

奔豚汤对慢性束缚应激小鼠焦虑的影响

宋伍¹, 刘萍^{2*}, 姜爽¹, 苏鑫¹, 刘智¹, 钟慧群¹, 张艺红¹

(1. 长春中医药大学基础医学院, 长春 130117; 2. 遵义医学院药学院, 贵州遵义 563000)

[摘要] **目的:**实验观察奔豚汤对慢性束缚应激诱导小鼠焦虑模型的影响,从中枢神经递质角度阐述奔豚汤抗焦虑的可能机制。**方法:**72只小鼠随机分为6组,分别为正常组,模型组,奔豚汤低、中、高剂量组(3.51, 10.53, 31.59 g·kg⁻¹)和阳性药地西洋组(4 mg·kg⁻¹),各组均采用灌胃给药30 d。通过慢性束缚应激建立小鼠焦虑模型;自主活动检测、旷场实验、明暗箱实验和高架十字迷宫实验从行为学分析奔豚汤对焦虑小鼠行为学的保护作用;高效液相结合荧光检测器检测海马谷氨酸(Glu)和γ-氨基丁酸(GABA)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马内γ-氨基丁酸受体(GABA_A-R_{α5}), GABA转运体-1(GAT-1)和GAT-3蛋白表达。**结果:**与模型组比较,奔豚汤高剂量可以明显提高旷场中央区域的时间($P < 0.05$),增加在高架十字迷宫开臂停留时间和进入次数($P < 0.05$),提高海马内GABA水平($P < 0.05$),降低Glu水平($P < 0.05$),且能够明显降低GAT-1和GAT-3蛋白表达($P < 0.05$)。**结论:**奔豚汤能够改善慢性束缚应激诱导小鼠焦虑行为,可能是通过下调海马区GAT-1和GAT-3蛋白表达,进而调节中枢神经系统氨基酸类神经递质的含量。

[关键词] 奔豚汤; 束缚应激; 焦虑; γ-氨基丁酸; 谷氨酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0139-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110139

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170309.1012.012.html>

[网络出版时间] 2017-03-09 10:12

Anxiolytic Effect of Bentuntang in Mice with Chronic Restraint Stress

SONG Wu¹, LIU Ping^{2*}, JIANG Shuang¹, SU Xin¹, LIU Zhi¹, ZHONG Hui-qun¹, ZHANG Yi-hong¹

(1. College of Basic Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;
2. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anxiolytic effect of Bentuntang (BTT) in mice with chronic restraint stress and explore its possible mechanism from the perspective of the central neurotransmitter. **Method:** The 72 mice were randomly divided into 6 groups: saline group, model group, BTT low dose (3.51 g·kg⁻¹), BTT middle dose (10.53 g·kg⁻¹), BTT high dose group (31.59 g·kg⁻¹) and diazepam group (4 mg·kg⁻¹). All the drugs were administrated by intragastric administration for 30 days. Chronic restraint stress was used to induce mice anxiety models; open field test, locomotion activity test, elevated plus maze tests and light/dark box test were used to analyze the protective effect of BTT in stressed mice from the behavioral prospective; high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection were used for detection of glutamate (Glu) and gamma aminobutyric acid (GABA) contents; the expression levels of GABA_A-R_{α5}, GABA transporter (GAT-1) and GAT-3 in hippocampus were detected by Western blot. **Result:** The experimental results showed that as compared with the model group, high dose BTT could significantly improve the time in the central region in open field test ($P < 0.05$), increase the entries and time in open arms in elevated plus maze tests ($P < 0.05$); increase the level of GABA in the hippocampus ($P < 0.05$), and decrease glutamate level ($P < 0.05$). In addition, the protein

[收稿日期] 20161219(010)

[基金项目] 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目(2016, No. 27)

[第一作者] 宋伍, 博士, 讲师, 从事中枢神经药理研究, Tel: 0431-86172197, E-mail: five841110@126.com

[通讯作者] *刘萍, 博士, 讲师, 从事中药防治神经退行性疾病的研究, Tel: 18300916112, E-mail: lpiuing@163.com

expression levels of GAT-1 and GAT-3 in hippocampus were decreased. **Conclusion:** BTT could improve the chronic restraint stress-induced anxiety in mice, possibly by regulating the contents of amino acid neurotransmitters via decreasing GAT-1 and GAT-3 protein expression levels in the central nervous system.

