

白香丹胶囊对焦虑情绪模型大鼠额区皮层 γ -氨基丁酸 B 受体和腺苷酸环化酶表达的影响

蔡洪信^{1,2}, 许莉莉¹, 殷慧敏¹, 张惠云^{1*}

(1. 山东中医药大学中医药经典理论教育部重点实验室, 济南 250355;

2. 泰山医学院生命科学研究中心, 山东 泰安 271000)

[摘要] **目的:**检测焦虑情绪模型大鼠额区皮层 γ -氨基丁酸(GABA)B 受体两个亚基 GABA_BR1, GABA_BR2 和腺苷酸环化酶(AC)表达的变化,初步探讨白香丹胶囊对焦虑情绪的干预机制。**方法:**白香丹胶囊由芍药苷、香附挥发油和丹皮酚配伍组成。大鼠随机分为正常组、模型组、白香丹胶囊组(200 mg·kg⁻¹)、巴氯芬组(8 mg·kg⁻¹),采用“孤养加异种大鼠入侵”方法,大鼠孤养 2 周,然后异种大鼠居住入侵刺激 2 周,制备焦虑情绪大鼠模型。从居住入侵第 2 周开始,药物组按相应剂量 ig 给药 7 d,每日 1 次。通过糖水偏好实验、旷场实验和高架十字迷宫实验进行模型评价,用免疫荧光技术检测各组大鼠额区皮层 GABA_BR1, GABA_BR2 和 AC 的表达变化。**结果:**与正常组比较,模型组糖水偏好系数降低,旷场实验得分增高($P < 0.05$),高架十字迷宫实验进入开放臂次数百分数(OE%)和开放臂停留时间的百分数(OT%)降低($P < 0.05$),额区皮层 GABA_BR1, GABA_BR2, AC 表达水平降低($P < 0.05$)。与模型组比较,白香丹胶囊组和巴氯芬组旷场实验得分降低($P < 0.05$),OE%和 OT%值升高($P < 0.05$),额区皮层 GABA_BR1, GABA_BR2, AC 表达水平升高($P < 0.05$)。**结论:**大鼠额区皮层 GABA_BR1, GABA_BR2, AC 表达下调可能与焦虑情绪的产生有关,白香丹胶囊抗焦虑作用的中枢机制可能与其恢复额区皮层的 GABA_BR 的表达和功能有关。

[关键词] 焦虑;白香丹胶囊; γ -氨基丁酸 B 受体;腺苷酸环化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0153-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1218.021.html>

[网络出版时间] 2012-05-04 12:18

Effect of Baixiangdan Capsule on Expression of GABA_BR and Adenylate Cyclase of Frontal Cortex in Rats with Anxiety Emotion

CAI Hong-xin^{1,2}, XU Li-li¹, YIN Hui-min¹, ZHANG Hui-yun^{1*}

(1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medical Classical Theory, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Center of Life Science, Taishan Medical College, Taian 271000, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of γ -aminobutyric acid B receptor (GABA_BR) and adenylate cyclase (AC) of forbral cortex in rats with anxiety emotion and to explore the antianxiety mechanism of baixiangdan capsule. **Method:** Paeoniflorin, cyperolone and paeonolum were main ingredients of baixiangdan capsule. Wistar rats were divided into normal group, model group, baixiangdan capsule group (200 mg·kg⁻¹) and baclofen group (8 mg·kg⁻¹). The rats were administrated with relevant drugs intragastrically once a day for 7 days. The anxiety emotion rat models were established by a social isolation plus resident intruder stress. The rats

[收稿日期] 20111125(015)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(2011CB505102);国家自然科学基金重点项目(30930110)

[第一作者] 蔡洪信, 博士研究生, 讲师, 从事情志病动物模型与干预方药作用机制研究, Tel: 18854803585, E-mail: caihongxin163@163.com

