

·方药研究·

本文引用:陈宝艳,李坤寅,甄玉花.疏肝健脾法对产后缺乳肝郁脾虚证大鼠泌乳干预作用的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(12):1374-1379.

疏肝健脾法对产后缺乳肝郁脾虚证大鼠泌乳干预作用的实验研究

陈宝艳¹,李坤寅²,甄玉花²

(1.广州中医药大学第一附属医院,广东 广州 510405;2.广州中医药大学第三附属医院,广东 广州 510378)

[摘要] **目的** 探讨疏肝健脾法对产后缺乳肝郁脾虚证大鼠泌乳的干预作用。**方法** 采用甲磺酸溴隐亭溶液+慢性束缚法复制大鼠产后缺乳肝郁脾虚证结合动物模型,将60只Wistar大鼠随机分为空白对照组,模型组,西药对照组,中药低、中、高剂量组,每组10只,通过大鼠宏观表征、体质量、每小时泌乳量、仔鼠窝净增重、旷场实验、D-木糖排泄率观察疏肝健脾法的干预作用。**结果** 与模型组相比,西药对照组和中药低、中、高剂量组均可改善缺乳大鼠的宏观表征、增加大鼠体质量和仔鼠净增重,增加大鼠每小时泌乳量,增加大鼠水平运动和垂直运动次数,增加大鼠尿D-木糖排泄率($P<0.05$),且中药中剂量组效果最好。**结论** 疏肝健脾法能促进肝郁脾虚证产后缺乳大鼠泌乳,同时可改善大鼠宏观表征、行为学表现及脾胃功能。

[关键词] 疏肝健脾法;产后缺乳;肝郁脾虚证;动物模型;泌乳量

[中图分类号] R271.4;R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.12.005

Effect of Liver-Soothing and Spleen-Strengthening Prescription on Lactation in Postpartum Hypogalactia Rats with Liver-Qi Stagnation and Spleen Deficiency Syndrome: An Experimental Study

CHEN Baoyan¹, LI Kunyin², ZHEN Yuhua²

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China;

2. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510378, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of liver-soothing and spleen-strengthening prescription on lactation in postpartum hypogalactia rats with liver-Qi stagnation and spleen deficiency syndrome. **Methods** A rat model of postpartum hypogalactia comorbid with liver-Qi stagnation and spleen deficiency syndrome was established by administration of bromocriptine mesylate solution and chronic restraint stress. A total of 60 Wistar rats were randomly divided into blank control group, model group, Western medicine control group, and traditional Chinese medicine groups (low, medium, and high doses), with 10 rats in each group. The effect of liver-soothing and spleen-strengthening prescription was evaluated by macroscopic representation, body mass, lactation volume per hour, open-field test, and D-xylose excretion rate of rats, as well as net weight gain per litter. **Results** Compared with the model group, the Western medicine control group and traditional Chinese medicine groups (low, medium, and high doses) had significantly improved macroscopic representation and significant increases in body mass, lactation volume per hour, number of horizontal and vertical movements, and D-xylose excretion rate of the rats, as well as net weight gain per litter ($P<0.05$), with the greatest improvements observed in the medium-dose traditional Chinese medicine group. **Conclusion** Liver-soothing and spleen-strengthening prescription can promote the lactation of postpartum hypogalactia rats with liver-Qi stagnation and spleen deficiency syndrome, and can improve the macroscopic representation, behavioral performance, and

[收稿日期] 2018-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603653)。

[作者简介] 陈宝艳,女,医学博士,副主任医师,研究方向:围产医学与中医药对母胎的保护作用,E-mail:1027915064@qq.com。

the function of the spleen and stomach.

[**Keywords**] liver-soothing and spleen-strengthening prescription; postpartum hypogalactia; liver-Qi stagnation and spleen deficiency syndrome; animal model; lactation volume

产后缺乳属于产后病范畴,是指产妇哺乳期间乳汁减少或无乳汁,而无法满足婴儿需求^[1]。中医学认为,产后缺乳的病机为气血亏虚^[2]、肝郁气滞、肝郁脾虚等。前期研究发现,产后缺乳证型除单纯虚证外,虚实夹杂证亦较常见,临床上,肝郁脾虚证是最常见的证候之一^[3],亦有学者提出产后缺乳从肝胃论治^[4],因此,研究肝郁脾虚证产后缺乳具有更大的实际意义。因此,本研究以 Wistar 大鼠为造模载体,探讨疏肝健脾法对产后缺乳肝郁脾虚证大鼠宏观表征、体质量、每小时泌乳量、仔鼠窝净增重、旷场实验和 D-木糖排泄率的影响,旨在为催乳辨证论治和中药研发提供理论和实验基础。