[Key words] Bentuntang; restraint stress; anxiety; gamma aminobutyric acid (GABA); glutamate

焦虑症作为一种危害人类健康生活的精神类疾病,随着当今社会发展和竞争的日渐加剧,我国焦虑症患者逐年增长^[1-2]。目前临床常用的抗焦虑药主要包括地西洋、氟西汀、丁螺环酮等,但这些药物有不同程度的中枢抑制作用和其他不良反应^[2]。当今研发抗焦虑药的作用靶点多集中在 γ -氨基丁酸受体(GABA 受体),5-羟色胺受体(5-HT 受体),胆囊收缩素受体(CCKB 受体),组胺 H₃ 受体和 NMDA 受体等。其中, γ -氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统最重要的抑制性神经递质,与突触后膜的特异性 GABA 受体结合,产生神经抑制性作用。突触间隙 GABA 含量的维持主要依赖于 GABA 转运体(γ -aminobutyric acid transporter, GAT)。GAT 主要位于神经元突触前膜、胶质细胞膜,将突触间隙的 GABA 转运入神经元或胶质细胞。大量研究证实,GABA 转运体(GAT-1, GAT-3 等)对 GABA 代谢起着重要作用,在焦虑症发病中起到了重要作用。

中医学治疗焦虑症有悠久的历史,临床常用的单味药包括地黄、百合、酸枣仁、黄芩、远志等,中药方剂常用的有柴胡加龙骨牡蛎汤、百合地黄汤、逍遥散等^[3-5],现代临床和药理实验研究也证实上述药物有明确的抗焦虑作用。焦虑奔豚汤出自张仲景的《金匱要略》,由葛根、李根白皮、黄芩、当归、白芍、川芎、半夏、甘草 8 味中药组成,用来治疗下焦肝肾气结、冲气上逆所致的“奔豚气病”^[6]。尽管古代医学文献中“奔豚”的含义有争议,但多数研究者认为与焦虑的惊恐发作和心脏神经官能症密切相关,或有此症的患者也往往伴有长期情绪不畅。目前,奔豚汤在临床上也常用来治疗焦虑症惊恐发作、抑郁症、神经官能症和神经性头痛等^[7-8],临床实践证明有较好疗效。奔豚汤的实验研究较少,史先芬等^[9]发现奔豚汤能够缩短绝望模型小鼠的悬尾和强迫游泳时间,提示其抗抑郁作用,但生理生化机制仍不清楚。尽管大量临床经验表明奔豚汤能够改善患者的焦虑情绪,但在抗焦虑方面的实验研究却未见报道。基于此,本研究从神经行为学,GABA 神经递质和 GABA 在海马代谢转运的角度考察了奔豚汤对束缚应激小鼠焦虑模型的保护作用和初步机制,为奔豚汤临床使用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雄性,体重(20 ± 2) g,长春中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(吉)2011-0004。本研究经长春中医药大学实验动物伦理委员会审核通过,动物实验方案符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定。

1.2 药物及试剂 奔豚汤组成:甘草(炙)(批号 20160618),川芎(批号 20160511),当归(批号 20160618),半夏(批号 20160629),黄芩(批号 20160610),葛根(批号 20160609),白芍(批号 20160618),生姜(批号 20160620),桑白皮(批号 20160524);奔豚汤药材均采购与长春中医药大学传统诊疗中心,比例为 60:60:60:120:60:150:60:120:120,按照人与小鼠体表面积计算得到临床等效量 10.53 g·kg⁻¹作为中、低剂量为 1/3 临床等效量,高剂量为 3 倍临床等效量。谷氨酸(Glu)和 GABA 对照品(美国 Sigma 公司,批号分别为 20140911,20140720);GABAa-R α 5, GAT-1 和 GAT-3 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 B1730, B1223, B0823);山羊抗小鼠二抗(北京中杉金桥生物公司,批号 159771)。

