

## 实验研究

# 气郁证模型大鼠的病理特征

吴相春<sup>1,\*</sup> 来静<sup>3</sup> 吴相锋<sup>2</sup> 贾振华<sup>1</sup> 王洪涛<sup>1</sup>

(1.河北中西医结合医药研究院络病研究室,河北省石家庄市桥西区新石北路 385号;

2.河北以岭医院; 3.石家庄市第三医院)

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2005CB523301);

国家“十一五”重大新药创制专项(2009ZX093313-003)

\* 通讯作者: wxc2222@163.com, 13903113619

**[摘要]** 目的 探讨气郁证的病理基础。方法 将20只健康雄性Wistar大鼠随机分为对照组与气郁组,采用慢性束缚法建立气郁证大鼠模型,观察气郁证大鼠的精神、体重、摄食量、蔗糖水摄取量,检测血清皮质酮(CORT)、血浆血管紧张素II(AngII)、内皮素(ET)、血清5羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、血清一氧化氮(NO),计算胸腺及肾上腺指数,透射电镜观察胸主动脉组织内皮细胞超微结构的变化。结果 气郁组大鼠表现为精神萎靡,反应迟钝,摄食量减少,体重增长缓慢;蔗糖水摄取量、摄食量及体重均明显低于对照组( $P < 0.01$ );气郁组大鼠血浆ET、AngII、血清CORT、NE、E升高,NO、5-HT降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),胸腺、脾脏指数明显降低( $P < 0.05$ );胸主动脉内皮细胞超微结构发生明显改变。结论 气郁证大鼠存在明显的血管内皮结构和功能的损害,神经、内分泌、免疫系统紊乱失衡是气郁证的病理基础。

**[关键词]** 气郁证;一氧化氮;内皮素;血管紧张素II;血清皮质酮;去甲肾上腺素

### Pathologic Status of Qi-Stagnation Model Rats

WU Xiangchun<sup>1,2</sup>, LAI Jing<sup>3</sup>, WU Xiangfeng<sup>2</sup>, JIA Zhenhua<sup>1</sup>, WANG Hongtao<sup>1</sup>

(1. Hebei Academy of Integrated Traditional and Western Medicine, Shijiazhuang 050035; 2. Hebei Yiling Hospital; 3. Third Hospital of Shijiazhuang City)

**ABSTRACT Objective** To explore the pathologic basis of qi stagnation. **Methods** Twenty healthy male Wistar rats were randomized into normal group and model group. The rat models with Qi stagnation were established by chronic constraint for 6 weeks. The general condition including spirit, weight, food and sucrose water intake of the models were recorded. The level of serum cortisone (CORT), plasma angiotensin II (AngII), endothelin (ET), serum 5-hydroxy-tryptamine (5-HT), norepinephrine (NE), epinephrine (E), and nitric oxide (NO) were measured. The thymus and adrenal gland indices were calculated. Changes in ultrastructure of thoracic aorta endothelial cells were observed with transmission electron microscope. **Results** Compared with the normal group, the model rats showed listlessness, slow response, reduction of diet, and weight increase becoming slower, food intake, sucrose water intake, and weight were significantly reduced ( $P < 0.01$ ). The level of plasma ET, AngII, serum CORT, NE, and E of the model group increased significantly, and the level of NO and 5-HT decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The thymus and spleen indices were significantly lowered ( $P < 0.05$ ), and the ultrastructure of thoracic aortic endothelial cells was obvious changed. **Conclusion** The model rats with Qi stagnation have obvious endothelial damage in the structure and function. Their neural-endocrine-immune system disorder serves as the pathological basis of qi stagnation.

