

酸枣仁汤组分与抗焦虑效用的相关性研究

王守勇¹, 谢鸣^{2*}, 王欣³

(1. 济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272029; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;
3. 山东中医药大学, 济南 250014)

[摘要] 目的: 探讨酸枣仁汤有关组分与抗焦虑作用的关系及其物质基础。方法: 酸枣仁汤 A ~F6 个组分按正交表配成 8 个组分配方酸枣仁汤 ~酸枣仁汤, 采用国际通用的高架十字迷宫模型 (EPM), 考察各配方对小鼠行为学的影响, 并就各组分对抗焦虑主要指标的影响进行分析。结果: 酸枣仁汤、酸枣仁汤组小鼠进入开放臂次数比 (OE%) 和在开放臂停留时间比 (OT%) 均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 酸枣仁汤、酸枣仁汤组 OE% 值显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但开放臂和封闭臂总的进入次数 (OE + CE) 与对照组相比均无显著差异 ($P > 0.05$)。酸枣仁汤、酸枣仁汤组各指标均无显著性差异。组分 C 仅对 OE% 有显著影响 (负影响, $P < 0.05$), 组分 E 仅对 OT% 有显著影响 (正影响, $P < 0.05$), 其他各组分对 OE%、OT% 均未有显著影响。结论: 酸枣仁汤组配方中, 除了含原方全部组分的配方酸枣仁汤外, 含 B 和 E 的配方酸枣仁汤与抗焦虑关系最为密切, 两方均具有抗焦虑作用。各组分与抗焦虑效用具有一定的相关性, 存在着相互协同、相互拮抗的关系, 组分 B、E 在抗焦虑效应方面有一定的协同作用。酸枣仁汤所含的多糖和黄酮类成分, 可能是其抗焦虑作用的物质基础。

[关键词] 酸枣仁汤; 高架十字迷宫模型; 组分配方; 焦虑; 行为学; 相关性

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0104-05

Correlation Between Component Compatibilities of Suanzaoren Decoction and Their Effects of Anti-anxiety

WANG Shou-yong¹, XIE Ming^{2*}, WANG Xin³

(1. Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining 272029, China;
2. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the relationship between different component compatibilities of Suanzaoren decoction (SZRD) and their effects of anti-anxiety, so as to discuss the material basis of the effect. **Methods:** 6 components of Suanzaoren decoction were formulated according to orthogonal meter and got SZRD ~SZRD, adopting the international common-used anxiety animal model with the elevated plus-maze test (EPM), the effect of component compatibilities on behavior of mouse was observed. And the effects of all different components on percentage of open arm entries (OE%) and of times spent in the open arms (OT%) were analyzed. **Results:** OE% and OT% of SZRD and SZRD mice were both higher than that of control group ($P < 0.05$), OE% of SZRD and SZRDV groups were higher than that of control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between every group and control group about total number entries (OE + CE) ($P > 0.05$). There was no significant difference about the index between SZRD and SZRD group. Components C only effected OE% significantly (negative, $P < 0.05$), components E only effected OT% significantly (positive, $P < 0.05$), others had no significant effect. **Conclusions:** SZRD had close relationship with anti-anxiety effect besides the recipe SZRD

including all components, both of them have the effect of anti-anxiety. Different component compatibilities of Suanzaoren decoction are of certain pertinence to their anti-anxiety function, in which synergism and antagonism were affirmed. Components B and E had synergism in the respect of anti-anxiety. Polysaccharide and flavonoids of Suanzaoren decoction are probably the material basis of anti-anxiety.

