

柴牡安神颗粒抗焦虑作用及其活性机制

胡晓炜，罗广彬，范琼尹，毕于聪，吴梦婷，赵保胜，徐砚通，王停*
(北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029)

[摘要] 目的:观察柴牡安神颗粒的抗焦虑作用,并探讨其作用机制。方法:ICR 小鼠按体质量随机分为正常组、地西洋(0.002 g·kg⁻¹)组和解郁安神颗粒(0.001 4 g·kg⁻¹)组,柴牡安神颗粒高、中、低剂量(0.001 98,0.000 99,0.000 495 g·kg⁻¹)组,每组 20 只。为了考察药物抗焦虑作用,小鼠每天上午灌胃给药 4 周后,测试明暗箱、开场活动实验,然后动物取血,其中每组 6 只小鼠通过心脏灌注 10% 甲醛后取脑组织固定,其余小鼠取血后去取脑海马组织置于液氮保存。采用酶联免疫吸附方法检测小鼠海马组织和外周血中 γ -氨基丁酸(GABA)及谷氨酸(Glu)含量,计算 GABA/Glu;采用免疫组化法测定海马组织 γ -氨基丁酸受体 α_1 蛋白的表达。为了考察药物催眠作用,小鼠灌胃给药 7 d 后,进行阈下剂量戊巴比妥钠协同催眠实验。结果:与正常组比较,明暗箱实验证实柴牡安神颗粒低、中剂量组显著延长了小鼠明箱停留持续时间($P<0.05$),中剂量组增加了明箱进入次数($P<0.05$);开场实验证实柴牡安神颗粒高剂量显著增加了小鼠在中心的区域距离($P<0.01$)和中心区域停留时间($P<0.05$)。进一步实验证实,在海马组织中,与正常组比较,柴牡安神颗粒高剂量组提高了 GABA 含量($P<0.05$),显著降低了 Glu 含量($P<0.01$),提高了 GABA/Glu($P<0.05$);在外周血,与正常组比较柴牡安神颗粒高剂量组显著降低了 Glu 含量($P<0.01$),同时显著增加了 GABA 含量($P<0.01$),从而显著提高了 GABA/Glu($P<0.01$)。海马组织 GABA α_1 受体蛋白免疫组化结果显示柴牡安神颗粒中剂量组明显提高了 GABA α_1 蛋白表达。阈下剂量戊巴比妥钠协同催眠实验证实柴牡安神颗粒中剂量组明显提高了小鼠的入睡率($P<0.05$)。结论:柴牡安神颗粒具有显著抗焦虑作用,作用机制与提高海马 GABA 含量,降低 Glu 的含量,且提高了海马 GABA α_1 蛋白表达密切相关。外周血 GABA、Glu 含量变化与海马组织变化呈正相关,对临床诊断具有参考意义。柴牡安神颗粒同时具有改善睡眠的作用。

[关键词] 柴牡安神颗粒; 抗焦虑; γ -氨基丁酸; 谷氨酸
[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)13-0041-08
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20191326
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190318.1644.012.html>
[网络出版时间] 2019-03-20 16:40

Anxiolytic Effect of Chanmu Anshen Granule and Its Bioactive Mechanism

HU Xiao-wei, LUO Guang-bin, FAN Qiong-yin, BI Yu-cong, WU Meng-ting,
ZHAO Bao-sheng, XU Yan-tong, WANG Ting*
(Research Institution of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To assess the anxiolytic effect of Chaimu Anshen granules (CMASG) and investigate its bioactive mechanism. **Method:** ICR mice were randomly divided into normal group, diazepam group (0.002 g·kg⁻¹), Jieyu Anshen granules group (0.001 4 g·kg⁻¹), high, medium, and low-dose (0.001 98, 0.000 99, 0.000 495 g·kg⁻¹) Chaimu Anshen granule groups, with 20 mice in each group. To detect the anxiolytic effect of CMASG, mice were intragastrically administered for 4 weeks in the morning, and light-dark box transition test and open field test were performed once the other day. After the behavior tests, blood samples were collected. Six mice of each group were perfused with formalin through heart, and then the brains were fixed for

[收稿日期] 20190130(019)
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301011)
[第一作者] 胡晓炜,在读硕士,从事中药抗焦虑研究,E-mail:hxwtail@163.com
[通信作者] *王停,博士,教授,博士生导师,从事中药新药研发研究,E-mail:wangting@sina.com

