

薛茜尹,吴淑雅,许婧余,等. 慢性心理应激模型小鼠中医证型变化规律研究[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 180-189.

XUE Q Y, WU S Y, XU J Y, et al. Study on patterns of traditional Chinese medicine syndrome changes in mouse models of chronic psychological stress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 180-189.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.003

慢性心理应激模型小鼠中医证型变化规律研究

薛茜尹¹, 吴淑雅¹, 许婧余¹, 张怡¹, 张铭珈², 敖海清^{1*}

(1. 广州中医药大学 公共卫生与管理学院, 广州 510006; 2. 浙江中医药大学 基础医学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 研究慢性心理应激模型小鼠在造模过程中的证型变化规律及其可能的物质基础。**方法** 采用慢性温和和不可预见应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)方法制备慢性心理应激小鼠模型,造模 2 周后在造模同时使用逍遥散(XYS 组)和四逆散(SNS 组)治疗,比较造模小鼠(M4 组和 M6 组)和给药 2 周(S4 组和 X4 组)、4 周(S6 组和 X6 组)后慢性心理应激小鼠的一般情况、行为学和生化指标。**结果** 与 M4 组小鼠比较,S4 组和 X4 组小鼠体质量、旷场实验总路程和中央路程、血清去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)浓度、胃部 Ghrelin 表达均升高;S4 组小鼠糖水偏好率、血清 D-木糖浓度均升高;与 X4 组比较,S4 组小鼠旷场实验总路程、血清 D-木糖浓度均升高;与 M6 组小鼠比较,S6 组和 X6 组小鼠体质量、血清 NE 浓度、血清 D-木糖浓度、胃部 Ghrelin 表达均升高;X6 组小鼠糖水偏好率、旷场实验总路程、穿梭箱实验主动逃避次数均升高,血清皮质酮(cortisol, CORT)浓度降低;与 S6 组相比,X6 组小鼠体质量、旷场实验总路程、血清 D-木糖浓度、胃部 Ghrelin 表达均升高。**结论** 慢性心理应激小鼠造模过程中中医证型由肝郁气滞证演变为肝郁脾虚证,其证候变化生物学基础可能是血清 CORT 和 NE 浓度组合变化及胃中 Ghrelin 水平下降。

【关键词】 慢性心理应激;情志致病;中医证型;辨证论治

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0180-10

Study on patterns of traditional Chinese medicine syndrome changes in mouse models of chronic psychological stress

XUE Qianyin¹, WU Shuya¹, XU Jingyu¹, ZHANG Yi¹, ZHANG Mingjia², AO Haiqing^{1*}

(1. School of Public Health and Management, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. School of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: AO Haiqing. E-mail: aohaiqing@gzucm.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the patterns of syndrome changes and their possible material basis in mouse models of chronic psychological stress during the modeling process. **Methods** A chronic unpredictable mild stress (CUMS) method was employed to prepare a model of chronic psychological stress in mice. After 2 weeks of modeling, Xiaoyao powder (XYS group) and Sini powder (SNS group) were administered concurrently with the modeling process. General conditions, behavioral, and biochemical indicators were compared between the modeling mice (M4 and M6 group) and the mice treated for 2 weeks (S4 and X4 group) and 4 weeks (S6 and X6 group) after

【基金项目】 国家自然科学基金(81673838), 国家自然科学基金青年项目(82205229), 广东省区域联合基金-青年基金项目(2021A1515110798)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81673838), Youth Project of the National Natural Science Foundation of China (82205229), Guangdong Regional Joint Fund-Youth Fund Project (2021A1515110798).

【作者简介】 薛茜尹,女,在读博士研究生,研究方向:中医药抗应激损伤及心身医学。Email:xqy777777@163.com

【通信作者】 敖海清,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:肝藏象理论及中医药抗应激损伤。Email:aohaiqing@gzucm.edu.cn

chronic psychological stress. **Results** Compared with M4 group mice, body mass, total distance and central distance in the open field test, serum NE concentration, and gastric Ghrelin expression were increased in S4 group and X4 group mice, and sugar water preference rate and serum D-xylose concentration were increased in S4 group mice. Compared with X4 group mice, total distance in the open field test and serum D-xylose concentration were increased in the S4 group mice. Compared with M6 group mice, body mass, serum NE concentration, serum D-xylose concentration, and gastric Ghrelin expression were increased in group S6 and X6 group mice; sugar water preference rate, total distance in the open field test, and active avoidance counts in the shuttle box test were increased in X6 group mice, while their serum CORT concentration was decreased. Compared with S6 group mice, body mass, total distance in the open field test, serum D-xylose concentration, and gastric Ghrelin expression in X6 group mice were increased. **Conclusions** During the process of modeling chronic psychological stress in mice, the traditional Chinese medicine syndrome evolved from liver qi stagnation to liver qi stagnation with spleen deficiency. The biological bases of the syndrome changes may be the combined changes in serum CORT and NE concentrations and the decrease in gastric Ghrelin levels.

[Keywords] chronic psychological stress; emotional disorders; traditional Chinese medicine syndromes; syndrome differentiation and treatment

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

应激(stress)是指在受到各种内外界环境因素刺激时,机体所出现全身范围的非特异性反应^[1],慢性心理应激是指作用于精神心理的应激源长时间作用而导致的应激反应,长期处于高压应激状态会增加焦虑、抑郁以及其他心理障碍的风险^[2-3],也会增加肿瘤等多种疾病的发生风险^[4]。

慢性心理应激可以归类于中医情志致病范畴。情志是中医对情绪和情感的特有称谓,情志也影响着人体脏腑气血。现有单纯使用慢性心理应激造模的小鼠研究多聚焦于抑郁症,因为造模具体方法和时间不同,结果可见肝郁气滞型^[5-6]、肝郁脾虚型^[7]及肝郁阳虚型^[8]等多种证型表现。中医对疾病的认识是动态变化的,《素问·玉机真藏论》中云:“五脏相通,移皆有次”^[9],情志致病聚焦于肝但仍伴有其他脏腑病变,在慢性心理应激造模过程中中医证型的变化规律仍待探索。

本研究通过以方测证结合生化指标变化,以探寻慢性心理应激造模过程中的证型变化规律及其可能的物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠共 80 只,6 ~ 7 周

