

柴郁地仙方对围绝经期抑郁症模型大鼠行为学及 HPG 轴的影响※

● 李丽丽 朱红梅[▲]

摘要 目的:探讨柴郁地仙方抗围绝经期抑郁症的作用途径。方法:50只SD大鼠分为假手术组、模型组、盐酸氟西汀组、戊酸雌二醇组、柴郁地仙方组,每组10只,假手术组行假手术,其余行卵巢去势术后孤养并予以21d慢性轻度不可预见性刺激,观察刺激过程大鼠行为学变化,采用Elisa法检测血清E2、FSH、LH水平。结果:柴郁地仙方能够维持大鼠Open-Field水平得分稳定,上调血清E2水平,抑制血清FSH、LH过度分泌,与模型组比较差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。结论:柴郁地仙方能改善围绝经期抑郁症大鼠行为,其机制可能与纠正HPG轴功能紊乱相关。

关键词 柴郁地仙方 围绝经期抑郁症 HPG轴

围绝经期抑郁症(PDD)是指初发于围绝经期,以持续的情绪抑郁为主要特征的一种情感障碍性疾病^[1]。抗抑郁与激素替代疗法对本病的治疗具有一定的效果,但由于PDD本身发病的复杂性及药物潜在的副作用,患者依存性较差^[2-3]。中医学主张整体观念与辨证论治相结合,对疾病的治疗有多靶点、毒副作用小、依从性好的优点。中药复方柴郁地仙方在治疗PDD的临床应用中疗效显著^[4],但药理机制尚不明确。本实验观察柴郁地仙方对PDD模型大鼠行为学及下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的影响。

1 材料

1.1 药物 柴郁地仙方:柴胡12g,郁金10g,熟地黄10g,仙灵脾10g,党参10g,茯苓10g,法半夏12g(免煎冲剂,江阴天江药业有限公司);盐酸氟西汀胶囊(上海中西制药有限公司生产,生产批号:150102);戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司广州分公司生产,进口药注册号:H20120368,药品批

准文号:国药准字J20130009)。

1.2 动物 SPF级SD大鼠50只,3~4月龄,体重(240 ± 10)g,购自厦门大学实验动物中心[许可证号:SCXK(闽)2013-0001]。5只/笼饲养,食物与水充足供给,可自由摄取,饲养室温度(22 ± 1)℃,相对湿度50%,光照时间7:00-19:00,适应饲养环境1周后开始实验。

1.3 主要试剂 大鼠雌二醇(E2)、促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成激素(LH)酶联免疫吸附测定(Elisa)试剂盒(上海优选生物科技有限公司,批次号分别为:20150725B、20150810B、20150725B)。

1.4 主要仪器 ZH-ZFT型旷场实验视频分析系统(安徽正华生物仪器设备有限公司);M2000多功能酶标仪(瑞士Tecan公司),CKX31倒置显微镜(日本Olympus公司),CHOL-16M高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 50只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、盐酸氟西汀组、戊酸雌二醇组、柴郁地仙方组,每组10只大鼠,其中假手术组大鼠行假手术,其余4组大鼠均进行卵巢去势手术。

2.2 卵巢去势手术(Ovx)^[5] 大鼠经7%水合氯醛溶液(400ml/kg)腹腔注射麻醉后腹位固定,于最末肋

※基金项目 福建省卫生厅资助项目(No. WZPW201307)

▲通讯作者 朱红梅,女,教授,主要从事经方治疗妇科病及围绝经期抑郁症相关研究。E-mail:z5913778@126.com

●作者单位 厦门大学医学院(361000)

骨下端、腋中线距脊柱外 2cm 处切开皮肤、筋膜及肌肉层,取出黄色脂肪包裹的黄红相间的卵巢组织,分离脂肪团,将卵巢、输卵管及周围脂肪一并结扎切除,将子宫放回原位,缝合肌肉和皮肤,用青霉素钠敷于伤口处。

