

石菖蒲挥发油和水煎液的抗焦虑作用

冯波, 靖慧军, 郭敏娟, 崔瑛*, 孙婷婷, 李乾胜, 张志娟
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:观察石菖蒲抗焦虑作用并探讨其作用机制。方法:将昆明种雄性小鼠随机分为 8 组($n=12$),分别为模型对照组、阳性对照组、石菖蒲挥发油高、中、低剂量组($10, 5, 2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),石菖蒲水煎液高、中、低剂量组($20, 15, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),模型组 ig 生理盐水,阳性组 ig 地西洋($2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),连续 ig 给药 5 d,末次给药 0.5 h 后进行高架十字迷宫实验和明暗箱实验,观察石菖蒲对小鼠焦虑行为的干预作用。用酶联免疫法测定小鼠脑内 γ -氨基丁酸(GABA),谷氨酸(Glu),五羟色胺(5-HT)的含量。结果:①石菖蒲挥发油高、低剂量组和水煎液中、低剂量组能明显增加小鼠在高架十字迷宫装置上的开臂滞留时间(OT%, $P<0.05$),能明显增加小鼠的开臂进入次数(OE%, $P<0.05$)。②石菖蒲挥发油剂量组和水煎液高剂量组能显著增加小鼠脑内 GABA 的含量($P<0.05$);石菖蒲挥发油中、低剂量组和水煎液 3 个剂量组能显著降低小鼠脑内 Glu 的含量($P<0.05$);石菖蒲挥发油 3 个剂量组和水煎液 3 个剂量组能显著降低小鼠脑内 5-HT 的含量($P<0.05$)。结论:石菖蒲挥发油和水煎液在小鼠高架十字迷宫模型和明暗箱模型上均表现出抗焦虑作用,其作用效果与地西洋类似。作用机制可能与提高中枢 GABA 含量,降低 Glu 和 5-HT 含量有关。

[关键词] 石菖蒲; 高架十字迷宫; 明暗箱; 抗焦虑

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0207-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014090207

Antianxiety Effects of *Acorus tatarinowii* Volatile Oil
and Water Decoction

FENG Bo, JING Hui-jun, GUO Ming-juan, CUI Ying*, SUN Ting-ting, LI Qian-sheng, ZHANG Zhi-juan
(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the antianxiety effects of *Acorus tatarinowii* and to explore its mechanism of action. **Method:** The Kunming male mice were randomly divided into 8 groups ($n=12$), the model group, control group, positive control group diazepam (DZP), volatile oil of *A. tatarinowii* (VO) high dose group, middle dose group and low dose group ($10, 5, 2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), water decoction of *A. tatarinowii* (WD) high dose group, middle dose group and low dose group ($20, 15, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), the model control group intragastric administration physiological saline, positive control group intragastric administration DZP ($2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), continuous intragastric administration five days, 0.5 h after the last intragastric administration, do the elevated plus maze test and light-dark transitions test, to observe the intervention effect of *A. tatarinowii* Schott on anxiety behavior in mice. Determine the content of γ -aminobutyric acid (GABA), glutamic acid (Glu), serotonin (5-HT) in the mice brain by enzyme linked immunosorbent assay. **Result:** ①The VO high, low dose group and WD low dose group could significantly increase the mouse open arms in the elevated plus maze apparatuson the retention time of residence time than the open arm (OT)% ($P<0.05$); The VO high, middle dose group and WD middle, low dose group could obviously increase the number of open arm of mice in the

[收稿日期] 20131213(014)

[基金项目] 郑州市科技创新领军人才项目(121PLJRC534)

[第一作者] 冯波, 硕士研究生, 从事中药抗焦虑研究, Tel:13525559938, E-mail:fengbo0904@126.com

[通讯作者] * 崔瑛, 博士, 教授, 从事中药药性及中药抗焦虑研究, Tel:0371-86535313, E-mail:cyexin@126.com

elevated plus maze apparatus into the number of the number of open arm ratio (OE)% ($P < 0.05$). ②The VO dose group and WD high dose group could significantly increase the content of GABA in brain tissue of mice ($P < 0.05$). The VO middle, low group and WD dose group could significantly reduce the content of Glu in brain of mice ($P < 0.05$). The VO dose group and WD dose group could significantly reduce the content of 5-HT in brain of mice ($P < 0.05$). **Conclusion:** The VO dose group and WD dose group of *A. tatarinowii* in mice with elevated plus maze model and light-dark transitions test model showed anti anxiety effect, its effect is similar with diazepam. The mechanism may be related to the increasing GABA content, reducing the content of 5-HT and Glu.