1.3 仪器 2795 型高效液相色谱及 2475 型紫外检测器(美国 Waters 公司),DY89-I 型细胞匀浆机(香港万通达实业有限公司),YLS-1A 型多功能小鼠自主活动记录仪(山东省医学科学院设备站),DYY-III2 型电泳仪(北京六一公司)。

2 方法

2.1 分组、造模^[3]与给药 60 只 KM 小鼠,随机分为 5 组,分别为正常组,模型组,奔豚汤低、中、高剂量(3.51, 10.53, 31.59 mg·kg⁻¹)和阳性药地西洋组(4 mg·kg⁻¹)。模型组、奔豚汤组、地西洋组小鼠每日放置在束缚管中,时间为 1 h,30 min 后给药组灌胃给药奔豚汤,阳性药组灌胃给予地西洋,连续给药 30 d。第 30 天末次给药后,检测各组小鼠自主活动、高架十字迷宫、旷场试验和明暗箱穿梭实验。行为学实验结束后动物取闹并分离海马组织,称重,置于 -80 °C 保存用于海马组织内 Glu 和 GABA 含量的检测。

2.2 自主活动实验 小鼠自主活动箱规格为 30 cm × 30 cm × 45 cm, 箱体内部为黑色, 顶端置有摄像头和红外光源。实验开始后, 将小鼠放入箱中, 动物自由活动 10 min 后开始记录, 共记录 30 min。

2.3 高架十字迷宫实验 小鼠高架十字迷宫由 2 个开臂和 2 个闭臂(长 × 宽: 30 cm × 5 cm) 垂直交叉组成, 中间正方形区域 5 cm × 5 cm。实验开始时, 将小鼠置于中央平台, 头部面对一个开臂, 开始计时记录 5 min 小鼠探索行为, 包括小鼠进入开臂和闭臂的次数, 并记录在各臂停留的时间。每次实验结束后 75% 乙醇擦拭迷宫, 再将下一只小鼠放入。

2.4 明暗箱探索实验 明暗箱分为一个白色敞开的明箱(70 cm × 25 cm × 30 cm) 和一个黑色封闭的暗箱(70 cm × 25 cm × 30 cm), 两箱之间有一可在两箱自由穿梭的洞(5 cm × 5 cm)。实验开始将小鼠放入明箱中, 检测动物在明暗箱穿梭的次数及明箱停留时间, 共检测 5 min。

2.5 旷场实验 旷场实验箱为 30 cm × 30 cm 的正方形, 分为周围和中央两个区域。中央区为旷场箱中间区域大小为 15 cm × 15 cm 的小正方形, 两个正方形之间的区域为周围区域。将小鼠置于旷场箱的中央, 开始计 5 min, 考察动物探究行为, 记录小鼠进入中央区域的次数、停留时间和直立次数(后肢站起)。每实验完一只小鼠用 10% 乙醇溶液擦洗, 再进行下一只小鼠的实验。

2.6 小鼠海马 Glu 和 GABA 检测 海马组织加入高氯酸溶液(0.1 mol · L⁻¹) 匀浆, 匀浆液离心(15 min, 12 000 r · min⁻¹, 4 °C), 取上清液作为待测样品, 用高效液相结合荧光检测器检测, 根据峰面积和标准曲线计算递质含量。采用 ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 水相: 0.05 mol · L⁻¹ 乙酸钠, pH 6.5; 有机相: 97.5% 甲醇, 2.5% 的四氢呋喃混合液; 激发波长 340 nm, 发射波长 450 nm; 衍生化试剂: 邻苯二甲醛(OPA) 9 mg 溶解于甲醇 167 μL, 硼酸钠 0.4 mol, 二巯基乙醇 7 μL 用乙醇定溶 1.5 mL, 于 4 °C 避光保存。梯度洗脱程序 0.1 min, 有机相 28%; 7.0 min, 有机相 58%; 14 min, 有机相 28%。流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 37 °C。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 GABAa-Rα5, GAT-1 和 GAT-3 蛋白表达 将分离的海马组织, 加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液(1:9), 超声裂解 5 min, 离心并分离上清液, 将提取的样本蛋白于 -20 °C 保存。蛋白经 SDS-PAGE 胶电泳分离, 转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 GABAa-

