

- 104-107, 149.
- [13] 陈浩, 何小女, 邓运明, 等. 温通止痛膏对类风湿性关节炎风寒湿痹阻证模型大鼠的治疗作用研究[J]. 江西中医药大学学报, 2016, 28(6): 77-80.
- [14] 佟丽, 辛增辉, 陈育尧, 等. Mtb 诱导的 SD 佐剂性关节炎大鼠模型的建立及评价[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 259-263.
- [15] 刘维, 张磊, 吴沅皞. 解毒通络法控制类风湿关节炎症状的实验研究[J]. 天津中医药, 2011, 28(3): 234-236.
- [16] 张雪萍, 蔡广知, 安娜, 等. 两头尖醇提物抗佐剂性关节炎作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 131-134.
- [17] 龙静雯, 曹永孝, 刘静, 等. 克痹康胶囊的抗炎、抑制免疫和镇痛作用[J]. 中成药, 2006, 28(8): 1200-1202.
- [18] 赵会勤, 李超杰, 徐玉洁, 等. 瑶药岗松抗佐剂性关节炎的实验研究[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(5): 37-41.
- [19] 吕邵娃, 苏红, 于风明, 等. 类叶牡丹提取物对佐剂性关节炎大鼠治疗作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(2): 164-171.
- [20] 鄢顺琴, 吴榛清, 凤良元, 等. 芍药甘草汤的镇痛作用机制[J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(6): 42-44.
- [21] 莫晓川, 冯光霞, 曾佳, 等. 苗药四大血对佐剂性关节炎大鼠抗炎作用研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(1): 15-18.
- [22] 姜辉, 刘健, 高家荣, 等. 五味温通除痹胶囊对类风湿性关节炎风寒湿痹阻证模型大鼠的治疗作用[J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(6): 23-27.
- [23] 曾聪彦, 吴凤荣, 戴卫波, 等. 宽筋藤对类风湿性关节炎模型大鼠踝关节组织病理学的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(1): 147-151.
- [24] 曹艳红, 胡建东. 中医药治疗类风湿性关节炎研究进展[J]. 河南中医, 2015, 35(7): 1564-1566.
- [25] 高远, 李永吉. 类风湿性关节炎发病机制及中药靶向治疗的研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(35): 5030-5034.
- [26] 徐晖, 黄颖. 中药治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(1): 88-90.
- [27] 吴晶金. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(12): 70-73.
- [28] 许家栋, 上官嫵婉, 徐孟杰, 等. 类风湿关节炎的氧化应激与 SOD 抗氧化研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(7): 65-70.

香附挥发油对慢性束缚应激小鼠焦虑行为的影响

李世英, 谢云亮*

(北华大学附属医院, 吉林 吉林 132013)

摘要: 目的 探讨香附挥发油对慢性束缚应激小鼠焦虑行为的影响。方法 60 只小鼠随机分为正常组、模型组、氟西汀组 (20 mg/kg) 及香附挥发油高剂量组 (200 mg/kg)、中剂量组 (100 mg/kg)、低剂量组 (50 mg/kg), 每组 10 只, 采用慢性束缚应激法建立小鼠焦虑模型。通过强迫游泳实验、悬尾实验、旷场实验、明暗箱实验、高架十字迷宫实验分析挥发油对小鼠焦虑行为的影响, 并检测海马乙酰胆碱酯酶 (AChE)、5-羟色胺 (5-HT) 水平。结果 与模型组比较, 香附挥发油组可减少强迫游泳不动时间及悬尾不动时间, 提高进入旷场中央区域次数、中央区域时间及直立次数, 增加明箱停留时间、明暗箱穿梭次数及进入开臂次数、开臂停留时间, 同时还能降低 AChE 水平, 升高 5-HT 水平, 以上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 香附挥发油能改善慢性束缚应激小鼠焦虑行为, 其作用机制可能与调节中枢胆碱能系统、增加海马单胺类递质 5-HT 水平有关。

关键词: 香附; 挥发油; 慢性束缚应激; 焦虑行为

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)10-2140-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.10.006

Effects of volatile oils from *Cyperus rotundus* on the anxiety behaviors of mice exposed to chronic restraint stress

LI Shi-ying, XIE Yun-liang*

收稿日期: 2017-07-14

基金项目: 吉林省教育厅“十二五”科学研究计划项目 (吉教科文合字 [2014] 499)

作者简介: 李世英 (1977—), 男, 硕士, 主治医师, 从事神经系统疾病的诊断及治疗研究。E-mail: lishiying1979@126.com

* 通信作者: 谢云亮 (1980—), 男, 博士, 副主任医师, 从事神经系统疾病的诊断及治疗研究。Tel: 13944225857, E-mail: 2047415819@qq.com

