

基于分子机制的逍遥散方证相关研究思路

严志祎¹ 焦海燕¹ 马庆宇¹ 李晓娟¹ 潘秋霞¹ 王亭晔¹ 侯雅静¹ 王方方¹

刘玥芸¹ 陈家旭¹ 岳利峰²

(1 北京中医药大学中医学院, 北京, 100029; 2 北京中医药大学东直门医院, 北京, 100700)

摘要 逍遥散作为疏肝健脾的经典方剂, 在临床上广泛应用于治疗各科疾病所涉及的肝郁脾虚证之中, 长久以来也进行了大量关于逍遥散调节作用与肝郁脾虚证发病机制内在联系与规律的研究。文章从分子机制研究的侧面着手, 探讨了逍遥散方证研究的思路, 以期今后包括逍遥散与肝郁脾虚证在内的方证研究提供思路与方法。

关键词 肝郁脾虚证; 逍遥散; 方正相关; 分子机制

Discussion on molecular mechanism in correlation between prescription and syndrome of Xiaoyaosan

Yan Zhiyi¹, Jiao Haiyan¹, Ma Qingyu¹, Li Xiaojuan¹, Pan Qiuxia¹, Wang Tingye¹, Hou Yajing¹,

Wang Fangfang¹, Liu Yueyun¹, Chen Jiaxu¹, Yue Lifeng²

(1 School of Basic Medical Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Dongzhimen Hospital

Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract Xiaoyaosan is the classic prescription of soothing the liver and invigorating the spleen, which is widely used in clinical departments, especially syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency. For long times, there is a lot of researches about the inner link between the regulating effect of Xiaoyaosan and the mechanism of syndrome of liver depression and spleen deficiency. This paper starts from the molecular mechanism, and discusses the thought in prescription and syndrome of Xiaoyaosan, hoping to provide the thinking and method to the study of prescription and syndrome including Xiaoyaosan and syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency.

Key Words Syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency; Xiaoyaosan; Correlation between prescription and syndrome; Molecular mechanism

中图分类号: R-331 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.03.002

在临床与基础研究中, 逍遥散都被广泛地运用于治疗肝郁脾虚证, 在运用现代研究手段研究逍遥散与肝郁脾虚证方证相关的理论之时, 人们进行了大量的分子机制研究, 但对于其方证相关科学内涵的认识仍未清晰。因此, 我们在本文试从分子生物学机制的角度, 立足于逍遥散与肝郁脾虚证的方证研究, 探讨其研究思路与方法。

1 逍遥散方证研究的意义

方证体系首见于《伤寒论》, 方证相关规律是一种复杂的对应规律, 方剂本身作为一复杂系统干预了同样复杂的人体系统, 主要是关键病机层面上的对应, 不同方药干预不同的靶点, 方证对应是保证临床疗效的关键^[1]。方证相应是临床与基础研究中基本的指导思想, 方证研究是探究方药与病证之间的对应关系及其内涵的研究领域, 是以比较医学为方

法论基础, 以证的内涵与方药紧密关联为逻辑基础, 以中医辨证论治的经验为背景, 以具有特定属性的病证模型和特定组成的方药为研究工具^[2], 并且在西医的病与中医证的结合下, 形成了病证结合的动物模型, 为中医证的研究提供现实有效的途径^[3]。方证研究离不开动物实验和动物模型, 基于方证相应原理, 对成功的动物模型施以相应的方药, 在模型的制作中, 证候与疾病的病因病机相结合, 在符合中医理论的同时, 又能利用以西医疾病模型为基础, 使中医证的不确定因素在病的有效补充下变得更加清晰, 贴近临床实际, 也能更准确地阐明证候本质, 以此研究微观物质分子的改变, 这是探究分子水平的方证相关与内在逻辑的根本。

逍遥散一方首见于《太平惠民和剂局方·卷九·治妇人诸疾》, 具有疏肝解郁, 健脾和营, 养血调经

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81473597); 国家自然科学基金重点项目(编号: 81630104); 国家自然科学基金青年项目(编号: 81302960)

通信作者: 陈家旭, 男, 教授, 博士研究生导师, 北京市朝阳区北三环东路 11 号北京中医药大学中医学院中医诊断系 83 号信箱, 邮编: 100029, Tel: (010) 64286656, E-mail: chenjx@bucm.edu.cn