[Key words] Suanzaoren decoction; elevated plus-maze; component compatibilities; anxiety; behavior; correlation

酸枣仁汤水提物具有显著的抗焦虑作用^[1]。为探讨其有关组分与抗焦虑作用的关系,在其水提物初步分离出组分的基础上,采用国际上通用的焦虑动物模型——高架十字迷宫模型(The elevated plus-maze, EPM),考察酸枣仁汤的组分及其不同配伍对小鼠焦虑模型的影响。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雄性,体重(28 ±3)g,中国医学科学院实验动物研究所提供,动物合格证号 SCXK11-00-0066;提前两周购入,本室动物室饲养。

1.2 药物

1.2.1 地西洋 地西洋片剂,2.5 mg ×20 片,京卫药准字(1996)第 154011 号,批号 0204090,北京益民制药厂生产,地西洋片研磨,加入 2% 羧甲基纤维素钠适量,用蒸馏水配成 0.2 mg · mL⁻¹ 混悬液,备用。

1.2.2 酸枣仁汤组分配方 酸枣仁汤处方参照《方剂学》五版教材,由酸枣仁 18g,炙甘草 3g,知母 10g,茯苓 10g,川芎 5g 组成。药材购自北京同仁堂总店。采用系统分离方法,对酸枣仁汤所含组分进行分离。全部药材蒸馏 2 遍,得芳香水与水煎液;芳香水经石油醚萃取,回收石油醚,得 A 组分(主要为挥发油),水煎液浓缩依次用 60% 乙醇、80% 乙醇醇沉处理,得沉淀物为 B 组分(主要为多糖);乙醇液回收乙醇浓缩得浸膏,浸膏水溶液乙醚萃取,得乙醚萃取液与水溶液,乙醚萃取液回收乙醚得 C 组分(乙醚部位,含游离三萜、甾体类及脂肪油等)。水溶液浓缩至适当体积,上聚酰胺柱层析,分别用水、不同浓度乙醇洗脱,水、30% 乙醇后洗脱部分(检识不含黄酮)、50% 乙醇洗脱部分合并,减压干燥,得 D 组分(含皂苷及苷元);30% 乙醇先洗脱部分,减压干燥,得 E 组分(主要含黄酮);95% 乙醇洗脱部分,减压干燥,得 F 组分(95% 乙醇部位)。酸枣仁汤共提取分离出 A、B、C、D、E、F 6 个组分(其中 B 为多糖, E 为黄酮类成分, C 为乙醚部位),按 L₆(2⁷) 正交表^[2] 进行

组分配方,得酸枣仁汤 (A + B + C + D + E + F)、酸枣仁汤 (A + B + C)、酸枣仁汤 (A + D + E)、酸枣仁汤 (A + F)、酸枣仁汤 (B + D + F)、酸枣仁汤 (B + E)、酸枣仁汤 (C + D)、酸枣仁汤 (C + E + F),共 8 个配方。组分配伍用量是根据该组分的含量(得率)和全方水煎液的给药剂量计算而得(见表 1),用蒸馏水配制成溶液或混悬液,备用。

表 1 酸枣仁汤各组分剂量配方表(g · kg⁻¹)

组分	A	B	C	D	E	F
用量	4.03	2.298	0.03	2.662	0.044	0.013

代表挥发油石油醚溶液 mL 数,因所得挥发油量很少,故将所得全部挥发油溶于 500 mL 石油醚定容以用于配方。

1.3 行为学测试仪器 小鼠 EPM^[3] 迷宫由两个相对的开放臂(open arm,长 ×宽分别为 30 cm ×5 cm)和两个相对的封闭臂(close arm,长 ×宽 ×高分别为 30 cm ×5 cm ×15 cm)组成,一个连接四只臂的中央平台(central platform,5 cm ×5 cm),即:开放臂—中央平台—开放臂或封闭臂—中央平台—封闭臂,此二者互相垂直成为“十”(plus)形状。开放臂周围设有 0.25 cm 高的边缘。

