文章编号:1000-5404(2013)03-0237-04

论著

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

李晶晶,汤建林,胡岚岚,周世文,周吉银 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院临床药理基地)

[摘要] **目的** 考察钩藤总碱(rhynchophylla total alkaloids,RTA)抗焦虑药效。**方法** 采用国际通用的大鼠高架十字迷宫焦虑动物模型(elevated plus-maze anxiety animal model,EPM)和小鼠期待性焦虑实验,观察RTA Ⅰ组[200 mg/(kg·d)]、RTA Ⅱ组[400 mg/(kg·d)]、RTA Ⅲ组[800 mg/(kg·d)]3个剂量组对大、小鼠焦虑行为学的影响;采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定RTA干预前后EPM大鼠的脑组织内去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和5-羟色胺(5-HT)单胺类神经递质的含量。**结果** 与空白对照组比较,RTA 3个剂量组大鼠进入开放臂次数比例(OE%)和在开放臂滞留时间比例(OT%)有显著升高($P<0.05$),RTA 3个剂量组小鼠均无应激性体温升高,RTA Ⅲ组EPM大鼠脑组织中NE、DA、5-HT含量较空白对照组显著下降($P<0.05$)。**结论** 在大鼠EPM和小鼠期待性焦虑实验中,RTA显示出一定的抗焦虑作用,其作用机制可能与降低EPM刺激后大鼠脑组织中NE、DA和5-HT含量有关。

[关键词] 钩藤总碱;高架十字迷宫模型;小鼠期待性焦虑实验;单胺神经递质;抗焦虑
[中图法分类号] R285.5; R338.14; R749.72 [文献标志码] A

Effect of rhynchophylla total alkaloids on behavior and contents of monoamine neurotransmitters in brain tissues of anxiety model rats

Li Jingjing, Tang Jianlin, Hu Lanlan, Zhou Shiwen, Zhou Jiyin (Base for Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the putative anxiolytic effect of rhynchophylla total alkaloids (RTA). **Methods** The internationally accepted elevated plus-maze anxiety animal model (EPM) in rats and the anticipatory anxiety experiment in mice were performed to observe the effects of RTA Ⅰ [200 mg/(kg·d)], RTA Ⅱ [400 mg/(kg·d)] and RTA Ⅲ [800 mg/(kg·d)] on the behavior of rats and mice. Then the contents of monoamine neurotransmitters including norepinephrine (NE), dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in rat brain tissues were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the control group, the percentage of the times of rats entering the open arm (OE%) and percentage of time spent in the open arm (OT%) were significantly higher ($P<0.05$) in all the RTA treatment groups. There was no stress-induced hyperthermia (SIH) in the mice of three RTA groups. The contents of NE, DA and 5-HT in rat brain tissues decreased significantly in all the RTA groups as compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusion** According to the rat EMP model and mice anticipatory anxiety experiment, RTA shows certain anxiolytic effect, and the mechanism may be related to the reduction of NE, DA and 5-HT in the brain tissues of EMP rats.

[**Key words**] rhynchophylla total alkaloids; elevated plus-maze anxiety animal model; monoamine neurotransmitters; behavior; anti-anxiety

Corresponding author: Tang Jianlin, Tel: 86-23-68755311, E-mail: jltang6317@163.com

钩藤属茜草科植物,带钩茎枝入药,性凉、味甘苦,具有清热平肝、息风定惊的功效[1],其作为我国传统中药已有悠久的使用历史,主要有效成分为钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱和异去氢钩藤碱等四环氧化单萜吲哚生物碱[2-3]。现代实验研究表明,钩藤生物碱除了具有对心血管系统,包括降血压、抗心律失常、舒张血管平滑肌等药理作用外还对中枢神经系统产生影

[通信作者] 汤建林,电话:(023)68755311,E-mail:jltang6317@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.0854.002.html(2012-12-19)

响,例如镇静、抗惊厥、抗癫痫、脑保护和神经细胞保护等[4-7]。Jung等[8]研究显示钩藤水提物是经由神经系统作用的有效抗焦虑剂,其药效影响与中枢5-羟色胺(5-HT)能神经递质密切相关。为了进一步探讨钩藤总碱(rhynchophylla total alkaloids,RTA)的抗焦虑作用以及其与脑组织单胺类神经递质的关系,本研究采用国际通用的大鼠高架十字迷宫焦虑动物模型(elevated plus-maze anxiety animal model,EPM)和小鼠期待性焦虑实验,通过观察RTA对动物行为学的影响考察其抗焦虑作用,并用酶联免疫吸附法(ELISA)检测RTA对EPM大鼠脑组织内单胺类递质去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和5-HT含量的影响,认识其可能相关的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性成年SD大鼠88只,级别SPF/VAF,体质量(200±50)g;健康雄性成年昆明小鼠90只,级别SPF/VAF,体质量(20±5)g,均购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