[**Key words**] *Acorus tatarinowii*; elevated plus maze; light-dark transitions test; antianxiety

石菖蒲为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott. 的根茎,始载于《神农本草经》,具有化湿开胃,开窍豁痰,醒神益智的功能,用于脘痞不饥,噤口下痢,神昏癫痫,健忘耳聋。石菖蒲的主要有效部位是其挥发性成分,其中发挥作用的主要活性成分是 α -细辛醚和 β -细辛醚^[1]。大量实验表明,石菖蒲挥发油既具有兴奋、抗抑郁、抗缺氧作用,又具有镇静、催眠、抗惊厥作用,同时也有较好的益智、脑保护作用^[2]。本实验是基于其镇静、催眠作用,对其抗焦虑作用进行观察。

1 材料

1.1 仪器 PM-200 型高架十字迷宫装置(成都泰盟科技有限公司),小鼠明暗箱装置[实验室自制,一箱为明室(15 cm × 10 cm × 20 cm),另一箱为暗室(25 cm × 10 cm × 20 cm),两室有一圆形孔相通],TGL-16gR 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),微量移液器(上海雷勃分析仪器有限公司),XK96 型快速混匀器(中国姜堰市新康医疗器械有限公司),EL-S 型电子天平(常州市天之平仪器设备有限公司),680 型酶免仪(美国 Bio-Rad Laboratories),JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药物与试剂 石菖蒲购于河南中医学院第三附属医院,产地安徽,批号 120501,经河南中医学院陈随清教授鉴定为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott. 的根茎,质量标准符合《中国药典》2010 年版一部要求。地西洋(天津力生制药股份有限公司,批号 1101001)。氯化钠注射液(河南双鹤华利药业有限公司,批号 13020605B)。聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(吐温-80,天津市永大化学试剂开发中心,化学纯,批号 20080328)。 γ -氨基丁酸(GABA)检测试剂盒(批号 20130202B);谷氨酸(Glu)检测试剂盒(批号 20130202B);5-羟色胺(5-HT)检测试剂盒(批号 20130202B)均为 R&D 生产。

1.3 动物 SPF 级昆明种小鼠 96 只,雄性,体重 18 ~ 22 g,购自于郑州大学实验动物中心,许可证号 SCXK(豫)2010-0002。分笼饲养在(20 ± 2) °C 的动物室,专人饲养和管理。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 石菖蒲挥发油的提取 挥发油提取采用文献方法^[3],精密称定石菖蒲饮片 60 g,加 8 倍量水,置 1 000 mL 圆底烧瓶中,浸泡 4 h,加一定量的水与玻璃珠数粒,自冷凝管上端加水使充满挥发油测定器的刻度部分,并溢流入烧瓶时为止,将烧瓶置电热套中加热至沸,并保持微沸 6 h,停止加热,放置片刻,开启测定器下端活塞,将水缓缓放出,收集挥发油,用无水硫酸钠脱水,得到橙黄色油 0.6 mL。挥发油用吐温-80、氯化钠注射液配制成 1 g · mL⁻¹ 的溶液(按生药量计算,下同),备用。

2.1.2 石菖蒲水煎液的制备 采用文献方法^[4],精密称取石菖蒲饮片 120 g,加 10 倍量的水,浸泡 1 h。回流提取 1 h,残渣用 1 500 mL 水煎煮 0.5 h。合并两次滤液,浓缩成 2 g · mL⁻¹ 的溶液,备用。

2.2 对高架十字迷宫和明暗箱试验的影响

2.2.1 分组与给药 将 96 只小鼠不限食水饲养 3 d,禁食 24 h 后,称重,标记。随机分为模型对照组(生理盐水),阳性对照组(地西洋 2.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹),挥发油高、中、低剂量组(10, 5, 2.5 g · kg⁻¹ · d⁻¹),水提液高、中、低剂量组(20, 15, 10 g · kg⁻¹ · d⁻¹),每组 12 只。给药体积 10 mL · kg⁻¹,连续给药 5 d。

2.2.2 行为学试验 末次给药 0.5 h 后进行高架十字迷宫实验和明暗箱实验,记录小鼠在高架十字迷宫上 5 min 进入开臂的次数比(OE%)、在开臂的停留时间比(OT%)和小鼠在明暗箱中 10 min 的穿箱次数(TT)。

2.3 小鼠脑组织的处理 小鼠行为学实验结束后,立即断头处死,冰台上迅速剥离全脑,用 1/万天平分别精密称重;以脑组织(g):生理盐水(mL)1:9 的

比例加入冰冷的生理盐水,低温下用超声波细胞粉碎机进行匀浆;匀浆液在 4 ℃,6 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液置 5 mL 离心管中,即得 10% 的小鼠脑匀浆液,然后进行酶联免疫吸附试验,分别测定脑组织中 GABA,Glu 和 5-HT 的含量。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件对结果进行单因素方差分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为有统计学差异。

