DOI:10.13194/j.issn.1673-842x.2017.11.004

柴龙解郁丹对焦虑模型大鼠单胺类神经递质影响

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,江苏 连云港 222004;2.武汉市第一医院,湖北 武汉 430022)

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:采用不确定性空瓶刺激法建立大鼠焦虑模型,给予柴龙解郁丹干预1个月并以西酞普兰做对照,观察柴龙解郁丹对焦虑模型大鼠焦虑行为及海马单胺类神经递质(5-HT、DA、NE)含量的影响,单胺类神经递质采用酶联免疫吸附方法(ELISA)检测。结果:柴龙解郁丹能够显著改善模型大鼠焦虑行为优于西酞普兰组($P<0.01$),降低大鼠海马区5-HT、DA、NE的含量($P<0.05$),但对5-HT的调节作用不及西酞普兰($P<0.01$),对DA、NE含量的影响功同西酞普兰($P>0.05$),降低单胺类神经递质未呈现出量效关系。结论:柴龙解郁丹有显著的抗焦虑作用,可能与降低焦虑模型大鼠海马单胺类神经递质而发挥抗焦虑作用有关。

关键词:柴龙解郁丹;焦虑症;5-HT;DA;NE;模型大鼠
中图分类号:R749.72 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-842X(2017)11-0016-03

Effects of *Chailong Jieyu* Pill on Monoamine Neurotransmitters in Rat Models with Anxiety Disorder

FENG Guangkui[1], MA Xianjun[1], CHEN Yinyi[1], BIAN Guangrong[1], YANG Chao[2], GU Baodong[1]
(1. Lianyungang Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Lianyungang 222004, Jiangsu, China; 2.Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei, China)

Abstract: *Objective*: To investigate the effect and action mechanism of *Chailong Jieyu* Pill on the behavior of rat models with anxiety disorder. *Methods*: Rat models with anxiety disorder were established using uncertain empty bottle stimulation. To observe the effects of *Chailong Jieyu* Pill on anxious behaviour and monoamine neurotransmitter (5-HT, DA, NE) in hippocampus of anxiety model rats, 1 months were treated with *Chailong Jieyu* Pill, and citalopram was used as control. Enzyme linked immunosorbent assay was utilized to detect monoamine neurotransmitter. *Results*: *Chailong Jieyu* Pill can significantly improve the anxiety behavior in rats better than the citalopram group ($P<0.01$), reduce the content of the rat hippocampus 5-HT, DA, NE ($P<0.05$), but the regulatory effect of *Chailong Jieyu* Pill on 5-hydroxytryptamine was less than that of citalopram ($P<0.01$). The effect on the content of DA and NE were the same as that of citalopram ($P>0.05$).The decrease of monoamine neurotransmitter showed no dose effect relationship. *Conclusions*: *Chailong Jieyu* Pill has significant anti-anxiety effect probably through diminishing monoamine neurotransmitters in the hippocampus with rat models of anxiety disorder.

Keywords: *Chailong Jieyu* Pill; anxiety disorder; 5-hydroxytryptamine; dopamine; norepinephrine; model rats

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],笔者经长期临床实践发现,院内制剂柴龙解郁丹,对改善焦虑症有良好的临床疗效[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的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

选择清洁级雄性SD大鼠,由南京中医药大学动物实验中心[许可证书号:SCXK(苏)2013-0003]提供,适应性饲养1周,选择40只重量(200±20)g,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(简称空白组)、模型组、西酞普兰组(简称西药组)、柴龙解郁丹小剂量组(简称中小组)、柴龙解郁丹大剂量组(简称中大组)。

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:(1)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2 h、第2次1 h,合并滤液浓缩至适量;(2)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Z04000043,60 g/瓶。氢溴酸西酞普兰(西安杨森制药,陕药制字Z566665803)源于市售,20 mg/粒,14粒/盒。大鼠给药剂量折算为柴龙解郁丹小剂量为1620 mg/kg

收稿日期:2017-06-20
基金项目:江苏省中医药局科技项目(YB2015117)
作者简介:丰广魁(1962-),男,山西山阴人,教授、主任中医师,博士,研究方向:脑内科疾病。

微信公众号:lnzyydxxb(或扫左侧二维码关注)
投稿平台:http://lzxb.cbpt.cnki.net

（相当于成人常用量）、大剂量为3240 mg/kg（相当于成人常用量的1倍），氢溴酸西酞普兰为1.8 mg/kg。

设备和试剂盒如下：大鼠5-羟色胺试剂盒（5-HT）、大鼠多巴胺试剂盒（DA）、大鼠去甲肾上腺素试剂盒（NE）、紫外光度仪、核酸电泳仪。自制敞箱：采用自制硬纸板箱，箱子的长宽高分别为80 cm×80 cm×80 cm，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个方格的正方形。