龄,体质量(20 ± 2)g,购于广州锐格生物科技有限公司【SCXK(粤)2021-0059】。动物饲养于广州中医药大学动物实验中心【SYXK(粤)2023-0342】,温度 23 ~ 25 ℃,湿度 50% ~ 70%,昼夜照明为 12 h/12 h 模拟自然环境,本实验经由广州中医药大学动物中心动物实验伦理委员会审核批准(20240306013)。

1.1.2 药物

逍遥散组方药材颗粒剂(柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、生姜、薄荷、炙甘草)、四逆散组方药材颗粒剂(柴胡、枳实、白芍、炙甘草)均购自广东一方制药有限公司。将各药物颗粒剂溶于水后加热煮沸浓缩,根据《药理实验方法学(第 4 版)》^[10]分别配置成 3.3 g/mL 逍遥散溶液和 2.5 g/mL 四逆散溶液。

1.1.3 主要试剂与仪器

小鼠皮质酮(cortisol, CORT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、D-木糖 ELISA 试剂盒(酶免公司,货号:MM-0061M1、MM-0627M1、MM-46426M1,中国);DAB 显色试剂盒(中杉金桥公司,货号:ZLI-9017,中国);苏木素染色液(碧云天公司,货号:C0107,中国);Ghrelin 抗体(Proteintech 公司,货号:13309-1-AP,中国)。Ep 束缚管、束缚铁笼均为自制;LED 频闪灯;摄像头、行为学分析软件(上海吉量软件科技有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备

将 80 只小鼠随机分为空白对照组 (NC 组) 10 只和应激模型组 (M 组) 70 只。适应性饲养 1 周后进行慢性温和不可预知应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 造模。造模 2 周后,从 M 组随机挑选小鼠 50 只,分为应激 2 周组 (M2 组) 10 只、四逆散组 (SNS 组) 20 只和逍遥散组 (XYS 组) 20 只,分别给予四逆散治疗 2 周 (S4 组) 10 只、4 周 (S6 组) 10 只和逍遥散治疗 2 周 (X4 组) 10 只、4 周 (X6 组) 10 只治疗,剩余 M 组分为应激 4 周组 (M4 组) 10 只和应激 6 周组 (M6 组) 10 只。除 NC 组外,给药期间仍进行 CUMS 造模刺激。按照 0.1 mL/10 g 小鼠体质量灌胃给药,M 组予等量生理盐水灌胃。具体分组方法见图 1。

CUMS 造模方法参考文献^[11-12]和课题组前期研究经验^[13-14],包括:24 h 禁食、24 h 禁水、Ep 管束缚 6 h、铁笼束缚 12 h、斜笼 24 h、潮湿垫料 24 h、无垫料 24 h、频闪灯 12 h、力竭游泳、15 ℃ 冷水游泳 5 min 共 10 种刺激,每日随机 2 种。应激时间随机选择,应激方法随机选取,连续 2 d 不使用相同的应激方式且不同时禁食禁水。实验过程中,接受应激处理的所有小鼠需在同 1 d 的相同时间暴露于同一应激源。

1.2.2 行为学实验

(1)糖水偏好实验:用以检测小鼠的快感缺

乏程度^[12]。各组据分组接受相应天数 CUMS 后,将小鼠独笼饲养,据课题组前期经验,先放置两瓶 1%糖水适应性饲养,24 h 后将其中一瓶更换为纯水,12 h 后更换糖水和纯水的位置防止小鼠位置偏爱,12 h 后禁食禁水,24 h 后放置 1%糖水、纯水各一瓶,12 h 后对调两个瓶子的位置,12 h 后称取糖水、纯水的质量。糖水偏好率 = 糖水消耗量/(糖水消耗量 + 纯水消耗量) × 100%。

(2)旷场实验:用来检测小鼠的兴奋性及紧张度^[15]。将摄像机置于旷场反应箱的上方,记录小鼠在旷场箱中的活动情况,每次测试后均用 75%乙醇擦拭旷场箱,避免干扰。以 8 min 小鼠水平运动的总路程和中央路程作为评价指标。

(3)穿梭箱实验(主动回避/被动回避实验):用以检测小鼠的学习、记忆能力的综合认知能力^[16]。穿梭箱由两个箱子构成,实验有两个刺激:光刺激(条件反射)和电刺激(非条件反射)。实验前小鼠单独饲养 7 d,实验开始时将小鼠放入任一箱内,两个箱子均不开灯;适应环境 5 min 后,有小鼠箱子的灯打开,5 s 后该侧箱子底下的电棒会接通电源(电流强度 0.15 mA,维持 25 s)刺激小鼠跑向另一侧箱子,如此算一个回合。实验前对小鼠进行 50 个回合训练,使小鼠产生相关记忆,即:一旦一侧箱子有光,处于该侧箱子的小鼠就会因为害怕被电击而逃到另一侧箱子,以此规避伤害。开灯后 5 s 内逃向另一侧箱子为主动逃避反应阳性,记录小鼠逃到平台的次数;开灯