3 结果

3.1 对小鼠高架十字迷宫和明暗箱行为的影响
与模型对照组比较,阳性对照地西洋组,石菖蒲挥发油高、低剂量组和水煎液中、低剂量组能明显增加小鼠在高架十字迷宫装置上的开臂滞留时间 (*P* < 0.05);阳性对照组,石菖蒲挥发油高、中剂量组和水煎液中、低剂量组能明显增加小鼠在高架十字迷

宫装置上的开臂进入次数比 (*P* < 0.05);阳性对照组能明显增加小鼠明暗箱穿箱次数 (*P* < 0.05),石菖蒲挥发油中、低剂量组和水煎液的低剂量组有增加小鼠明暗箱穿箱次数的作用趋势,没有显著性差异;石菖蒲挥发油和水提液表现出与地西洋相似的抗焦虑作用。见表 1。

3.2 小鼠脑内 GABA, Glu 和 5-HT 含量的影响
与模型对照组比较,阳性对照组,石菖蒲挥发油高、中、低剂量组和水煎液高剂量组能显著增加小鼠脑内 GABA 的含量 (*P* < 0.05);阳性对照组,挥发油中、低剂量组和水煎液高、中、低剂量组能显著降低小鼠脑内 Glu 的含量 (*P* < 0.05);阳性对照组,石菖蒲挥发油高、中、低剂量组和水煎液高、中、低剂量组能显著降低小鼠脑内 5-HT 的含量 (*P* < 0.05)。见表 2。

表 1 石菖蒲对小鼠高架十字迷宫和明暗箱行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	开臂滞留时间比/%	开臂进入次数比/%	穿箱数/次
模型对照	—	41.21 ± 7.96	43.16 ± 8.38	16.00 ± 4.82
地西洋	0.002 5	53.94 ± 10.47 ¹⁾	53.53 ± 9.30 ¹⁾	32.11 ± 8.91 ¹⁾
石菖蒲挥发油	10	51.59 ± 8.02 ¹⁾	52.79 ± 6.99 ¹⁾	16.00 ± 2.24
	5	47.81 ± 7.32	51.06 ± 4.88 ¹⁾	19.78 ± 9.78
	2.5	50.66 ± 5.54 ¹⁾	48.84 ± 5.01	20.22 ± 6.38
石菖蒲水煎液	20	42.83 ± 10.67	45.77 ± 13.74	16.11 ± 5.67
	15	51.72 ± 7.74 ¹⁾	52.21 ± 5.80 ¹⁾	12.56 ± 9.10
	10	50.79 ± 7.55 ¹⁾	52.44 ± 6.37 ¹⁾	19.56 ± 7.70

注:与模型对照组比较¹⁾ *P* < 0.05 (表 2 同)。

表 2 石菖蒲对小鼠脑组织内 GABA, Glu, 5-HT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	GABA/μmol·L ⁻¹	Glu/mg·L ⁻¹	5-HT/μg·L ⁻¹
模型对照	—	1.60 ± 0.33	2.35 ± 0.30	21.19 ± 1.64
地西洋	0.002 5	2.11 ± 0.16 ¹⁾	2.00 ± 0.24 ¹⁾	18.76 ± 1.05 ¹⁾
石菖蒲挥发油	10	2.36 ± 0.20 ¹⁾	2.06 ± 0.16	16.16 ± 1.57 ¹⁾
	5	2.37 ± 0.33 ¹⁾	1.94 ± 0.37 ¹⁾	15.49 ± 1.51 ¹⁾
	2.5	2.54 ± 0.24 ¹⁾	1.75 ± 0.28 ¹⁾	15.95 ± 1.22 ¹⁾
石菖蒲水煎液	20	2.53 ± 0.24 ¹⁾	1.71 ± 0.28 ¹⁾	14.88 ± 1.39 ¹⁾
	15	1.93 ± 0.17	2.03 ± 0.13 ¹⁾	15.14 ± 0.60 ¹⁾
	10	1.96 ± 0.20	1.69 ± 0.24 ¹⁾	12.31 ± 1.18 ¹⁾

4 讨论

高架十字迷宫装置和明暗箱探寻装置是公认的焦虑实验装置。小鼠在高架十字迷宫装置中会出现紧张、担心、恐惧或发作性惊恐等种种焦虑行为,实验指标以进入开臂次数百分比(OE%)、开臂滞留时间百分比(OT%)来反映动物的焦虑状态,焦虑动物