1.2　方法

1.2.1　造模

采用林文娟等建立的空瓶刺激法造模[3]，各组大鼠除对照组外，均给予1周定时饮水训练，定时喂水训练为1 d 2次，分别是9：00-9：10、21：00-21：10，其余时间撤去容器不给饮水。应激实验是在上述两个时间段内给予1次不确定的空瓶刺激，即有1次饮到水、有1次饮不到水，持续刺激2周时间结束[4-6]。详见表1。

表1　空瓶刺激时间表

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。

造模结束后第1天，测定大鼠旷场实验[7]指标，并开始给药。灌胃药液量按体重比 1 mL/100 g 计，每天灌胃1次；空白组和模型组每日均给等量生理盐水；各组均于上午8：00-12：00给药，30 d后再次检测大鼠旷场实验指标，随后断头摘取脑组织样本分离出海马备用。

1.2.2　实验指标检测内容及方法

旷场实验，将大鼠放置于自制的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5 min，每只大鼠测试1次。水平运动次数计分标准：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1 cm以上，后肢性站立1次计1分。

标本摘取和指标测定，实验结束后大鼠行10%水合氯醛（4 mL/100 g）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15 mg左右，充分剪碎或研磨，加入约500 μL的生理盐水，充分混匀。5000 r/min离心10 min，去上清，-80 ℃保存。

单胺类神经递质检测，设空白孔和标准孔，加待测样品 10 μL（样品最终稀释度为5倍），将样品加于酶标板孔底部，并轻轻晃动混匀，加入50 μL标准品、100 μL待测样品于反应孔内，立即加入50 μL的生物素标记的抗体，盖上膜板并轻轻振荡混匀，37 ℃温育45 min，洗甩去孔内液体，每孔加满洗涤液，振荡30 s，甩去洗涤液并用吸水纸拍干，重复洗涤4次，再每孔加入100 μL的亲和链酶素-HRP并轻轻振荡混匀，37 ℃温育30 min，再次如前方法洗涤4次，洗涤后于每孔加入底物A、B各50 μL，轻轻振荡混匀，37 ℃温育5 min，避免光照，取出酶标板，迅速加入50 μL终止液开始测定结果。

1.3　统计方法

采用SPSS19.0统计软件进行数据的处理，计量数据用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。采用多因素方差分析。假设检验使用双侧检验，以$P<0.05$为有统计学意义，$P<0.01$为有显著统计学意义。

2　结果

2.1　旷场实验

各组大鼠水平运动及垂直运动得分均明显减少，与空白组比较有统计学差异（$P<0.05$），标志造模成功；给药后，西药组比模型组水平运动得分增加（$P<0.05$），垂直运动得分改善不明显（$P>0.05$）；中小组比模型组水平运动得分显著增加（$P<0.01$），垂直运动得分也增加（$P<0.05$），且中小组比西药组水平运动得分多，之间有差异（$P<0.05$），垂直运动无差异（$P>0.05$）；中大组水平运动及垂直运动得分比模型组均显著增加（$P<0.01$），与西药组也有显著差异（$P<0.05$），中大组与中小组水平运动、垂直运动均无显著差异（$P>0.05$）。见表2。

表2　各组大鼠不同时间旷场实验结果比较（分，n=40，$\bar{x} \pm s$）

项目	组别	造模前	造模后	给药后
水平运动	空白组	46.75 ± 6.80	43.13 ± 5.91	44.00 ± 5.95
	模型组	46.50 ± 6.55	26.88 ± 5.91**	25.88 ± 7.70
	西药组	47.63 ± 11.51	27.63 ± 7.23**	35.13 ± 8.60*▲
	中小组	46.38 ± 12.20	30.13 ± 8.01**	42.75 ± 3.96▲▲○
	中大组	44.38 ± 9.12	27.13 ± 7.26**	43.88 ± 7.26▲▲○
垂直运动	空白组	11.50 ± 3.21	10.00 ± 3.46	10.75 ± 4.27
	模型组	11.13 ± 2.70	5.00 ± 2.27**	5.25 ± 2.38
	西药组	10.88 ± 4.36	5.75 ± 3.11*	6.88 ± 2.30*
	中小组	11.38 ± 4.10	5.88 ± 2.90*	9.25 ± 3.88▲
	中大组	10.88 ± 3.09	5.75 ± 3.92*	9.75 ± 2.76▲▲○

