“柴龙解郁丹”对焦虑模型大鼠行为学及皮质激素受体的影响研究

丰广魁[1]　马先军[1]　陈隐漪[1]　卞光荣[1]　杨　超[2]　顾宝东[1]

（1.南京中医药大学连云港附属医院脑病科，江苏连云港222004；2.武汉市第一医院康复科，湖北武汉430000）

摘　要　目的：探讨柴龙解郁丹对焦虑模型大鼠行为学的影响及其作用机制。方法：清洁级雄性SD大鼠随机分为空白对照组、模型组、西药（氢溴酸西酞普兰）组和柴龙解郁丹小、大剂量组，除空白对照组以外，其余各组大鼠采用不确定性空瓶刺激法建立大鼠焦虑模型，造模结束后，各组大鼠分别灌胃给予相应的药物，空白对照组和模型组灌胃等体积生理盐水，连续灌胃30d。观察各组大鼠造模前后与治疗后一般形态、体重、旷场试验等行为学指标的变化；采用逆转录-聚合酶联反应（RT-PCR）检测方法检测各组大鼠治疗后海马盐皮质激素受体（MR）及糖皮质激素受体（GR）基因表达。结果：造模后模型组与各给药组大鼠体重和旷场试验得分均明显低于空白对照组（$P<0.05$，$P<0.01$）；治疗后西药组和柴龙解郁丹各剂量组大鼠体重和旷场试验水平运动得分明显高于模型组（$P<0.05$，$P<0.01$），柴龙解郁丹大剂量对大鼠体重和旷场试验评分的改善明显优于氢溴酸西酞普兰。与空白对照组比较，模型组大鼠脑内MR基因表达明显升高（$P<0.05$），GR基因表达明显降低（$P<0.05$）；经氢溴酸西酞普兰和柴龙解郁丹治疗后大鼠脑内MR基因表达降低，GR基因表达升高，以西药和柴龙解郁丹大剂量改善最为明显（$P<0.05$，$P<0.01$）。结论：柴龙解郁丹有显著的抗焦虑作用，其可能的作用机理为调节MR、GR基因表达。

关键词　柴龙解郁丹　焦虑症　行为学　基因表达　SD大鼠　皮质激素受体　实验研究

中图分类号　R749.72　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1672-397X（2017）10-0079-04

焦虑症的发病率正逐年升高，人群中焦虑症的终生患病率约为4.1%[1]。我们经10年的临床实践发现，疏肝解郁、重镇安神的柴龙解郁丹（南京中医药大学连云港附属医院院内制剂）对改善焦虑症、失眠症有良好的临床作用，相关临床研究表明柴龙解郁丹对焦虑症患者HAMA量表评分、中医症状评分有显著改善作用[2]。为了进一步探讨柴龙解郁丹的抗焦虑机制，我们观察了柴龙解郁丹对焦虑模型大鼠行为学及皮质激素受体的影响，现报告如下。

1　实验材料

1.1　实验动物　清洁级雄性SD大鼠，体重（200±20）g，由南京中医药大学动物实验中心提供，许可证书号：SCXK（苏）2013-0003，适应性饲养1周。

1.2　药品与试剂　柴龙解郁丹由南京中医药大学连云港附属医院制剂室提供，药物制备：取柴胡、黄芩、炙甘草、龙骨、牡蛎、珍珠母、生姜、大枣加水煎煮2次，第1次2h，第2次1h，合并滤液浓缩至适量；取法半夏、党参粉碎成细粉，与上述浓缩液混合制丸，干燥分装即得。批号：苏药制字Z04000043，60g/瓶。氢溴酸西酞普兰（西安杨森制药，陕药制字Z566665803）。cDNA第一链合成试剂盒，KeyGen公司，批号KGA1313；Taq DNA Polymerase，Fermentas公司，批号EP0405；Regular Agarose G10，Biowest公司，批号111860。

1.3　实验仪器　高速冷冻离心机，eppendorf公司，型号Centrifuge 5804R；紫外光度仪，SHIMADZU公司，型号UV-2450；PCR循环仪，Labnet公司，型号Multigene Gradient TC9600-G；核酸电泳仪，北京六一仪器厂，型号DYY-6B；凝胶成像仪，BIO-RAD公司，型号Gel Doc XR；TRIzol，Invitrogen公司，型号15596-026。