的 OE% 和 OT% 明显降低,经典抗焦虑药物地西洋则使两者升高,通过实验笔者发现石菖蒲显示出与地西洋相似的作用。明暗箱模型以明箱中的亮光作为刺激源,由于小鼠趋暗的习性,小鼠条件反射本能是向暗箱爬行,当它被置于明箱中时,会表现出焦虑神经症的症状^[5]。小鼠在正常情况下更倾向于在

昏暗一边活动,但当焦虑减轻时,就会增加在明暗两边转换次数以及在明亮一边探寻行为的次数,用此来评价实验动物焦虑的程度^[6]。本实验结果显示,阳性对照组能明显增加小鼠明暗箱穿箱次数($P < 0.05$),石菖蒲挥发油中、低剂量和水煎液低剂量有增加小鼠明暗箱穿箱次数的作用趋势。

脑内存在的氨基酸,不仅是合成多种蛋白质的原料,同时还具有突触传递功能^[7]。Glu 属于兴奋性氨基酸,在中枢兴奋性氨基酸中占主导地位;GABA 属于抑制性氨基酸,是中枢神经系统的主要抑制性神经递质^[8]。在中枢神经系统中,最重要的抑制性氨基酸是 γ -氨基丁酸,其在脑组织内广泛存在。40% 以上的抑制性神经传导由 GABA 介导,GABA 可能通过激活受体而对离子通道构成影响,造成突触后膜超级化,抑制突触后电位产生,抑制神经元放电,从而发挥抗焦虑作用,因此 GABA 在控制神经元兴奋性方面,起着非常重要的作用^[9]。5-HT 广泛存在于哺乳动物组织中,特别在大脑皮层及神经突触内含量很高,属于生物原胺类神经递质,是调节神经活动的一种重要物质。中枢 5-HT 系统功能失调会导致抑郁、焦虑、惊恐、强迫等多种精神障碍^[10]。本实验结果显示,石菖蒲挥发油高、中、低剂量组和石菖蒲水煎液高剂量组能显著提高小鼠脑内的 γ -氨基丁酸含量($P < 0.05$);石菖蒲挥发油中、低剂量组和石菖蒲水煎液高、中、低剂量组能显著降低小鼠脑内的 Glu 含量($P < 0.05$);石菖蒲挥发油高、中、低剂量组和水煎液高、中、低剂量组能显著降低小鼠脑内的 5-HT 的含量($P < 0.05$),说明石菖蒲的抗焦虑作用,可能与提高 GABA 含量,降低谷氨酸与 5-HT 含量有关。

有研究表明^[11],石菖蒲的挥发性成分和水煎液是其主要的有效部位,因其能够降低兴奋性氨基酸的水平,从而发挥镇静作用;石菖蒲的挥发性成分、水煎液和去油水煎液,可以减少兴奋性氨基酸的神经毒性,是脑保护作用的主要活性部位;石菖蒲各提

取部位,通过不同的途径,呈现出对中枢神经系统的保护作用。据此我们选取石菖蒲的挥发油、水煎液和去油水煎液进行抗焦虑药效实验,通过多次预实验,我们发现石菖蒲的去油水煎液部位抗焦虑效果不好,因此舍弃去油水煎液部位。石菖蒲抗焦虑的活性物质,尚有待于进一步研究探讨。

[参考文献]

[1] 吴启端,吴清和. 石菖蒲的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(6):477.

[2] 韩亚亮,刘萍,何新荣,等. 石菖蒲挥发油的基本成分及其药理作用研究进展[J]. 中国药物应用与监测,2011,8(2):120.

[3] 李成冲,王晓丽,杨会敏,等. 石菖蒲挥发油提取工艺的正交实验研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2010,31(3):404.

[4] 唐洪梅,席萍. 石菖蒲不同部位镇静抗致惊厥作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(4):45.

[5] 李浩,张华,马铁明,等. 电针对暗箱实验大鼠行为及中缝背核 5-羟色胺作用机制探讨[J]. 实用中医内科杂志,2007,21(8):23.

[6] 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.

[7] 吴立坤. 贯归定志方抗焦虑作用药效学研究及机制探讨[D]. 北京:北京中医药大学,2009.

[8] 王学铭. 精神与精神病的生物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:168.

[9] 赵瑞珍,李宁,李冬梅. 焦虑障碍中医院干预机理研究[J]. 北京中医院大学学报:中医临床版,2012,19(2):9.

[10] 孔秋玲,邹江冰,蒋琳兰. 焦虑症的生化病理机制研究进展[J]. 广东医学,2011,32(21):2869.

[11] 唐洪梅. 石菖蒲对中枢神经系统的作用及机理研究[D]. 广州:广州中医药大学,2001.

[责任编辑 聂淑琴]