2 方法

2.1 动物分组及处置 小鼠每笼 9 ~10 只,不限食水。光照节律 12L 12D(7:00 ~19:00),室温(21 ±2),保持安静。随机分为 10 组,即空白对照组、地西洋组、酸枣仁汤 ~酸枣仁汤 组,每组 18 ~20 只。其中酸枣仁汤 ~ 组分别按相当于全方生药 20g · kg⁻¹ · d⁻¹ ig 酸枣仁汤 ~酸枣仁汤,地西洋组按 2.0 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ ig,正常组给予等容积蒸馏水。连续 10 d,中药于末次药后 1.5 h,地西洋组和对照组于末次 ig 后 0.5 h 做行为学测试。所有动物提前 2h 进入实验室。

2.2 指标测试

2.2.1 测试环境 实验室内光线昏暗(以 1.5 m 距离处能区分小鼠细微活动的最低亮度为准)并保持恒亮^[1]。行为学测试于 8:00 ~15:30 进行。

2.2.2 测试指标 小鼠置于 EPM 中央平台,使其头部正对其中一个开放臂,释放后即开始记录 5min 内下述指标^[3-4]: 进入开放臂次数 (open arm entry, OE):进入到任一开放臂的次数,以小鼠 4 个爪子均进入到臂内为准,中途 1 个爪子从该臂中完全退出则为该次进入活动完成; 进入开放臂时间 (open arm time, OT),单位为 s; 进入封闭臂次数 (close arm entry, CE):进入到任一封闭臂的次数,以小鼠 4 个爪子均进入到臂内为准; 进入封闭臂时间 (close arm time, CT):单位为 s; 低头(向下)探究次数 (head-dipping):小鼠置身于开放臂时,一边用前爪握住迷宫边缘一边把头部和肩部伸出开放臂的边缘向迷宫下面探究的行为次数。

由(1)~(4)分别计算出: 开放臂和封闭臂总的进入次数(进臂总次数, OE + CE), 开放臂进入次数比 (OE%), 即 $OE / (OE + CE) \times 100\%$; 开放臂停留时间比 (OT%), 即 $OT / (OT + CT) \times 100\%$ 。

2.3 数据处理 各组数据用(̄±s)表示,多组间的显著性检验采用 q 检验,用软件 SPSS 10.0 (one-way ANOVA) 进行处理。采用有重复的 L₈(2⁷) 正交实验分析用表,用 F 检验评定各组分对开放臂进入次数比(OE%)和开放臂停留时间比(OT%)的影响,数据用软件 SPSS 10.0 (General Linear Model) 进行处理。

3 结果

3.1 组分配方对小鼠 EPM 模型行为学的影响

3.1.1 组分配方对小鼠开放臂进入次数比和开放臂停留时间比的影响 结果见表 2。从表 2 可以看出,与对照组相比,地西洋组 OE% 和 OT% 均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。酸枣仁汤、酸枣仁汤、酸枣仁汤、酸枣仁汤 组小鼠 OE% 均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 酸枣仁汤、酸枣仁汤 组 OT% 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。组分配方各组间 OE% 和 OT% 均无显著差异 ($P > 0.05$)。

3.1.2 组分配伍对小鼠低头探究次数、进臂总次数的影响 结果见表 3。从表 3 可以看出,与对照组比较,地西洋组低头探究次数显著增加 ($P < 0.01$)。各组分配方组低头探究次数均无显著增加,但酸枣仁汤、酸枣仁汤 组低头探究次数有升高趋势。与对照组比较,地西洋组进臂总次数没有显著变化 ($P > 0.05$),组分配方各组进臂总次数也没有显著变化 ($P > 0.05$)。

表 2 酸枣仁汤、酸枣仁汤 对 EPM 小鼠开放臂进入次数比、开放臂停留时间比的影响 (̄±s)