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

2.2　单胺类神经递质

各给药组5-HT、DA、NE神经递含量均有所降低。西药组比模型组均降低（$P<0.01$），但仍高于空白组（$P>0.05$）；中小组对5-HT含量降低不及西药组，之间有显著性差异（$P<0.01$），降低DA、NE含量近似西药组（$P>0.05$）；中大组降低5-HT含量也不及西药组，有显著性差异（$P<0.01$），降低DA、NE接近西药组（$P>0.05$），中大组与中小组无显著差异（$P>0.05$）。结果见表3。

表3　各组大鼠脑内单胺类神经递质结果比较（ng/mL，n=40，$\bar{x} \pm s$）

组别	5-HT	DA	NE
空白组	2.285 ± 0.445	5.578 ± 0.618	12.44 ± 0.638
模型组	4.115 ± 0.459**	7.568 ± 0.438**	15.462 ± 1.157**
西药组	2.754 ± 0.225*▲▲	6.084 ± 0.528▲▲	13.790 ± 0.986**▲▲
中小组	3.456 ± 0.284**▲▲○○	6.615 ± 1.171*▲	14.077 ± 0.829**▲
中大组	3.494 ± 0.106**▲▲○○	6.781 ± 0.863**▲	14.045 ± 1.263**▲

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

3 讨论

焦虑症是严重困扰人民健康的疾病，采用实验的方法研究中药对焦虑的作用机制对中医药的研发和焦虑症的研究都有重要的临床意义。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。本实验通过大鼠旷场实验表明，水平运动及垂直运动得分均减少（$P<0.05$），提示实验大鼠出现焦虑行为，模型制备成功。在大鼠旷场实验中，中小组水平运动得分显著增多（$P<0.01$），垂直运动得分也增多（$P<0.05$），与空白组接近（$P>0.05$）；中大组水平及垂直运动得分均增多（$P<0.01$），优于西药组（$P<0.05$），与空白组相当（$P>0.05$）。垂直运动属于主动行为，焦虑症的主动行为减少，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，西药组对垂直运动改善不显著（$P>0.05$），而中小组、中大组均显著改善（$P>0.05$），可见，柴龙解郁丹对焦虑大鼠有显著的抗焦虑作用。

焦虑症发病与脑内单胺类神经递质释放亢进有关，降低5-HT、DA、NE功能的药物则有抗焦虑作用[8]；目前认为突出间隙5-HT神经递质浓度的增加与焦虑症发作成正比例关系[9]，精神抑制剂既能缓解焦虑症的临床表现，又都降低DA能传递的特征，提示DA能系统可能在焦虑症发病机制中起着重要作用[10]。NE在焦虑中扮演的角色还不十分清楚，但有很多研究者从脑脊液、血和尿中寻找到的证据都支持焦虑发作时有NE能活动增加这一观点[11]。西酞普兰是选择性5-HT再摄取抑制剂，而且是最显著的再摄取抑制剂之一，对焦虑症的治疗临床效果明显，也是公认的抗焦虑首选药物之一，故选择西酞普兰作为对照药物。实验结果显示，柴龙解郁丹小、大剂量组能显著降低大鼠海马单胺类神经递质的含量，除降低5-HT的作用不及西酞普兰外（$P<0.01$），降低DA、NE作用与西酞普兰类似（$P>0.05$），推测柴龙解郁丹可能是通过参与减少海马组织单胺类神经递质的释放起到抗焦虑作用的；但并不完全是，因为作为与焦虑关系密切的5-HT其降低程度明显弱于西酞普兰，而其行为学指标改善程度却优于西酞普兰，表明柴龙解郁丹对焦虑症的改善是综合作用。柴龙解郁丹大剂量组与小剂量组对单胺类神经递质的影响变化无显著性差异，表明其对焦虑症的影响未呈显著剂量依赖性，未呈现剂量依赖的原因尚不明确。