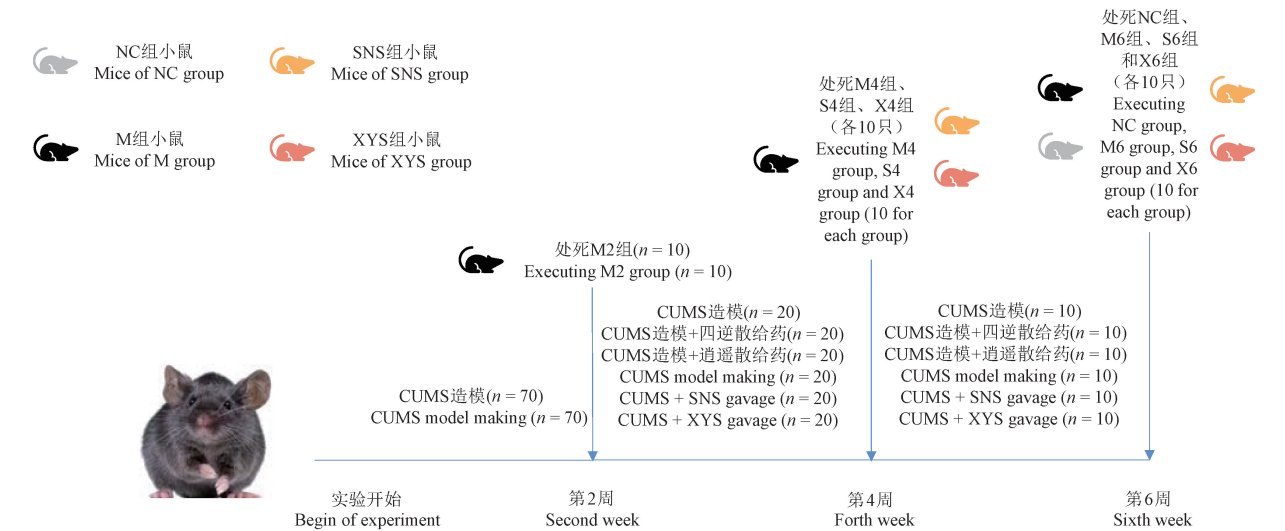


图 1 小鼠分组方式

Figure 1 Mouse grouping method

后出现电击时逃向另一侧为被动逃避反应阳性,记录小鼠从暗箱逃出的时间;开灯、电击时均不逃跑为主动、被动逃避反应阴性。每只小鼠测试后,用 75%乙醇擦拭去除箱子中的气味后再进行下一只小鼠操作。最后用每只小鼠在结束训练后进行的 30 个回合中主动回避次数和平均被动逃避时间来评价小鼠的学习记忆能力。

1.2.3 指标检测

(1)一般情况:每日观察小鼠的一般情况,包括精神状态、饮水、摄食、皮毛色泽、自主活动及粪便等,并观察小鼠对抓取刺激的反应,每周定时测量各组小鼠体质量。

(2)ELISA 检测血清 CORT、NE 浓度:用 2%戊巴比妥钠麻醉小鼠后,取血,室温静置 1 h 后,4 ℃ 下、3000 r/min 离心 20 min,收集血清并保存于-80 ℃冰箱中待用。小鼠血清 CORT 和 NE 浓度严格按照试剂盒说明书进行操作。

(3)血清 D-木糖检测:小鼠行为学测试后,禁食不禁水 24 h,按 10 mL/kg 灌胃 5% D-木糖溶液,1 h 后用 2%戊巴比妥钠麻醉小鼠,取血,室温静置 1 h 后,4 ℃、3000 r/min 离心 20 min,收集血清保存于-80 ℃冰箱中待用。小鼠血清 D-木糖检测严格按照试剂盒说明书进行操作。

(4)胃部苏木素-伊红(HE)染色观察形态:胃底部黏膜以 4%多聚甲醛固定液 4 ℃固定 24 h,常规石蜡包埋后,横切切片、脱蜡,常规 HE 染色,脱水后用中性树胶封片,晾干后观察。

(5)免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)检测胃黏膜 Ghrelin 阳性细胞表达:胃底部黏膜以 4%多聚甲醛固定液 4 ℃固定 24 h,常规石蜡包埋后,横切切片、脱蜡,配制柠檬酸钠抗原修复液,用高压锅进行抗原修复,煮沸后开盖自然冷却至室温。用阻断剂室温孵育 20 min,添加 Ghrelin 一抗(1:200)4 ℃孵育 2 d;用增强液室温孵育 1 h,使用增强酶标室温孵育 1 h,DAB 染色后使用苏木素染色,脱水后用中性树胶封片,晾干后观察。使用阳性染色面积占比进行统计学分析。

1.3 统计学分析

统计分析采用 SPSS 21.0 软件完成。计量资料采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;符合正态分布与方差齐性的计量资料,多组间比较采用单因

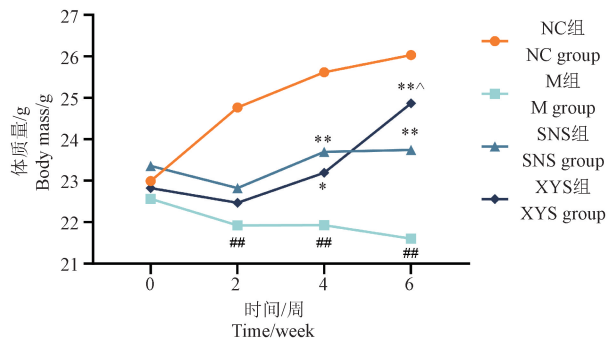
素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;符合正态分布但方差不齐的计量资料,使用 Dunnett's T3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

2.1.1 体质量变化

与 NC 组比较,M2 组、M4 组、M6 组小鼠体质量显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,X4 组小鼠体质量升高($P < 0.05$),S4 组小鼠体质量显著升高($P < 0.01$);与 M6 组比较,S6、X6 组小鼠体质量显著升高($P < 0.01$);与 S6 组比较,X6 组小鼠体质量升高($P < 0.05$)。见图 2。



注:与 NC 组相比,## $P < 0.01$;与 M 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 SNS 组相比,^ $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 2 小鼠体质量变化($n = 10$)

Note. Compared with NC group, ## $P < 0.01$. Compared with M group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with SNS group, ^ $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Changes in mice body mass($n = 10$)

2.1.2 中医证候外观表征概述

NC 组小鼠毛色黑灰柔顺、体型正常,日常活动敏捷,抓取时抗争激烈,伴大小便失禁。造模 2 周后,小鼠动作机警、毛发凌乱、警惕性强,抓取时抗争激烈,偶见大小便失禁。造模 4 周后,M4 组小鼠活动减少、抓取时偶有挣扎,少见大小便失禁;S4 组和 X4 组小鼠较 M4 组小鼠活动增多,S4 组小鼠比 X4 组小鼠抓取时抗争更加激烈。造模 6 周后,M6 组小鼠毛发凌乱、形体消瘦,日常活动减少,喜在角落抱团,抓取时几乎无反抗,偶有大便失禁且稀软;S6 组和 X6 组小鼠较 M6 组小鼠更加活跃,S6 组较 X6 组小鼠大便偶见稀软,X6 组小鼠毛色较 S6 组和 M6 组小鼠更加柔顺有光泽。

2.2 行为学实验

2.2.1 糖水偏好实验

与 NC 组比,M4 组和 M6 组小鼠糖水偏好率显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比,S4 组小鼠糖水偏好率显著升高($P < 0.01$);与 M6 组比较,X6 组小鼠糖水偏好率显著升高($P < 0.01$)。见表 1。