[通讯作者] *张惠云, 教授, 博士生导师, 从事中药调肝方药药理研究, Tel: 0531-89628596, E-mail: zhhuiyun@163.com

were evaluated by sucrose intake, the open field and elevated plus-maze tests. The expression of GABA_BR1, GABA_BR2 and AC in frontal cortex were detected by the immunofluorescence. **Result:** Compared with normal group, the model group had the lower sucrose intake, the higher total score of open field tests, the lower open arm entry percent (OE%) and the lower open arm time percent (OT%) of elevated plus-maze tests and the lower expression of GABA_BR1, GABA_BR2 and AC in frontal cortex. Compared with model group, baixiangdan capsule and baclofen decreased the total score of open field tests, increased the OE% and OT% of elevated plus-maze tests and the expression of GABA_BR1, GABA_BR2 and AC in frontal cortex. **Conclusion:** The lower expression of GABA_BR1, GABA_BR2 and AC in frontal cortex may have close relationship with anxiety emotion. Increasing the expression and the function of GABA_BR in frontal cortex maybe one of the mechanisms of the antianxiety effect by Baixiangdan capsule.

[**Key words**] anxiety; Baixiangdan capsule; γ -aminobutyric acid B receptor; adenylate cyclase

白香丹胶囊由芍药苷、香附挥发油和丹皮酚配伍组成,其处方配伍简练,有效组分清楚,临床研究表明对缓解焦虑情绪有良好的疗效,但其作用机制尚未完全明确。本文通过复制焦虑情绪大鼠模型,予以白香丹胶囊干预,观察大鼠额区皮层 γ -氨基丁酸(GABA)_B受体两个亚基 GABA_BR1, GABA_BR2 和腺苷酸环化酶(AC)表达的变化,以期揭示白香丹胶囊抗焦虑作用的部分中枢机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,200 g 左右,作为居住鼠。SPF 级雄性 SD 大鼠,150 g 左右,作为入侵鼠。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号 SCXK(京)2002-0003。

1.2 药品及试剂 白香丹胶囊(青岛海川生产,批号 20110321),巴氯芬(诺华制药生产,批号 T0313)。小鼠抗大鼠 GABA_BR1 单克隆一抗(Santa Cruz 公司,sc-166408),兔抗大鼠 GABA_BR2 多克隆一抗(Santa Cruz 公司,sc-28792),兔抗大鼠 AC 多克隆一抗(Santa Cruz 公司,sc-25743);TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,ZF-0313),FITC 标记的山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,ZF-0311)。

1.3 仪器设备 旷场实验箱(自制)、高架十字迷宫(自制)、RM2145 型石蜡切片机(Leica),BX51 型荧光显微镜(Olympus)。

2 方法

2.1 焦虑情绪大鼠模型制备及给药 依据文献[1]利用“孤养加异种大鼠入侵”方法制备焦虑情绪大鼠模型。雄性 Wistar 大鼠 40 只,作为居住鼠,随机分为 4 组,正常组、模型组、白香丹胶囊组、巴氯芬组,每组 10 只。正常组每笼 5 只饲养,模型组和药物组大鼠均单笼单只饲养 2 周。2 周结束后,对

Wistar 大鼠称量体重,进行糖水偏好实验、旷场行为学实验。于第 3 周开始,每天进行雄性 SD 大鼠居住入侵 15 min,每日 1 次,连续 2 周。从居住入侵第 2 周开始,白香丹胶囊组给予白香丹 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹,巴氯芬组给予巴氯芬 8 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig,模型组及正常组大鼠给予相同体积的蒸馏水 ig,每天 1 次,连续 7 d。2 周入侵完成后立即对 4 组 Wistar 大鼠称量体重,进行糖水偏好实验、旷场行为学实验和高架十字迷宫实验。

2.2 行为学评价 采用糖水偏好实验、旷场实验和高架十字迷宫实验进行评价。

2.2.1 旷场实验 记录大鼠水平得分和垂直得分,旷场实验得分 = 水平得分 + 垂直得分。3 min/次,行为学评定采用盲法。

2.2.2 糖水偏好实验 向大鼠提供 2 瓶水,供其 1 h 内自由选择。1 瓶含 0.8% 蔗糖水溶液,1 瓶则为自来水。糖水偏好系数用消耗糖水与整个液体消耗的百分比表示。