之功效,在早期多被用以“治妇人诸疾”,但随着社会的发展和时代的变迁,郁证表现越来越复杂多样,逍遥散的适应证越来越广泛,不局限于妇科疾病,但大都具有肝郁脾虚这一共同病机,肝主疏泄、调畅气机,肝脏是人体应激机制的调节中心^[4],同时脾的运化功能除了作用于消化系统外,还与神经内分泌免疫调节网络密切相关^[5],机体许多系统功能的变化以及活性物质的改变均与肝郁脾虚证有着密不可分的关系,这些都是逍遥散与肝郁脾虚证方证相关研究的基础,对临床方证对应的运用具有指导意义。因此,展开逍遥散与肝郁脾虚证相关的科学研究是方证相关研究的具体形式,体现了方证对应规律研究的思路与方法。

2 基于分子生物学机制对逍遥散方证研究的探索

2.1 逍遥散方证的相关性研究 逍遥散的调节机制以及肝郁脾虚证的发病机制是一个动态而复杂的过程,涉及其中的调节方式多种多样。研究表明,逍遥散的治疗作用与机体许多系统都有关联,与大量的微观物质的变化具有相关性,主要是关于逍遥散与特定因素相关性的研究,这一因素可以是基因、蛋白、活性物质、组织形态等等,比如某些物质的表达水平与肝郁脾虚证的发生密切相关,以此为依据我们可通过实验,观察逍遥散是否对其有干预作用。相关性研究在逍遥散方证研究中最常见的一类,其研究主要在于探讨逍遥散于肝郁脾虚证的调节作用与某一物质的相关性,以研究其表达量的多寡或活性作为研究内容,如调节慢性束缚应激肝郁脾虚证模型大鼠 SP、VIP 基因的表达而对肝郁脾虚证脑肠互动功能产生影响,调节慢性束缚应激大鼠下丘脑弓状核神经肽 Y 与瘦素受体,从而影响食欲与体重^[6],逍遥散能够上调慢性束缚应激大鼠前额皮质与海马 CA1 区 BDNF 的表达的同时下调 TrkB 与 NT-3^[7],逍遥散通过下调 GluR1 mRNA 而上调 GluR2 mRNA 在海马 CA1 区的表达影响海马突触可塑性^[8],还能够通过上调海马神经元 PSD-95 与 SYP 的表达水平,逆转慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠学习记忆功能的下降^[9],采用 MTT 法检测慢性应激大鼠脾淋巴细胞活性,发现逍遥散可以明显提高脾淋巴细胞活性,拮抗应激大鼠的免疫抑制状态^[10],逍遥散还能够通过提高肝郁脾虚型慢性疲劳综合征患者血中 NK 细胞活性和免疫球蛋白水平,以此提高机体免疫力发挥疗效^[11],具有拮抗应激大鼠大鼠海马突触体内 Ca^{2+} 浓度与 PKC 活性升高的作用^[12],可通过调节中枢胆碱神经递质活性和数量,

以此对抗 D-gal 所致 AD 小鼠模型^[13],可通过抑制蓝斑-去甲肾上腺素能神经元的活性从而改善慢性束缚应激大鼠抑郁样行为^[14],可通过调节能量代谢、氨基酸代谢、肠道微生物活性对 CUMS 模型大鼠起到治疗作用^[15]。