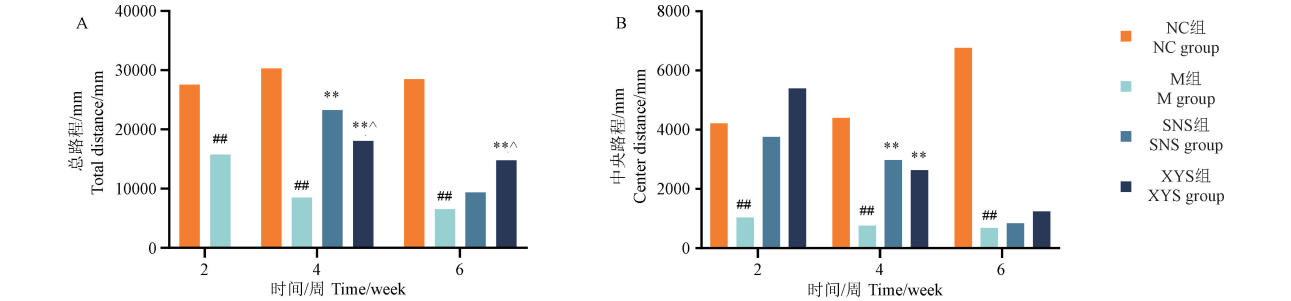
2.2.2 旷场实验

与 NC 组比较,M2 组、M4 组和 M6 组小鼠总路程显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,S4 组和

X4 组小鼠总路程显著升高($P < 0.01$);与 M6 组比较,X6 组小鼠总路程显著升高($P < 0.01$);与 X4 组比较,S4 组小鼠总路程升高($P < 0.05$);与 S6 组比较,X6 组小鼠总路程显著升高($P < 0.01$),见图 3A。与 NC 组比较,M2 组、M4 组和 M6 组小鼠中央路程显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,S4 组和 X4 组小鼠中央路程显著升高($P < 0.01$);其余组之间中央路程无统计学意义,见图 3B。小鼠旷场实验路线见图 4。

表 1 小鼠糖水偏好率变化($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

时间 Times	NC 组 NC group	M 组 M group	SNS 组 SNS group	XYX 组 XYX group
第 2 周 Second week	90.90 ± 4.70	82.60 ± 4.00	80.72 ± 7.61	81.56 ± 4.17
第 4 周 Forth week	88.42 ± 3.15	71.76 ± 9.54 ^{##}	87.47 ± 4.34 ^{**}	82.09 ± 4.24
第 6 周 Sixth week	88.17 ± 3.07	69.17 ± 7.67 ^{##}	75.31 ± 4.57	85.45 ± 4.02 ^{**}



注:A:总路程结果;B:中央路程结果。

图 3 小鼠旷场实验结果($n = 10$)

Note. A. Results of total distance. B. Results of center distance.

Figure 3 Results of mice open field text($n = 10$)

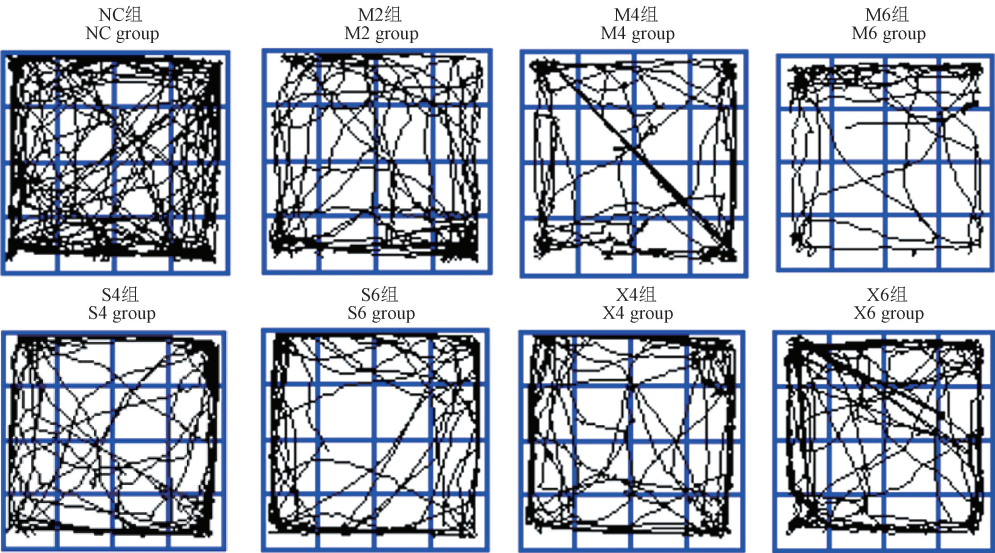


图 4 小鼠旷场轨迹图

Figure 4 Track map of mice in open field test

2.2.3 穿梭箱实验

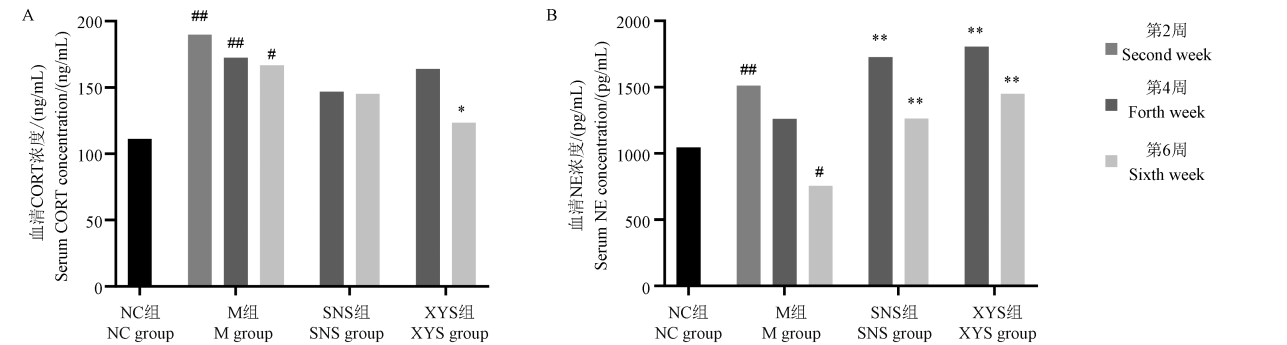
与 NC 组比较,M4 组和 M6 组小鼠主动逃避次数显著降低($P < 0.01$);与 M6 组比较,X6 组小鼠主动逃避次数升高($P < 0.05$)。第一次被动逃避时间各组间无统计学意义,见表 2。