2.3 假手术(SHAM)^[6] 取出大鼠黄色脂肪包裹的黄红相间的卵巢组织,确保卵巢及输卵管组织完整,仅切除卵巢周围部分脂肪团,将卵巢送回腹腔,逐层缝合,同法摘除对侧卵巢周围脂肪团,其它步骤与 Ovx 组相同。

2.4 大鼠动情周期观察 将蘸有生理盐水的棉拭子轻轻插入大鼠阴道内约 1~2cm,轻轻旋转擦拭后取出,将棉拭子擦拭下的阴道分泌物均匀涂抹到载玻片上,于倒置电子显微镜下观察标本中半透明阴道上皮细胞数量,每日 18:00 进行,连续 6d。阴道上皮细胞数量没有明显变化,说明手术清除卵巢成功;反之失败。假手术组大鼠涂片中上皮细胞数量应存在周期性变化。

2.5 抑郁模型制备^[7] 采用孤养与 21d 慢性轻度不可预见性应激(CUMS)相结合的方法建立抑郁模型。刺激包括:冰水游泳(4℃,5min)、热应激(45℃,5min)、夹尾(1min)、禁水(24h)、禁食(48h)、潮湿垫料(24h)、束缚(1h)、鼠笼倾斜(45°,24h)、昼夜颠倒、通宵照明,平均每种刺激 2 次,按顺序进行 2 轮。假手术组 5 只/笼常规饲养,不参与 CUMS 过程。

2.6 药物干预 假手术组、模型组予生理盐水灌胃,盐酸氟西汀组予盐酸氟西汀混悬液灌胃,戊酸雌二醇组予戊酸雌二醇混悬液灌胃,柴郁地仙方组予柴郁地仙方混悬液灌胃。药物按大鼠-人体质量等效剂量比 6.3 配制,4℃ 保存,0.1mL·kg⁻¹ 体重灌胃,灌胃前加热至 37℃,自 CUMS 开始第 1d 起至结束后 1d,共 22d,每日 18:00 进行。

2.7 行为学观察(Open-field 实验) 于 CUMS 第 1d、11d 和 21d 早晨 8:00-12:00 昏暗安静环境下进行。实验旷场边长 100×100cm,周壁高 30cm,周壁及底部为黑色。观察者通过悬挂于敞箱之上的摄像头于计算机上观察动物情况并记录其 5min 内水平移动距离。每只大鼠仅进行 1 次测试。

2.8 标本取材 CUMS 刺激 21d 后空腹饲养 24h 后,10% 水合氯醛溶液,0.3mL/100g 腹腔注射麻醉,下腹处剪除长毛后常规消毒,切开皮肤和腹肌,进行腹主动脉抽血,4℃ 低温储存备用。

2.9 血清 E2、FSH、LH 水平测定 血液标本 4℃ 环境 3000r/min 离心 15min,取上清液按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

2.10 数据处理 所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS19.0 统计软件对两组间的数据在符合正态分布情况下,进行两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 Open-Field 水平移动总距离的影响 CUMS 刺激前各组大鼠水平移动总距离得分间差异无统计学意义($P > 0.05$)。CUMS 后第 1d 开始给药干预,21d 刺激结束后,停止药物干预。结果显示模型组水平得分显著下降($P < 0.01$),造模成功。柴郁地仙方组与模型组比较,CUMS 第 11d 及 21d 水平得分均显著提高(均 $P < 0.01$)。三种药物均能提高模型大鼠水平移动得分,然而,短期(CUMS 第 11d)、长期(CUMS 第 21d)效果存在差异:短期干预水平得分柴郁地仙方组显著高于两阳性药物组(均 $P < 0.05$);长期干预水平得分柴郁地仙方组与盐酸氟西汀组差异无统计学意义($P > 0.05$),显著高于戊酸雌二醇组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 Open-Field 水平移动总距离得分($n = 10, \bar{x} \pm s$)

