

逍遥丸对慢性束缚应激小鼠行为学和神经递质含量的影响

高珍,寇俊萍*,柴程芝,余伯阳,严永清
(中国药科大学中药复方研究室,南京 211198)

[摘要] **目的:** 考察逍遥丸对慢性束缚应激小鼠行为学和脑内神经递质含量的影响。**方法:** 采用每天束缚小鼠 8 h,连续 10 d,制备慢性束缚应激小鼠模型,正常组和模型组 ig 给予等体积蒸馏水,药物组给予逍遥丸按人临床用量换算成小鼠等效剂量 $1.365 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的混悬液,均在束缚前 1 h ig 给药,连续 12 d,于第 11 d 采用旷场实验测定小鼠的自发活动,第 12 d 采用酶联免疫法测定小鼠不同脑区神经递质含量。**结果:** 小鼠每天束缚 8 h 连续 10 d 后,穿格次数和直立次数显著减少 ($P < 0.05$),同时,海马 5-羟色胺(5-HT)、前脑去甲肾上腺素(NE)、加压素(AVP)含量和下丘脑组胺含量非常显著增加 ($P < 0.01$)。连续 ig 给予逍遥丸,可显著增加模型小鼠的穿格次数 ($P < 0.05$),显著减少模型小鼠脑内的 5-HT, NE, AVP 含量 ($P < 0.01$) 及组胺含量 ($P < 0.05$)。**结论:** 逍遥丸明显改善慢性束缚引起的小鼠行为学异常,下调脑内单胺类神经递质和 AVP 含量变化。

[关键词] 逍遥丸;慢性束缚应激;行为学;神经递质含量

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0174-03

Effect of Xiaoyao Wan on Behavior and Neurotransmitters in Mice with Chronic Restraint Stress

GAO Zhen, KOU Jun-ping*, CHAI Cheng-zhi, YU Bo-yang, YAN Yong-qing
(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine, China
Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Xiaoyao Wan (XYW) on the behavior and the content of brain neurotransmitters in mice with chronic restraint stress (CRS), so as to provide some evidence for its clinical application. **Method:** Mice were restraint for 8 h daily over a period of 10 days to prepare the CRS model. Mice of control and model group were given orally with equal volume of distilled water, and XYW group was given suspension of XYW at the dose of $1.365 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ according to its clinical dose 1 h before restraint for 12 days. The locomotor activity of mice was observed in open field test (OFT) on the 11th day and the content of neurotransmitters in various brain regions was examined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) on the 12th day. **Result:** Compared with the control group, both ambulation movements and rearing times in OFT were significantly decreased and the content of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in hippocampus, norepinephrine (NE) and arginine vasopressin hormone (AVP) in forebrain and histamine in hypothalamus in CRS mice were significantly increased in the model group. XYW could significantly increase ambulation movements and rearing times in OFT and decrease the content of 5-HT, NE, AVP and histamine in brains of CRS mice. **Conclusion:** XYW could improve not only abnormal behavior but also alteration in content of monoamine neurotransmitters and AVP in brain induced by CRS.

[Key words] Xiaoyao Wan; chronic restraint stress; behavior; content of neurotransmitters

[收稿日期] 20110131(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873322)

[第一作者] 高珍,硕士研究生,从事中药复方作用机制研究,Tel:025-861185158,E-mail:gggz297@126.com

[通讯作者] *寇俊萍,博士,教授,从事中药复方作用机制与药效物质基础研究,Tel:025-861185158,E-mail:junpinkou@163.com

逍遥丸(Xiaoyao Wan, XYW)出自宋代《太平惠民和剂局方》,由柴胡、当归、白芍、白术(炒)、茯苓、薄荷、生姜、甘草(炙)等组成,其功效为疏肝解郁、养血健脾,为中医治疗肝郁脾虚证的经典方剂,临床上广泛应用于多种精神系统疾病的防治^[1-2]。研究显示,逍遥丸具有调节神经、免疫、内分泌系统及抗氧化等广泛药理活性,并具有调节应激性肝郁证动物脑组织中单胺类神经递质含量的作用^[3-4],但其活性机制尚不十分清楚。本文采用慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)小鼠模型模拟“肝郁脾虚”证,考察中成药逍遥丸对慢性束缚应激小鼠模型行为学和神经递质含量的影响,以期为该方临床应用提供进一步参考依据,也为探讨“肝郁脾虚”的科学内涵提供线索。