Rα5(稀释比例 1:500), GAT-1(稀释比例 1:1 000) 或 GAT-3(稀释比例 1:500) 一抗, 4 °C 孵育过夜, 加辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 2 h, 洗膜 3 次, 显影拍照。免疫印迹条带采用 Quantity One 软件分析。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组别的差异采用单因素方差分析结合 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对慢性束缚应激小鼠自主活动的影响 与正常组比较, 束缚应激模型组小鼠自发活动无显著性变化。与模型组比较, 奔豚汤 3 个剂量均不影响小鼠自主活动, 而地西洋(4 mg · kg⁻¹) 可显著降低小鼠自主活动($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 奔豚汤对慢性束缚应激小鼠自主活动的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 1 Effect of Bentuntang on locomotion action in chronic stress of mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	自主活动数/次
正常	-	98.33 ± 7.43
模型	-	94.72 ± 8.20
奔豚汤	3.51	105.71 ± 8.03
	10.53	102.14 ± 11.51
	31.59	94.96 ± 7.84
地西洋	0.004	63.01 ± 6.11 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对慢性束缚应激小鼠高架十字迷宫行为学的影响 与正常组比较, 束缚应激模型小鼠开臂停留时间(OT)和进入开臂次数(OE)减少, OT 和 OE 明显降低($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 奔豚汤高剂量组能够提高开臂停留时间和进入次数, OT 和 OE 明显升高($P < 0.05, P < 0.01$); 中、低剂量组没有显著性影响。地西洋组显著显著减少进入闭臂次数, 这可能与自发活动减少有关。见表 2, 3。

3.3 对慢性束缚应激小鼠明暗箱穿梭的影响 与正常组比较, 模型组小鼠在明箱停留时间显著减少($P < 0.05$); 与模型组比较, 奔豚汤高剂量组显著增加小鼠在明箱的停留时间($P < 0.05$), 有增加穿梭次数的趋势, 但没有显著性差异; 地西洋组也能够明显增加明箱停留时间($P < 0.05$), 但对穿梭次数无显著性影响。见表 4。

3.4 对慢性束缚应激小鼠旷场实验的影响 与正常组比较, 模型组动物进入中央区域次数和停留时间显著减少($P < 0.05$); 与模型组比较, 奔豚汤高剂量组和地西洋组能够显著增加小鼠在中央区域停留

表 2 奔豚汤对慢性束缚应激小鼠高架十字迷宫入臂时间影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Bentutang on open and closed arms time in chronic stress of mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	开臂时间/s	闭臂时间/s	OT/%
正常	-	117.53 ± 32.94	126.09 ± 25.23	48.14 ± 11.21
模型	-	69.22 ± 15.65 ¹⁾	154.35 ± 29.74	30.91 ± 15.14 ¹⁾
奔豚汤	3.51	64.86 ± 21.70	169.21 ± 27.44	27.46 ± 9.66
	10.53	83.08 ± 18.25	163.40 ± 31.77	33.74 ± 14.57
	31.59	90.14 ± 15.58 ²⁾	149.57 ± 28.00	37.04 ± 11.89 ²⁾
地西洋	0.004	83.20 ± 19.29 ²⁾	133.74 ± 19.20	38.42 ± 8.10 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4,7 同)。

表 3 奔豚汤对慢性束缚应激小鼠高架十字迷宫入臂次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of Bentutang on open and closed arms entries in chronic stress of mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	开臂次数/s	闭臂次数/s	OE/%
正常	-	12.92 ± 3.32	14.32 ± 3.49	47.25 ± 5.94
模型	-	6.98 ± 2.05 ¹⁾	17.30 ± 4.39	29.08 ± 3.02 ²⁾
奔豚汤	3.51	7.42 ± 2.14	18.72 ± 4.48	28.46 ± 3.24
	10.53	6.20 ± 2.34	17.54 ± 4.33	26.16 ± 2.43
	31.59	10.86 ± 3.91 ³⁾	16.65 ± 3.61	41.53 ± 3.23 ⁴⁾
地西洋	0.004	8.68 ± 2.40	11.14 ± 2.17 ³⁾	45.26 ± 3.58 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 5 同)。