2　实验方法

2.1　分组　选择40只经旷场试验（Open-Field）筛选行为学相近大鼠，随机分为空白对照组、模型组、西酞普兰组（简称西药组）和柴龙解郁丹小、大剂量组，每组8只。

2.2　造模　采用林文娟等[3]建立的空瓶刺激法造模，除空白对照组外其余各组大鼠均先给予1周定时饮水训练，2次/d，分别于每日9:00—9:10、21:00—21:10喂水，其余时间撤去容器不给饮水。1周饮水训练后开始进行应激，即在上述2个时间段内给予1次不确定的空瓶刺激，持续2周。具体空瓶刺激时间见表1。

基金项目：江苏省中医药局基金项目（YB2015117）

2.3 给药 造模结束后第1天开始给药。大鼠给药剂量折算为柴龙解郁丹小剂量为1620mg/kg（相当于成人常用量），大剂量为3240mg/kg（相当于成人常用量的1倍），氢溴酸西酞普兰为1.8mg/kg，空白对照组和模型组灌胃等量生理盐水。灌胃药液量按1mL/100g体重计，每日于上午8:00—12:00灌胃给药，1次/d，共灌胃30d。

2.4 观察指标

2.4.1 一般形态学及体重、旷场试验 分别于造模前、后及治疗后观察大鼠一般形态[4]，测量体重[5]，进行旷场试验[6]。一般形态学包括大鼠毛发、色泽、身体姿态、精神状况、活动情况、耳廓色泽、对束缚应激的反抗情况。旷场试验采用自制正方体硬纸板箱，长宽高均为80cm，箱子的内壁和底面用黑色油纸遮盖并用胶布固定，用粉笔将地面平均划分为25个正方形。将大鼠放置于自制敞箱底面的中央格内，观察大鼠的水平运动和垂直运动，以穿越底面格为水平运动次数，以大鼠后肢直立次数为垂直运动。测定时间为5min，每只大鼠测试1次。水平运动计分标准：大鼠1/2身体进入另一方格计1分；垂直运动计分标准：两前肢离地1cm以上，后肢性站立1次计1分。

2.4.2 盐皮质激素受体（MR）与糖皮质激素受体（GR）基因表达检测 治疗及行为学观察完成后各组大鼠10%水合氯醛（4mL/100g）腹腔内注射麻醉，快速断头处死，在冰盘上剥离大脑，分离出海马。取海马约15mg左右，充分剪碎或研磨，加入约500μL生理盐水，充分混匀。5000r/min离心10min，去上清，-80℃保存。盐皮质激素受体（MR）与糖皮质激素受体（GR）基因表达检测采用cDNA第一链合成试剂盒、Tap DNA Polymerase、Regular Agarose G10、PCR循环仪、核酸电泳仪。按照试剂盒说明书操作，运用一步法RT-PCR测试基因表达。MRmRNA上游引物3′-AACAAAATGCCCCACGGTTA-5′（20bp），下游引物3′-GGGACGATGCAATGGACTGT-5′（20bp）；GRmRNA上游引物3′-GGATTTCCAGAGCCCACCAT-5′（20bp），下游引物3′-CATTCCTGATGGTCACCTCG-5′（20bp）。

2.5 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行数据处理，计量资料用（$\bar{x}\pm s$）表示，采用多因素方差分析，假设检验使用双侧检验，以$P<0.05$为差异有统计学意义，$P<0.01$为有显著统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠一般情况比较 造模前各组大鼠一般情况良好，精神佳，行动敏捷，毛色明亮，较为整洁，饮食正常。造模后，各造模大鼠精神萎靡，毛发凌乱，反应迟钝，束缚反抗剧烈，嘶叫挣扎。给药后西药组、柴龙解郁丹各剂量组大鼠叫声较为柔和，反抗、对峙较前较弱，挣脱、撕咬次数较少；模型组大鼠对束缚反应剧烈，反抗，撕咬笼子，嘶叫，极力挣脱。此外，模型组大鼠大便溏稀，空白对照组与各给药组大鼠大便干稀适中、成型。

3.2 各组大鼠体重比较 造模后各组大鼠与空白对照组比较体重增长偏少，差异有统计学意义（$P<0.01$）；给药结束后各给药组与模型组比较体重增长快（$P<0.05$，$P<0.01$），柴龙解郁丹小剂量组和西药组体重相近（$P>0.05$），柴龙解郁丹大剂量组较小剂量组和西药组体重增长较快（$P<0.05$），接近空白对照组（$P>0.05$）。见表2。