(The Hospital Affiliated to Beihua University, Jilin 132013, China)

KEY WORDS: *Cyperus rotundus* L.; volatile oils; chronic restraint stress; anxiety behaviors

焦虑症是指机体面对环境中一些不确定、潜在的压力或威胁时所产生的正常反应,包括行为、认知、情绪的改变,以发作性惊恐或持续性恐惧、担心、紧张为主要特征,并伴有运动不安、植物神经系统症状等^[1]。随着当今生活压力增加、生活节奏加快、竞争日益加剧等因素,焦虑症患者数量呈逐年升高趋势,目前临床上使用的抗焦虑药物主要包括氟西汀、地西洋、丁螺环酮等,但均存在较多副作用,从而限制了其临床使用^[2]。

香附又名香草头,始载于《名医别录》,为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎,性平,味辛、微甘、苦,具有理气解郁之功效,其正丁醇萃取部位和醇提物乙酸乙酯萃取部位对“行为绝望”动物模型有较明显的改善作用^[3],与夏枯草配伍的水煎剂有改善小鼠焦虑行为作用^[4]。挥发油为香附主要活性成分,包括多种单萜、倍半萜及其氧化物,具有较好的镇痛效果^[5],但该成分是否具有抗焦虑作用尚不明确。因此,本实验采用慢性束缚应激法建立小鼠焦虑模型,并通过神经行为学实验分析香附挥发油对其的影响。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雄性,体质量(20±2)g,由吉林大学实验动物中心提供,许可证号SCXK(吉)2011-0004。

1.2 试剂 香附购于当地药材市场,经专家鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的根茎,其挥发油为本实验室根据文献^[6]自制,收率0.35%,即1g挥发油相当于285.71g生药量,香附烯、 α -香附酮是其主要成分,两者总含有量32.51%。氟西汀购于澳大利亚艾华大药厂,批号141104;AChE测定试剂盒、5-HT酶联免疫试剂盒购于上海酶联生物技术公司,批号20160523、20160422。

1.3 仪器 ZS-XWT型小鼠悬尾实验视频分析系统,购于北京众实迪科技发展有限公司;TM-Vision型行为学实验系统,购于成都泰盟软件有限公司;L2S型分光光度计,购于上海精密仪器仪表公司;HBS-1096A型酶联免疫检测仪,购于南京德铁实验设备有限公司。

2 方法

2.1 建模、分组与给药 60只小鼠按体质量随机

分为6组,即正常组、模型组、氟西汀组(20 mg/kg)、香附挥发油高剂量组(200 mg/kg)、香附挥发油中剂量组(100 mg/kg)、香附挥发油低剂量组(50 mg/kg),每组10只。模型组、氟西汀组、香附挥发油组小鼠每日在束缚管中放置1h,除模型组外各组于0.5h后灌胃给予相应药物,连续30d。

2.2 强迫游泳实验^[7] 实验装置为一个直径为14cm、高度为22cm的透明玻璃容器,在水温(25±0.5)℃、水深10cm条件下测试。小鼠自由游泳,当表现为头露出水面呈漂浮状态而不寻求逃脱时,表明其处于无助和绝望状态,测试时间为6min,记录后4min内小鼠累积不动时间。

2.3 悬尾实验^[8] 实验装置由6个活动区域组成,在距小鼠尾尖2cm处用医用胶布将其黏附于固定杆处,固定磁铁吸附于活动箱通道顶部,确保小鼠可在头部距底面5cm处倒置悬挂。实验全过程由摄像机记录,并依据悬尾实验视频分析系统测定悬尾不动时间。

2.4 旷场实验 旷场实验箱(30cm×30cm)分为周围、中央2个区域,中央区域大小为15cm×15cm。实验时,将小鼠置于中央区域,考察小鼠探究行为,测试时间为5min,记录小鼠进入中央区域次数、停留时间、直立次数。

2.5 明暗箱实验 明暗箱由1个敞开的白色明箱(70cm×25cm×30cm)、1个封闭的黑色暗箱(70cm×25cm×30cm)、两箱之间可自由穿梭的洞(5cm×5cm)三部分构成。测试时,将小鼠放入明箱中,记录其在明箱停留时间及明暗箱穿梭次数,测试时间为5min。

2.6 高架十字迷宫实验 高架十字迷宫由2个开臂(30cm×5cm)、2个闭臂(30cm×5cm)垂直交叉组成,中间为大小5cm×5cm的正方形区域。测试时,将小鼠放入中央的正方形区域内,头部朝向开闭,记录其进入开臂次数(OE)、开臂停留时间(OT),测试时间为5min。