相关性的研究是以各类研究的手段将传统医学的方与证同现代医学研究结合的第一步,通过观察相关指标在肝郁脾虚证中的变化以及与逍遥散调节的联系,阐释方证相应的科学内涵。

2.2 逍遥散方证相关性研究的拓展 在相关性研究之后,想要进一步研究逍遥散对肝郁脾虚证的干预作用,就不能只是简单的观察逍遥散直接或间接改变一些分子物质的表达和活性的作用,而要探索分子改变与方证研究之间的深层关系,最常见的方法是探讨与方证相关的分子功能所对应的信号通路或系统的改变,通常是以 Western-blot 等实验方法检测这一信号通路或系统的表达以及下游分子的表达或者活化状态,以此证明逍遥散的作用与通路分子的表达具有一定关系。比如在进行逍遥散通过 JAK/STAT 信号通路改善应激与抑郁样行为的研究中,为了说明逍遥散调控了 JAK/STAT 信号通路,通过 ELISA 检测杏仁核中 JAK/STAT 信号通路下游分子 TNF- α , gp130, total-Jak2, total-STAT3 含量,以此证明了逍遥散与 JAK/STAT 信号通路分子的表达之间具有逻辑关联^[16];又如有研究通过观察逍遥散对慢性复合应激肝郁脾虚证模型小鼠下丘脑视上核与室旁核中 Apelin 与 APJ 受体的表达情况,证明了逍遥散的调节作用与 Apelin/APJ 生物系统功能的改变具有关联性^[17];在关于逍遥散对肝郁脾虚模型大鼠海马突触可塑性调节作用的研究中,逍遥散对通路上 NMDA 受体、CaMK II、Kalirin 以及 Rac1 的表达具有调节作用,因而与 NMDAR/CaMK II/Kalirin/Rac 通路的改变具有联系^[18];在关于逍遥散对 CNP/NPR-B 系统调控作用的研究中,设置了高中低剂量的逍遥散实验组,检测直肠中 CNP 与 NPR-B 的表达水平,结果显示逍遥散高与中剂量对 CNP 与 NPR-B 有上调的作用,证明了高中剂量逍遥散的调控与 CNP/NPR-B 系统变化的关系^[19]。此外,在研究信号通路是否为逍遥散治疗肝郁脾虚证的作用靶点的同时,论证信号通路与肝郁脾虚证发病机制之间的联系,通常选取特定的阻断剂,如在研究慢性束缚应激大鼠 JAK 通路改变与逍遥散调节作用的实验中,运用了 JAK 通路阻断剂 SP600125,结果发现阻断 JAK 通路能够减轻大鼠的应激焦虑等表现,这就

证明了 JAK 通路的改变与慢性束缚应激的发生机制具有关联^[20]。

通过将方药、证候之间具有相关性的分子物质作为颜料,而后将相关的信号通路或生物系统的功能改变作为画笔,通过不断的研究和探索,力求绘制出方证对应生物学基础的蓝图,是方证研究的一种思路,也为深入阐明肝郁脾虚证的生物学基础与逍遥散的作用机制提供了研究思路。

2.3 逍遥散方证研究中的形态改变 在逍遥散方证的实验研究中,对组织或细胞形态变化的观察也是逍遥散分子机制研究的一类重要手段,如在体外实验中发现,运用不同浓度逍遥散制备的含药血清能够改变线粒体膜电位和游离 Ca^{2+} 浓度,逆转核破裂、核固缩等变化,以此有效的逆转氧化应激诱导的海马神经元损伤^[21],慢性束缚应激导致肝郁脾虚证大鼠海马 CA1 区出现了细胞核变形、线粒体嵴模糊,突触结构不清等变化,逍遥散可明显改善这些超微结构的损伤^[22],多相性应激使大鼠海马神经元损伤导致神经元内 Nissl 体减少,逍遥散能通过抑制海马神经元细胞外 Ca^{2+} 大量内流,阻止 Ca^{2+} 超载,以此改善应激对大鼠海马神经元造成的损伤及神经元内 Nissl 体的减少,从而改善应激大鼠的学习记忆状况^[23],在关于肝郁脾虚证模型小鼠前额皮质星形胶质细胞功能的实验研究中,通过尼氏染色发现模型组神经元数量显著减少,且前额皮质神经元出现排列紊乱、缺失、损伤明显、形态不规则、核边界模糊、分布不均匀等病理表现,逍遥散可通过改善神经元形态和数量等达到治疗肝郁脾虚证的目的^[24]。这类研究通过直观的观察组织与细胞形态的改变以及逍遥散的干预作用,为方证研究提供形态学上的依据,是分子水平逍遥散方证物质基础的有力补充,丰富了方证研究的内容。

3 展望

方证对应是方与证之间的适配性或关联性,方证相关表现为多个或某类方剂治疗某一病证在不同程度上显现疗效,是作为药物刺激与生物反应或方剂与机体密切相关的整体观,也是中医辨证论治中最具有特色的学术特征之一。辨证论治包括方证对应,而方证对应则是中医辨证论治原则的体现,方剂的应用既是辨证论治的结果,也是遵循方证对应原则的体现。方证对应是对辨证论治模式的深化、简化和具体化,可操作性更强,可以说辨证论治是一种最基本的临床辨治方法,而辨方论治则是一种高级的、特殊的辨证方法^[25]。因此,从方药药理作用来