2.2.3 高架十字迷宫实验 将大鼠从中央格面向开放臂放入,记录大鼠 5 min 的活动情况。观察指标:进入开放臂次数(open arm entry,OE)、进入封闭臂次数(close arm entry,CE)、向下探究次数(head dipping,HD)、封闭臂后腿直立次数(rearing,RE)、进入开放臂时间(open arm time,OT)和进入封闭臂时间(close arm time,CT)等指标。计算开放臂百分数 [OE% = OE/(OE + CE) × 100%] 和在开放臂停留时间的百分数 [OT% = OT/(OT + CT) × 100%] 反映动物的焦虑状态。

2.3 脑组织处理及切片 于实验结束的第 2 天,大鼠麻醉后开胸,升主动脉插管,生理盐水灌注冲洗后,灌注 4% 多聚甲醛,断头取脑,留取额区皮层,石蜡包埋、切片。

2.4 免疫荧光技术检测 常规脱蜡至水,微波热抗原修复,依次滴加血清封闭、滴加一抗稀释液、滴加 FITC 或 TRITC 标记的二抗,荧光显微镜下观察额区皮层 $GABA_B R1$, $GABA_B R2$, AC 的表达情况,采用 Image-pro plus6.0 图像采集分析软件,对每张切片在 400 倍光镜下随机选择 5 个互不重叠的视野进行图像采集,并对各个视野的平均荧光强度值(MFI)进行半定量检测分析,取其平均值。

2.5 统计方法 用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析和 LSD 检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性

水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠体重、旷场实验得分和糖水偏好值比较 居住入侵前,各组大鼠体重、旷场实验得分和糖水偏好系数无显著性差异。居住入侵 2 周后,与正常组比较,模型组体重减轻,旷场实验得分增高,糖水偏好值降低。与模型组比较,白香丹胶囊组体重增加,旷场实验得分降低,糖水偏好值增高;巴氯芬组旷场实验得分降低。见表 1。

表 1 各组大鼠体重、旷场实验得分和糖水偏好系数比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	入侵前			入侵后		
		体重/g	旷场实验得分	糖水偏好系数	体重/g	旷场实验得分	糖水偏好系数
正常	-	294.10 ± 12.30	78.30 ± 19.32	0.71 ± 0.05	349.30 ± 24.09	75.60 ± 11.94	0.72 ± 0.05
模型	-	287.20 ± 14.73	75.80 ± 14.02	0.69 ± 0.07	302.30 ± 22.35 ¹⁾	92.20 ± 9.34 ¹⁾	0.56 ± 0.08 ¹⁾
白香丹胶囊	200	286.80 ± 8.77	74.10 ± 14.06	0.68 ± 0.06	334.30 ± 27.24 ²⁾	74.70 ± 9.51 ²⁾	0.70 ± 0.06 ²⁾
巴氯芬	8	285.60 ± 13.21	75.20 ± 20.77	0.67 ± 0.07	320.00 ± 22.27	56.80 ± 14.23 ²⁾	0.55 ± 0.08

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

3.2 各组大鼠居住入侵 2 周后高架迷宫结果比较 居住入侵 2 周后,与正常组比较,模型组 OE/(OE + CE)和 OT/(OT + CT)值降低,OE + CE、HD 和 RE 值增高。与模型组比较,白香丹胶囊组和巴氯芬组 OE/(OE + CE)和 OT/(OT + CT)值增高,OE + CE、HD 和 RE 值降低。见表 2。

3.3 各组大鼠免疫荧光结果比较 $GABA_B R1$,

$GABA_B R2$, AC 在各组大鼠额区皮层都有表达,阳性细胞主要为神经元,表达部位主要在胞膜。双染显示, $GABA_B R1$ 和 $GABA_B R2$ 在神经元胞膜上共表达。与正常组比较,模型组 $GABA_B R1$, $GABA_B R2$, AC 平均荧光强度(MFI)均降低。与模型组比较,白香丹胶囊组和巴氯芬组 $GABA_B R1$, $GABA_B R2$, AC MFI 均升高。见表 3。