2.7 海马AChE、5-HT水平检测 小鼠摘眼球取血后,颈椎脱臼法处死,取脑并分离海马组织。海马AChE水平检测采用分光光度法,5-HT水平检测采用酶联免疫法,分别按照试剂盒说明书进行操作。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间差异采用 One-way ANOVA 分析结合 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 挥发油对不动时间的影响 与正常组比较, 模型组小鼠强迫游泳不动时间、悬尾不动时间均明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 香附挥发油高、中剂量组的强迫游泳不动时间, 以及高、中、低剂量组的悬尾不动时间均显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

3.2 挥发油对旷场实验指标的影响 与正常组比较, 模型组小鼠进入中央区域次数、中央区域时间、直立次数均显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 香附挥发油组小鼠进入中央区域次数、中央

表 1 挥发油对不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 1 Effect of volatile oils on immobility time ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	强迫游泳不 动时间/s	悬尾不动 时间/s
正常组	—	52.69 ± 10.62	59.87 ± 11.43
模型组	—	86.47 ± 15.17**	97.58 ± 20.64**
氟西汀组	20	56.62 ± 13.18##	62.12 ± 12.37##
香附挥发油高剂量组	200	63.96 ± 12.53##	71.57 ± 13.16##
香附挥发油中剂量组	100	73.48 ± 15.61#	78.33 ± 14.66##
香附挥发油低剂量组	50	79.22 ± 16.03	85.14 ± 16.32#

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

区域时间均显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但只有高剂量组小鼠直立次数显著增加 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 挥发油对旷场实验指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 2 Effects of volatile oils on open-field test indices ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	进入中央区域次数/次	中央区域时间/%	直立次数/次
正常组	—	15.78 ± 3.10	36.57 ± 5.43	19.48 ± 3.52
模型组	—	6.59 ± 1.91**	20.81 ± 4.85**	16.14 ± 4.32**
氟西汀组	20	12.68 ± 2.62##	34.53 ± 5.73##	18.40 ± 3.87#
香附挥发油高剂量组	200	10.04 ± 2.38##	32.27 ± 5.04##	18.25 ± 4.12#
香附挥发油中剂量组	100	8.29 ± 1.65##	29.17 ± 4.11##	17.39 ± 3.68
香附挥发油低剂量组	50	8.11 ± 1.81#	23.51 ± 4.70#	16.73 ± 3.21

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.3 挥发油对明暗箱实验、高架十字迷宫实验指标的影响 与正常组比较, 模型组小鼠明箱停留时间、明暗箱穿梭次数均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 香附挥发油组小鼠明箱停留时间、明暗箱穿梭次数均显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

与正常组比较, 模型组小鼠进入开臂次数、开臂停留时间显著减少, 两者比例显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 香附挥发油高、中剂量组小鼠进入开臂次数、开臂停留时间显著增加, 两者比例显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 挥发油对明暗箱实验、高架十字迷宫实验指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 3 Effects of volatile oils on light/dark box test and indices for elevated plus maze ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	明箱停留时间/%	明暗箱穿梭次数/次	OE/%	OT/%
正常组	—	34.61 ± 5.37	17.65 ± 3.14	47.64 ± 5.70	48.70 ± 5.04
模型组	—	19.52 ± 3.64**	9.49 ± 2.48**	26.55 ± 3.23**	27.13 ± 3.32**
氟西汀组	20	29.51 ± 4.69##	13.61 ± 2.62##	45.25 ± 5.16##	38.45 ± 4.40##
香附挥发油高剂量组	200	27.44 ± 4.30##	13.22 ± 3.45##	41.48 ± 4.21##	35.22 ± 4.03##
香附挥发油中剂量组	100	25.81 ± 3.11##	12.36 ± 3.67##	29.16 ± 3.69##	31.55 ± 4.83#
香附挥发油低剂量组	50	24.43 ± 4.36##	11.53 ± 2.84#	27.43 ± 3.21	29.92 ± 3.65

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.4 挥发油对 AChE、5-HT 水平的影响 与正常组比较, 模型组小鼠 AChE 水平显著升高, 5-HT 水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 香附挥发油组小鼠 AChE 水平均显著下降, 5-HT 水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4。

4 讨论

强迫游泳实验、悬尾实验是评价抗焦虑药物的经典模型, 当动物无法摆脱环境束缚而导致焦虑时, 给予抗焦虑药物后可使其不动时间减少^[9]; 旷场实验通过检测进入旷场中央区域次数、中央区域时间、直立次数等指标, 评价动物对新环境的警