**Key Words** qi stagnation; nitric oxide; endothelin; angiotensin II; cortisone; norepinephrine

《素问·举痛论》曰:“百病皆生于气也,怒则气上,喜则气缓……九气不同,何病之生?”张介宾亦曰:“气之在人,和则为正气,不和则为邪气。凡表里虚实,逆顺缓急,无不因气而至,故百病皆生于气”。《丹溪心法·六郁》云:“气血冲和,万病不生,一有怫郁,诸病生焉,故人身诸病,多生于郁”。《医碥》曰:“百病皆生于郁……郁而不舒,则皆肝木之病矣”。可

见“百病皆生于气,始于郁”。本研究通过气郁大鼠模型,探讨“百病皆生于气,始于郁”理论的实验基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物及分组

健康雄性Wistar大鼠20只,体重200~230g,购于北京维通利华实验动物中心,大鼠5只/笼,饲养在河北以岭医药研究院药理实验室,按体重随机分

为下列 2 组,对照组和气郁组,正常饲料饮食

## 1.2 实验仪器及试剂

束缚盒参照朱清静、唐已婷等<sup>[1-2]</sup>方法选择合适的大鼠固定盒,该盒呈筒状,长约 25cm,筒口外径 7cm,内径 5cm,筒内前端置一直径小于筒的内径,并可以前后调节的圆嘴塑料口,其口为通气口,后端为开关闸门。血清一氧化氮(NO)试剂盒由南京建成生物试剂公司提供;血浆内皮素(ET)试剂盒、血管紧张素II(AngII)试剂盒由北京普尔伟业生物科技有限公司提供。血清皮质酮(CORT)试剂盒由北京北方生物技术研究所提供;血清五羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)试剂盒由美国 RapidBioLab 公司提供。

## 1.3 气郁模型造模方法

参照朱清静<sup>[1]</sup>、唐已婷等<sup>[2]</sup>的方法,实验开始时即给予束缚法,将大鼠放入束缚盒内,调节前端活动部位到合适的位置,使大鼠不产生强烈反抗的紧张程度,每天 6h(9:00~15:00),连续 6 周。

## 1.4 观察指标

1.4.1 行为学观察 称每日摄食量;每周记录体重一次;观察模型动物精神、活动情况等。1%蔗糖水摄取量测定参照金光亮<sup>[3]</sup>的方法,在实验前先对所有的大鼠进行 1%蔗糖水摄取训练,即先用蔗糖水喂养 48h,随后断水 24h,再于 8:00~9:00 的 1h 内测量每只大鼠摄取蔗糖水的量,以此作为每只大鼠蔗糖水摄取量的基线,在实验末于 8:00~9:00 测 1h 内的蔗糖水摄取量。

1.4.2 内皮功能的检测 采用硝酸还原酶法检测血清 NO 含量(中国人民解放军白求恩国际和平医院);放射免疫法检测血浆 ET 含量(中国人民解放军总医院)。

1.4.3 神经递质的测定 放射免疫法检测血清 CORT 血浆 AngII 含量(中国人民解放军总医院);酶联免疫法检测 5-HT、NE、E 含量(中国人民解放军白求恩国际和平医院)。

1.4.4 胸腺、脾脏指数 颈总动脉取血后,解剖称取胸腺、脾脏质量,观察表面形态,按公式计算脏器

指数:脏器指数 = 脏器质量(g) × 100 / 大鼠质量(g)

1.4.5 主动脉组织内皮细胞超微结构 实验结束后,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,颈总动脉取血后,仔细分离并截取一小段动脉,迅速浸入电镜液中,修成 1mm × 1mm × 1mm 大小组织块,置 4%戊二醛固定液中 4℃ 保存(由河北医科大学基础医学院电镜室协助完成)。

## 1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件,计量数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 两组大鼠行为学比较

初期气郁组大鼠表现为打斗、撕咬、尖叫等情绪过激行为,随着造模时间的推移,上述过激行为逐渐减少,精神萎靡,胡须下垂,贴边,扎堆,反应迟钝,毛色失去光泽。摄食量减少,体重明显减轻,有统计学差异( $P < 0.01$ )。实验前两组大鼠 1%蔗糖水摄取量无明显差异;实验末气郁组蔗糖水摄取量为(13.82 ± 2.71)g,较对照组(21.00 ± 1.47)g 显著降低,有统计学差异( $P < 0.01$ ),表明气郁组大鼠兴趣减低,情志抑郁。

