变化.实验结果发现：血小板聚集率明显升高，全血粘度、血浆比粘度升高，复钙时间延长，红细胞比容减小，血沉

加快。血液流变学的检测发放：大鼠体内抗凝，静脉注射0..2%肝素钠0.5ml/100g，取血，检测血液流变学各项指标[26]。

2.4血小板超微结构与放射免疫法血小板和血瘀密切相关。电镜下血小板超微结构的变化：血小板带有树枝状突起和许多微突，并以粘连聚集者为多。用免疫法测定

TXA2, PGI2. TXA2 是目前发现的最强的血小板聚集物和促血管收缩物质，而PGI2

是目前最有效的抑制血小板最强的物质和血管扩张物质[29]。

3组织器官形态学指标

3.1免疫器官脾和胸腺是体内重要的，在维持机体正常免疫功能方面发挥重要作用[29]。有关实验结果发现：模型大鼠体重及胸腺、脾重量显著减轻，，自然恢复1周后上述指标未见明显恢复或过度恢复。免疫器官称重的方法：处死大鼠后，立即剥离脾脏、胸腺，用滤纸吸去附带的血液，称重，计算脾脏、胸腺指数（mg/g）[26]。

4 Th化指标

4.1单胺类神经递质脑内单胺类神经递质是调节机体情绪、行为状态、精神活动的重要物质。有关中枢单胺类递质与肝郁证之间的关系越来越受到关注。脑内的单胺类神经递质包括去甲肾上腺素(NoradrenaUne, NE)、多巴胺(Dopamine, DA)及5-羟色胺（5-Hydmxytryptamine, 5-HT），现代研究认为它们对情绪的影响最大。它们是一类调节机体生理活动的重要物质，这些物质在体内的含量可反映神经系统功能变化[30]。单胺类神经递质的测定：大鼠断头，取脑组织，称重后置于含有5ml预冷酸化正丁醇的匀浆器中，冰水浴中匀浆，离心。用荧光分光光度法测定脑组织中去甲肾上腺（NA）、多巴胺（DA）、5-羟色胺（5-HT）的含量。另外，肝郁模型的大鼠存在海马单胺递质的异常变化。方法：取模型制备中的各组大鼠，于末次给药后30min处死，在冰盘上摘取大脑。迅速分离海马组织，置液氮罐中保存。根据文献[31]采用反相高效液相色谱电化学法测定海马组织中NA、5-HT含量。结果：发现肝郁模型大鼠脑组织中NA含量明显降低、5-HT显著增加。

5肝郁模型指标评述

目前，在研究中仍然存在着选取的一般指标项目较多，而特异性、敏感性均高的指标相对较少的现状，其中不少指标在不同证型之间有类似的改变，故在今后的研究中，应选取灵敏性、特异性均高的指标，进行多重比较研究，有必要建立符合临床实际情况，可重复性强的，简单易行的评价标准，找出真正为肝郁证所特有的诊断，最终为研究人员和临床医师诊断肝郁，判断病情提供便利找到理想的治疗肝郁的方法。

参考文献

[1]. 黄瑞红, 王艳红, 罗惠珍. 从肝气郁结论情志与健康的关系[J]. 中国民康医学杂志, 2003, 15（3): 146-146.

[2]. 王竹风, 陈家旭, 赵歆, 等. 探讨肝郁的影响[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(10).

[3]. 陈家旭, 杨维益． 神经－内分泌－免疫网络研究概况及其与中医肝脏关系的探讨[J]． 北京中医药大学学报, 1995, 18(4): 7．

[4]. 陈国桢、金益强、李学文, 等. 肝郁脾虚的理论与实验研究[J], 湖南医学院学报, 1979, 4(3): 131-143.

[5]. 皱移海, 黄韧, 连至诚, 等. 实验动物学[M], 广州: 暨南大学出版社, 1999.16(7): 180.

[6]. 包祖晓. 焦虑症中医证治探讨, 吉林中医药, 2008, 28(3): 169-170.

[7]. 任路, 李浩. 关于肝郁证动物模型研究现状及存在问题的思考, 中医药学报, 2006, 34（4）: 44-46.

[8]. 陈小野主编. 实用中医证候动物模型学. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 16.

[9]. 顾永华, 彭绵. 中医肝郁证研究概况[J], 成都中医药大学学报, 1987, 10(3): 56.

[10]. 须惠仁, 傅湘琦, 向丽华, 等. 肝郁证的动物模型研究-激怒刺激对大鼠血液流变学的影响[J], 中医杂志, 1991, 32(6): 161.

[11]. 聂丹丽, 陈嘉屿, 崔大汇, 等. 胃动灵对肝郁、脾虚大鼠模型胃肠运动影响的实验研究[J], 陕西中医, 2000, 21(6): 283.

[12]. 任路, 李浩. 关于肝郁证动物模型研究现状及存在问题的思考[N]. 中医药学报, 2006, 34(4): 44-46.

[13]. 张雪琴, 崔跃, 骆渊, 等. 抑郁症的环境应激动物模型的研究[J]. 神经疾病与精神卫生, 2010, 10(1): 100-101.