1.2 实验药品

RTA:自制,由钩藤药材粉碎,过筛,酸化乙醇超声提取,减压回收乙醇,调pH值至10~11,氯仿萃取,回收挥干,减压干燥得钩藤总碱,-20 ℃冰箱保存备用。经HPLC法含量测定RTA中主要有效成分钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱,含量达69%,符合中药5类新药开发标准。钩藤药材购于中药材公司,产地湖南,经本室张恃平副主任药师鉴定。地西泮注射液(DZP):国药准字H12020957,2 mL∶10 mg,购于天津金耀氨基酸有限公司。二甲亚砜(DMSO)AR购于成都科龙化工试剂厂。

1.3 仪器与试剂

高架十字迷宫系统购于淮北正华生物仪器设备有限公司;数字测温仪(直径2 mm)XGN82 101221购于北京业之恒科技有限公司;大鼠NE、DA、5-HT ELISA检测试剂盒购于上海源叶生物科技有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及处理 实验大鼠购进后适应性饲养1周,采用完全随机化法将60只大鼠分为空白对照组(等容积的20% DMSO水溶液)、DZP阳性对照组[5 mg/(kg·d)]、RTAⅠ[200 mg/(kg·d)]、RTAⅡ[400 mg/(kg·d)]、RTAⅢ组[800 mg/(kg·d)],每组12只,各组每天上午灌胃给药,连续7 d,于第7天末次给药30 min后做EMP行为学测试,实验时间为8:00-13:00。

实验大鼠购进后适应性饲养1周,采用完全随机化法将28只大鼠分为空白对照未经EPM刺激组、空白对照EPM刺激组和RTAⅢ未经EPM刺激组、RTAⅢ EPM刺激组(本实验拟考察RTA抗焦虑的初步作用机制,遂采取EPM行为学测试影响最大的RTAⅢ组检测),每组7只,每天上午灌胃给药,连续3 d,第3天给药30 min后空白对照EPM刺激组和RTAⅢ EPM刺激组进行EPM行为学测试,空白对照未经EPM刺激组和RTAⅢ未经EPM刺激组不进行测试,随后即刻取4组大鼠脑组织。

实验小鼠购进后适应性饲养1周,采用完全随机化法将小鼠分为5组(同大鼠),每组18只,分别随机抽取6只小鼠标记上1~6号,饲养期间对每组小鼠时常进行离群的抓取动作练习,各组每天上午灌胃给药,连续7 d,于第7天末次给药45 min后进行测肛温实验。实验在8:00-12:00进行。

1.4.2 实验焦虑模型行为学测试

1.4.2.1 EPM 模型装置由呈"十"字形的4个臂区组成,其中2个为开放臂区(无围墙),2个为密闭臂区(有围墙),提升固定于距地面50 cm高度。测试时将大鼠头部正对其中1个开放臂放入十字迷宫的中央,观察大鼠的活动情况。正常情况下,大鼠回避进入开放臂区而局限在密闭臂区活动,如果在开放臂区的进入次数和停留时间的百分比增加,提示抗焦虑反应的发生。

测试条件:实验室内光线昏暗(以1.5 m距离处能辨别大鼠细微活动的最低亮度为准),保持安静,室温(20±5)℃。测试箱放置于实验室一角,周围2 m不透光高布遮挡。实验过程中有1名人员专门负责大鼠的抓取,1名人员擦拭迷宫,1名事先经过EPM测试仪培训的人员电脑操作观察记录大鼠的行为活动。

测试指标:迷宫测试前将每只准备实验的大鼠提前单独放入1个塑料盒中,任其自由探究活动5 min后由专人迅速置于EPM的中央平台处,使其头部正对其中1个开放臂,释放后即开始记录下述指标:①进入开放臂次数(open arm entry, OE):实验大鼠进入到任一开放臂的次数,以大鼠4只爪均进入开放臂内为准,中途如果1只爪从该臂中完全退出则为该次进入活动完成;②进入开放臂时间(open arm time,OT):实验大鼠进入开放臂的时间(s);③进入封闭臂次数(close arm entry, CE):实验大鼠进入到任一封闭臂的次数,标准同开放臂;④进入封闭臂时间(close arm time, CT):进入封闭臂的时间(s)。由上述指标分别计算出:①进入开放臂次数比例(OE%):OE/(OE+CE)×100%;②在开放臂停留时间比例(OT%):OT/(OT+CT)×100%;③进入开放臂和封闭臂的总次数(OE+CE):表示大鼠的运动活力。每只大鼠测试5 min。