1 材料

1.1 药品与试剂 逍遥丸(XYW,河南宛西制药股份有限公司,批号090837)。组胺 ELISA 试剂盒、加压素(AVP) ELISA 试剂盒、去甲肾上腺素(NE) ELISA 试剂盒及5-羟色胺(5-HT) ELISA 试剂盒均购自南京迈迪特生物化学有限公司,批号BJ20100107。

1.2 动物 雌性 ICR 小鼠,18~24 g,购自扬州大学比较医学中心,合格证号 SCXK(苏)2007-0001。

1.3 仪器 自制圆柱形旷场实验箱(直径30 cm 圆形场地,高20 cm。由两个同心圆分为外侧、中间及中心区域),匀浆机(FSH-II型高速电动匀浆机(江苏省金坛市环宇科学仪器厂),Z-323K 冷冻离心机(德国 HERMLE 公司)。

2 方法

2.1 动物筛选和分组 采用旷场实验(open field test)对小鼠的自发活动进行测定与筛选,将过于兴奋和过于安静的小鼠剔除,按照自发活动结果和体重将小鼠随机分为正常组、模型组、XYW 组,分别 ig 给予 10 mL·kg⁻¹ 的蒸馏水及逍遥丸混悬液(按人临床用药 9 g 生药/60 kg 换算成小鼠等效剂量 1.365 g·kg⁻¹·d⁻¹)。

2.2 慢性束缚应激小鼠模型制备 每日 9:00 ig 给药后 1 h,除正常组外,将小鼠固定于自制束缚台上,每天 8 h,连续 10 d,制备慢性束缚模型。

2.3 小鼠自发活动观察 给药第 11 天,将小鼠放入旷场实验箱的中心位置,记录小鼠 2 min 内由底面中心开始跑动所穿越的格数、后腿站立(包括扶壁站立和自由站立)的次数,试验在暗室、安静的环境

中进行。

2.4 小鼠脑内神经递质含量的测定 各组小鼠于第 12 天给药 1 h 后,迅速断头取出全脑,于冰浴中分离下丘脑、海马及前脑,并称量。将各组织以 1 mL PBS,在 8 000 r·min⁻¹ 条件下匀浆后,4 ℃,5 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,吸取上清液于 -70 ℃ 保存,ELISA 法测定下丘脑中组胺、海马中的 5-HT 含量及前脑中 NE,AVP 含量。

2.5 统计学分析 采用 Office Excel 2003 软件进行统计,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及组间 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 逍遥丸对慢性束缚应激小鼠自发活动的影响

旷场实验结果见表 1,慢性束缚应激模型组小鼠的穿格次数和直立次数显著减少($P < 0.05$);连续 11 d ig 给予逍遥丸 1.365 g·kg⁻¹,可以显著增加模型小鼠的穿格次数($P < 0.05$),有一定增加直立次数的趋势。

表 1 逍遥丸对慢性束缚应激小鼠自发活动的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/生药 g·kg ⁻¹	穿格数/次	直立数/次
正常	-	59.50 ± 29.30 ¹⁾	19.90 ± 12.20 ¹⁾
模型	-	28.78 ± 16.80	9.44 ± 7.99
逍遥丸	1.365	50.22 ± 24.47 ¹⁾	17.14 ± 7.22

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 逍遥丸对慢性束缚应激小鼠脑内神经递质含量的影响 结果由表 2 可见,慢性束缚应激模型组小鼠的海马组织中的 5-HT 含量,前脑组织的 NE,AVP 含量,下丘脑组织的组胺含量非常显著增加($P < 0.01$);连续 12 d ig 给予逍遥丸,可非常显著降低模型小鼠海马组织的 5-HT,前脑的 NE,AVP 含量($P < 0.01$),显著降低模型小鼠下丘脑组织的组胺含量($P < 0.05$)。

4 讨论

本研究在文献基础上,采用慢性束缚应激小鼠模型,考察防治肝郁脾虚证的代表方剂逍遥丸对其行为学和脑内神经递质含量的影响,以期进一步阐释其作用机制。

旷场实验在考察动物在新环境下的探究行为最常用,也是反映动物“兴奋”或“抑郁”状态等情绪反应一种较为经典的方法^[5],本文结果显示,慢性束缚应激模型小鼠在自发活动中的穿格和直立次数明显减少,与文献报道一致^[1],而同时灌胃给予逍遥丸,