	CUMS 第 1d(m)	CUMS 第 11d(m)	CUMS 第 21d(m)
假手术组	28.11 ± 4.80	26.84 ± 4.48	23.76 ± 3.53
模型组	27.63 ± 4.67	18.86 ± 3.48**	10.80 ± 2.61**
盐酸氟西汀组	27.62 ± 5.26	23.06 ± 3.96*△#	24.35 ± 3.94△△
戊酸雌二醇组	27.83 ± 4.84	23.34 ± 4.54△#	19.37 ± 3.10**△△##
柴郁地仙方组	27.68 ± 6.45	27.86 ± 3.74△△	24.87 ± 4.03△△

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与柴郁地仙方组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

3.2 对血清性激素水平的影响 Ovx 手术合 21d 孤养与 CUMS 刺激配合药物干预后,模型大鼠血清 E2 水平显著下降($P < 0.01$),FSH、LH 水平显著升高(均 $P < 0.01$)。柴郁地仙方能够逆转这一变化,升高 E2 水平,降低 LH、FSH 水平,与模型组比较差异显著(均

$P < 0.01$)。柴郁地仙方对血清激素作用与戊酸雌二醇差异无统计学意义($P > 0.05$)。柴郁地仙方与盐酸氟西汀对模型大鼠血清 E2 水平影响差异无统计学意义,柴郁地仙方组血清 FSH、LH 水平显著低于盐酸氟西汀组(均 $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 对血清性激素水平的影响(n=10)

	E2 (pg/mL)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)
假手术组	35.07 ± 8.70	6.63 ± 1.33	16.02 ± 3.61
模型组	18.63 ± 6.00**	10.29 ± 2.27**	25.51 ± 5.93**
盐酸氟西汀组	24.83 ± 7.91**	9.55 ± 1.48**#	23.26 ± 4.76**#
戊酸雌二醇组	30.29 ± 5.94 ^{△△}	7.87 ± 2.06 ^{△△}	19.48 ± 5.59 ^{△△}
柴郁地仙方组	28.93 ± 9.67 ^{△△}	7.44 ± 2.13 ^{△△}	18.76 ± 4.62 ^{△△}

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与柴郁地仙方组比较,# $P < 0.05$ 。

4 讨论

本实验以 Ovx 方法建立一种内源性雌激素撤退的模型,以探究外源药物干预对激素水平的影响。该方法基本模拟了围绝经期女性卵巢功能衰退的生理状态,被广泛应用于围绝经期动物研究和激素研究中^[8]。慢性抑郁状态模型的建立采用孤养与 CUMS 相结合的方法,具有应激因子多变性和不可预测性的特点,能够反映人类抑郁发生、发展机制^[9]。假手术组大鼠保留卵巢功能,经动态阴道涂片观察后证明符合育龄期大鼠生理状态。模型组与药物干预组均行 Ovx 术及 21d 孤养与 CUMS,动态阴道涂片观察已证明无内源性激素波动对实验结果造成影响,实验结果能够较为客观的评价药物干预对性腺轴的作用。

《素问·阴阳应象大论》云:“年四十而阴气自半。”《医学正传》认为:“月经全凭肾水施化,肾水既乏,则经血日以干涸。”围绝经期是一个缓慢的过渡阶段,自身存在肾精衰少的生理特征,目前中医界对于本病的治疗也主要以肾精不足为出发点,提倡补肾疏肝的治疗原则^[10]。然而,抑郁发作与狂躁发作相对立,核心症状表现为情绪低落、兴趣缺乏、乐趣丧失^[11],基于阴阳对立统一的理论,本课题组认为 PDD 的发生一定原因是由于阳气的不足引起的。在选方过程中,重视本病临床症状特征,遵从围绝经期妇女生理特点,兼顾人体阳气,遵从“天之大宝只此一轮红日,人之大宝只此一息真阳”理论,选用“温而不燥,为燮理阴阳之佳品”的仙灵脾配合熟地黄以滋补肾阴,培补肾气,临床使用最善调节女性内分泌;柴胡、郁金