表4 挥发油对AChE、5-HT水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab.4 Effects of volatile oils on AChE and 5-HT levels
($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	AChE/ (U·mg prot ⁻¹)	5-HT/ (ng·mg prot ⁻¹)
正常组	—	19.13 ± 2.75	1.14 ± 0.35
模型组	—	28.82 ± 4.09**	0.76 ± 0.24**
氟西汀组	20	21.50 ± 2.89 ^{##}	1.08 ± 0.28 ^{##}
香附挥发油高剂量组	200	22.16 ± 3.47 ^{##}	1.06 ± 0.19 ^{##}
香附挥发油中剂量组	100	24.31 ± 3.31 ^{##}	0.91 ± 0.14 ^{##}
香附挥发油低剂量组	50	24.87 ± 3.46 ^{##}	0.88 ± 0.13 [#]

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

觉性,以及在新环境下的抑郁样、探索性、自发活动行为,可反映中枢神经系统的兴奋性^[10];明暗箱实验是利用小鼠本身的趋暗习性及在焦虑情况下倾向于在暗箱一侧活动的特点而建立,而高架十字迷宫实验是通过小鼠在高悬空旷环境的恐惧特性及探究特性之间形成的矛盾心理来模仿人类的焦虑状态,两者均广泛用于抗焦虑抑郁药的效果评价^[11-12]。本实验发现,与模型组比较,香附挥发油组可显著减少小鼠强迫游泳不动时间、悬尾不动时间,提高进入旷场中央区域次数、中央区域时间、直立次数,增加明箱停留时间、明暗箱穿梭次数、进入开臂次数、开臂停留时间,表明香附挥发油具有改善慢性束缚应激小鼠焦虑行为的作用。

乙酰胆碱具有维持意识清醒、促进学习记忆等功能,而AChE参与了其分解过程,故脑内该水平对认知功能的影响具有决定性作用^[13];5-HT为单胺类神经递质,其脑内水平异常表达是焦虑症的主要发病机制之一。大量研究表明,当脑内5-HT水平降低时,动物受到应激后焦虑症状更明显;给予抗焦虑药物治疗后,随着该因子水平升高,焦虑症状也得到明显改善^[14]。本实验发现,与模型组比较,香附挥发油组小鼠海马AChE水平显著下降,5-HT水平显著升高,表明香附挥发油改善慢性束缚应激小鼠焦虑行为可能与调节中枢胆碱能系统、增加海马单胺类递质5-HT水平有关,其深入机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 赵洪庆,韩远山,杜青,等.不同时间点不同应激方法致大鼠焦虑样行为的研究[J].中国比较医学杂志,2017,27(1):22-26.

[2] 宋伍,刘萍,姜爽,等.豚豚汤对慢性束缚应激小鼠焦虑的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):139-144.

[3] 周中流,刘永辉.香附提取物的抗抑郁活性及其作用机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):191-193.

[4] 胡静娜.夏枯草香附水煎剂对行为绝望抑郁模型小鼠抗抑郁作用研究[J].浙江中西医结合杂志,2013,23(11):883-885.

[5] 丁平,田友清,陈国胜,等.香附油滴丸抗炎镇痛作用及其物质基础研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(20):172-176.

[6] 金晶,蔡亚玲,赵钟祥,等.香附挥发油提取工艺及主要成分的研究[J].中药材,2006,29(5):490-492.

[7] 李苗苗,王丹,毕文鹏,等.N-棕榈酰乙醇胺对慢性束缚应激小鼠焦虑抑郁样行为的影响[J].中国病理生理杂志,2017,33(3):435-443.

[8] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 85(3): 367-370.

[9] 孙世光,刘健,鹿岩,等.昆明小鼠强迫游泳实验与悬尾实验抑郁模型相关性[J].中国药理学与毒理学杂志,2014,28(1):107-112.

[10] 刘友平,刘田,毕航,等.品系、性别和生物节律对小鼠旷场实验的影响[J].西安交通大学学报(医学版),2014,35(5):634-638.

[11] 孙世光,李子峰,刘健,等.昆明小鼠焦虑与抑郁动物模型相关性研究:明暗箱实验与悬尾实验[J].中国药理学通报,2012,28(2):289-293.

[12] 李宁,唐启盛,赵瑞珍,等.慢性焦虑应激大鼠行为学的变化及高架十字迷宫的测评[J].中华中医药学刊,2010,28(4):711-713.

[13] McHugh S B, Francis A, McAuley J D, et al. Hippocampal acetylcholine depletion has no effect on anxiety, spatial novelty preference, or differential reward for low rates of responding (DRL) performance in rats[J]. *Behav Neurosci*, 2015, 129(4): 491-501.

[14] Zemdegs J, Quesseveur G, Jarriault D, et al. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(13): 2095-2110.