表 4 奔豚汤对小鼠明暗箱穿梭的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of Bentutang on light-box time and transitions in chronic stress of mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	明箱时间/%	明暗箱穿梭数/次
正常	-	36.17 ± 10.37	19.31 ± 6.77
模型	-	21.91 ± 6.00 ¹⁾	11.87 ± 4.85 ¹⁾
奔豚汤	3.51	23.85 ± 7.42	12.33 ± 3.98
	10.53	24.11 ± 9.23	14.48 ± 4.06
	31.59	29.40 ± 6.24 ²⁾	15.55 ± 5.42
地西洋	0.004	31.61 ± 5.06 ²⁾	14.96 ± 4.06

时间和进入次数($P < 0.05, P < 0.01$);各给药组对小鼠直立次数均无显著性影响。见表 5。

3.5 对慢性束缚应激小鼠氨基酸类神经递质的

表 5 奔豚汤对小鼠旷场实验的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effect of Bentutang on behavior changes of open-field test in chronic stress of mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	中央区域数/次	中央区域时间/%	直立数/次
正常	-	14.31 ± 5.58	35.89 ± 10.92	17.83 ± 4.28
模型	-	5.55 ± 2.29 ²⁾	20.65 ± 4.22 ¹⁾	15.96 ± 4.63
奔豚汤	3.51	6.62 ± 4.70	21.70 ± 5.95	16.23 ± 5.72
	10.53	6.22 ± 3.59	28.97 ± 6.34	15.17 ± 6.66
	31.59	9.77 ± 3.78 ³⁾	31.61 ± 6.90 ³⁾	17.19 ± 5.02
地西洋	0.004	11.96 ± 4.56 ⁴⁾	30.64 ± 7.83 ³⁾	15.24 ± 4.87

影响 与正常组比较,模型组动物海马组织 Glu 水平显著增加,而 GABA 水平下降($P < 0.05$);与模型组比较,奔豚汤中剂量组显著增加海马 GABA 水平($P < 0.05$);奔豚汤高剂量组和地西洋组能够显著增加 GABA 水平并降低 Glu 含量($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。

3.6 奔豚汤对海马 GABAa-Rα5, GAT-1 和 GAT-3 表达的影响 与正常组比较,模型组海马 GABAa 受体, GAT-1 和 GAT-3 表达显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,奔豚汤中剂量能够显著降低 GAT-1 表达量,奔豚汤高剂量能够显著降低 GAT-1 和 GAT-3 表达,奔豚汤各剂量对 GABAa 受体表达均无显著性影响($P < 0.05$),而地西洋可显著降低 GABAa 受体的表达。见图 1,表 7。

表 6 奔豚汤对小鼠海马 Glu 和 GABA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 6 Effect of Bentuntang on Glu and GABA levels of hippocampus in chronic stress of mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Glu	GABA
正常	-	232.14 \pm 34.67	605.29 \pm 58.90
模型	-	284.22 \pm 28.34 ¹⁾	498.57 \pm 47.31 ¹⁾
奔豚汤	3.51	288.73 \pm 43.96	528.10 \pm 68.09
	10.53	260.71 \pm 19.36	569.81 \pm 51.29 ²⁾
	31.59	243.09 \pm 25.50 ²⁾	576.52 \pm 64.10 ²⁾
地西洋	0.004	248.28 \pm 32.37 ²⁾	593.33 \pm 40.71 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,
³⁾ $P < 0.01$ 。

表 7 奔豚汤对慢性束缚应激小鼠海马 GABAa-R α 5, GAT-1 和 GAT-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