理解证候的科学内涵,从证与方药的不同角度相互补充,这对中医证候的现代研究具有重要意义^[26]。理法方药的统一是保证临床疗效的关键,中药复方是通过众多作用环节和机制起到治疗作用,是多组分、多途径、多靶点的作用过程。方证相应研究以经典方药为切入点,借助现代科学技术尽可能全面的了解证候的物质基础和评价方药的疗效。由于复方多成分、多靶点及机制复杂的特点与证候的系统复杂性,方证研究中展开分子机制研究亟需更多更好的思路与方法,在合理运用基因组学、蛋白组学、代谢组学等技术的基础上,展开微观病理改变的多靶效应环节与中药复方组分配伍作用机制的方证对应研究,并且采用系统生物学、系统工程理论等多学科知识进行跨领域多角度研究方证内涵和物质基础,才能为临床的诊断治疗提供可靠依据。

本文以逍遥散与肝郁脾虚证方证研究中分子机制的研究为切入点,通过探讨方证相关性研究,从分子表达、信号通路或生物系统的改变以及细胞或组织形态变化的实验研究中探析了逍遥散与肝郁脾虚证方证研究的思路,希望能够为今后的方证对应理论科学内涵的实验研究与设计提供参考。

参考文献

- [1] 陈家旭. 试论开展方证相关内涵研究的意义[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(9): 581-582.
- [2] 刘进娜, 谢鸣. 方证相关——中医学探索的新领域[J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1193-1198.
- [3] 曹灵修, 张林. 方证关系研究思路简[J]. 中华中医药杂志, 2016, 55(8): 3166-3169.
- [4] 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): 7-12.
- [5] 陈家旭. 中医脾虚证的研究进展与展望[J]. 中医药导报, 1998, 4(8): 14-16.
- [6] Wang S X, Chen J X, Yue G X, et al. Xiaoyaosan Decoction Regulates Changes in Neuropeptide Y and Leptin Receptor in the Rat Arcuate Nucleus after Chronic Immobilization Stress[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2012, 2012(4): 381278.
- [7] Chen, Jx, W. X. Li, J. Yang. Effects of the Chinese traditional prescription Xiaoyaosan decoction on chronic immobilization stress-induced changes in behavior and brain BDNF, TrkB, and NT-3 in rats [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2008; 745-755.
- [8] Liang Y, Guo X L, Chen J X, et al. Effects of the chinese traditional prescription xiaoyaosan decoction on chronic immobilization stress-induced changes in behavior and ultrastructure in rat hippocampus[J]. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2013, 2013: 984797.