组别	剂量 /(g·kg ⁻¹)	n	OE/%	OT/%
空白	—	19	10.11 ±11.79	6.05 ±10.21
地西洋	2 × 10 ⁻³	20	32.62 ±15.85 ²⁾	35.78 ±20.27 ²⁾
酸枣仁汤	20	18	20.31 ±12.88 ¹⁾	22.46 ±16.75 ¹⁾
酸枣仁汤	20	20	15.08 ± 9.88	7.85 ± 7.19
酸枣仁汤	20	18	22.01 ±20.58 ¹⁾	19.96 ±25.84
酸枣仁汤	20	19	19.33 ±13.35	16.31 ±14.64
酸枣仁汤	20	20	21.44 ±17.45 ¹⁾	13.94 ±16.77
酸枣仁汤	20	20	22.18 ±15.88 ¹⁾	24.13 ±20.23 ¹⁾
酸枣仁汤	20	19	16.77 ±14.22	15.10 ±18.58
酸枣仁汤	20	18	13.04 ±13.30	15.42 ±17.83

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 3 酸枣仁汤、酸枣仁汤 对 EPM 小鼠低头探究次数、进臂总次数的影响 (̄±s)

组别	剂量 /(g·kg ⁻¹)	n	低头探究 次数/次	进臂总次数 /次
空白	—	19	3.63 ± 8.27	16.00 ±2.77
地西洋	2 × 10 ⁻³	20	21.40 ±13.91 ²⁾	20.85 ±6.10
酸枣仁汤	20	18	20.16 ±19.35	15.15 ±3.86
酸枣仁汤	20	20	3.45 ± 3.76	15.05 ±6.51
酸枣仁汤	20	18	3.94 ± 5.96	12.94 ±3.56
酸枣仁汤	20	19	6.90 ± 8.56	15.70 ±3.95
酸枣仁汤	20	20	5.65 ± 9.22	15.05 ±5.21
酸枣仁汤	20	20	19.60 ±21.00	14.05 ±3.46
酸枣仁汤	20	19	1.95 ± 2.95	14.65 ±5.08
酸枣仁汤	20	18	5.58 ±10.61	14.11 ±4.47

3.2 不同组分对小鼠 OE% 和 OT% 影响的正交试验分析

3.2.1 不同组分对 OE% 影响的分析 结果见表 4。从表 4 可以看出,仅组分 C 对 OE% 有显著影响 ($P < 0.05$),其余各组分均未有显著影响。用 C 时,OE% 为 16.30 ±1.75,不用时为 21.24 ±1.71。

表 4 不同组分对开放臂进入次数比影响的方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	25.73	1	25.73	0.114	0.736
B	14.52	1	14.52	0.645	0.423
C	919.60	1	919.60	4.083	0.045 ¹⁾
D	279.62	1	279.62	1.242	0.267
E	57.07	1	57.07	0.253	0.615
F	8.65	1	8.65	0.038	0.845

3.2.2 不同组分对 OT% 影响的分析

结果见表 5。

从表 5 可以看出, 仅组分 E 对 OT% 有显著影响 ($P < 0.05$), 其余各组分均未有显著影响。用 E 时, OT% 为 20.49 ± 2.08 , 不用时为 13.30 ± 2.04 。

表 5 不同组分对开放臂停留时间比影响的方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	9.49	1	9.49	0.030	0.863
B	5.88	1	5.88	0.018	0.892
C	429.64	1	429.64	1.346	0.248
D	141.36	1	141.36	0.443	0.507
E	1 951.14	1	1 951.14	6.111	0.015 ¹⁾
F	2.80	1	2.80	0.009	0.926

4 讨论

高架十字迷宫 (EPM) 是抗焦虑研究中应用最广泛的模型之一^[5-6]。OE% 和 OT% 是该模型测试中的经典指标^[7], 反映的是动物趋近—规避冲突的结果, 与焦虑程度直接相关。通常抗焦虑药只增加动物对开放臂的探索, 使 OE% 和 OT% 上升。进臂总次数反映动物总的运动能力, 用来观察药物有无镇静作用及镇静强度^[8-10]。非保护区的活动性 (如开放臂的 head-dipping 次数) 在一定程度上与抗焦虑剂的效应相关^[11]。