表1 空瓶刺激时间

时间	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
9：00	ES	ES	ES	ES	ES	ES	N	N	N	ES	N	N	ES	N	ES	ES	N	ES	N	N	ES
21：00	ES	ES	ES	ES	ES	ES	ES	ES	ES	N	ES	ES	N	ES	N	N	ES	N	ES	ES	N

注：ES代表喂水，N代表空瓶（不喂水）。

表2 各组大鼠不同时间体重比较（$\bar{x}\pm s$） g

时间	动物数（只）	空白对照组	模型组	西药组	柴龙解郁丹小剂量组	柴龙解郁丹大剂量组
造模前	8	196.38±5.24	195.38±6.52	199.63±5.37	195.13±10.45	197.38±5.26
造模后	8	317.38±28.02	283.88±12.35**	284.63±11.66**	284.50±9.38**	289.38±22.96*
治疗后	8	443.25±20.39	402.75±12.03**	415.75±9.71**▲	414.38±9.15**▲	431.13±13.40▲▲○●

注：与同时期空白组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与同时期模型组比较，▲ $P<0.05$，▲▲ $P<0.01$；与同时期西药组比较，○ $P<0.05$；与同时期柴龙解郁丹小剂量组比较，● $P<0.05$。

3.3 各组大鼠旷场试验评分比较 造模后，造模大鼠水平运动及垂直运动评分均明显低于空白对照组（$P<0.05$，$P<0.01$），标志造模成功。治疗后，西药组大鼠水平运动评分明显高于模型组（$P<0.05$），垂直运动评分改善不明显（$P>0.05$）；柴龙解郁丹各剂量组水平运动、垂直运动评分明显高于模型组（$P<0.05$，$P<0.01$），也高于西药组；柴龙解郁丹各剂量组间比较，评分无显著性差异（$P>0.05$）。见表3。

3.4 各组大鼠治疗后海马组织盐皮质激素受体（MR）与糖皮质激素受体（GR）基因表达比较 与空白对照组比较，模型组大鼠海马内MR基因表达显著上调（$P<0.01$），GR基因表达显著下调（$P<0.01$）。与模型组比较，西药组、柴龙解郁丹大剂量组MR基因表达下调（$P<0.05$，$P<0.01$），各给药组GR基因表达显著上调（$P<0.05$，$P<0.01$）。见表4。

4 讨论

焦虑模型的制作有许多种方法，空瓶刺激模型是一种成熟、便于操作、公认的焦虑动物制备方法。本实验通过大鼠一般情况、体重变化及旷场试验表

表3　各组大鼠不同时间旷场试验评分比较（$\bar{x}\pm s$）　　分

项目	组别	动物数（只）	造模前	造模后	治疗后
水平运动	空白对照组	8	46.75±6.80	43.13±5.91	44.00±5.95
	模型组	8	46.50±6.55	26.88±5.91**	25.88±7.70
	西药组	8	47.63±11.51	27.63±7.23**	35.13±8.60*▲
	柴龙解郁丹小剂量组	8	46.38±12.20	30.13±8.01**	42.75±3.96▲▲○
	柴龙解郁丹大剂量组	8	44.38±9.12	27.13±7.26**	43.88±7.26▲▲○
垂直运动	空白对照组	8	11.50±3.21	10.00±3.46	10.75±4.27
	模型组	8	11.13±2.70	5.00±2.27**	5.25±2.38
	西药组	8	10.88±4.36	5.75±3.11*	6.88±2.30*
	柴龙解郁丹小剂量组	8	11.38±4.10	5.88±2.90*	9.25±3.88▲
	柴龙解郁丹大剂量组	8	10.88±3.09	5.75±3.92*	9.75±2.76▲▲○

注：与空白对照组比较，*P<0.05，**P<0.01；与模型组比较，▲P<0.05，▲▲P<0.01；与西药组比较，○P<0.05。

表4　各组大鼠海马组织MR与GR基因表达比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	MR基因表达	GR基因表达
空白对照组	8	0.160±0.052	0.618±0.121
模型组	8	0.470±0.186**	0.303±0.080**
西药组	8	0.272±0.089**▲	0.557±0.103▲▲
柴龙解郁丹小剂量组	8	0.312±0.107**	0.422±0.103**▲○
柴龙解郁丹大剂量组	8	0.185±0.058▲▲○●	0.562±0.107▲▲●