immunohistochemistry test. Hippocampus of the other mice in each group were collected and stored in liquid nitrogen. The content of γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamic acid (Glu) in hippocampus and blood samples were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the ratio of GABA/Glu was calculated. The expression of GABA α_1 receptor was evaluated by the immunohistochemistry method. To test the hypnosis effect of CMASG, mice were administered intragastrically for 7 days. The sub-threshold dose of pentobarbital sodium in the sleep experiment was tested. **Result:** Compared with normal group, the light-dark box transitions test demonstrated that low-dose and medium-dose CMASG groups significantly prolonged the duration in light box ($P < 0.05$), and the middle-dose group significantly increased the frequency of entrance to light box ($P < 0.05$). The open field test confirmed that the high-dose CMASG significantly increased the travel distance ($P < 0.01$) and duration ($P < 0.05$) in central region. Further experiments demonstrated that in hippocampus, compared with the normal group, the high-dose CMASG significantly increased the content of GABA ($P < 0.05$), but significantly reduced the Glu content ($P < 0.01$). The high-dose group significantly increased the GABA/Glu ratio ($P < 0.01$). In the blood samples, high-dose CMASG significantly reduced the Glu content ($P < 0.01$), and the high-dose group significantly increased the GABA content ($P < 0.01$) and the GABA/Glu ratio ($P < 0.01$). The immunohistochemical results of GABA α_1 receptor protein in hippocampus showed that the medium-dose CMASG significantly increased the expression of GABA α_1 protein. The sub-threshold dose of pentobarbital sodium on sleep experiments confirmed that the medium-dose CMASG significantly increased the rate of sleep in mice. **Conclusion:** CMASG showed an anxiolytic effect, and its bioactive mechanism was related with the increase of GABA content, and the decrease of Glu content in hippocampus. Furthermore, it increased the expression of GABA α_1 protein in hippocampus. The changes in content of GABA and Glu in peripheral blood were positively correlated with the changes in hippocampal tissues, which provided reference for clinical diagnosis. CMASG also exhibited an effect in improvement of sleep.

[Key words] Chanmu Anshen granule; anxiolytic; γ -aminobutyric acid (GABA); glutamic acid

焦虑症是以焦虑为主要临床表现的神经症,发作时临床可见持续性焦虑、紧张和恐惧,伴有头晕、心悸、胸闷、呼吸急促、出汗、口干等自主神经系统症状和肌肉紧张、运动性不安等症状^[1]。流行病学调查显示,焦虑症在心身障碍疾病中占 18%,且发病率呈现逐年上升趋势^[2]。近 10 年来,无论是地方区域性调查还是 4 省市联合调查显示,国内焦虑障碍患病率明显高于 1982 年全国 12 个地区和 1993 年 7 个地区的协作调查结果,区调查至 2000 年间,患病率有上升趋势,2001—2009 年的调查中总患病率为 2.8%,上升趋势及幅度均较高^[3]。2017 年报道显示中国焦虑障碍患病率为 4.98%,高于中国 20 世纪 80 年代,90 年代调查结果^[4]。焦虑症导致的临床症状很多,包括神经性头痛、头昏、头晕、失眠、多梦、记忆下降、反应迟钝、神经衰弱,乃至心脏神经官能症、胃神经官能症,肠易激综合征免疫力低下等^[5],对患者生活质量及心理健康造成了显著不良影响。焦虑症的发病机制,现代医学研究尚未得到充分揭示,目前公认的假说包括神经递质紊乱假说、内分泌功能紊乱假说和免疫功能紊乱等。神经递质

假说认为焦虑症发病与脑内多种神经递质紊乱密切相关,包括单胺类神经递质如 5-羟色胺(5-HT),去甲肾上腺素(NE)和多巴胺(DA)^[6-8],脑内主要抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)和脑内主要兴奋性神经递质谷氨酸(Glu)^[9]等。神经内分泌功能紊乱与焦虑的发生密切相关,主要涉及下丘脑-垂体-肾上腺轴、下丘脑-垂体-性腺轴、下丘脑-垂体-甲状腺轴、神经肽递质、神经类固醇、女性性激素等活动异常^[10]。临床研究发现,焦虑患者多伴有免疫功能紊乱的现象^[11-12]。余思邈等^[13]研究表明焦虑、抑郁状态在原发性肝癌患者中普遍存在,对原发性肝癌患者的细胞免疫及体液免疫功能均有明显的抑制作用。失眠是焦虑症的重要临床症状。据调查,70%焦虑障碍患者伴随有睡眠紊乱^[14],广泛性焦虑障碍、惊恐障碍和创伤后应激障碍与失眠的关系更为密切^[15]。失眠症不仅是焦虑障碍患者最早和最常见的主诉,而且为临床诊断提供了重要参考价值。失眠与精神疾病在病程中有着相互的影响,不同焦虑障碍的亚型都有不同的睡眠紊乱临床表现。焦虑障碍可持续多年,呈慢性状态,与之相关的失眠问题