8 个组分配方中, 酸枣仁汤 与酸枣仁汤 主要行为学指标 OE%、OT% 均能显著升高, 而并不影响进臂总次数, 表明该两个配方有显著的抗焦虑作用而对小鼠的运动能力无显著影响 (即无镇静作用); 且两方有升高小鼠在开放臂 (非保护区) 低头探究次数 (head-dipping) 的趋势, 一定程度上支持其抗焦虑作用。

组分配方中, 酸枣仁汤 、酸枣仁汤 、酸枣仁汤 和酸枣仁汤 均有不同程度的抗焦虑作用, 酸枣仁汤 和酸枣仁汤 对 OE%、OT% 均有效; 而酸枣仁汤 和酸枣仁汤 仅对 OE% 有效。提示酸枣仁汤 组分及其不同配方与抗焦虑效用的相关性有所不同, 其中酸枣仁汤 的主要行为学指标均能显著升高, 且与基本涵括全部组分的酸枣仁汤 效用相当, 提示酸枣仁汤 与抗焦虑作用关系最为密切。

酸枣仁汤 由 B 和 E 两组分配伍而成, 因此, B、E 组分可能是酸枣仁汤 抗焦虑作用的主要组分。一个值得注意的现象是, 含有 B 或 E 的配方除了酸枣仁汤 和酸枣仁汤 外, 还有酸枣仁汤 (A + B + C) 和酸枣仁汤 (B + D + F) 或酸枣仁汤 (A + D + E) 和酸枣仁汤 (C + E + F) 4 组, 其中同时含

B 和 E 组分的酸枣仁汤 和酸枣仁汤 两组的作用显著, 含 E 组分的酸枣仁汤 和含 B 组分的酸枣仁汤 两组有一定作用, 而含 B 组分的酸枣仁汤 和含 E 组分的酸枣仁汤 则无作用。推测 B、E 组分在抗焦虑方面具有协同作用。因分离到 6 个组分, 考虑到实验的可操作性, 选用了 $L_8(2^7)$ 正交表, 据该表进行了组分组合, 得到 8 个组分配方。所得 8 个配方中每个配方至少含两个组分, 每个组分未再单独设置一个实验组。由于所选正交表中没有安排各组分交互作用的考察, B、E 单个组分的抗焦虑作用也未观察, 因此 B、E 组分的协同作用有待进一步确认。

各组分对抗焦虑主要指标影响的正交分析中发现, 对于 OE%, 仅 C 组分有显著影响 ($P < 0.05$), 而 B、E 两组分均无显著影响; C 不用时 OE% 值更大, 以不用为好。对于 OT%, 仅 E 组分有显著影响 ($P < 0.05$), E 用时 OT% 值更大, 以用为好。在所有组分中, 没有一个组分对 OE% 和 OT% 均有显著影响, 而酸枣仁汤 对 OE%、OT% 均有效, 进一步提示 B、E 组分在抗焦虑方面有协同作用。酸枣仁汤 涵括全部组分, 虽含有 C, 但由于其他组分的伍用, 其整体效应仍表现为对 OE%、OT% 均有显著影响。酸枣仁汤 (A + D + E), 虽含有 E 组分, 但由于 A、D 组分的伍用, 对 OT% 并无影响, 而升高 OE% 值。酸枣仁汤 (C + E + F), 虽含有 E, 但由于 C、F 的伍用 (有可能是 C 的影响), 对 OE%、OT% 均无影响。酸枣仁汤 V (B + D + F) 虽不含有 E (但同时也不含有 C), 但由于 B、D、F 组分的伍用, 能升高 OE% 值。分析表明酸枣仁汤 各组分配伍对 EPM 模型抗焦虑主要指标影响确实存在着相互协同、相互拮抗的关系。单个组分的正交分析结果与组分配方的整体药效存在一定的差异性, 很可能由于其他组分的伍用, 与该组分产生了协同或拮抗作用, 使含有 2 个或多个组分的配方通过整合作用, 在单个组分效应 (有或无、强或弱) 的基础上, 而表现为产生了效应或效应消失, 效应增强或减弱, 作用范围扩大或作用特点改变等, 体现了方剂或中药复方发挥效用的整体性特征。