2.3 指标检测

2.3.1 血清 CORT、NE 浓度

与 NC 组比较,M2 组和 M4 组 CORT 的浓度

显著升高($P < 0.01$),M6 组 CORT 浓度升高($P < 0.05$);与 M6 组比较,X6 组 CORT 浓度下降($P < 0.05$),见图 5A。与 NC 组比较,M2 组 NE 浓度显著升高($P < 0.01$),M6 组 NE 浓度降低($P < 0.05$);与 M4 组比较,S4 组和 X4 组 NE 浓度显著升高($P < 0.01$);与 M6 组比较,S6 组和 X6 组 NE 浓度显著升高($P < 0.01$),见图 5B。



注:A:血清 CORT 浓度;B:血清 NE 浓度;与 NC 组相比,# $P < 0.05$ 。(下图同)
Note. A. Concentration in serum CORT. B. Concentration in serum NE. Compared with NC group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 5 Concentration of stress-related indicators in mouse serum($n = 5$)

表 2 小鼠穿梭箱实验结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Results of mice shuttle box experiment($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组 Groups	时间 Times	主动逃避次数 Active evasion frequency	第一次被动逃避时间/s First passive evasion time/s
NC 组 NC group	第 2 周 Second week	1.20 ± 0.79	1.07 ± 0.32
	第 4 周 Forth week	2.30 ± 0.95	0.91 ± 0.15
	第 6 周 Sixth week	2.20 ± 1.14	0.86 ± 0.20
M 组 M group	第 2 周 Second week	0.70 ± 1.25	0.91 ± 0.15
	第 4 周 Forth week	0.20 ± 0.63##	1.00 ± 0.20
	第 6 周 Sixth week	0.30 ± 0.48##	1.08 ± 0.30
SNS 组 SNS group	第 2 周 Second week	—	—
	第 4 周 Forth week	1.50 ± 0.71	0.85 ± 0.10
	第 6 周 Sixth week	1.40 ± 1.35	0.79 ± 0.12
YYS 组 YYS group	第 2 周 Second week	—	—
	第 4 周 Forth week	1.20 ± 0.92	1.01 ± 0.11
	第 6 周 Sixth week	2.00 ± 1.41*	0.80 ± 0.14

2.3.2 血清 D-木糖检测

与 NC 组比较,M2 组 D-木糖浓度降低($P < 0.05$),M4 组和 M6 组 D-木糖浓度显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,S4 组 D-木糖浓度升高($P < 0.05$);与 M6 组比较,S6 组和 X6 组 D-木糖水平

均显著升高($P < 0.01$);S4 组 D-木糖浓度高于 X4 组($P < 0.05$);X6 组 D-木糖水平高于 S6 组 D-木糖水平($P < 0.05$)。见图 6。

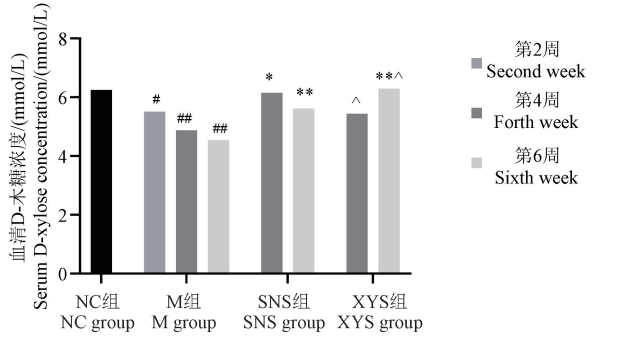


Figure 6 Changes in serum D-xylose in mice($n = 5$)

2.3.3 胃部 HE 染色观察

NC 组小鼠呈正常胃黏膜表现,腺体排列整齐、呈高柱状、形态规则;M2 组小鼠腺体排列相对整齐,腺体底部略见腺腔扩张;M4 组小鼠周围腺体减少,腺体排列相对紊乱;M6 组小鼠胃部腺体显著减少,腺体排列紊乱、显著萎缩;S4 组小鼠

胃部腺体底部略见腺腔扩张;S6 组小鼠胃小凹处略见排列紊乱;X4 组小鼠胃黏膜腺体排列相对整齐;X6 组小鼠腺体底部略见萎缩,胃黏膜较为完整。见图 7。

2.3.4 胃黏膜 Ghrelin 阳性细胞表达

与 NC 组相比,M2 组、M4 组、M6 组 Ghrelin

表达水平均显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,S4 组和 X4 组 Ghrelin 表达水平均升高($P < 0.05$);与 M6 组比较,S6 组 Ghrelin 表达水平升高($P < 0.05$),X6 组 Ghrelin 表达水平显著升高($P < 0.01$),且 X6 组比 S6 组显著升高($P < 0.01$)。见图 8。