1 材料

1.1 实验动物

选取健康 SPF 级 Wistar 临产期孕鼠为实验大鼠,20~24 周,体质量 300~400 g,由广州中医药大学实验中心提供,生产许可证号:SCXK(粤)2013-00034。实验大鼠在广州中医药大学第一附属医院 SPF 级实验室饲养(许可证号:SYXK(粤)2013-0092),母、仔鼠按窝同笼饲养,室温控制在 22~24 ℃,湿度 45%~65%。昼夜明暗交替时间 12/12 h。大鼠体质量及对应每窝仔鼠总质量无统计学差异。

1.2 药品与试剂

中药组方:在临床实践和前期研究工作基础上^[5-6],本研究采用疏肝健脾法开展实验研究。本课题化裁组方为:柴胡 15 g,当归 10 g,白芍 15 g,川芎 10 g,漏芦 10 g,通草 10 g,桔梗 10 g,王不留行 10 g,党参 30 g,白术 15 g,茯苓 15 g,炙甘草 10 g。中药在广州中医药大学第一附属医院科研药房按标准浓缩采用旋转蒸发仪(IKA)制备。具体操作如下:疏肝健脾方原方药材重量为 160 g/剂,将药物置入煎锅内,加入 8 倍重量蒸馏水(1 280 mL),浸泡 30 min 后开始煎煮,煮沸后转小火煮 40 min,8 层纱布过滤出药液。再加入 1 280 mL 蒸馏水,二次煎煮后,滤出药液。将上述药液合并,离心(3 000 r/min)5 min 后,减压浓缩至对应浓度的药液(低浓度:1.109 g/mL,中浓度:

2.218 g/mL,高浓度:4.435 g/mL)。课题设计低、中、高 3 个中药剂量组,据前期研究结果,结合人与动物剂量换算法,各组的给药剂量分别为:低剂量组为 168 g/kg,中剂量组为 33.6 g/kg,高剂量组为 67.2 g/kg(换算后与人的药物剂量关系为 1:1、1:2、1:4)。甲磺酸溴隐亭片:匈牙利吉瑞大药厂,2.5 mg/片(进口药品注册证号:H20110116)。配制完成的溴隐亭放置于棕色瓶或锡箔纸包裹的玻璃瓶,4 ℃避光保存备用。甲氧氯普胺片:天津力生制药股份有限公司,5 mg/片。D-木糖试剂盒:南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器与设备

束缚筒:为塑料制品,主筒长 18 cm,筒口直径长 6.5 cm,前端有一透气孔,便于大鼠呼吸空气,后端为可调节的闸门。自制木质旷场箱:立方体,长×宽×高为 100 cm×100 cm×40 cm,内侧壁及底面贴为黑色,用黑线划分为 20 cm×20 cm 面积相等的 25 格。酶标仪(Multiskan Mk3 型):赛默飞世尔(上海)仪器有限公司。

2 实验方法

2.1 动物模型的建立

(1)实验第 1~7 天(溴隐亭溶液制备及大鼠灌胃):根据预实验以及人与动物剂量换算法,给实验大鼠按照 0.525 mg/(kg·d)灌服溴隐亭溶液。每天早、晚 8 时各 1 次,连续 7 d。对照组予等体积的蒸馏水灌胃。(2)实验第 1~21 天(慢性束缚造模):将大鼠置于自制束缚筒内以限制大鼠活动,并放于操作台上,每天 3 h(10~13 时),连续 21 d。

2.2 实验分组及干预

采用随机数字表法将 60 只实验大鼠随机分为 6 组,分别为:空白对照组(正常哺乳期大鼠)、模型组、西药对照组(模型+甲氧氯普胺片)、中药低剂量组(模型+中药低剂量)、中药中剂量组(模型+中药中剂量)、中药高剂量组(模型+中药高剂量),每组 10 只,每笼 1 只。在实验第 22~28 天,予相应干预,具体如下:西药对照组予甲氧氯普胺片,根据预实验以及人与动物剂量换算法,按 3.15 mg/(kg·d)体质量

给药,每天早、晚8时各1次,连续7d。换算得到的药物低、中、高剂量浓度分别为1.109、2.218、4.435 g/mL。每天早晚8时各1次,连续7d;模型组、空白对照组予等体积蒸馏水灌胃。