也可持续多年^[16]。因此考察药物抗焦虑效果的同时有必要考察其抗失眠效果。

目前,焦虑症的临床治疗常采用西药治疗、心理疗法、针刺治疗及中药治疗 4 种方法。西药治疗中常用的抗焦虑药如苯二氮卓类、选择性 5-HT 及 NE 再摄取抑制药、钙离子通道调节剂、阿扎哌隆类及大麻二酚等^[17]。长期服用苯二氮卓类药物会导致药物依赖、增加运动功能损害、记忆损害及认知障碍的风险^[16],影响了其临床的广泛应用。中医药治疗焦虑症具有副作用小、个体化强等优势,具有较高临床研究价值,在焦虑症的临床治疗中越来越受到人们的重视。如符为民教授运用黄连温胆汤治疗焦虑症,不仅疗效确切而且避免了西药毒副作用^[18];传统针灸治疗情志类疾病如焦虑,常用穴位有百会、神门、印堂、内关、三阴交、足三里等,取得了较好的疗效^[19];于泽鹏等^[20]发现五味子醋具有镇静、催眠及抗焦虑作用;陈陆松等^[21]研究表明柏子养心方合疏肝宁神散治疗广泛性焦虑障碍可有效改善焦虑症状,改善生活质量,并降低复发风险,疗效优于西药;柴龙解郁丹治疗广泛性焦虑症,自拟中医症状量表治疗组总有效率优于对照组,显示出起效快、安全有效、副反应低、依从性高的优势^[22]。柴牡安神颗粒来源于名老中医经验处方,由北柴胡、黄芩、生牡蛎、磁石、党参片、法半夏、夏枯草等中药组成,诸药联用共奏“疏肝解郁、清热除烦、安神定志”之效^[23]。为进一步探索柴牡安神颗粒的药效学活性及其作用机制,本研究采用动物行为学实验,观察其对焦虑模型小鼠的干预作用,并探讨其作用机制,以期柴牡安神颗粒的临床应用和中药新药研发提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 柴牡安神颗粒由北柴胡、黄芩、生牡蛎、磁石、党参片、法半夏、夏枯草等中药组成,以上中药购于北京本草方源药业有限公司,由北京中医药大学中药学院李向日教授鉴定为正品。地西洋片(北京益民药业有限公司,批号 20170102),解郁安神颗粒(神威药业集团有限公司,批号 17092721),戊巴比妥钠(上海榕柏生物技术有限公司,批号 201806)。

1.2 动物 SPF 级 ICR 小鼠,120 只,雌雄各半,体质量(18±2)g,购自北京维通利华生物科技公司,合格证号 SCXK(京)2016-0006。动物饲养于屏障环境动物室,使用许可证号 SYXK(京)-2017-0046。实验期间自由饮水、摄食,室温 20~25℃,湿度

40%~70%,光照周期明暗各 12 h,通风良好。经北京中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,伦理审查编号 BUCM-4-20170714404-3004。

1.3 试剂 GABA, Glu 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(北京议达成科技有限公司,批号均为 201706);4%多聚甲醛(北京拜尔迪生物科技有限公司,批号 201703);Sucrose 蔗糖(Amresco 公司,批号 20170335),羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G-HRP 标记抗体(Biodee 公司,批号 201704),GABA α₁ 抗体(Abcam 公司,批号 201704)。

1.4 仪器 Centrifuge 5417R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);xMark 10092 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);Olympus BX41 型光学显微镜(中国上海赖氏电子科技有限公司);XR-XZ301 型旷场实验箱,XR-XB210 型明暗箱(中国上海欣软信息科技有限公司);CM1950 型恒温冰冻切片机(德国 Leica 公司);XH6080 型放射免疫分析仪(中国西安核仪厂)。

2 方法

2.1 动物分组和焦虑动物模型的制备 ICR 小鼠适应性饲养 1 周,按体质量随机分为正常组、地西洋(0.002 g·kg⁻¹)组、解郁安神颗粒(0.001 4 g·kg⁻¹)组和柴牡安神颗粒低、中、高剂量[0.000 495, 0.000 99, 0.001 98 g·kg⁻¹(人临床有效剂量的 5, 10, 20 倍)]组^[24-25],每组 20 只,雌雄各半。各组每天上午灌胃给药,连续 4 周。正常组每天同时以等体积蒸馏水灌胃。中药组和正常组末次给药 1 h,地西洋组灌胃 0.5 h 后,于 8:00~14:00 进行行为学测试,隔天测试不同行为学实验。

2.2 行为学实验

2.2.1 明暗箱探究实验^[26] 明暗箱(45 cm×27 cm×27 cm),包括较大部分明箱区(27 cm×27 cm×27 cm),底部分成 9 个面积相等的方格(9 cm×9 cm),100 W 的白炽灯泡照射;较小部分为暗区(18 cm×27 cm×27 cm),底部分成 6 个面积相等的方格(9 cm×9 cm)30 W 红灯灯泡照射,两箱体之间有 1 个门。实验时,将小鼠放入明箱正中央格,用摄像系统记录动物 5 min 的行为变化,计算明箱进入次数和明箱停留时间。

2.2.2 开场活动测试^[27] 实验前 60 min 将小鼠移至行为学测试实验室使其适应环境。实验时,将小鼠置于开场实验装置(500 mm×500 mm×500 mm)中央,迅速拉上遮光罩帘。在操作软件中记录小鼠编号、日期、状态后打开记录系统,选取九宫格模式,