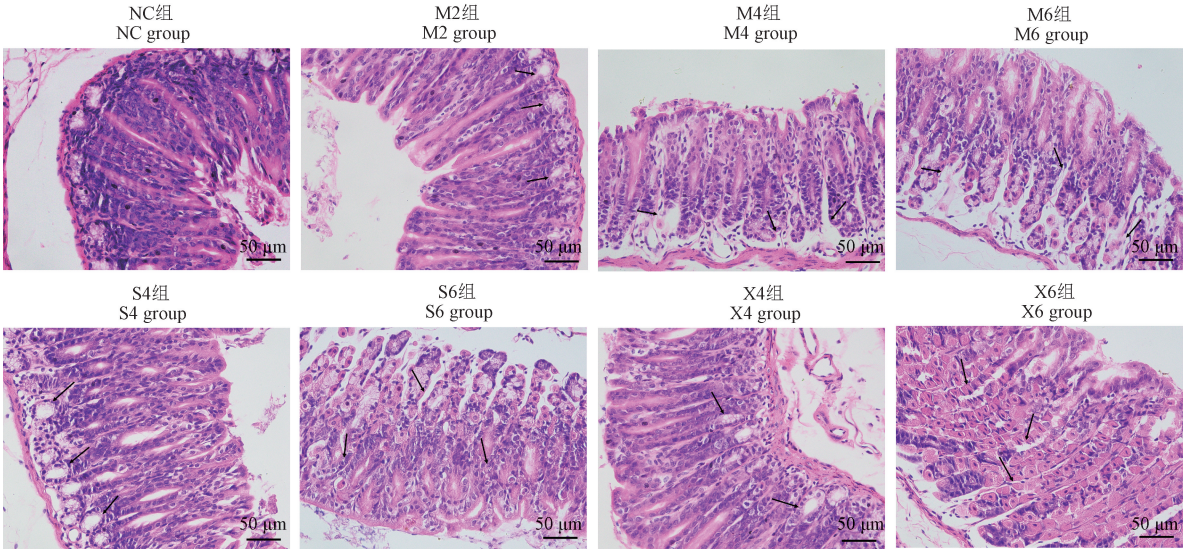
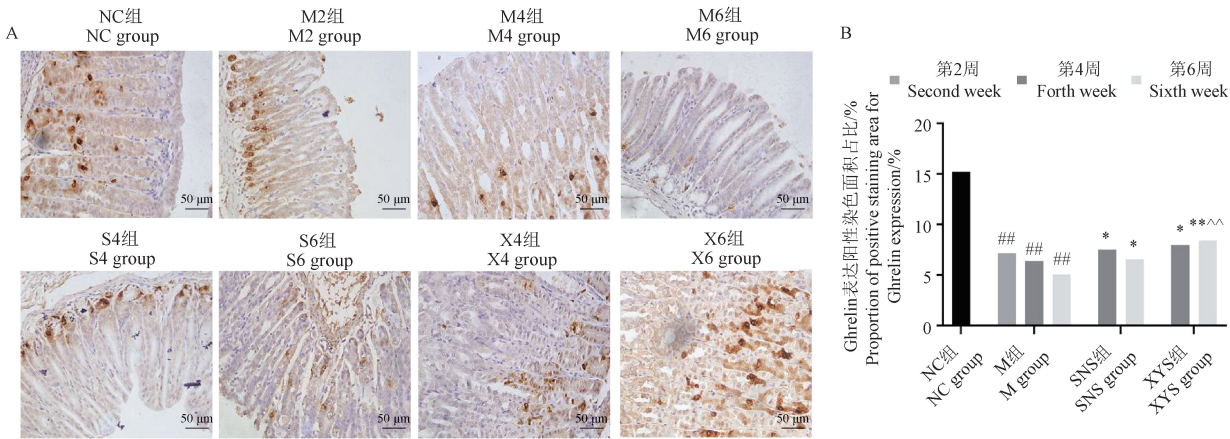


图 7 小鼠胃部 HE 染色结果
Figure 7 HE staining results of mice stomach



注:A:小鼠胃部 Ghrelin 表达 IHC 结果;B:小鼠胃部 Ghrelin 表达阳性染色面积占比。

图 8 小鼠胃部 Ghrelin 表达 IHC 结果($n = 5$)

Note. A. IHC results of Ghrelin expression in mice stomach. B. Proportion of positive staining area for Ghrelin expression in mice stomach.

Figure 8 IHC results of Ghrelin expression in mice stomach($n = 5$)

3 讨论

慢性心理应激是因为在较长时间内受到持续压力而在生理、心理上体现出的累积性反应,

是许多心身疾病形成的重要病因之一。本研究通过慢性不可预知温和应激模拟真实世界中引起怒、惊、恐等情绪的应激事件。在实验初期,小鼠被抓取灌胃时常伴有大小便失禁,本团队认为

这可能是“恐伤肾”的表现。在实验进展 1 周后,小鼠已适应抓取灌胃因此不再伴有大小便失禁的现象,但因为实验周期中,每日仍有灌胃和两种不可预知的应激刺激且小鼠无法逃离该环境,所以小鼠的情绪体验由“惊恐”逐渐转变为“郁怒”。《柳州医话》指出“七情之病,必由肝引起”^[17],《傅青主女科》言“肝气不舒,久郁伤脾”^[18],肝脾在生理上相互依赖,在病理上相互影响。逍遥散和四逆散分别是疏肝健脾和疏肝解郁的代表方剂,课题组前期研究发现逍遥散颗粒剂对 CMUS 造模小鼠的行为学指标改善效果明显^[19]。本研究采用“以方测证”的研究方法,通过对小鼠服用逍遥散或四逆散后行为变化的观察,结合中医理论,本团队认为慢性心理应激的病程主要涉及肝脾两脏。

糖水消耗实验和旷场实验是 CUMS 模型常用的评价指标,分别可以反应小鼠的快感缺乏程度和兴奋紧张程度,在本次实验中主要用于疗效评价。从实验结果分析发现疏肝理气的四逆散对造模 4 周的小鼠疗效优于疏肝健脾的逍遥散,而逍遥散对造模 6 周的小鼠疗效优于四逆散,从方证对应的角度来分析推测,本研究认为:小鼠造模的过程中经历了肝郁气滞向肝郁脾虚的证候转化过程。

血清 CORT 和 NE 分别由肾上腺皮质和髓质分泌,可以反映机体应激水平。本研究观察到在应激初期,血清 CORT 和 NE 浓度快速上升,当小鼠处于较长期的应激后,血清 CORT 和 NE 浓度逐渐呈下降趋势。詹雯洁等^[20]研究了青少年抑郁障碍患者血浆皮质醇与中医证型的相关性,发现多数抑郁障碍患者血浆皮质醇水平升高,且肝郁气滞证抑郁患者皮质醇升高更为明显。胡随瑜等^[21]对 1977 例抑郁症患者的中医证型研究,发现肝郁气滞型多出现在轻度抑郁症患者或抑郁症发病早期,而肝郁脾虚型多为长病程抑郁症或反复性抑郁症患者。袁洋等^[22]对 112 例非酒精性脂肪肝患者证候研究发现,肝郁脾虚型患者的病程(21.52 ± 32.05)个月远超过肝郁气滞型患者的病程(9.18 ± 10.72)个月。结合实验观察与理论研究,本团队推测不同浓度的 CORT 和 NE 可能是肝郁气滞证和肝郁脾虚证的部分物质基础。