2.3 观察指标

2.3.1 大鼠宏观表征 实验期间每天观察大鼠的精神、毛色、耳廓、眼裂黏膜的颜色与光泽度、行为姿势、活跃程度、粪便性状、对束缚的反应灵敏性等一般情况。

2.3.2 大鼠体质量、进食量、进水量 每天早8点用电子秤进行大鼠体质量、鼠粮称质量并记录饮水量。

2.3.3 大鼠每小时泌乳量 根据参考文献提供的方法^[7],记录大鼠每小时泌乳量和仔鼠窝净增重(仔鼠窝净增重=第28天窝仔鼠哺乳后总质量-第1天隔离前仔鼠总质量)。每日上午8点大鼠灌胃,灌胃2h以后,第1次称质量,使用电子称称取每窝仔鼠的总质量 W_1 ,称量后将大鼠与整窝仔鼠隔离开,隔离过程需注意保温。母仔隔离4h后,第2次称质量,称取每窝仔鼠的总质量 W_2 ,称量后将大鼠与仔鼠同笼哺乳2h,然后进行第3次称质量,称取整窝仔鼠的总质量 W_3 。按小时计算实验母鼠的泌乳量,用公式表达为:

$$\text{母鼠每小时泌乳量} = W_3 - W_2 + (W_1 - W_2) / 4$$

2.3.4 旷场试验 根据参考文献^[8],实验第1天、21天、28天分别观察5min内大鼠在旷场箱内的活动情况。观察指标包括,水平运动:大鼠三爪以上均跨入相邻格的次数;垂直运动:两前肢离开箱底或攀伏在侧壁上的次数;修饰次数:大鼠以其前肢抓痒、洗脸、理毛或舔足的次数。

2.3.5 D-木糖排泄率 测定采用D-木糖检测试剂盒,以间苯三酚比色法测定。模型大鼠分别于实验的第21、28天21:00开始禁食11h,相应的第2天(即第22、29天)8时开始用代谢笼收集每只大鼠5h(8~13时)的尿液,为未服D-木糖尿液;13时每只大鼠灌服10% D-木糖溶液,灌服量为1.5 g/kg,用代谢笼收集从13:10开始的每只大鼠5h(13:10~18:10)尿液,为服D-木糖后尿液。以上过程禁食不禁水。取得的大鼠尿液当天晚上按D-木糖检测试剂盒(间苯三酚比色法)说明书进行处理,根据参考文

献^[9]计算尿D-木糖排泄率。

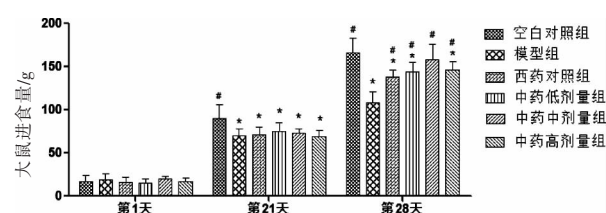
2.4 统计学方法

运用SPSS 19.0软件,对数据做正态性检验,正态分布的数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较采用ANOVA;进行方差齐性检验,符合方差齐性,两两比较采用LSD法,若方差不齐,则采用Dunnett's T_3 法进行两两比较,以 $P < 0.05$ 作为差异存在统计学意义。

3 实验结果

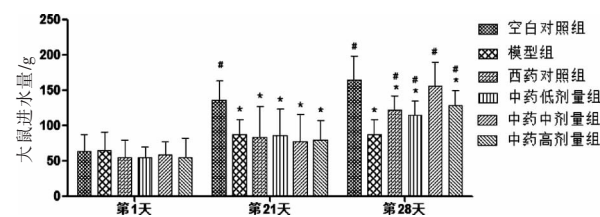
3.1 大鼠宏观表征比较

造模前,大鼠产后精神状态尚可、皮毛光泽、反应较灵敏、大便成球形、干稀适中。束缚开始时,模型组大鼠呈反抗不安、烦躁状态,之后转变为神态倦怠、闭眼、嗜卧、蜷缩、拱背、皮毛干枯无光泽、大便不成形或稀溏等。模型组大鼠进食量、进水量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而空白对照组的大鼠则仍反应灵敏,皮毛有光泽,大便成球形、干稀适中。第29天,与模型组相比,各药物治疗组精神好转,反应尚灵敏,大便成球形、肛周无黄染,各治疗组大鼠进食量、进水量均增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1、图2。