1.4.2.2 小鼠期待性焦虑实验 小鼠灌胃给药45 min后,将编号1、2、3的3只小鼠按顺序取出,固定,从肛门插入数字测温仪的热敏电阻探子,进入直肠约3 cm,测定直肠温度,每只平均操作时间控制在10 min以内,取其均值作为基础体温,其余未编号的12只小鼠只是依次抓取1只放回笼内,不测体温,最后依次测定4、5、6号小鼠的体温,取其均值作为基础体温,最后4、5、6号小鼠与前面的1、2、3号小鼠体温差值为体温增加值。

1.4.3 大鼠脑组织取材和脑匀浆样品的制备 空白对照未经EPM刺激组、空白对照EPM刺激组和RTAⅢ未经EPM刺激组、RTAⅢ EPM刺激组大鼠立即断头处死,迅速在冰盘上剥离出脑组织,用冰冷的生理盐水冲洗除去血液,滤纸拭干称量。

按1 g脑组织加入10 mL冰生理盐水的比例置入玻璃匀浆器中,冰浴下匀浆。将组织匀浆液转入10 mL离心管中,置冷冻离心机(4 ℃)内以离心半径1 cm,3 000 r/min,低温离心20 min,取上清液分装待测。每只大鼠样本测2份。

1.4.4 单胺类神经递质测定 试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验。往预先包被(NE、DA、5-HT)抗体的包被微孔中,依次加入标本、标准品、HRP标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤。用底物TMB显色,TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品的NE、DA、5-HT呈正相关。用酶标仪在450 nm波长下测定光密度值[$D(450)$]。

1.5 统计学分析

采用SPSS 11.0统计软件,结果以$\bar{x} \pm s$表示,组间数据比较行t检验。

2 结果

2.1 RTA对EPM大鼠OE+CE、OE%、OT%的影响

与空白对照组比较,RTA 3个剂量组大鼠OE%和OT%显著高于空白对照组($P<0.05$),与DZP阳性对照组比较,没有统计学差异($P>0.05$)。与空白对照组比较,RTAⅢ组OE+CE明显高于空白对照组($P<0.05$),说明本剂量下大鼠的运动能力有所增加,提示其抗焦虑作用下不影响大鼠的运动能力。见表1。

表1 RTA对EPM大鼠OE%、OT%、OE+CE的影响($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

组别	OE%(%)	OT%(%)	OE+CE
空白对照组	30.01±3.48	34.05±4.59	12.00±1.64
DZP阳性对照组	43.56±3.32[a]	43.18±5.37[a]	12.50±2.70
RTAⅠ组	41.18±4.60[a]	41.25±4.36[a]	12.00±1.64
RTAⅡ组	42.34±3.94[a]	44.02±5.64[a]	14.00±2.24
RTAⅢ组	48.11±5.65[a]	45.54±6.59[a]	16.00±2.63[a]

a: $P<0.05$,与空白对照组比较

2.2 RTA对小鼠期待性焦虑实验的影响

空白对照组显示出应激性体温升高现象,阳性对照组和RTA 3个剂量组小鼠均未产生此现象,表现出抗焦虑作用。见表2。

表2 小鼠期待性焦虑实验结果(℃,$n=18$)

组别	编号1、2、3小鼠的平均体温	编号4、5、6小鼠的平均体温	温差
空白对照组	35.9	37.1	1.2
DZP阳性对照组	36.2	36.2	0.0
RTAⅠ组	36.9	36.6	0.3
RTAⅡ组	37.0	36.7	0.3
RTAⅢ组	36.9	36.8	0.1

中间未编号的12只小鼠只做依次抓取动作,不测体温

2.3 RTA对EPM大鼠脑组织单胺类递质的影响

EPM刺激后,空白对照组较未经EPM刺激空白对照组大鼠脑组织NE、DA、5-HT含量显著升高($P<0.05$);RTAⅢ组与空白对照组比较,大鼠脑组织NE、DA、5-HT含量均有不同程度的降低($P<0.05$)。见表3。