D-木糖在小肠中的吸收方式是被动扩散,且在体内不被肝代谢,其吸收水平能够反映小肠的表面积及小肠吸收功能水平,在许多现代研究中,血清 D-木糖水平是脾虚证的相关指标^[23-25]。Ghrelin 为生长激素释放激素,又称胃饥饿素,主要由存在于胃底黏膜层的 X/A 泌酸细胞合成,主要生理功能是促进生长激素释放与促进进食,也有研究发现 Ghrelin 在学习、记忆和神经保护方面具有调节功能,并且能够缓解焦虑、抑郁等情志改变及睡眠障碍^[26]。MINGARDI 等^[27]发现, Ghrelin 对情绪的调控作用可能来自于其抗炎、抗氧化和神经营养作用。FAHED 等^[28]对抑郁症患者进行了夜间禁食后测定其血液 Ghrelin 浓度及情绪变化,发现 Ghrelin 升高的患者抑郁症状缓解更加明显,且食欲得到改善。姚玉璞等^[29]曾对肝郁气结型和肝郁脾虚型抑郁患者进行抑郁症消化道症状的证候特点研究,结果发现压力越大消化道症状积分越高,病程越长脾虚分值越高。本研究发现,在应激 4 周时,使用逍遥散与四逆散对小鼠消化系统改善作用相似,但在应激 6 周时,逍遥散对慢性心理应激导致的血清 D-木糖水平下降和胃中 Ghrelin 表达下降的改善优于四逆散,侧面印证慢性心理应激证候特征为肝郁脾虚证,且胃部 Ghrelin 表达下降可能是慢性心理应激肝郁气滞证转向肝郁脾虚证的物质基础。

中医理论强调辨证论治,证候的变化可以反映病势发展和转归、预测疾病走向,及时进行针对性治疗,可以达到控制病情、防止疾病恶化的目的。如果慢性心理应激是引起“证”的主要因素,那么将与中医理论中“异病同治”思想不谋而合——因为是相同的证(即由慢性心理应激造成的病理改变),所以可以采用同样的治法(即治疗慢性心理应激引起的生理改变)。在强调辨证的同时并不是要忽视辨病。证候代表的并非一个疾病单元,而是某种疾病发展变化的外在表现。与应激相关的疾病有常见证候,如腹泻型肠易激综合征以大肠湿热证和肝郁脾虚证多见^[30]、抑郁症以肝郁气滞证和肝郁脾虚证多见^[31]、失眠以肝郁化火证和阴虚火旺证多见^[32]等,在辨病的基础上考虑证候,有助于选择更加准确的治疗方案。本研究并未聚焦于某一特定疾病,而是探讨情志变化作为病因时对疾病证型的影响。探究慢性

心理应激证候演变规律有利于提高辨证论治的主动性、预见性和针对性,即当面对慢性心理应激作为主要病因的疾病时,提供辨证论治的思路作为参考,确定先后主次、轻重缓急,有助于提高辨证准确度、把握疾病发展过程中证候演变规律、提高医者对疾病转归的预见性。其次,将慢性心理应激作为中医病因加以研究,结合现代检验手段,有助于理解中医证候的生理学基础,探寻证候的物质基础和特异性指标。

本研究选用疏肝方四逆散和疏肝解郁方逍遥散,通过实验验证结合方药反证,证实慢性心理应激的致病特点由开始的肝郁气滞证逐渐转变为肝郁脾虚证,其物质基础可能是 CORT 和 NE 以不同浓度进行组合以及 Ghrelin 水平的下降。

参 考 文 献 (References)

- [1] SAPOLSKY R M. Stress and the brain; individual variability and the inverted-U [J]. Nat Neurosci, 2015, 18 (10): 1344-1346.
- [2] RAY A, GULATI K, RAI N. Stress, anxiety, and immunomodulation; a pharmacological analysis [J]. Vitam Horm, 2017, 103: 1-25.
- [3] YANG L, ZHAO Y, WANG Y, et al. The effects of psychological stress on depression [J]. Curr Neuropsychopharmacol, 2015, 13(4): 494-504.
- [4] CUI B, PENG F, LU J, et al. Cancer and stress: nextgen strategies [J]. Brain Behav Immun, 2021, 93: 368-383.
- [5] 于琦,金光亮. 三种复方对慢性应激模型大鼠海马 CREB、BDNF 基因表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(3): 591-594.
YU Q, JIN G L. The effects of three complex prescriptions on BDNF and CREB expression of liver depression model by chronic unpredictable mild stress in rats [J]. Chin J Pathophysiol, 2009, 25(3): 591-594.
- [6] 于琦,金光亮. 三种复方对慢性应激肝郁模型大鼠海马 5-HT_{1A} 受体基因表达的影响 [J]. 北京中医药, 2008, 27(1): 57-59.
YU Q, JIN G L. Effects of three kinds of compound prescriptions on gene expression of 5-HT_{1A} receptor in hippocampus of rats with chronic stress and liver depression [J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2008, 27(1): 57-59.
- [7] 刘玥芸,郭晓玲,赵宏波,等. 逍遥散提取物对肝郁脾虚证模型大鼠药效的行为学评价 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 2138-2141.
LIU Y Y, GUO X L, ZHAO H B, et al. Behavior evaluation of rat model with stagnation of liver Qi and spleen deficiency syndrome regulating by Xiaoyao San extract [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28(7): 2138-2141.
- [8] 余楷杰,高静静,巩子汉,等. 母婴分离/束缚应激模型小鼠海马小胶质细胞变化及温阳解郁方的调节作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 49-57.
SHE K J, GAO J J, GONG Z H, et al. Changes of microglia in hippocampus of mice induced by maternal separation with restraint stress and regulatory effect of Wenyang Jieyu prescription [J]. Chin J Experim Tradit Med Formul, 2021, 27(18): 49-57.
- [9] 傅景华. 黄帝内经素问 [M]. 北京: 中医古籍出版社; 1997.
FU J H. Suwen of Huangdi Neijing [M]. Beijing: Publishing House of Ancient Chinese Medical Books; 1997.
- [10] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2010.
WEI W, WU X M, LI Y J. Experimental methodology of pharmacology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2010.
- [11] 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): 247-251.
- [12] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. Psychopharmacology, 1987, 93(3): 358-364.
- [13] 张怡,张铭阳,冯庭宇,等. 肝郁气滞、肝郁脾虚证慢性应激模型大鼠外周血 Th17/Treg 平衡偏移的比较 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(2): 229-233.
ZHANG Y, ZHANG M J, FENG T Y, et al. Comparison of Th17/treg balance deviation in peripheral blood of chronic stress model rats with liver stagnation and qi stagnation and liver stagnation and spleen deficiency syndrome [J]. J Basic Chin Med, 2023, 29(2): 229-233.
- [14] 朱艳芳,徐志伟,敖海清,等. 加减小逍遥散对慢性心理应激 2 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(6): 555-557, 592.
ZHU Y F, XU Z W, AO H Q, et al. Effect of modified Xiaoyao San on insulin resistance in type 2 diabetes mellitus mice with chronic psychological stress [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2013, 24(6): 555-557, 592.
- [15] PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 463(1/2/3): 3-33.
- [16] FERNÁNDEZ-TERUEL A, TOBEÑA A. Revisiting the role of anxiety in the initial acquisition of two-way active avoidance: pharmacological, behavioural and neuroanatomical convergence [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2020, 118: 739-758.