表 2 各组大鼠居住入侵 2 周后高架迷宫实验结果比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	OE + CE/次	OE/(OE + CE)	OT/(OT + CT)	HD/次	RE/次
正常	-	10.80 ± 2.57	0.51 ± 0.08	0.48 ± 0.12	13.40 ± 4.53	10.60 ± 3.17
模型	-	16.20 ± 3.65 ¹⁾	0.28 ± 0.10 ¹⁾	0.26 ± 0.09 ¹⁾	18.50 ± 5.78 ¹⁾	17.90 ± 5.09 ¹⁾
白香丹胶囊	200	9.60 ± 2.17 ²⁾	0.53 ± 0.15 ²⁾	0.47 ± 0.12 ²⁾	10.60 ± 4.20 ²⁾	8.60 ± 3.66 ²⁾
巴氯芬	8	8.50 ± 2.32 ²⁾	0.46 ± 0.11 ²⁾	0.45 ± 0.11 ²⁾	7.20 ± 3.52 ²⁾	8.30 ± 4.01 ²⁾

表 3 各组大鼠额区皮层 $GABA_B R1$, $GABA_B R2$, AC 平均荧光强度的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	$GABA_B R1$	$GABA_B R2$	AC	MFI
正常	-	0.409 9 ± 0.013 9	0.497 8 ± 0.025 7	0.319 1 ± 0.017 8	
模型	-	0.394 6 ± 0.012 3 ¹⁾	0.469 6 ± 0.017 4 ¹⁾	0.288 9 ± 0.019 8 ¹⁾	
白香丹胶囊	200	0.411 3 ± 0.011 9 ²⁾	0.503 7 ± 0.022 7 ²⁾	0.318 4 ± 0.025 8 ²⁾	
巴氯芬	8	0.430 1 ± 0.015 2 ²⁾	0.530 3 ± 0.024 1 ²⁾	0.331 3 ± 0.023 6 ²⁾	

4 讨论

本研究利用“孤养加异种大鼠入侵”方法制备焦虑情绪大鼠模型,与正常组比较,模型组大鼠体重明显下降,糖水偏好系数降低,旷场实验得分增高。高架十字迷宫实验^[2]以进入开放臂百分数(OE%)

和在开放臂停留时间的百分数(OT%)反映动物的焦虑状态,焦虑动物的 OE% 和 OT% 可明显降低;向下探究次数(HD)反映动物对陌生环境的好奇探究或因惊恐而寻求逃避,与焦虑程度有一定相关性;以开放臂和封闭臂总进入次数(OE + CE)反映动物

总的运动能力,以封闭臂后腿直立次数(RE)用来观察药物有无镇静作用及镇静强度。本研究显示,与正常组比较,模型组大鼠 OE% 和 OT% 明显降低,HD 明显增加,表明模型大鼠具有焦虑情绪;OE + CE 明显增加,RE 明显增加,表明模型大鼠烦躁多动。以上证实了本实验成功复制了大鼠焦虑情绪模型。

白香丹胶囊由白芍、香附、丹皮 3 味中药之主要药效成分伍组成,其处方简练,具有平肝理气的作用,临床应用显示对焦虑情绪有明显的缓解作用。本研究显示,与模型组比较,白香丹胶囊能增加焦虑情绪大鼠的体重,增加其糖水偏好系数,缓解其焦虑情绪,并还有一定的镇静作用;巴氯芬亦能增加高架十字迷宫实验的 OE% 和 OT%,降低 HD 值,有一定程度的抗焦虑作用,但不能改善其体重下降和糖水偏好系数降低的情况,这可能与巴氯芬的胃肠道副反应有一定的关系。