[14]. Barbalho CA, Nunes de Souza RL, Canto de Souza A． Similar anxiolytic——like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release an endogenous benzoazepine inverse agonist in mice exposedto elevated plus-mazetest[J]． Brain-Res, 2009, 1267(24): 65-76.

[15]. 叔云, 卞如廉, 陈修． 药理实验方法学[M]．2版． 北京: 人民卫生出版社, 1991, 642-643.

[16]. 夏军, 叶慧, 周义成, 等． 慢性应激大鼠抑郁模型的建立及其有效性的探讨[N]． 华中科技大学学报(医学版), 2005, 34(4): 493-495.

[17]. 尚向永． 肝郁证候患者的心理研究[J]. 中国健康心理学杂志, 2007, 15(11): 983-984.

[18]. 岳利峰, 丁杰, 陈家旭等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价[N]. 北京中医药大学学报, 2008, 6(31): 396-400.

[19]. 周力, 蒲琴, 申理等. 利用不良情志刺激建立肝郁证动物模型初探[J]. 中药药理与临

床,2008,24(3):114-115.

[20]. Poraolt RD. Anton G. Blavet N, et a1． Behavioural despair in rats: anLqq model sensitive to antidepressant treatments． Eur J Pharmacol. 1978, 47(4): 379-391．

[21]. 马行, 库宝善, 姚海燕等. 对抑郁模型小鼠强迫游泳实验方法的探讨[N]. 徐州医学院学报, 2005, 25(3): 230-233.

[22]. 史正刚, 李玉霞, 李洁等. 热立清直肠滴注液对实验性发热大鼠体温及下丘脑中IL-1 B和cAMP含量的影响[J]. 中医儿科杂志, 2009, 5(5): 11-15.

[23]. Steru L, Chermat R, Thierry B, et a1． The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice[J]． Psy—chopharmacology, 1985, 85(3): 367-370．

[24]. 张雪琴, 崔跃, 骆渊等. 抑郁症的环境应激动物模型研究[J]. 神经疾病与精神卫生, 2010, 10(1): 100-101.

[25]. 刘莲, 减佩林. 保神开郁冲剂对肝郁证大鼠免疫学机制的影响[N]. 辽宁中医学院学报, 2001, 6(3): 139-141.

[26]. 严亨秀, 任昉, 顾健等. 柴胡疏肝散对实验性肝郁证大鼠的影响[J]. 中药药理与临床, 2006, 22（6): 5-6.

[27]. 王桐生, 阎胡, 王玉杰等. 柴疏四君汤对肝郁脾虚大鼠下丘脑一垂体一肾上腺皮质轴变化的调整作用[N]. 安徽中医学院学报, 2009, 28(3): 29-31.

[28]. 李艳彦, 谢鸣, 王洪海. 肝郁脾虚证模型大鼠血流变及TXB2、PGF l a的变化[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(1): 15-18.

[29]. 周永仓, 翁心植等. TXA2, PGI2的平衡与临床[J]. 中华内科杂志, 1987, 26(1): 49.

[30]. 张虹, 王明军. 逍遥散对肝郁证大鼠脑内神经递质的影响[J]. 中医药学刊, 2006, 24(7): 1331-1332.

[31]. 王桐生, 谢呜, 张艳, 等. 肝郁模型大鼠行为学与脑单胺递质的变化及柴胡的干预作用[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(10): 934-937.

致**谢**

时光茬再，光阴似箭！回顾这三年寒窗，衷心感谢导师冯玛莉教授的辛勤培养，感谢导师学业上给予的悉心指导、生活上无微不至的关怀。导师渊博精深的知识、严谨踏实的治学态度和对科学不懈追求的精神，使学生时刻铭刻在心并受益终生。学生三年来的每一点成长，每一分进步都凝聚着老师殷切的期望和满腔的心血，衷心感谢导师的谆谆教侮和悉心指导！

由衷感谢ft西省中医院中心实验室的老师对本研究的悉心指导！感谢在临床实习中刘照峰、高艳霞、刘亚丽等老师对我的启发与帮助。

感谢研究生部中医临床基础教研室全体老师给予的帮助与支持！感谢研究生处全体老师在我学习和工作中给予的大力协助！

感谢师姐宋美卿，师兄白灵给予的热情帮助！

最后我要深深的感谢我的父母和家人给予我无私的鼓励和支持，使我全身心的投入到学习和工作中，顺利完成学业。

# 作者简介

姓名：郭建丽性别：女

出生年月：1985年1月民族：汉

籍贯：ft西省晋中市学历：硕士研究生学科：中医临床基础

研究方向：经典方证的临床及实验研究

教育背景：2009.9---2012.7 ft西省中医学院

2004.9---2009.7 ft西省中医学院

**发表论文**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 论文名称 | 发表刊物 | 署名次序 |
| 1 | 《中医肝郁证动物模型评价指标概述》 | 光明中医 | 第一作者 |
| 2 | 《利血平致肝郁脾虚的探讨》 | ft西中医学院学报 | 第一作者 |
| 3 | 《情志刺激致大鼠肝郁脾虚模型的研究》 | 中华中医药杂志 | 第一作者 |