B 组分为多糖, 主要来自茯苓和知母; E 组分为黄酮类成分, 主要来自酸枣仁和甘草。结合配伍理论, 酸枣仁汤 抗焦虑效用的物质基础可能主要涉及到君药酸枣仁和臣药茯苓、知母。多糖和黄酮类成

分在抗焦虑方面的协同作用,在一定程度上从物质基础(化学组分层次)上验证了酸枣仁汤君药、臣药的配伍意义。而 C 组分系酸枣仁汤系统分离中的乙醚部位,含有游离三萜、甾体类及脂肪油等,其成分复杂,究竟是其中的何种成分对抗焦虑效应产生不利影响,有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 王欣,谢鸣. 酸枣仁汤对高架十字迷宫大鼠行为学的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(1): 35.
- [2] 金丕焕. 医用统计方法 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993. 87.
- [3] Rodgers R J, Johnson N J. Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice [J]. *Pharmacol-Biochem-Behav*, 1998, 59(1): 221.
- [4] Lepicard E M, Joubert C, Hagneau I, *et al.* Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice [J]. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2000, 67(4): 739.
- [5] Hagenbuch N, Feldon J, Yee B K. Use of the elevated plus-maze test with opaque or transparent walls in the detection of mouse strain differences and the anxiolytic effects of diazepam [J]. *Behav-Pharmacol*, 2006, 17(1):

(上接第 103 页)

[参考文献]

- [1] 司富春,陈玉龙,徐晓宇,等. 古代中医文献对食管癌的认识 [J]. 河南中医, 2005, 25(6): 77.
- [2] 周仲瑛. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 223.
- [3] 贾永森. 启膈散、沙参麦冬汤和通幽汤调节 hEGF 刺激的食管癌 EC9706 细胞生长信号转导的研究 [D]. 上海中医药大学 2008 届博士学位论文, 2008, 5: 46.
- [4] Zhang Y X, Kong C Z. The role of mitogen-activated protein kinase cascades in inhibition of proliferation in human prostate carcinoma cells by raloxifene: an in vitro experiment [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(4): 271.
- [5] 司富春. PLC-1 在肿瘤发生中的作用 [J]. 河南中医,

31.

- [6] 闰智勇,张天娥,彭佳,等. 蜘蛛香对焦虑模型大鼠行为学及脑组织神经递质含量的影响 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 67.
- [7] Barbalho C A, Nunes de Souza R L, Canto de Souza A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test [J]. *Brain-Res*. 2009, 1267(24): 65.
- [8] Pellow S, Chopin P, File SE, *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat [J]. *J Neurosci Methods*, 1985, 14(3): 149.
- [9] Lister R G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 92(2): 180.
- [10] 陈志蓉,王维君,任志鸿. 抗焦虑新药 AF-5 在大小鼠高架十字迷宫中的作用 [J]. 中国药理通讯, 2004, 21(2): 53.
- [11] Cole J C and Rodgers R J. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro16-6028) in the murine elevated plus-maze [J]. *Behav. Pharmacol*, 1993, 4(6): 573.
- [6] Thomas S M, Coppelli F M, Wells A, *et al.* Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase C-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5629.
- [7] Lahn M, Paterson B M, Sundell K, *et al.* The role of protein kinase C-alpha (PKC-alpha) in malignancies of the gastrointestinal tract [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(1): 10.
- [8] Hanauske A R, Sundell K, Lahn M. The Role of Protein Kinase C-alpha (PKC-alpha) in Cancer and its Modulation by the Novel PKC-alpha-specific Inhibitor Aprinocarsen [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(16): 1923.