疏肝解郁,活血行滞;半夏化痰除湿,和胃健脾,交通阴阳;茯苓、人参相伍健脾养心安神。全方阴阳兼顾,补肾疏肝,兼有活血化瘀、养心健脾之功,切合围绝经期抑郁症阴阳失调,肾虚肝郁的基本病机。

本研究主要从大鼠行为学及血清性激素水平的角度探讨了柴郁地仙方治疗围绝经期抑郁症的作用机理。柴郁地仙方能够改善模型大鼠活动度降低情况,并抑制血清 FSH、LH 过度分泌,使 E2 保持较为正常的水平,说明本方在抗 PDD 过程中能够对 HPG 轴产生影响。值得注意的是,柴郁地仙方对 PDD 模型大鼠有长期的抗抑郁作用,且在短时间内对行为学影响效果比临床抗抑郁常用药盐酸氟西汀效果显著,而其在对 HPG 轴的作用上效果优于盐酸氟西汀,与雌激素替代疗法常用药戊酸雌二醇效果相当。临床上对单纯抗抑郁治疗效果不明显的中年女性补充雌激素,能够明显改善抑郁症状,提示 PDD 的发病过程与 HPG 轴功能紊乱相关^[12],因此,寻得一种兼具抗抑郁与调节生殖内分泌效果的治疗方案有助于降低该病造成的社会负担。柴郁地仙方能够在改善患者抑郁状态的同时纠正 HPG 轴的紊乱,值得在 PDD 治疗中推广应用。

参考文献

- [1] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:2555-2559.
- [2] Rush, A. J. . STAR * D: what have we learned? [J]. Am J Psychiatry, 2007, 164(2):201-204.

(下转第 72 页)

络穴、八脉交会穴(通于阴维脉),疏导水湿、宁心安神功效,对心动过缓及心动过速具有双向调节作用^[19];膻中,心包募穴、八会穴之气会,主治惊悸、咳嗽、胸闷、气喘等胸中气机不畅的病证;肺俞为肺之背俞穴,肺为生气之主,肺俞是肺气转输、输注之处,主治呼吸系统及与气有关的疾病。

5 小结与展望

中药穴位贴敷治疗属于中医外治法的一种,经皮给药,克服了口服药物所带来的胃肠道不良反应及肝肾功能损伤的不良影响。近年中医药发展迅速,采用中药穴位贴敷治疗心力衰竭也取得了一定的疗效,但中医运用穴位贴敷方法临床研究主要围绕肺系疾病最多。国内运用中药穴位贴敷对慢性心力衰竭的治疗研究相对较少。

近年国家加大对中医药事业发展的投入,中医药事业发展势头良好。穴位贴敷作为祖国医学的重要组成部分,医务工作者应对穴位贴敷治疗引起重视,加强对穴位贴敷治疗的理论研究,扩

大动物实验研究,以便更好地指导临床治疗,提高心衰患者生活质量,降低再住院率。

参考文献

- [1] 秦晓毅,卢新政. 2010年NICE慢性心力衰竭诊治指南更新的解读[J]. 心血管病学进展,2011,32(4):490-492.
- [2] 郝丽梅,毛静远,王贤良. 中医学对心力衰竭认识的历史脉络考略[J]. 中医杂志,2013,54(8):637-639.
- [3] 沈会. 心力衰竭古今中医文献的整理与研究[D]. 北京:北京中医药大学,2006.
- [4] 张伯礼,薛博瑜. 中医内科学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2012:8-94.
- [5] 吴伟,刘勇,赵英强. 心衰作为心力衰竭的中医病名探究[J]. 中医杂志,2013,54(10):891-892.
- [6] 王科军,张秀荣,苏德成. 古代医家对慢性心衰病因病机的认识[J]. 吉林中医药,2011,31(8):711-712.
- [7] 王亚红,王振涛. 郭维琴教授对心力衰竭的中医认识与辨治[J]. 河南中医,2003,23(10):12-13.
- [8] 冯秀芝,李文杰. 心衰病中医病因病机探讨[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,23(11):102-103.
- [9] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京:中国医药科技出版社,2002:77-80.
- [10] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:69.