中心区比例为 0.5,通过开场设备上方的摄像机及与其相连的监视器记录 5 min 内小鼠在中心区域的运动距离和停留时间,并计算中心区域水平运动百分率与中心区域停留时间率。

2.2.3 柴牡安神颗粒与戊巴比妥钠协同催眠作用观察 小鼠连续灌胃给药 7 d,末次给药 1 h 后腹腔注射戊巴比妥钠(0.05 g·kg⁻¹),以翻正反射消失 30 s 以上作为入睡判断标准,以翻正反射再现为睡眠结束,观察柴牡安神颗粒对注射催眠剂量戊巴比妥钠的小鼠睡眠潜伏期(注射戊巴比妥钠至翻正反射消失的时间)和睡眠时间(翻正反射消失至翻正反射再现的时间)的影响。

2.3 脑组织取材 各组小鼠行为学测试后立即麻醉,腹主动脉取血,每组随机选取 6 只小鼠用镊子提起心尖部,将灌注针刺破心尖部进针约 0.5 cm,剪开右心耳,进行灌注,直至肝脏由血红变为白色,取脑组织于多聚甲醛溶液中过夜,于次日更换多聚甲醛为 30% 蔗糖脱水,置于 4 ℃ 冰箱脱水固定。各组其余小鼠麻醉取血后,分离脑组织海马、皮层,于液氮中快速冷冻,储存于 -80 ℃ 冰箱备用。

2.4 海马组织 GABAα₁ 染色 OCT 包埋剂包埋脑组织,连续冰冻切片,厚度 10 μm,实验时,以 0.5% 甲醇浸泡切片 30 min,蒸馏水洗涤 3 次,2 min/次,0.1% Triton 浸泡 1 h,蒸馏水洗涤 2 次,2 min/次,免疫组化染色,每张切片滴加 GABAα₁ 一抗(1:50),37 ℃ 孵育 1~2 h,加生物素化羊抗兔 IgG,室温孵育 30 min。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,DAB 显色,待颜色显示棕色即放入 PBS 中终止反应;PBS 冲洗 10 min,苏木精复染 2 min,盐酸-乙醇分化,自来水冲洗 10~15 min;脱水,透明,封片,显微镜观察阳性表达情况。

2.5 小鼠外周血 GABA、Glu 水平的检测 将新鲜血液放置高速离心机中,4 ℃,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取外周血清,ELISA 检测 GABA 和 Glu 水平,并计算 GABA/Glu。

2.6 小鼠海马组织 GABA、Glu 水平的检测 将小鼠海马组织称量后按比例加入生理盐水,粉碎制备组织匀浆,4 ℃,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,吸取上清,ELISA 检测 GABA 和 Glu 水平,并计算 GABA/Glu。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较是否齐性,事后分析采用 Dunnett's Multiple

Comparison Test 方法各组均与正常组比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 柴牡安神颗粒对小鼠行为的影响

3.1.1 明暗箱 与正常组相比,柴牡安神颗粒低、中剂量组小鼠明箱持续时间明显延长($P < 0.05$),柴牡安神颗粒中剂量组明箱进入次数明显增加($P < 0.05$)。地西洋组明箱持续时间显著延长($P < 0.01$),明箱进入次数显著增加($P < 0.01$),解郁安神颗粒组明箱进入次数明显增加($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 柴牡安神颗粒对小鼠明暗箱实验的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 1 Effect of Chanmu Anshen granule on mice light dark transitions($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	明箱持续时间/s	明箱进入次数/次
正常	-	115.9 ± 9.99	14.69 ± 2.25
地西洋	0.002	140.0 ± 19.76 ²⁾	21.69 ± 4.80 ²⁾
解郁安神颗粒	0.001 4	118.9 ± 10.54	18.73 ± 3.59 ¹⁾
柴牡安神颗粒	0.000 495	129.7 ± 10.53 ¹⁾	17.60 ± 2.47
	0.000 99	129.9 ± 9.01 ¹⁾	18.56 ± 2.54 ¹⁾
	0.001 98	117.6 ± 13.47	17.94 ± 4.13

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

3.1.2 开场活动 与正常组相比,柴牡安神颗粒高剂量组小鼠中心区域运动距离显著增加($P < 0.01$),中心区域的停留时间明显延长($P < 0.05$);柴牡安神颗粒中剂量组小鼠在中心区域的运动距离明显延长($P < 0.05$),中心区域的停留时间显著增加($P < 0.01$)。柴牡安神颗粒低剂量组小鼠在中心区域停留时间明显延长($P < 0.05$)。与正常组相比,地西洋组小鼠中心区域的运动距离与停留时间均显著延长($P < 0.01$),解郁安神颗粒组中心区域的运动距离显著增加($P < 0.01$)。见表 2。