- [9] Meng Z Z, Chen J X, Jiang Y M, et al. Effect of Xiaoyaosan Decoction on Learning and Memory Deficit in Rats Induced by Chronic Immobilization Stress [J]. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2013, 2013 (17): 297154.
- [10] 余浚龙, 严灿. 逍遥散对慢性应激大鼠的免疫调节作用[J]. 广州医药, 2004, 35 (6): 56-57.
- [11] 时学英. 逍遥散治疗肝郁脾虚型慢性疲劳综合征的疗效及其对患者免疫功能的影响[J]. 浙江中医杂志, 2007, 42 (7): 394-395.
- [12] 敖海清, 徐志伟, 严灿, 等. 逍遥散对应激大鼠海马突触体内 PKC 活性及 Ca^{2+} 浓度的影响[J]. 山东中医杂志, 2006, 25 (2): 112-114.
- [13] 吴红彦, 王虎平. 以肝脾论治老年性痴呆及逍遥散对老年痴呆模型小鼠学习记忆能力、中枢胆碱能神经元活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (5): 190-192.
- [14] Ding X F, Zhao X H, Tao Y, et al. Xiao Yao San Improves Depressive-Like Behaviors in Rats with Chronic Immobilization Stress through Modulation of Locus Coeruleus-Norepinephrine System [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014 (6): 902516.
- [15] Gao X X, Cui J, Zheng X Y, et al. An investigation of the antidepressant action of xiaoyaosan in rats using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry combined with metabonomics. [J]. Phytotherapy Research, 2013, 27 (7): 1074-85.
- [16] 李晓娟, 白晓晖, 李娜, 等. 逍遥散对慢性束缚应激抑郁模型大鼠 JAK/STAT 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (5): 1700-1704.
- [17] 严志伟. 肝郁脾虚证模型小鼠下丘脑 Apdin/APJ 受体的变化及逍遥散的调节作用[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [18] 刘群. 慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠海马 NMDAR/CaMK II/Kalirin/Rac 通路的改变及逍遥散的调节作用[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [19] Li P, Tang X D, Cai Z X, et al. CNP signal pathway up-regulated in rectum of depressed rats and the interventional effect of Xiaoyaosan [J]. World Journal of Gastroenterology Wjg, 2015, 21 (5): 1518.
- [20] Hong-Bo Zhao, You-Ming Jiang, Xiao-Juan Li, et al. Xiao Yao San Improves the Anxiety-Like Behaviors of Rats Induced by Chronic Immobilization Stress: The Involvement of the JNK Signaling Pathway in the Hippocampus [J]. Biol. Pharm. Bull, 2017, 40 (2): 187-194.
- [21] Zhen-zhi Meng, Jing-hong Hu, Jia-xu Chen, et al. Xiaoyaosan Decoction, a Traditional Chinese Medicine, Inhibits Oxidative-Stress-Induced Hippocampus Neuron Apoptosis In Vitro [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2012, 2012 (12): 489254.
- [22] 梁媛, 陈家旭, 郭晓玲, 等. 逍遥散对肝郁脾虚证大鼠边缘系统神经元超微结构的影响[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24 (5): 577-581.
- [23] 徐志伟, 敖海清, 吴丽丽, 等. 逍遥散对慢性心理应激损伤大鼠海马神经元的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21 (1): 5-9.
- [24] 刘燕. 肝郁脾虚证小鼠前额皮质星形胶质细胞功能变化及逍遥散的调节机制[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [25] 熊兴江, 王阶, 王师菡, 等. 方证对应理论研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24 (12): 1624-1626.
- [26] 范颖. 方证相关的系统论探讨[J]. 中医杂志, 2005, 46 (4): 249-250.

(2017-02-20 收稿 责任编辑: 洪志强)

(上接第 483 页)

方证相应是临床取效的关键,而在方证相应的过程中,无论采用什么样的方式、方法,都不能脱离象思维。

参考文献

- [1] 熊兴江, 王阶, 王师菡, 等. 方证对应理论研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24 (12): 1624-1626.
- [2] 王树人. 回归原创之思: “象思维”视野下的中国智慧[M]. 南京: 江苏人民出版社, 2012: 1.
- [3] 何泽民. 论象思维对《黄帝内经》的影响[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 53 (15): 1334-1336.
- [4] 王永炎, 于敏. 象思维的路径[J]. 天津中医药, 2011, 28 (1): 1-4.
- [5] 邢玉瑞. 象思维过程研究[J]. 陕西中医学院学报, 2014, 37 (1): 5-6.
- [6] 邢玉瑞. 中医思维方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 37-39.
- [7] 李军伟, 宋咏梅. 探骊“象”思维在中医临床辨证论治中的运用[J]. 四川中医, 2011, 29 (9): 22-23.
- [8] 林慧光. 陈修园医学全书[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 806.
- [9] 刘佩珍, 刘月生. 论中医辨证论治的象思维特性[J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22 (5): 24-26.
- [10] 王新彦. 《千金方》的象思维研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [11] 熊兴江. 方证对应史研究[J]. 中西医结合学报, 2010, 8 (6): 581-587.
- [12] 周晓平, 郭海, 刘涛. 由增液汤谈“增水行舟”[J]. 河南中医, 2007, 27 (2): 12-13.
- [13] 王建云, 王新月, 王炎. 唯象思维与中医临证方法[J]. 中医杂志, 2013, 54 (2): 91-93.
- [14] 赵鲲鹏. 《伤寒杂病论》唯象医学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2005.
- [15] 陈家旭. 试论开展方证相关内涵研究的意义[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30 (9): 581-582.

(2017-02-20 收稿 责任编辑: 洪志强)