注：与空白对照组比较，**P<0.01；与模型组比较，▲P<0.05，▲▲P<0.01；与西药组比较，○P<0.05；与柴龙解郁丹小剂量组比较，●P<0.05。

明，模型组大鼠体重增长缓慢，水平运动及垂直运动得分均减少，提示实验大鼠出现焦虑行为，模型制备成功。柴龙解郁丹小剂量能够增加焦虑模型大鼠的体重，与西药组相当，但仍低于空白对照组，而柴龙解郁丹大剂量对大鼠体重的改善优于西药组，接近空白对照组。这可能与柴龙解郁丹具有疏肝解郁、健脾和胃之功，能够缓解紧张，改善焦虑状态，增加食欲有关。西酞普兰是5-HT再摄取抑制剂，通过抑制间隙5-HT的再摄取而发挥作用，其对5-HT再摄取的选择性在同类药物中最强，有良好的抗焦虑和抗抑郁作用，且不良反应少而轻[7]，是抗焦虑的一线用药。

旷场试验是常用于检验焦虑模型的试验方法。本研究结果表明，在大鼠旷场试验中，柴龙解郁丹小剂量组水平运动、垂直运动得分显著高于模型组，与空白对照组接近；柴龙解郁丹大剂量组水平运动、垂直运动亦明显高于模型组和西药组，与空白对照组相当。垂直运动属于主动行为，焦虑症往往表现为主动行为减少，造模后大鼠的垂直运动得分低于水平运动得分也说明这一点。因此，垂直运动得分提高比水平运动得分提高更有意义。氢溴酸西酞普兰对垂直运动改善不显著，而柴龙解郁丹各剂量均能显著改善模型大鼠垂直运动得分，可见柴龙解郁丹对焦虑大鼠有显著的抗焦虑作用。

糖皮质激素是由肾上腺皮质分泌的一类甾体激素。基础水平的糖皮质激素释放遵循基本的自然规律，和许多心理和身体健康密切相关[8]。糖皮质激素急性释放时将对机体产生诸多影响，且其分泌常在应激或创伤时产生[9]。糖皮质激素浓度如果一直处于高水平或长期低水平都将损害机体的行为和生理功能，并可能导致机体的病理变化[10]。通常糖皮质激素发挥作用要通过与盐皮质激素受体（MR）和糖皮质激素受体（GR）结合来完成。应激反应时释放的糖皮质激素与MR和GR的结合是有差异的，首先与MR结合，随后才会与GR结合，其与MR结合的亲和力是与GR结合亲和力的10倍[11]。因此，糖皮质激素浓度在基础水平范围时几乎完全和MR结合，只有糖皮质激素浓度高于基础水平才会与GR结合。越来越多的研究表明，MR与GR之间的平衡状态对精神类疾病的恢复至关重要[11]。对噬齿类动物的研究表明，焦虑、恐惧情绪的产生与MR及GR基因的表达密切相关[12]。海马神经元中包含丰富的MR及GR，这两种受体的平衡对神经元的兴奋性、应激反应等起重要作用[11]。本研究结果显示，柴龙解郁丹小剂量组MR下调不显著，但与西药组比较无显著差异，GR上调显著，但不及西药组；柴龙解郁丹大剂量可显著下调模型大鼠海马组织MR基因表达、上调GR基因表达，且优于西药组和柴龙解郁丹小剂量组，接近空白对照组。可见，柴龙解郁丹能够显著调节MR、GR基因表达，且呈现量效关系。有研究表明，对慢性情绪刺激的大鼠，氟西汀可以通过调节海马内MR和GR的蛋白表达而改善大鼠的抑郁症状[11]，尚未见到有关西酞普兰对MR、GR基因表达影响的报道。

焦虑症主要由情志不舒、气机郁滞所致，肝郁气结是病机的关键，疏肝解郁是治疗的基本原则。柴龙解郁丹是我院院内制剂，2004年获批江苏省院内制剂许可，该药具有疏肝理气、清肝泄热、健脾化痰、潜镇降逆作用。本实验结果显示，柴龙解郁丹能够显著改善焦虑模型大鼠焦虑行为，增加体重，其可能的作用机制与调节MR、GR基因表达有关。但对柴龙解郁丹小剂量调节MR、GR基因表达不显著而大剂量却非常显著的原因还不十分清楚，有待进一步研究。