GABA_BR 属代谢调节型受体,广泛分布于中枢神经系统和外周组织,特别是在脑组织中有很高的表达。GABA_BR 与 Gi/oG 蛋白偶联,介导慢速突触后抑制电流,也能使突触后膜超极化,不易于兴奋。GABA_BR 还通过一系列的其他途径抑制神经兴奋性并影响突触的可塑性,以起到对情绪的精细调节。GABA_BR 是含有两个亚基 GABA_BR1 和 GABA_BR2 的异源二聚体,两个亚基共表达才能使受体有功能。GABA_BR1 亚基主要起与配体结合的作用,GABA_BR2 亚基主要与 G 蛋白偶联,通过离子通道或 AC 而发挥 GABA_BR 的功能和效应。GABA_BR 表达降低,可通过其偶联的 Gi/oG 蛋白,使 AC 表达下降,使 cAMP 生成减少,抑制 PKA 和 ERK 信号通路,两条信号通路的交汇点在核转录因子 CREB^[3]。CREB 表达下降与焦虑症状密切相关,CREB 基因敲除或缺陷小鼠焦虑行为明显增加,与其引起神经肽 Y 和脑源性神经营养因子表达下降有关^[4]。抗焦虑药激活的多条信号转导通路,最终都可以引起核转录因子 CREB 磷酸化,进而调节许多促进细胞生长、增殖、存活和神经可塑性的基因表达,发挥抗焦虑作用^[5]。

巴氯芬为 GABA_BR1 激动剂,动物实验^[6]显示其具有抗焦虑作用。很多研究资料显示 GABA_BR 是治疗焦虑症的作用靶点,如巴氯芬是第一个应用于临床的 GABA_BR 完全激动剂,但是由于其较为严重的副作用,限制了它的临床应用。动物实验^[7-8]显示,GABA_BR 的部分激动剂或增强剂具有抗焦虑

的作用,同时并没有完全激动剂所引起的副作用,可能会成为更好的抗焦虑药物。

本研究显示,与正常组比较,模型组大鼠额区皮层 GABA_BR1, GABA_BR2, AC 表达降低,这表明模型大鼠其焦虑情绪与额区皮层 GABA_BR 表达及功能降低有一定的关系。与模型组大鼠比较,给予巴氯芬干预能明显增加额区皮层 GABA_BR1, GABA_BR2, AC 的表达。白香丹胶囊组也能使额区皮层 GABA_BR1, GABA_BR2, AC 的表达增高,并且其对大鼠一般情况的改善要明显优于巴氯芬。由此推测,白香丹胶囊抗焦虑作用的机制之一可能与其起到 GABA_BR 的部分激动剂或增强剂的作用有关,这尚需要以后进一步加以证实。

[参考文献]

- [1] Sheng Wei, Huiyun Zhang, Jie Gao, et al. Impact of social isolation and resident intruder stress on aggressive behavior in the male rat [J]. *Neural Regen Res*, 2010, 5 (15):1175.
- [2] Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice [J]. *Behav Brain Res*, 2002, 134(1/2):49.
- [3] Claire L Padgett, Paul A Slesinger. GABA_B Receptor coupling to G-proteins and ion channels [J]. *Adv Pharmacol*, 2010, 58:123.
- [4] Valverde O, Mantamadiotis T, Torrecilla M, et al. Modulation of anxiety-like behavior and morphine dependence in CREB-deficient mice [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29:1122.
- [5] Pandey SC. Anxiety and alcohol abuse disorders: a common role for CREB and its target, the neuropeptide Y gene [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24:456.
- [6] Lopes A P, da Cunha I C, Steffens S M, et al. GABA_A and GABA_B agonist microinjections into medial accumbens shell increase feeding and induce anxiolysis in an animal model of anxiety [J]. *Behav Brain Res*, 2007, 184 (2):142.
- [7] Jacobson L H, Cryan J F. Evaluation of the anxiolytic-like profile of the GABA_B receptor positive modulator CGP7930 in rodents [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 54(5):854.
- [8] Chen Y, Menendez-Roche N, Sher E. Differential modulation by the GABA_B receptor Allosteric potentiator 2, 6-di-tert-butyl-4-(3-hydroxy-2, 2-dimethylpropyl)-phenol (CGP7930) of synaptic transmission in the rat hippocampal CA1 area [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 317(3):1170.

[责任编辑 聂淑琴]