3.2 柴牡安神颗粒对小鼠脑内神经递质的影响

3.2.1 小鼠海马组织 GABA 和 Glu 水平 与正常组相比,柴牡安神颗粒高剂量组 GABA 含量明显升高($P < 0.05$),Glu 含量显著降低($P < 0.01$),GABA/Glu 明显升高($P < 0.05$)。柴牡安神颗粒中剂量组 GABA 含量明显升高($P < 0.05$),Glu 含量明显降低($P < 0.05$),柴牡安神颗粒低剂量组 Glu 含量明显降低($P < 0.05$)。与正常组相比,地西洋组 GABA 含量明显升高($P < 0.05$),Glu 含量明显降低($P < 0.05$),GABA/Glu 显著升高($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 柴牡安神颗粒对小鼠开场活动实验的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Chanmu Anshen granule on mice open field test($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	中心区域距离/cm	中心区域时间/s	全区域距离/cm
正常	—	747.5 ± 152.1	25.96 ± 8.22	1 626 ± 416.5
地西洋	0.002	939.5 ± 142.4 ²⁾	36.90 ± 9.75 ²⁾	1 883 ± 491.7
解郁安神颗粒	0.001 4	912.2 ± 134.0 ²⁾	33.35 ± 8.45	1 559 ± 373.5
柴牡安神颗粒	0.000 495	826.7 ± 132.8	36.51 ± 8.69 ¹⁾	1 520 ± 422.5
	0.000 99	896.4 ± 85.1 ¹⁾	41.26 ± 8.50 ²⁾	1 629 ± 389.9
	0.001 98	913.9 ± 93.4 ²⁾	36.31 ± 10.93 ¹⁾	1 695 ± 543.0

表 3 柴牡安神颗粒对小鼠海马组织 GABA 和 Glu 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Table 3 Effect of Chanmu Anshen granule on GABA and Glu levels in hippocampus of mice($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GABA/μg·g ⁻¹	Glu/μg·g ⁻¹	GABA/Glu
正常	—	49.17 ± 0.01	49.85 ± 1.04	1.01 ± 0.01
地西洋	0.002	53.12 ± 1.76 ¹⁾	48.38 ± 0.64 ¹⁾	1.10 ± 0.04 ²⁾
解郁安神颗粒	0.001 4	50.47 ± 0.46	48.81 ± 0.54	1.05 ± 0.01
柴牡安神颗粒	0.000 495	51.23 ± 1.46	48.26 ± 0.57 ¹⁾	1.04 ± 0.03
	0.000 99	51.80 ± 2.25 ¹⁾	48.40 ± 0.58 ¹⁾	1.04 ± 0.02
	0.001 98	51.80 ± 0.91 ¹⁾	48.01 ± 0.95 ²⁾	1.06 ± 0.02 ¹⁾

3.2.2 小鼠外周血 GABA 和 Glu 水平 与正常组相比,柴牡安神颗粒高剂量组中 GABA 含量显著升高($P < 0.01$), Glu 含量显著降低($P < 0.01$), GABA/Glu 显著升高($P < 0.01$);柴牡安神颗粒中

剂量组中 Glu 的含量明显降低($P < 0.05$);地西洋组的 GABA 含量明显升高($P < 0.05$), Glu 含量明显降低($P < 0.05$)。见表 4。

3.2.3 柴牡安神颗粒对小鼠海马组织 GABAα₁ 蛋

表 4 柴牡安神颗粒对小鼠外周血 GABA, Glu 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 4 Effect of Chanmu Anshen granule on GABA and Glu levels in peripheral blood of mice($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GABA/μg·g ⁻¹	Glu/μg·g ⁻¹	GABA/Glu
正常	—	47.40 ± 5.99	45.00 ± 3.11	1.08 ± 0.19
地西洋	0.002	50.32 ± 8.25 ¹⁾	40.76 ± 1.03 ¹⁾	1.23 ± 0.19
解郁安神颗粒	0.001 4	52.88 ± 5.49	43.87 ± 1.77	1.21 ± 0.16
柴牡安神颗粒	0.000 495	48.68 ± 1.38	43.37 ± 2.04	1.12 ± 0.06
	0.000 99	52.94 ± 4.24	41.50 ± 1.06 ¹⁾	1.28 ± 0.12
	0.001 98	60.72 ± 3.59 ²⁾	40.83 ± 1.84 ²⁾	1.48 ± 0.09 ²⁾