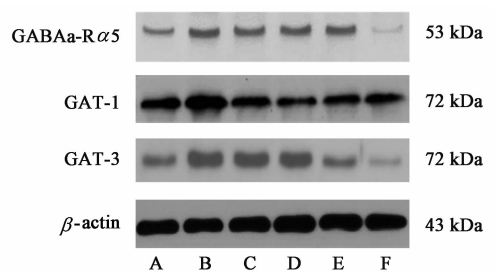
Table 7 Effect of Bentuntang on GABAa-R α 5, GAT-1 and GAT-3 proteins expression of hippocampus in chronic stress of mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	GABAa-R α 5/ β -actin	GAT-1/ β -actin	GAT-3/ β -actin
正常	-	23.71 \pm 5.69	95.67 \pm 8.58	32.09 \pm 7.51
模型	-	53.33 \pm 15.19 ¹⁾	146.99 \pm 18.27 ¹⁾	89.26 \pm 12.14 ¹⁾
奔豚汤	3.51	49.03 \pm 7.48	112.75 \pm 12.88	84.67 \pm 16.74
	10.53	38.74 \pm 16.68	84.68 \pm 17.01 ²⁾	87.08 \pm 22.58
	31.59	40.95 \pm 9.00	99.40 \pm 12.27 ²⁾	48.59 \pm 16.16 ²⁾
地西洋	0.004	14.78 \pm 4.63 ²⁾	88.33 \pm 7.13 ²⁾	35.73 \pm 6.06 ²⁾

4 讨论

本研究采用小鼠慢性束缚应激焦虑模型。该模型作为非损伤性刺激,可以较好的模拟心理压力、挫折、拥挤等不利的生活状态,与人类应激及其导致心身性疾病过程相似,常用于抗焦虑、抗抑郁药物初步筛选^[10]。在束缚应激状态下,机体的病理状态主要由神经、内分泌、免疫等系统共同参与。研究多数认为丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)在应激反应过程中起着关键作用,又与其他各系统,如外周神经系统等之间的相互作用。GABA 是中枢神经系统最主要的抑制性神经递质,大量研究证实它参与焦虑症的病理生理过程。经典抗焦虑药物(如地西洋)多通过作用于 GABA 受体发挥抗焦虑作用。Glu 是中枢神经系统中的兴奋性氨基酸类神经递质,谷氨酸通过特异性受体 NMDA 受体,介导中枢兴奋性过程^[11]。本研究发现,奔豚汤有提高 GABA 递质含量,与传统抗焦虑药有类似的作用途径。

突触间隙 GABA 含量主要依赖 GABA 运体 GAT 的表达和功能,其最主要的功能是将突触间隙的 GABA 转运入突触体终止其作用,也可以将胞浆内 GABA 转运入囊泡。根据 GAT 的定位和药理学特性等方面的差异,分为 GAT-1, GAT-2, GAT-3,



A. 正常组; B. 模型组; C. 奔豚汤 3.51 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 奔豚汤 10.53 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 奔豚汤 31.59 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 地西洋 4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 各组小鼠海马 GABAa-R α 5, GAT-1 和 GAT-3 蛋白的表达
Fig. 1 Expression of GABAa-R α 5, GAT-1 and GAT-3 protein in each mice

GAT-4 和 VGAT 5 种亚型。本研究发现长期给予奔豚汤能够显著降低慢性束缚应激诱导的 GAT-1 和 GAT-3 表达,从而增加海马内 GABA 递质含量。另外,实验结果发现奔豚汤对 GABAa 受体表达并没有显著性影响。上述结果提示,奔豚汤可能通过降低 GAT 蛋白表达,减少 GABA 递质的摄取而增加突触间隙的含量,从而发挥抗焦虑作用,但对束缚应激引起 GABAa 受体的调节没有显著性作用。