### 2.2 两组大鼠神经递质比较

表 1 示,与对照组比较,气郁组 5-HT 明显下降,有统计学差异( $P < 0.01$ ),表明气郁大鼠处于情绪抑郁状态。与对照组比较,气郁组大鼠血浆 AngII、血清 CORT、NE、E 明显增高( $P < 0.01$ ),表明气郁大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴、肾素-血管紧张素系统、交感神经-肾上腺髓质系统处于异常激活状态。

### 2.3 两组大鼠胸腺、脾脏指数比较

与对照组比较,气郁组大鼠胸腺、脾脏明显萎缩;与对照组胸腺指数(0.13 ± 0.029)比较,气郁组大鼠胸腺指数(0.105 ± 0.023)明显降低,有统计学差异( $P < 0.05$ )。与对照组脾脏指数(0.218 ± 0.050)比较,气郁组大鼠脾脏指数(0.184 ± 0.031)明显降低,有统计学差异( $P < 0.05$ )。表明气郁组大鼠免疫功能下降。

表 1 两组大鼠神经递质比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	5-HT (ng/ml)	CORT (ng/ml)	AngII (pg/ml)	NE (ng/ml)	E (pg/ml)
对照组	10	346.27 ± 67.72	25.0 ± 1.83	685.59 ± 253.27	73.15 ± 14.53	146.90 ± 37.15
气郁组	10	248.51 ± 78.94	29.08 ± 2.09	1087.54 ± 349.42	99.25 ± 9.65	197.40 ± 23.12*

注:与正常组比较,\*  $P < 0.01$

## 2.4 两组大鼠内皮功能比较

表 2 示,与对照组比较,气郁组大鼠血浆 ET 增高、血清 NO 降低,有统计学差异 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),表明气郁组大鼠血管内皮功能受损。

表 2 两组大鼠 ET、NO 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	ET (pg/ml)	NO (umol/L)
对照组	10	142.9 ± 8.72	45.22 ± 12.42
气郁组	10	163.19 ± 24.74	25.68 ± 10.92*

注:与正常组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$

## 2.5 两组大鼠主动脉组织超微结构改变

对照组血管内皮细胞形态规则,连接紧密,基底膜完整,细胞核及细胞器存在,线粒体结构无异常。气郁组内皮细胞线粒体大部分嵴和部分膜融合或消失,粗面内质网扩张,脱颗粒明显,吞饮小泡数量明显减少。提示气郁组大鼠主动脉血管内皮细胞结构损伤。

## 3 讨论

《景岳全书·诸气》曰:“夫百病皆生于气,正与气之为用,无所不至,一有不調,则无所不病。……欲求其本,则只求一气字,足以尽之,盖不調之处,即病所在之处”。中医认为:“郁者,滞而不通之意,百病者生于郁。人若气流畅通,病安从作?一有拂郁,当升不升,当降不降,当化不化,或郁于气,或郁于血(血郁可源于气郁,亦可致气郁,且六郁以气郁为先),病斯作矣”。故曰:“百病皆生于气,始于郁”。气机郁滞为百病之源,诸气之郁,先责之肝,气郁责在肝郁,故肝郁为诸郁之本。有“万病不离乎郁,诸郁皆属于肝之说”。周学海《读医随笔》指出:“医者善调于肝,乃善治百病”。血之运行,听命于气;血之藏泄其职在肝,“以肝属木,木气冲和调达,不致遏郁,则血脉流畅”(《血证论》)故血之畅行,赖于肝之疏泄,如此则“气血冲和,万病不生”。肝之疏泄失司,则血之运行障碍,由此而产生气滞血瘀、气血逆乱等气血失调的病理变化<sup>[4]</sup>。