表 2 逍遥丸对慢性束缚应激小鼠脑内神经递质含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	海马	前脑	前脑	下丘脑
		5-HT/ng·mg ⁻¹	NE/pg·mg ⁻¹	AVP/pg·mg ⁻¹	组胺/pg·mg ⁻¹
正常	-	0.033 ± 0.013 ²⁾	0.594 ± 0.026 ²⁾	0.167 ± 0.014 ²⁾	0.514 ± 0.046 ²⁾
模型	-	0.089 ± 0.021	1.190 ± 0.042	0.432 ± 0.015	1.153 ± 0.083
逍遥丸	1.365	0.050 ± 0.010 ²⁾	0.930 ± 0.054 ²⁾	0.308 ± 0.019 ²⁾	0.722 ± 0.122 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

可显著增加模型小鼠的穿格次数,有增加其直立次数的趋势,表明逍遥丸在一定程度上改善慢性束缚所诱导的小鼠异常情绪反应。

同时,慢性束缚应激还可影响机体的免疫、神经内分泌系统^[9],NE,5-HT 是参与情绪调控的重要神经递质,在应激刺激下,其水平均可增加^[6-7]。本研究结果显示,与正常组相比,慢性束缚应激模型组小鼠海马区 5-HT 含量、前脑 NE 明显增加,而逍遥丸可以显著减低模型小鼠的 NE,5-HT 含量,进一步证实逍遥丸可改善拟“肝郁”状态。值得注意的是,该结果与文献报道^[2,4]逍遥丸(散)升高脑内的 NE,5-HT 含量有所不同,可能与模型制备条件、测定脑区、动物种属、给药剂量等差异有关,也提示逍遥丸对不同应激状态下神经递质的影响比较复杂,其调节机制有待进一步探讨。

另有研究表明,组胺作为脑内一种重要的神经递质,可协同 NE,5-HT,DA 等参与应激反应调节自发活动^[8-10],并可促进参与调节应激的重要介质之一 AVP 的释放^[11-12],本研究结果显示,慢性束缚应激模型小鼠下丘脑的组胺含量及前脑的 AVP 含量显著增加,连续 12 d ig 给予逍遥丸,对于上述变化具有明显的抑制作用,提示组胺及其通路可能参与逍遥丸调节应激及改善肝郁脾虚病机的作用,为进一步阐释逍遥丸的作用机制提供新线索。

综上所述,本研究证实逍遥丸具有明显改善慢性束缚应激模型小鼠的作用,其机制可能与调节脑内单胺类神经递质信号通路有关,为其临床用于肝郁脾虚证提供一定参考依据,值得进一步深入研究和探讨。

[参考文献]

[1] 焦格,元海军,陈向伟.加味逍遥散对慢性束缚应激

BALB/C 小鼠行为学变化的调节研究[J].山西中医学院学报,2007,8(5):9.

[2] 宝丽,陈婧,黄琳,等.逍遥丸对小鼠行为绝望和应激性抑郁的影响[J].中药材,2008,31(9):1360.

[3] Liao H, Banbury L K, Leach D N. Elucidation of Danzhixiaoyao Wan and its constituent herbs on antioxidant activity and inhibition of nitric oxide production[J]. Evid Based Complement Altern Med, 2007,4(4):425.

[4] 高萧枫,秦雪梅,王明军.逍遥散和柴胡对慢性束缚应激肝郁模型大鼠脑内单胺类神经递质的影响[J].中药药理与临床,2005,21(2):6.

[5] 梁媛,郭晓玲,岳广欣,等.逍遥散对肝郁脾虚证模型大鼠行为学变化的调节作用[J].北京中医药大学学报,2010,33(5):317.

[6] 毛海燕,叶林,叶向荣.肝郁证大鼠中枢神经递质变化的观察[J].福建中医药,2002,33(2):17.

[7] 唐已婷,陈家旭.慢性束缚应激动物模型研究进展[J].北京中医药大学学报,2002,25(1):25.

[8] Haas H, Sergeeva O A, Selbach O. Histamine in the nervous system [J]. Physiol Rev,2008,88(3):1183.

[9] 高珍,崔征,寇俊萍.组胺 H1 受体功能及调节机制研究进展[J].现代生物医学进展,2009,19(9):3768.

[10] He R R, Yao N, Wang M. Effects of histamine on lipid metabolic disorder in mice loaded with restraint stress [J]. J Pharmacol Sci,2009,111(2):117.

[11] Uirich K, Edwin W, Anderas K. Histaminergic and catecholaminergic interactions in the central regulation of vasopressin and oxytocin secretion [J]. Endocrinol, 1999,140(8):3713.

[12] Stephen J L, Lesley Q S, David S J, et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in mice lacking functional vasopressin V1b receptors [J]. Endocrinol,2007,148(2):849.

[责任编辑 聂淑琴]