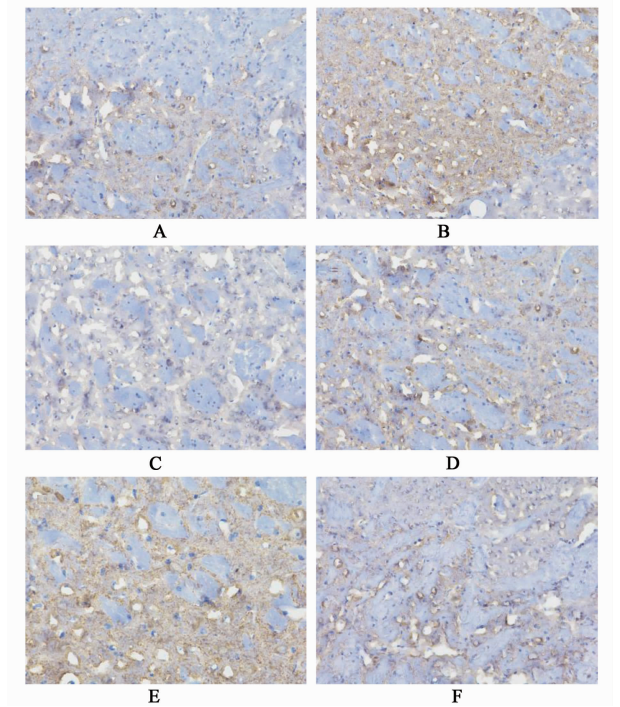
白表达的影响 与正常组相比,地西洋组、柴牡安神颗粒中、低剂量组 GABAα₁ 蛋白表达水平提高,高剂量组没有显著增高趋势,解郁安神颗粒组 GABAα₁ 蛋白表达水平降低趋势。见图 1。

3.3 柴牡安神颗粒对小鼠阈下剂量戊巴比妥钠协同催眠作用的影响 与正常组相比,柴牡安神颗粒中剂量组小鼠入睡率明显提高($P < 0.05$),柴牡安神颗粒低、高剂量组入睡率也有一定提高,但无统计学差异。与正常组相比,地西洋组小鼠入睡率显著提高($P < 0.01$),解郁安神颗粒降低了小鼠入睡率,

但无明显统计学意义。见表 5。

4 讨论

近年来随着生活节奏的不断加快,焦虑症发病率呈逐年上升的趋势。由于目前临床治疗焦虑症常采用苯二氮卓类、抗抑郁药物及抗癫痫药物等^[28],这些药物存在明显副作用,因此寻求有效、安全的抗焦虑药物是研究新方向,中医中药疗法正好与此需求相契合。焦虑症属中医“郁证”“惊证”“恐证”“惊悸”“怔忡”“不寐”“脏躁”“百合病”等范畴^[29]。本病病位主要在肝、心,与脾、肺、肾相关;由于肝气



A. 正常组;B. 地西洋组;C. 解郁安神颗粒组;D~F. 柴牡安神颗粒低、中、高剂量组
图 1 柴牡安神颗粒对小鼠海马组织 GABA α_1 蛋白表达的影响 (IHC, $\times 200$)

Fig.1 Effect of Chanmu Anshen granule on GABA α_1 protein in mouse hippocampus(IHC, $\times 200$)

表 5 柴牡安神颗粒对小鼠阈下剂量戊巴比妥钠协同催眠作用的影响

Table 5 Effect of Chanmu Anshen granule on synergistic and hypnotic effect of subliminal pentobarbital sodium in mice

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	睡眠动物只数/只	入睡率/%
正常	—	1	8.3
地西洋	0.002	7	58.3 ²⁾
解郁安神颗粒	0.0014	0	0
柴牡安神颗粒	0.000495	3	25
	0.00099	4	33.33 ¹⁾
	0.00198	2	16

郁结、郁而化火、耗伤阴血、血不养心、心神不宁而发病,其核心病机为肝郁化热、心神不安^[25]。柴牡安神颗粒以疏肝解郁、清热除烦、安神定志为主要治疗方法,在临床上取得了良好治疗效果,可明显改善焦虑紧张和睡眠障碍的症状,具有安全有效、毒副作用小的优点。方中北柴胡、黄芩片味苦性寒,北柴胡归肝、胆经,疏肝解郁、升举阳气;黄芩片归胆、肺、脾、胃经,清热燥湿、泻火解毒;北柴胡之升散得黄芩片之降泄,两者配伍使用,一散一清,既能疏泄气机之

郁滞,又能清泄体内之郁火,共为君药。生牡蛎咸寒,重镇安神;磁石咸寒,镇惊安神;党参片健脾益气;法半夏消痞散结,是为臣药。以上诸药相合,取《伤寒论》柴胡龙骨牡蛎汤之意,针对胸满烦惊而设,共行和解安神之效,陈国统等^[30]研究表明,柴胡龙骨牡蛎汤加减结合抗焦虑抑郁药物对躯体化焦虑、抑郁状态的疗效显著。佐以夏枯草清热泻火;栀子苦寒,泻火除烦;淡豆豉除烦、宣发郁热;桂枝温通经脉,共为佐药。心神不宁多因阴阳失调而成,《医学秘旨》曰:“半夏得阴而生,夏枯草得阳而长,是阴阳配合之妙也”,此方中半夏与夏枯草同用,恰取其义,两者也是临床治疗失眠的常用药对。栀子合淡豆豉即《伤寒论》栀子豉汤,专治“虚烦不眠,心下懊憹”,冯美珍^[31]研究表明栀子豉汤可有效缓解患者抑郁及焦虑情绪,提高治疗效果,且不会增加不良反应发生率,具有安全性。炙甘草助党参片扶正,且能调和诸药,是为使药。诸药相合,共奏疏肝解郁、清热除烦、安神定志之效。