血管内皮是机体的一个重要组成部分,其解剖部位位于一易损伤的功能性界面。内皮细胞的损伤及功能紊乱与多种疾病的发生、发展密切相关,许多病理状态下,血管内皮发生障碍<sup>[5-6]</sup>。因此,内皮功能障碍是多种疾病的病理学基础。是动脉粥样硬化开始和进展的重要病理变化之一<sup>[7]</sup>。下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴、肾素-血管紧张素系统、交感神经-肾上腺髓质系统等共同调控机体重要的生理功能和病理变化,应激反应时,丘脑-垂体-肾上腺皮质

轴功能增强,往往会导致各种身心疾病,垂体内分泌与情绪密切相关<sup>[8]</sup>。近年来大量研究证实在血管、心脏局部组织也存在 RAAS 的激活<sup>[9]</sup>。情绪应激能显著降低大鼠原发性体液免疫功能(抗卵清蛋白水平和脾脏指数),显著升高肾上腺素、去甲肾上腺素、皮质酮水平。交感神经系统参与了情绪应激的体液免疫调节作用<sup>[10]</sup>。慢性应激改变交感神经组成,影响胸腺发育和 T 细胞分化成熟。心理应激情况下,免疫器官损伤的最明确的特征之一是胸腺皮质、髓质均变薄萎缩,胸腺细胞的超微结构变化<sup>[11]</sup>。5-HT 在调节机体的情绪方面具有相当重要的作用,5-HT 的降低在一定程度上可以反映应激大鼠的抑郁状态。由内皮细胞释放的 NO 是主要的内源性血管舒张系统,其功能与由交感神经系统和肾素-血管紧张素系统构成的血管收缩机制保持平衡。ET 能促进 Ang II、ALD、NE 的分泌,促进交感神经的兴奋。ET-1 局部肾素-血管紧张素系统和内皮收缩因子以及其它血管活性物质共同构成了一个自身调节系统<sup>[12]</sup>。

本研究采用慢性束缚方法建立气郁证大鼠模型,结果显示气郁证大鼠摄食量减少,体重增长缓慢,蔗糖水摄取量减少,表明气郁大鼠情志抑郁,兴趣减低;气郁证大鼠 ET 明显增高,NO 下降,主动脉组织内皮细胞超微结构发生明显改变。气郁组大鼠应激激素 CORT 水平升高,Ang II、NE 明显增高,表明气郁证可导致大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴、肾素-血管紧张素系统、交感神经-肾上腺髓质系统兴奋;气郁大鼠胸腺、脾脏萎缩,脏器指数明显降低,表明免疫功能下降。提示气郁大鼠内皮结构和功能受损,神经、内分泌、免疫系统紊乱失衡,显示气郁是血管内皮功能障碍的重要危险因素,在疾病的发生发展过程中发挥重要作用。

本研究结果表明,神经、内分泌、免疫系统的紊乱失衡以及由此而导致的血管内皮功能障碍是气机郁滞的实验基础,为“百病皆生于气,始于郁”理论提供了实验依据。

## 参考文献

- [1]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的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2004,12(4):220-221.
- [2]唐已婷,陈家旭.三种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].北京中医药大学学报,2002,25(3):23-26.

(下转第 230 页)

存在争议,有研究证明 CRT的高表达可保护细胞,减轻氧化应激或一氧化氮诱导的细胞凋亡<sup>[6]</sup>。但也有报道 CRT过表达增加 H9c2成心肌细胞对养护应激的敏感性,加重细胞损伤<sup>[7]</sup>。研究显示,缺氧预处理 24h 后心肌细胞内 CRT表达增加,提示 CRT可能通过维持细胞内  $Ca^{2+}$  稳态参与预处理的心肌细胞保护作用<sup>[8]</sup>。

酶联免疫吸附实验用酶标记物作为指示物,以抗原-抗体的特异性结合反应为基础,在酶标记物同抗原-抗体结合后,通过酶的催化放大作用,使得酶联免疫吸附试验既保持抗原抗体反应的特异性,又体现酶催化放大的敏感性,应用双抗体夹心法测定标本中大鼠 CRT水平。通过免疫组化法来检测大鼠心肌组织中的 CRT表达量,是利用其高度特异性、高敏感性和能对抗原进行精确定位的独特优势,揭示针刺不同经穴对心肌组织中的 CRT表达量的影响。