- [11] 林良才.《理瀹骈文》对中医外治法发展的贡献之分析与研究[J]. 中医外治杂志,2005,14(4):6-7.
- [12] 万艳芳. 中医穴位敷贴治疗及护理[J]. 内蒙古中医药,2015,31(1):139-140.
- [13] 陈仁泽. 张仲景外治法的文献及理论研究[D]. 北京:北京中医药大学,2010.
- [14] 黄健. 中药穴位敷贴辅助治疗慢性收缩性心力衰竭的疗效观察[D]. 山东青岛:山东中医药大学,2012.
- [15] 王平平,王升旭,王艳杰,等. 穴位贴敷经皮给药贴对哮喘豚鼠血清中环氧化酶2水平的影响[J]. 广州中医药大学学报,2010,27(3):236-238,241,317.
- [16] 田桂春,孙伯青. 穴位敷贴治疗慢性心力衰竭心肾阳虚证疗效观察[J]. 中医临床研究,2015,5(15):10-11.
- [17] 姜英,付均如. 穴位贴敷中药配合治疗充血性心力衰竭[J]. 天津中医药,2005,22(2):116-116.
- [18] 唐静,付玉娜,李武卫. 穴位贴敷加艾灸治疗慢性心力衰竭临床观察[J]. 辽宁中医学院学报,2013,41(7):11-12.
- [19] 魏楚蓉,伍赶球. 冰片的药理作用及其机制研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志,2010,6(5):447-451.
- [20] 赵立君,李凤娥. 强心贴穴位贴敷治疗慢性心力衰竭48例[J]. 河南中医,2016,35(3):433-434.
- [21] 任路辉,王皓光. 二乌温阳贴穴位贴敷治疗慢性心力衰竭患者30例[J]. 中医杂志,2012,53(10):874-876.

(上接第66页)

- [3] 李丽,玛依努尔,尼亚孜,等. 围绝经妇女激素替代治疗与妇科肿瘤关系的回顾分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2010,26(11):849-852.
- [4] 洪艳珠,李丽丽,周海虹,等. 柴郁地仙方治疗围绝经期抑郁症体会[J]. 中国中医基础医学杂志,2016,22(2):265-266.
- [5] 王华富,许惠琴,陈敏敏,等. 百合知母汤不同配比对去势围绝经期综合征肾虚证大鼠子宫系数及血清性激素的影响[J]. 中华中医药杂志,2010,25(4):531-535.
- [6] 侯雪芹,李悦,荣翠平,等. 雌性大鼠去

- 卵巢模型中脑神经内分泌信号异常传导的机理[J]. 中国实验动物学报,2016,26(1):80-86.
- [7] 黄国钧,黄勤挽. 医药实验动物模型:制作与应用[M]. 北京:化学工业出版社 生物. 医药出版分社,2008:23-24.
- [8] Katz R J, Roth K A, Carroll B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev,1981,5(2):247.
- [9] 蔡熙,黄晖,王岚. 围绝经期动物模

- 型的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,10(13):71-73.
- [10] 王联庆,王金娥,贾守凯. 更年期抑郁症从肝肾论治[J]. 中国中医基础医学杂志,2012,18(2):189-190.
- [11] 沈渔邨. 精神病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:562-563.
- [12] Worsley, R.; Davis, S. R.; Gavrilidis, E.; et al. Hormonal therapies for new onset and relapsed depression during perimenopause [J]. Maturitas,2012,73(2):127-133.