本研究采用了公认的明暗箱探究和开场活动模型评价柴牡安神颗粒抗焦虑药效。明暗箱探究实验是基于小鼠回避明光天性,在正常情况下,老鼠倾向于在暗箱活动,包括探寻性行为;如果焦虑减轻时,就会出现在明箱探寻行为的次数和时间增加现象。本研究证实柴牡安神颗粒既能显著增长小鼠在明箱的停留时间,又能显著增加明箱进入次数,表明柴牡安神颗粒能够显著减轻小鼠的焦虑行为。开场活动测试是基于小鼠对新环境具有天生靠近周边的倾向,进入开放场地中央部分的次数和时间可反映焦虑反应的程度^[32]。本研究证实柴牡安神颗粒既显著增加了小鼠在中心区域的活动距离,又延长了中心区域停留时间,表明柴牡安神颗粒能够显著减轻小鼠的焦虑行为。

GABA 是中枢神经系统重要的抑制性神经递质, Glu 是中枢神经系统内重要的兴奋性神经递质。当体内 GABA 缺乏时会产生焦虑、不安、忧虑等情绪^[33]。中枢神经系统中 Glu 的含量降低能够有效起到镇静、催眠、缓解焦虑的作用^[34-35]。本实验证实柴牡安神颗粒既显著提高了小鼠海马中 GABA 含量,同时显著降低了 Glu 含量,从而显著增加了 GABA/Glu,证实柴牡安神颗粒抗焦虑作用是通过改变海马 GABA 和 Glu 含量实现的。外周血中 GABA 和 Glu 含量改变与海马中变化呈正相关,提示对临床诊断具有一定参考价值。GABA 受体是 GABA 发挥生物活性的关键环节,包括离子型

GABA_A 和 G-蛋白偶联 GABA_B 2 种亚型,均在焦虑调节中发挥重要作用^[36]。其中 GABA_A 受体含有苯二氮结合位点,在抗焦虑药物治疗中发挥重要作用,GABA α_1 是 GABA_A 受体的一种表型。本研究采用免疫组化方法证实,柴牡安神颗粒能够显著增加 GABA α_1 蛋白表达水平,进一步证实柴牡安神颗粒抗焦虑作用机制是通过 GABA 系统发挥了作用。

失眠是焦虑症的重要临床症状。阈下剂量戊巴比妥钠催眠实验是考察药物改善睡眠的经典模型,通过观测受试药对阈下剂量戊巴比妥钠诱导睡眠时间影响,评价受试药物对睡眠功能调节作用。本研究证实柴牡安神颗粒能够显著提高小鼠睡眠率,具有良好催眠效果,提示对临床改善焦虑症症状具有良好改善作用。

综上所述,柴牡安神颗粒能够显著改善小鼠焦虑行为,其生物活性作用机制与提高小鼠海马 GABA 含量,降低 Glu 含量,提高海马 GABA α_1 受体表达密切相关,同时证实柴牡安神颗粒能够显著改善小鼠睡眠。该研究为柴牡安神颗粒抗焦虑作用的新药开发提高了工作基础,更深入的柴牡安神颗粒抗焦虑作用机制有待进一步探索。

[参考文献]

[1] 林举达. 焦虑症病因及其发病机制初探[J]. 医学与哲学,1997,18(9):51-52.

[2] Kessler R C, Chiu W T, Demler O, et al. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication [J]. Arch Gen Psych, 2005, 62(6): 617-627.

[3] 胡强,万玉美,苏亮,等. 中国普通人群焦虑障碍患病率的荟萃分析[J]. 中华精神科杂志,2013,46(4): 204-211.

[4] Pigott T A. Gender differences in the epidemiology and treatment of anxiety disorders[J]. J Clin Psych, 1999, 18(1):4-15.

[5] 罗荣. 浅谈焦虑症的临床表现及诊断[J]. 求医问药: 学术版,2012,10(8):229-230.

[6] 韩玲娜,王春雷,张莉. 外侧缰核中 5-HT_{2C}受体在帕金森病模型大鼠焦虑行为中的调节作用及其机制[J]. 吉林大学学报:医学版,2016,42(3):473-480.

[7] 宋灵云,李苗苗,于海玲. 芥酸酰胺对小鼠的抗焦虑样作用 [J]. 沈阳药科大学学报,2017,34(4): 333-337.

[8] 任莹莹,周良良,吴华丽,等. 靶向单胺受体及谷氨酸系统抗抑郁药的研究进展[J]. 药物资讯,2016,5(2):38-44.

[9] 周春,韦少俊. 重性抑郁障碍患者相关脑代谢物的水平变化及其作用研究进展 [J]. 山东医药,2016,56(15):98-100.