现代对焦虑症的研究,发现与中医学的“惊悸”、“怔忡”、“奔豚”等病有密切相关性。其中,奔豚气病为我国古代的疾病名称,因病气上冲如豚奔状而得名。本病发病时,患者自感有气从小腹上冲,冲击到胃部或心脏等,发病时高度紧张,或伴有濒死感;患者平时经常感觉焦虑不安,坐卧不宁,情绪波动或情绪低落。现代医学根据本病的发病特点属于神经症范畴,发病时与焦虑性神经症大发作有类似之处,提示了奔豚气病与焦虑症的相关性。焦虑奔豚汤出自张仲景的《金匱要略》,奔豚汤现代常用于治疗焦虑症或神经官能症。奔豚汤由葛根、李根白皮(由桑白皮替代)、黄芩、当归、白芍、川芎、半夏、甘草 8 味药组成组成。现代实验研究表明,方中的黄芩活性物质黄芩苷具有明确的抗焦虑作用,并能

够结合并激动 GABA 受体^[12-14];高架十字迷宫实验表明,方中的当归和川芎也能够改善动物的焦虑行为^[13];葛根中的葛根素可通过抑制 β 受体发挥抗焦虑作用。

本研究采用长期束缚应激造成的小鼠焦虑模型,从自主活动、旷场实验、明暗箱实验和高架十字迷宫实验从行为学分析奔豚汤对焦虑小鼠的保护作用,在连续给予 30 d 后,高剂量奔豚汤使小鼠在旷场中央区域的活动性提升,在高架十字迷宫开臂停留时间和进入次数升高,并提高海马内 GABA 水平,降低 Glu 水平。本实验结果提示奔豚汤能够通过改善氨基酸类递质水平,从而改善焦虑行为。值得注意的是,奔豚汤高、中、低 3 个剂量对小鼠自主活动均无显著性影响,而地西洋显著降低自主活动,提示奔豚汤发挥的抗焦虑作用与中枢兴奋性无关。目前多数镇静药物都不同程度的降低中枢兴奋性,奔豚汤在不影响中枢兴奋性的同时改善了焦虑症状。因此,笔者推测奔豚汤对纹状体内兴奋性神经递质,如多巴胺(DA),去甲肾上腺素(NE)等无显著性影响。

综上所述,奔豚汤通过降低 GAT 蛋白表达从而调节海马内 GABA 和 Glu 的水平,改善慢性束缚应激诱导的焦虑行为。本研究为揭示奔豚汤的药理作用和临床使用提供理论依据。

[参考文献]

[1] 马静. 中西药治疗焦虑症研究进展[J]. 医学美学美容旬刊, 2015, 24(6):1013-1014.
[2] 冯超英. 焦虑症的药物治疗研究进展[J]. 医药导报, 2006, 25(5):447-450.

[3] 李建梅, 孔令东. 中医药治疗抑郁、焦虑症的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(12):805-807.
[4] 房纬, 孙庆. 广泛性焦虑症的中医临床研究进展[J]. 新中医, 2008, 40(3):113-115.
[5] 朱晨军. 中医药治疗焦虑症的研究进展[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
[6] 陈祖皋. 奔豚汤的临床应用[J]. 现代中西医结合杂志, 1997, 6(1):56-57.
[7] 童舜华. 奔豚汤治疗神志病举隅[J]. 江西中医药, 2007, 38(1):48.
[8] 杨晓, 刘平. 奔豚汤治疗焦虑性神经官能症 26 例[J]. 陕西中医, 2007, 28(7):879.
[9] 史先芬, 宋海宏, 吴自光. 奔豚汤对行为绝望小鼠的抗抑郁作用研究[J]. 四川中医, 2012, 30(11):47-48.
[10] 唐己婷, 陈家旭. 慢性束缚应激动物模型的研究进展(综述)[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(1):25-28.
[11] 龚雪. γ -氨基丁酸对小鼠焦虑样行为及认知功能的影响[D]. 上海:复旦大学, 2013.
[12] 魏秀岩, 杨静玉, 吴春福. 黄芩苷对孤养小鼠的抗焦虑作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(2):142-146.
[13] 郑辉, 甄荣. 黄芩苷对 γ -氨基丁酸受体和抗焦虑症作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(4):304-306.
[14] 吴立坤, 张建军, 李伟, 等. 采用高架十字迷宫实验优选抗焦虑复方中药制剂中当归和川芎的制备工艺[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5):641-643.

[责任编辑 周冰冰]