表3 RTA对EPM大鼠脑组织NE、DA、5-HT含量的影响

(pg/mL,$n=7$,$\bar{x} \pm s$)

组别	NE	DA	5-HT
空白对照组			
未经EPM刺激	116.48±19.13	16.98±4.97	60.76±12.64
EPM刺激后	146.67±29.19[b]	21.37±7.56[b]	70.05±25.48[b]
RTAⅢ组			
未经EPM刺激	110.32±15.78	17.54±3.72	63.43±11.67
EPM刺激后	101.12±17.16[a]	17.36±5.15[a]	61.32±10.35[a]

a: $P<0.05$,与空白对照组比较; b: $P<0.05$,与未经EPM刺激比较

3 讨论

钩藤作为我国传统中药,在镇静、安神方面已有悠久的使用历史,且资源丰富。本实验采用EPM和小鼠期待性焦虑实验进行RTA抗焦虑药效研究,EPM模型为抗焦虑研究中国际公认的经典且应用最广泛的焦虑模型[9-10],具有简便快速、敏感性好等优点,它为非条件反射焦虑模型中的探究行为模型,动物不需特殊训练,以自发行为为基础,利用实验动物对新异环境的探究特性和对高悬敞开臂的恐惧心理,形成动物的矛盾冲突来考察大鼠的焦虑状态。本实验观察到RTA 3个剂量组大鼠OE%和OT%值显著高于空白对照组,RTAⅢ剂量组OE+CE明显高于空白对照组,在大鼠EMP模型上表现出抗焦虑作用,其作用效果与地西泮相当,且其抗焦虑作用下不影响大鼠的运动能力。小鼠期待性焦虑实验属于应激行为焦虑模型,此模型对抗焦虑药特异性较好,通过考察小鼠有无应激性体温升高现象产生发现,苯二氮卓类和丁螺环酮等抗焦虑药可抑制应激性体温升高,非抗焦虑药则无此作用。本研究表明RTA 3个剂量组均可对抗由应激所产生的小鼠体温升高,有明显的抗焦虑作用。本研究结果说明RTA具有一定的抗焦虑作用,但其定论还需要更多的实验论证。值得注意的是,现代流行病学研究显示,血压与精神、心理问题之间有密切的关系,血压升高的幅度与抑郁焦虑的严重程度通常呈正相关,而焦虑诱导的生理变化也使机体会产生心率加快、血压升高等症状。张淑英等[11]报道在西药治疗高血压病的基础上,配合服用中药汤剂天麻钩藤饮加减,治疗高血压病伴焦虑状态者收到满意效果。目前钩藤的降压药理作用已经得到明确肯定,如果其在抗焦虑的药效上能得到完全论证,这对临床高血压和焦虑症的治疗具有深刻意义。