注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$

图1 大鼠进食量比较



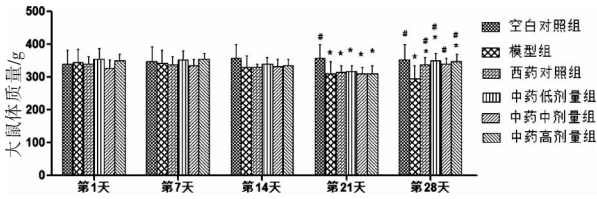
注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$

图2 大鼠进水量比较

3.2 大鼠体质量和仔鼠窝净增重比较

实验第1天、第7天、第14天各组大鼠体质量无明显差异($P > 0.05$)。第21天空白对照组体质量大于其余各组($P < 0.05$)。第28天,与空白对照组相比,

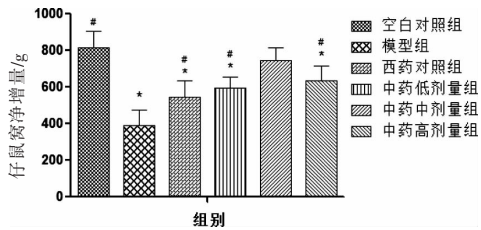
模型组、西药对照组、中药低剂量组、中药高剂量大鼠体质量降低($P<0.05$)。与模型组相比,各治疗组大鼠体质量增高($P<0.05$),空白对照组和中药中剂量组高于其余治疗组($P<0.05$)。见图 3。



注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

图 3 大鼠体质量比较

与空白对照组相比,模型组、西药对照组、中药低剂量组、中药高剂量组仔鼠窝净增重降低 ($P<0.05$),与模型组相比,各治疗组仔鼠净增重升高($P<0.05$),空白对照组和中药中剂量组高于其余治疗组 ($P<0.05$)。见图 4。

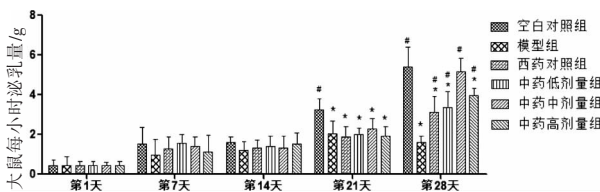


注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

图 4 仔鼠窝净增重比较

3.3 大鼠每小时泌乳量比较

实验第 21 天,与空白对照组相比,其余 5 组大鼠每小时泌乳量下降($P<0.05$)。第 28 天,与模型组相比,空白对照组及治疗组大鼠每小时泌乳量增多,西药对照组、中药低剂量组、中药高剂量组大鼠每小时泌乳量高于模型组,但低于空白对照组和中药中剂量组($P<0.05$)。见图 5。



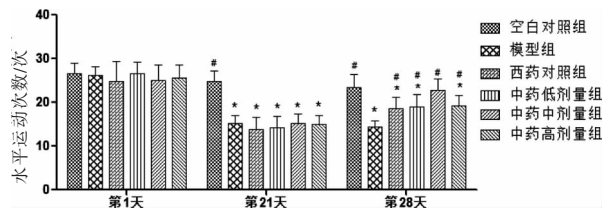
注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

图 5 大鼠每小时泌乳量比较

3.4 旷场实验结果比较

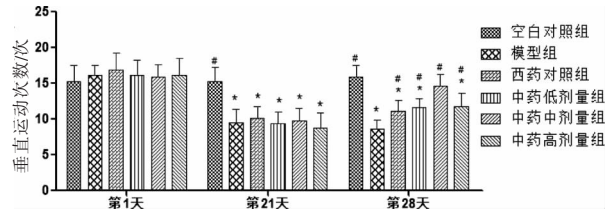
实验第 1 天,各组大鼠水平运动、垂直运动次数

差异无统计学意义。第 21 天,与空白对照组相比,其余各组大鼠水平运动和垂直运动次数均减少 ($P<0.05$)。第 28 天,与模型组相比,其余五组大鼠垂直运动、水平运动次数均增多,西药对照组、中药低剂量组、中药高剂量组大鼠垂直运动、水平运动次数多于模型组,但少于空白对照组和中药中剂量组($P<0.05$)。见图 6、图 7。在修饰次数方面,不同时期各组间修饰次数差异无统计学意义($P>0.05$)。