- [17] 盛燮荪, 张明权, 吴静芝, 等. 王孟英医著精华 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社; 1992.
SHENG B S, ZHANG M Q, WU J Z, et al. The essence of Wang Mengying's medical works [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Press; 1992.
- [18] 傅山. 傅青主女科 [M]. 上海: 上海人民出版社; 1978.
FU S. Fu Qingzhu's obstetrics and gynecology [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House; 1978.
- [19] ZHANG Y, LI X J, WANG X R, et al. Integrating metabolomics and network pharmacology to explore the mechanism of Xiao-Yao-San in the treatment of inflammatory response in CUMS mice [J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16 (11): 1607.
- [20] 詹雯洁, 骆利元, 汪琦, 等. 青少年抑郁障碍患者皮质醇水平与中医证候相关性研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2023, 25(4): 1475-1480.
ZHAN W J, LUO L Y, WANG Q, et al. A study on the correlation between cortisol levels and tcm syndrome distribution in adolescents with depressive disorder [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2023, 25(4): 1475-1480.
- [21] 胡随瑜, 张宏耕, 郑林, 等. 1977 例抑郁症患者中医不同证候构成比分析 [J]. *中国医师杂志*, 2003, 5(10): 1312-1314.
HU S Y, ZHANG H G, ZHENG L, et al. Analysis of TCM different syndromes composition ratio in 1977 patients with depression [J]. *J Chin Physician*, 2003, 5(10): 1312-1314.
- [22] 袁洋, 卜平, 孔桂美, 等. 112 例非酒精性脂肪肝证候病机的研究 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2007, 17(1): 40-42.
YUAN Y, BU P, KONG G M, et al. Study on syndrome pathogenesis of 112 cases of nonalcoholic fatty liver [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis*, 2007, 17(1): 40-42.
- [23] 薛晓倩, 黄学宽, 高宁, 等. 化湿液对湿阻证大鼠血清 D-木糖及 Ghrelin 含量的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(12): 206-209.
XUE X Q, HUANG X K, GAO N, et al. Effects of Huashi liquid on content of D-xylose and ghrelin in serum of rats with dampness retention syndrome [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2011, 17(12): 206-209.
- [24] 张广梅, 李杰, 吴萍, 等. 血清 D-木糖与太阴病(脾阳虚证)“欲解时”及理中汤干预的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(10): 4685-4688.
ZHANG G M, LI J, WU P, et al. Study on serum D-xylose changes in the recovery of Taiyin disease (syndrome of spleen Yang deficiency) and after the intervention of Lizhong Decoction [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33 (10): 4685-4688.
- [25] 李篮, 何群, 王欢欢, 等. 不同治疗方法对脾气虚证模型兔血清 D-木糖含量的影响 [J]. *中成药*, 2010, 32(12): 2165-2167.
LI L, HE Q, WANG H H, et al. Effects of different treatment methods on serum D-xylose content in rabbits with spleen-qi deficiency syndrome [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2010, 32(12): 2165-2167.
- [26] SANGER G J, BROAD J, CALLAGHAN B, et al. Ghrelin and motilin control systems in GI physiology and therapeutics [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 239: 379-416.
- [27] MINGARDI J, MEANTI R, PAOLI C, et al. Ghrelin, neuroinflammation, oxidative stress, and mood disorders: what are the connections? [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2024, 22: 1.
- [28] FAHED R, SCHULZ C, KLAUS J, et al. Ghrelin is associated with an elevated mood after an overnight fast in depression [J]. *J Psychiatr Res*, 2024, 175: 271-279.
- [29] 姚玉璞, 张立平, 郭蓉娟, 等. 从抑郁症的主要证型探讨“见肝之病, 知肝传脾” [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28 (4): 1081-1083.
YAO Y P, ZHANG L P, GUO R J, et al. Based on the main pattern of depression to explore the meaning of 'When the liver is affected, a prescription is chosen to replenish the spleen' [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2013, 28 (4): 1081-1083.
- [30] 熊钦, 李奕霖, 姚承佼, 等. 腹泻型肠易激综合征常见证型粪便肠道菌群宏基因组学横断面研究 [J]. *中医杂志*, 2024, 65(5): 503-511.
XIONG Q, LI Y L, YAO C J, et al. Metagenomics of fecal gut microbiota in common traditional Chinese medicine syndrome types of irritable bowel syndrome with diarrhea: a cross-sectional study [J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 65 (5): 503-511.
- [31] 张佳怡, 张顺玲, 钟琳炜, 等. 基于文献分析抑郁证的证型分布及用药规律 [J]. *中医临床研究*, 2024, 16(6): 33-38.
ZHANG J Y, ZHANG S L, ZHONG L W, et al. Analysis of depression syndrome distribution and medication rules based on the literature [J]. *Clin J Chin Med*, 2024, 16(6): 33-38.
- [32] 袁拯忠, 戴春秀, 叶人, 等. 913 例失眠患者中医证型分布的影响因素分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26 (7): 1587-1590.
YUAN Z Z, DAI C X, YE R, et al. Analysis on relative factors of TCM pattern identification of 913 insomnia cases [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2011, 26(7): 1587-1590.