焦虑症的发病机制与突触间隙NE、DA、5-HT等单胺类神经递质浓度的改变密切相关。NE能神经起源于蓝斑、腹侧背盖和孤束核等处,分布在丘脑、大脑

皮质、杏仁核、海马和下丘脑等参与焦虑和恐惧的脑区，与促肾上腺皮质激素释放激素神经元共存，组成蓝斑-NE-交感神经系统，共同参与应激反应，在动物的警醒和焦虑中起主导作用。Nutt 等[12]研究显示能促使蓝斑冲动释放增加的药物育亨宾可通过选择性阻断突触前 2a 受体，产生负反馈调节，促进 NE 释放，激发焦虑，相反的能促使蓝斑释放减少的药物如苯二氮卓类药物、三环类抗抑郁药、普萘洛尔等则有抗焦虑作用。DA 作为一种神经递质能够影响脑部的精神、情绪部位。其受体有 2 种亚型 D_1 和 D_2，当 D_1 受体功能不足时，前额皮质不再能抑制杏仁核，杏仁核脱抑制性兴奋，引起害怕和病理性焦虑，激动 D_2 受体直接激动杏仁核外侧核从而导致焦虑，而三氟拉嗪可阻断 D_2 受体起到抗焦虑的作用。一些神经安定药物，如氯丙嗪、氯哌啶醇共性是都具有对 DA 的拮抗作用。5-HT 系统起源于中缝核投射到黑质纹状体、边缘系统和皮质，广泛存在于与焦虑相关的脑区。动物研究文献提示有各种不同 5-HT 机制参与焦虑的产生，如 Toth[13]在新奇事物实验中得到 5-HT_{1A} 受体敲除小鼠对新奇事物的探究时间，探究活动和接近次数减少，在高架圆形迷宫实验中显示 5-HT_{1A} 受体敲除小鼠进入开区的次数和在开区的时间明显减少，与 EPM 结果相似。Graeff 等[14]研究显示，应激性刺激能激活下丘脑 5-HT_{1A} 突触后受体，表现出适应性和保护性焦虑。临床药物氯氮平通过抗 5-HT_{2A} 和 DA 受体既能改善焦虑失眠又缓解焦虑症状。另外，5-HT 能改变 NE 和 DA 在海马和额叶前部皮质中的释放。通过对蓝斑核的效应，5-HT 能够稳定唤醒状态防止未控制的焦虑和惊恐发生，也可以减弱额叶前部的活动来降低心理上的焦虑表现。本研究通过 ELISA 试剂盒检测未经 EMP 刺激和 EMP 刺激后空白对照组与 RTA 组大鼠脑内 NE、DA 和 5-HT 的含量，结果显示 EPM 刺激后空白对照组大鼠比未经 EPM 刺激的空白对照组大鼠脑内 NE、DA 和 5-HT 的含量显著增高，说明焦虑刺激后大鼠脑内 NE、DA 和 5-HT 有升高；EPM 刺激后 RTA 组与空白对照组比较，可使 EPM 大鼠脑内 NE、DA 和5-HT 含量产生降低，表明 RTA 对焦虑后的单胺类神经递质具有调节作用，可能是其抗焦虑作用机制之一。焦虑症作为一个复杂的神经官能症，其发生又受生物、社会、心理因素等综合影响，所以 RTA 抗焦虑作用机制有待进一步研究。

综上所述，本研究结果表明 RTA 在大鼠 EPM 和小鼠期待性焦虑实验中显示具有抗焦虑作用，对大鼠脑内单胺类神经递质具有调节作用，可能是其抗焦虑作用机制之一。这为发挥中医药优势，开发疗效确切，副作用较少，安全性高的抗焦虑中药提供了一定的实验依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版 一部[M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：240.

[2] Zhang W B, Chen C X, Sim S M, *et al*. *In vitro* vasodilator mechanisms of the indole alkaloids rhynchophylline and isorhynchophylline, isolated from the hook of Uncaria rhynchophylla (Miquel) [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004, 369(2): 232 – 238.

[3] Kim T J, Lee J H, Lee J J, *et al*. Corynoxeine isolated from the hook of Uncaria rhynchophylla inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation through the blocking of extracellular signal regulated kinase 1/2 phosphorylation [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(11): 2073 – 2078.

[4] Sakakibara I, Terabayashi S, Kubo M, *et al*. Effect on locomotion of indole alkaloids from the hooks of uncaria plants [J]. Phytomedicine, 1999, 6(3): 163 – 168.

[5] Hsieh C L, Tang N Y, Chiang S Y, *et al*. Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs, Uncaria rhynchophylla (MIQ) Jack and Gastrodia elata BI. in Kainic acid-treated rats[J]. Life Sci, 1999, 65(20): 2071 – 2082.

[6] Lee J, Son D, Lee P, *et al*. Alkaloid fraction of Uncaria rhynchophylla protects against N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in rat hippocampal slices [J]. Neurosci Lett, 2003, 348(1): 51 – 55.

[7] Shimada Y, Goto H, Itoh T, *et al*. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of Uncaria sinensis on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats[J]. J Pharm Pharmacol, 1999, 51(6): 715 – 722.

[8] Jung J W, Ahn N Y, Oh H R, *et al*. Anxiolytic effects of the aqueous extract of Uncaria rhynchophylla[J]. J Ethnopharmacol, 2006, 108(2): 193 – 197.

[9] Dalvi A, Rodgers R J. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1999, 62(4): 727 – 734.

[10] Moraes C L, Bertoglio L J, Carobrez A P. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze [J]. Behav Brain Res, 2008, 194(2): 181 – 186.

[11] 张淑英，杨锡燕. 天麻钩藤饮配合西药治疗高血压病伴焦虑状态的临床观察[J]. 天津中医药，2011，28(3)：191 – 193.

[12] Nutt D, Lawson C. Panic attacks. A neurochemical overview of models and mechanisms[J]. Br J Psychiatry, 1992(160): 165 – 178.

[13] Toth M. 5-HT1A receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 463(1/3): 177 – 184.

[14] Graeff F G, Netto C F, Zangrossi H Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1998, 23(2): 237 – 246.

（**收稿**：2012-10-11；**修回**：2012-12-04）

（编辑 张 维）