注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

图 6 大鼠旷场实验水平运动次数比较

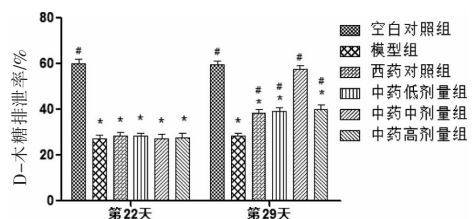


注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

图 7 大鼠旷场实验垂直运动次数比较

3.5 D-木糖排泄率

实验第 22 天,空白对照组大鼠 D-木糖排泄率高于其余各组($P<0.05$)。第 29 天,模型组大鼠 D-木糖排泄率低于其余 5 组,西药对照组、中药低剂量组、中药高剂量组 D-木糖排泄率高于模型组,但少于空白对照组和中药中剂量组($P<0.05$)。空白对照组大鼠 D-木糖排泄率与中药中剂量组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 8。



注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

图 8 大鼠旷场实验垂直运动次数比较

4 讨论

西医学认为,产后缺乳的发病原因,可能与乳腺发育不全、情绪焦虑或抑郁、产后哺乳不当、体质虚弱或营养不良等因素有关^[9]。各种原因导致的内分泌紊乱致下丘脑分泌的催乳素释放抑制因子分泌过多,并通过垂体门脉系统作用于垂体,抑制催乳素的合成及分泌^[7-11],或精神因素、心理因素抑制催乳素分泌,导致催乳素的合成和分泌减少,均可影响乳汁分泌。中医学中,产后缺乳的病因多与气血虚弱、肝郁脾虚、肝郁气滞等有关。我们的前期研究提示,约47%的产后缺乳与肝郁有关^[9]。这可能与现代女性工作、生活压力大,易致情志抑郁且产后气血虚弱、肝血不足,体内激素水平改变、母亲角色需适应等因素有关。

从中医学脏腑关系来看,肝与脾在生理、病理方面联系密切、相互影响,肝气郁滞,肝失疏泄,横逆犯脾而克脾土,脾失健运,则乳汁生化乏源,因此肝郁脾虚证是产后缺乳常见的中医证型,治疗应以疏肝理气、健脾养血、通络下乳为主要治法。故本研究以大鼠为实验动物,模拟西医病因病理,甲磺酸溴隐亭激活多巴胺受体抑制催乳素分泌,建立西医大鼠产后缺乳模型;模拟中医病机,慢性束缚致大鼠肝郁,肝疏泄不及、肝郁横逆犯脾致肝郁脾虚,建立产后缺乳中医证候模型,成功构建了产后缺乳病证结合动物模型,用于观察疏肝健脾法对产后缺乳肝郁脾虚证大鼠泌乳的干预作用。

本研究采用的中药是由下乳涌泉散(《清太医院配方》)和四君子汤(《太平惠民和剂局方》)化裁而来。下乳涌泉散为疏肝养血、通络下乳之良方^[12-13],四君子汤是健脾益气的基础方^[14]。君药柴胡具疏肝行气之功,臣以党参健脾养胃、补后天之本,辅以白术健脾燥湿,加强益气助运之力;当归、白芍为补血益气、滋养肝体之品。佐以茯苓甘淡,补利兼优,配白术健脾祛湿之功益著;王不留行、通草、漏芦均为通乳之要药,均可通络下乳^[15],兼有行血活血清利之力,通草、漏芦在治疗产后缺乳中出现频率较高^[16]。以炙甘草、川芎、桔梗司使药之职;炙甘草具有补脾

和胃功效,川芎为血中之气药,具有活血行气等功效,桔梗既升且降,善于开提肺气,引药上行。全方共奏疏肝理气、健脾养血、补中益气、通络下乳之功。全方将辨病与辨证相结合,产后缺乳疾病的病理变化和肝郁脾虚证的证候特征相结合,所以收效较好。本研究提示中药中剂量组疗效优于其他各药物组,药物干预后大鼠每小时泌乳量和仔鼠净增重增加明显,且大鼠宏观表征有明显改善、体质量增加、进食进水量增加,表明疏肝健脾中药不仅能促进产后大鼠泌乳,还可有效改善大鼠整体状态与身体机能,辨病疗效较好。