本项研究表明,缺血再灌注模型组血清 CRT含量虽有升高,但与假手术组比较无统计学意义,在 CRT蛋白基因表达中,表达量增加,出现了差异,显示缺血再灌注损伤增强了 CRT的敏感性。针刺内关、郄门后,血清 CRT含量明显升高,蛋白基因过量表达,与假手术组、缺血再灌注模型组比较均有统计学差异。我们以往的研究发现,针刺手厥阴心包经内关、郄门穴可减轻细胞内钙超载<sup>[2]</sup>,本次研究结果与国内外 CRT的高表达可保护心肌细胞的报道相一致<sup>[6]</sup>,说明 CRT的丰富表达对心肌细胞钙离子的调

节具有重要的意义,而 CRT参与细胞保护作用的机制尚待进一步研究

## 参考文献

- [1]Fu HM, Liu CZ, Flutter B, et al. Calreticulin maintains the low threshold of peptide required for efficient antigen presentation [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46 (16): 3198-3206.
- [2]田岳凤,王荣,李雷勇,等.针刺手厥阴经穴对缺血再灌注损伤心肌细胞蛋白激酶 C表达的影响 [J].*中医杂志*, 2007, 48(8): 713-715.
- [3]林文注,王佩,刘元亮,等.实验针灸学 [M].上海:上海科学技术出版社,1994:215.
- [4]汤晓燕.钙网蛋白的生物学功能及其与自身免疫疾病的关系 [J].*国外医学免疫学分册*, 2005, 28(4): 230-233.
- [5]秦联萍,高俊虹,付卫星,等.针刺预处理改善缺血性心律失常的机制——抑制心肌细胞内钙振荡的发生 [J].*针刺研究*, 2008, 33(2): 75-79.
- [6]Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, et al. Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (31): 29317-29326.
- [7]Ihara YS, Urata YS, Goto SJ, et al. Role of calreticulin in the sensitivity of myocardial H9c2 cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290 (1): 208-221.
- [8]徐菲菲,刘秀华,祝筱梅.低氧预处理通过上调钙网蛋白表达减轻大鼠心肌细胞氧化应激损伤 [J].*生理学报*, 2008, 60(1): 29-37.

(收稿日期: 2010-04-20; 修回日期: 2010-07-12)

[编辑: 崔京艳]

(上接第 226 页)

- [3]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.
- [4]张安玲.论调肝治百病 [J].*山东中医药大学学报*, 2000, 24(6): 417-419.
- [5]李建军.血管内皮功能障碍及其检测与防治 [J].*中国动脉硬化杂志*, 2001, 9(2): 175-178.
- [6]钟海兰,卢新政.血管内皮功能障碍与高血压 [J].*心血管病学进展*, 2009, 30(1): 62-65.
- [7]夏城东,殷惠军,陈可冀.他汀类药物改善内皮功能的多效应研究进展 [J].*心血管病学进展*, 2008, 29(6): 956-960.
- [8]韩晓春.下丘脑-垂体-肾上腺在慢性应激过程中的调节作用 [J].*医学综述*, 2006, 12(2): 73-75.
- [9]Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, et al. Ex-

pression of angiotensin and interleukin-6 in human coronary atherosclerotic plaques potential implications for inflammation and plaque instability [J]. *Circulation*, 2000, 101(12): 1372-1378.

- [10]邵枫,林文娟.外周交感神经系统在情绪应激体液免疫调节中的作用 [J].*中国行为医学科学*, 2001, 10(5): 401-403.
- [11]侯静,杨军平.心理应激与下丘脑-垂体-肾上腺-免疫轴功能关系的研究进展 [J].*实用临床医学*, 2006, 7(11): 202-204.
- [12]温进坤,韩梅.血管平滑肌细胞 [M].北京:科学出版社, 2005: 191-275.

(收稿日期: 2010-05-31; 修回日期: 2010-09-15)

[编辑: 行之]