焦虑症是以焦虑不安、惊恐担心为主要临床表现的精神疾病。本病是由不良情绪刺激，导致肝气不舒，扰动心神、肾志而出现心神不宁、惊恐紧张等一系列表现。主要由情志不舒、气机郁滞所致，肝郁气滞是病理关键，疏肝解郁是治疗的基本原则[12]。柴龙解郁丹是我院院内制剂，2004年获批江苏省药监局院内制剂许可，该药具有疏肝理气、清泄肝热、健脾化痰、潜镇降逆作用，由柴胡、黄芩、法半夏、党参、炙甘草、龙骨、牡蛎、珍珠母、生姜、大枣组成。方中柴胡微苦微寒，入肝经，疏肝解郁为君药，黄芩味苦质轻清胆经、上焦之热。半夏化痰开结，辛开苦降，助柴胡疏解气机，为安神要药。龙骨、牡蛎、珍珠母潜降镇逆，重镇安神共为臣药。党参、炙甘草补益心脾为佐药，并防重坠之品伤脾胃。生姜、大枣健脾和胃为使药，共奏疏肝解郁、镇静安神之功。现代研究证实，柴胡的主要成分柴胡皂苷可发挥拟胆碱样作用，通过抑制胆碱酯酶的作用调节消化系统和神经系统[13]，还有研究表明，柴胡类方在改善躯体症状、抑郁、烦躁易怒等主要精神症状有较好的疗效[14-15]，主要与调节下丘脑-垂体-肾上腺轴（HPA）亢进及脑类单胺类神经递质有关[14]。有研究显示龙骨、牡蛎具有镇静、抗惊厥的作用[16]。柴胡与龙骨、牡蛎配伍，从中提取的总苷能显著减少海马神经元细胞的死亡率，也具有对抗焦虑抑郁情绪的作用，可以改善大鼠一般行为学改变[17]；党参有抗疲劳、耐缺氧及增强机体免疫作用，生姜丙醇提取物具有利胆和抗5-HT作用，大枣有镇静、降压、抗惊厥的作用，能增加动物体重、肌力增强，对5-HT和组胺有一定的拮抗作用[18]。有关柴胡剂对焦虑的作用研究报道不多，多集中在抑郁方面，本实验结果显示柴龙解郁丹可显著改善大鼠焦虑行为，能够降低大鼠脑内单胺类神经递质含量，这也许是柴龙解郁丹抗焦虑的机制之一。◆

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、社会支持与心理健康的关系[C]//全国老年护理学术交流会议. 大连：中华护理学会，2012.

[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(3)：214-217.

[3] 孙君辉，凌沛学，蒋秋燕，等. 焦虑大鼠模型的应用及研究进展[J]. 食品与药品，2011，13(11)：438-441.

[4] 张雪. 安神方抗焦虑作用的疗效观察及相关机制研究[D]. 广州：南方医科大学，2012.

[5] 王静，陈利平，王发渭，等. 舒郁宁心汤对焦虑大鼠行为及血清神经肽和皮质酮水平的影响[J]. 中国中医急症，2013，22(9)：1459-1460.

[6] 张冰，李延利. 知母水煎剂对空瓶刺激诱发的慢性情绪应激的改善作用研究[D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2012.

[7] Yan Huang, Yan-ting Yang, Xiao-xu Liu, 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 & Tuina Science, 2015, 13(1): 1-8.

[8] 李晶晶，汤建林，胡岚岚，等. 钩藤总碱对焦虑模型行为学和脑组织单胺类神经递质的影响[J]. 第三军医大学学报，2013，35(3)：237-240.

[9] 孙艳，白克镇. 焦虑障碍与5-HT受体关系的研究进展[J]. 神经疾病与精神卫生，2010，10(5)：528-529.

[10] 刘小河，杨忠奇，冼绍祥，等. 温胆片对焦虑模型大鼠行为学和单胺类神经递质的影响[J]. 广州中医药大学学报，2012，29(6)：674-678.

[11] 袁勇贵，吴爱勤，张心保，等. 焦虑和抑郁障碍病的血浆单胺类神经递质研究[J]. 临床精神医学杂志，2001，11(3)：129.

[12] 丰广魁. 焦虑症的中医证治探微[J]. 辽宁中医杂志，2011，38(1)：48-49.

[13] 张静艳，张晓杰. 柴胡皂苷对抑郁模型大鼠海马乙酰胆碱代谢及组织形态学影响的实验研究[J]. 黑龙江中医药大学学报，2011(4)：506-507.

[14] 胡燕，洪敏. 柴胡类方治疗抑郁症研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2010，16(17)：247-249.

[15] 原红霞，韦彩柳，程遥. 小柴胡汤抗抑郁作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(15)：190-191.

[16] 张晗，张磊，刘洋. 龙骨、牡蛎化学成分、药理作用比较研究[J]. 中国中药杂志，2011，36(13)：1839-1840.

[17] Liu Y, Ma S, Rong Q. SCLM, total saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang, reduces chronic mild stress-induced apoptosis in the hippocampus in mice[J]. Pharmaceutical Biology, 2010, 48(8): 840-848.

[18] Zhu W, Ma S, Qu R, et al. Antidepressant-like effect of saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang, and its possible mechanism[J]. Life Sciences, 2006, 79(8): 749-756.