旷场实验是最常用于测定大鼠情绪和心理状态的行为学实验方法,可用量化指标客观反映出大鼠的活动性、探索性和抑郁、焦虑^[17-18]。疏肝健脾中药干预后的大鼠,其旷场实验水平运动、垂直运动次数均明显增加,提示疏肝健脾法可有效改善大鼠的肝郁状态,与既往研究有较为一致的实验论点^[9]。D-木糖代谢率是与小肠吸收功能成正相关的一个较为敏感和特异的检测指标,其水平的变化可以较为客观地反映动物的消化吸收和代谢功能,因此D-木糖排泄率常用于诊断脾虚证和评估药物疗效^[9]。研究提示中药各组均可提高大鼠尿D-木糖排泄率,且中剂量组效果最佳,提示疏肝健脾中药对小肠吸收功能有改善作用,有效缓解纳差、便溏等临床症状。结果显示,通过疏肝健脾法的药物干预,一方面增加了大鼠泌乳量,另一方面也改善了大鼠肝郁脾虚的脏腑失衡状态,将辨病与辨证相结合的中药治疗是干预本病的最佳途径。

为观察可能存在的剂量-效应关系,中药组设立了低、中、高3个组别,研究结果提示中药中剂量组疗效明显优于低、高剂量组,各项观察指标与空白对照组基本一致,这可能是由于低剂量组药物浓度较低,达不到有效的治疗效果,高剂量组可能由于浓稠的药液阻碍脾胃功能的吸收所致,因此中剂量组疗效最佳。

参考文献:

- [1] 连方,齐聪.中西医结合妇产科学[M].北京:人民卫生出版社,2012:249-251.

- [2] 赵春幸,郭小霞,刘 鑫,等.从气血同治理论探讨产后缺乳[J].中华中医药杂志,2017,32(10):4506-4508.
- [3] 陈宝艳.产后缺乳与中医体质及中药治疗的临床研究[D].广州:广州中医药大学,2014.
- [4] 赵春江,陈 瑶,何 振,等.从肝胃论治产后缺乳[J].西部中医药,2018,31(3):111-113.
- [5] 陈宝艳.中医体质与产后缺乳及证型的相关性研究[J].新中医,2016,48(1):127-130.
- [6] 陈宝艳.疏肝通络法治疗肝郁气滞证产后缺乳临床研究[J].新中医,2015,47(9):154-156.
- [7] 董世起.催乳汤对产后缺乳模型大鼠的治疗作用及其机制研究[D].北京:中国农业大学,2015.
- [8] 杨丽萍,李 改,万海娇,等.恐伤孕鼠对其 21 日龄子代情绪的影响[J].中华中医药杂志,2018,33(1):62-64.
- [9] 章海凤.隔药饼灸对 FGIDs(肝郁脾虚证)大鼠海马和杏仁核 AMPA 受体的调节机制[D].长沙:湖南中医药大学,2014.
- [10] 黄克斌.产后缺乳的论治体会[J].新疆中医药,2012,30(2):79-80.
- [11] 李 艳,黎开燕.补血升乳口服液对产后缺乳大鼠的治疗作用[J].中医药导报,2018,24(14):34-37.
- [12] 石国令.下乳涌泉散治疗产后缺乳 60 例[J].中医临床研究,2016,8(26):106-107.
- [13] 何 菊.下乳涌泉散加味治疗产后缺乳 56 例[J].浙江中医杂志,2015,50(10):740.
- [14] 高蓓蓓,彭 颖,李晓波.四君子汤复方多糖肠道免疫调节作用及其机制研究进展[J].中草药,2018,49(2):462-467.
- [15] 丁祥华.通乳汤治疗产后缺乳的效果观察[J].中药药理与临床,2015,31(1):295-296.
- [16] 康 晨,宋幸幸,田会玲,等.基于知识发现的催乳方剂及中药配伍规律挖掘[J].中国中医药图书情报杂志,2015,39(1):12-15.
- [17] 韩远山,蔺晓源,易刚强,等.复方紫金解郁片对慢性应激抑郁大鼠 HPA 轴及海马单胺神经递质的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):240-244.
- [18] FEDOTOVA J, SOULTANOV V, NIKITINA T, et al. Ropren[®] treatment reverses anxiety-like behavior and monoamines levels in gonadectomized rat model of Alzheimer's disease [J]. Biomed Pharmacother, 2016,83:1444-1455.
- [19] 吴晓玲,张贵锋.柴胡疏肝散对抑郁症大鼠行为学及旷场实验的影响[J].中国中医药现代远程教育,2018,16(2):90-92.
- [20] 崔小兵,孙 学,文红梅,等.不同加工方式的中药白术对脾虚大鼠唾液淀粉酶活性和尿中 D-木糖排泄率的影响[J].中国中药杂志,2016,41(14):2576-2580.

(本文编辑 杨 瑛)