参考文献

[1]　李雪晶，郭轶，胡建平.广泛性焦虑症患者应对方式、社会

左归丸的临床应用与实验研究进展

尹　芳　王　璐　金国琴
（上海中医药大学基础医学院生物化学教研室，上海 201203）

摘　要　左归丸为经典古方，八味药合用有滋阴补肾、填精益髓之功效，主治肝肾阴亏、精血不足、脑髓不充证。临床在心脑血管疾病、神经内分泌疾病、生殖系统疾病、骨科疾病等多类疾病的治疗中，有着广泛的应用。近年来，相关实验研究在延缓衰老、修复神经系统损伤、调节内分泌免疫、改善骨代谢及促进生殖发育等方面亦取得了一定进展。随着分子生物学的高速发展，借助新的技术方法，例如应用表观遗传修饰的理论技术，在分子水平更深入地探明经典补肾方药的作用机制，以期为中医药的临床应用提供更多的、新的实验依据。

关键词　左归丸　治疗应用　药理学　综述
中图分类号　R289.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1672-397X（2017）10-0082-04

左归丸出自明代张景岳的《景岳全书·新方八阵》，由熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶及龟版胶八味药材组成。《医学举要》卷五言："方用熟地之补肾为君；山药之补脾，山茱萸之补肝为臣；配以枸杞补精，川牛膝补血，菟丝子补肾中之气，鹿角胶、龟版胶补督任之元。虽曰左归，其实三阴并补，水火交济之方也。"八药合用，共奏滋阴补肾、填精益髓之功，主治真阴肾水不足，药物阴阳俱用，寓阳中求阴之意。此方为经典古方，临床上多有应用。现将近年来左归丸的临床应用和实验研究进展概述如下。

1　左归丸的临床应用

1.1　神经系统疾病　"肾精化生脑髓""肾通于脑"是中医学的基础理论之一。脑鸣是指延脑的耳蜗神经核至大脑皮质听觉中枢的整个通道任何一个部位

基金项目：国家自然科学基金面上项目（81473583 ）

支持与心理健康的关系[C].第15届全国老年护理学术交流会议论文集，2012：644.
[2] 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.
[3] 林文娟，王玮雯，邵枫.慢性情绪应激对大鼠行为、神经内分泌和免疫反应的影响：一个新的情绪应激模型[J].科学通报，2003，48（9）：926.
[4] 董宁，唐启盛，赵瑞珍，等.疏肝清热健脾法对广泛性焦虑大鼠脑内bax、bcl-2表达的影响[J].北京中医药大学学报，2015，38（6）：383.
[5] 魏宏文，矫玮，张有志，等.运动对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及体重的影响[J].体育学刊，2010，17（11）：100.
[6] HUANG Y，YANG Y T，LIU X X，et al.Effect of herbal-partitioned moxibustion at Tianshu（ST 25）and Qihai（CV 6）on pain-related behavior and emotion in rats with chronic inflammatory visceral pain[J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science，2015，13（1）：1.
[7] SHER L.SSRIs have a smaller benefit in paediatric when compared to adult major depressive disorder[J].Evid Based Ment Health，2016，19（1）：26.
[8] FRIES E，DETTENBORN L，KIRSCHBAUM C.The cortisol awakening response（CAR）：facts and future directions[J]. Int J Psychophysiol，2009，72（1）：67.
[9] FRIES E，HESSE J，HELLHAMMER J，et al.A new view on hypocortisolism[J]. Psychoneuroendocrinology，2005，30（10）：1010.
[10] CHROUSOS G P.Stress and disorders of the stress system[J]. Nat Rev Endocrinol，2009，5（7）：374.
[11] OITZL M S，CHAMPAGNE D L，VAN DER VEEN R，et al. Brain development under stress：hypotheses of glucocorticoid actions revisited[J].Neurosci Biobehav Rev，2010，34（6）：853.
[12] 周奇志，魏焦禄，蔡定均，等.电针结合重复经颅磁刺激对焦虑模型大鼠中枢肾上腺皮质激素受体基因表达的影响[J].重庆医学，2012，41（4）：317.

第一作者：丰广魁（1962—），男，医学博士，主任中医师，教授，从事脑病研究。lygfgk@163.com

收稿日期：2017-07-25
编辑：吴　宁