[10] Andrade T G, Avanzi V, Graeff F G. Effect of estradiol benzoate microinjection into the median raphe nucleus on contextual conditioning [J]. Behav Brain Res, 2009, 204(1): 112-116.

[11] 马丽华. 发育期遗传性癫痫大鼠海马组织 Glu 与 GABA 循环通路重要靶点的研究 [D]. 沈阳:中国医科大学,2013.

[12] LI Q, Bartley A F, Dobrunz L E. Endogenously released neuropeptide Y suppresses hippocampal short-term facilitation and is impaired by stress-induced anxiety [J]. J Neurosci, 2017, 37(1): 23-37.

[13] 余思邈,朱云,王立福,等. 焦虑和抑郁状态对原发性肝癌患者免疫功能的影响 [J]. 肝脏,2018,23(6): 496-498.

[14] Belleville G, Cousineau H, Levrier K, et al. The impact of cognitive-behavior therapy for anxiety disorders on concomitant sleep disturbances: a Meta-analysis [J]. J Anxiety Disord, 2010, 24(4): 379-386

[15] Mellman T A. Sleep and anxiety disorders [J]. Psychiatric Clinics, 2006, 29(4): 1047-1058.

[16] 赵文清,宋立升. 焦虑障碍患者的共病失眠问题 [J]. 精神医学杂志,2016,29(5):392-396.

[17] 舒山,程楠,韩咏竹. 广泛性焦虑障碍的药物治疗进展 [J]. 转化医学电子杂志,2016,3(3):51-54.

[18] 公晋,王永生. 符为民运用黄连温胆汤治疗焦虑症经验 [J]. 世界中西医结合杂志,2018,13(2): 187-189,273.

[19] 程新慧,刘奇,张承舜,等. 焦虑症的针灸临床治疗及选穴特点分析 [J]. 时珍国医国药,2015,26(2): 431-433.

[20] 于泽鹏,高佳琪,刘聪,等. 五味子醋镇静催眠抗焦虑作用及其作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(11):139-143.

[21] 陈陆松,江琛,齐小强. 柏子养心方合疏肝宁神散治疗广泛性焦虑障碍 [J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):200-203.

[22] 丰广魁,陈隐漪,李乐军,等. 柴龙解郁丹治疗广泛性焦虑症的临床研究 [J]. 南京中医药大学学报,2015,31(3):214-217.

[23] 王停,郑燕飞,王济,等. 第二十一讲 关于治疗焦虑症医案的探讨 [J]. 中医药通报,2015,14(3):7-11.

[24] 徐叔云. 药理实验方法学. 附录 [M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1861.

[25] Contrera J F, Matthews E J, Kruhlak N L, et al. Estimating the safe starting dose in phase I clinical trials

and no observed effect level based on QSAR modeling of the human maximum recommended daily dose[J]. Regul Toxicol Pharmacol,2004,40(3),185-206.

[26] 孙世光,李自发,魏盛,等. 昆明小鼠状态焦虑动物模型明暗箱实验的结构维度分析[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2011,20(7):627-629.

[27] Kuleshkaya N, Voikar V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: role of equipment and procedure[J]. Physiol Behav, 2014, 133: 30-38.

[28] 黄继忠,王祖承. 焦虑动物模型的实验方法和药理学评价[J]. 上海精神医学,2003,15(2):106-109.

[29] 孙文军,曲淼,徐向青,等. 焦虑障碍中医临床诊疗指南释义[J]. 北京中医药,2018,37(2):105-110.

[30] 陈国统,何杨伟,汪碧云. 柴胡龙骨牡蛎汤加减结合抗焦虑抑郁药物对躯体化焦虑、抑郁状态的疗效及机制分析[J]. 中华中医药学刊,2017,35(3):758-760.

[31] 冯美珍. 加味栀子豉汤治疗抑郁症患者 43 例[J]. 光明中医,2017,32(5):667-669.

[32] 黄继忠,王祖承. 焦虑动物模型的实验方法和药理学评价[J]. 上海精神医学,2003,15(2):106-109.

[33] Nikolaus S, Antke C, Beu M, et al. Cortical GABA, striatal dopamine and midbrain serotonin as the key players in compulsive and anxiety disorders-results from *in vivo* imaging studies[J]. Rev Neurosci, 2010, 21(2): 119-140.

[34] 王承展,黄庚娣,方青,等. 创伤性应激障碍样大鼠海马 GABA 受体表达的变化[J]. 中国心理卫生杂志,2016,30(12):952-956.

[35] Kita I, Seki Y, Nakatani Y, et al. Corticotropin-releasing factor neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus are involved in arousal/yawning response of rats[J]. Behav Brain Res, 2006, 169(1): 48-56.

[36] 张雪,黄仕营,张桑,等. 安神方的抗焦虑作用[J]. 南方医科大学学报,2012,32(1):80-84.

[责任编辑 张丰丰]