

蜘蛛香提取物及总缬草素的抗焦虑活性研究

翟 欣, 孔周扬[#], 王素娟, 蒋益萍, 张 宏, 郑承剑*, 秦路平*

第二军医大学药学院 生药教研室, 上海 200433

摘 要: **目的** 探讨蜘蛛香提取物及蜘蛛香总缬草素的抗焦虑作用及相关机制。**方法** 利用小鼠明暗箱、敞箱、高架十字迷宫和自发性活动实验观察小鼠行为学方面的表现, 评价蜘蛛香提取物及总缬草素抗焦虑作用; 利用 ELISA 试剂盒方法测定小鼠血清皮质酮和脑海马组织中神经递质 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE) 和多巴胺 (DA) 水平。**结果** 蜘蛛香提取物及总缬草素各剂量组对小鼠在明暗箱、敞箱、高架十字迷宫和自发性活动实验中的行为学表现均有改善作用, 且可降低小鼠血清皮质酮水平和下调脑海马组织中神经递质 NE、DA 及 5-HT 的水平。**结论** 蜘蛛香提取物及总缬草素均有抗焦虑作用, 其抗焦虑作用可能是通过作用于丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴系统和调节脑组织神经递质而实现的。

关键词: 蜘蛛香; 总缬草素; 抗焦虑; 皮质酮; 神经递质

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)08-1361-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.019

Study on anti-anxiety activity of extract and total valepotriate in *Valerianae Rhizoma*

ZHAI Xin, KONG Zhou-yang, WANG Su-juan, JIANG Yi-ping, ZHANG Hong, ZHENG Cheng-jian, QIN Lu-ping

Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To explore the anti-anxiety effects of the extract and total valepotriate from *Valerianae Rhizoma* and the relative mechanism. **Methods** The behaviors of mice were investigated in terms of using in light/dark transition test, open field test, and the elevated plus maze test and spontaneous activity. The the anti-anxiety effect of the extract and total valepotriate from *Valerianae Rhizoma* have been studied, serum corticosterone and mouse brain hippocampal tissue in the neurotransmitter 5-serotonin (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) levels were determined by ELISA kit. **Results** The behavior manifestations of mice in the light/black transition test, open field test, spontaneous activity, and elevated plus maze experiment of mice were improved by the extract and total valepotriate from *Valerianae Rhizoma* in each dosage group. Test result showed that they could reduce corticosterone level and down-regulate NE, DA, and 5-HT levels. **Conclusion** The extract and total valepotriate from *Valerianae Rhizoma* have the anti-anxiety effect and the potential to become the anti-anxiety drug.

Key words: *Valerianae Rhizoma*; total valepotriate; anxiolytic; corticosterone; neurotransmitters

蜘蛛香 *Valerianae Rhizoma* 为败酱科 (Valerianaceae) 缬草属 *Valerianae* L. 植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根茎和根, 主产于云南、贵州、四川等地, 具有疏散风热、利咽、透疹、明目退翳、解痉等作用; 主要用于治疗风热感冒、眼痛音哑、麻疹不透、风疹瘙痒、目赤翳障、惊风抽搐和破伤风^[1]。现代研究表明蜘蛛香还具有抗焦虑^[2]、

抗氧化^[3]、抗痉挛^[4]和抗抑郁^[5]等作用。近年来研究发现蜘蛛香中具有镇静、安神和抗抑郁等作用的主要活性成分为缬草素类^[6], 并且其抗焦虑作用也有相关报道^[7]。本研究通过明暗箱、敞箱、高架十字迷宫和自发性活动实验观察小鼠行为学方面的表现, 研究蜘蛛香提取物及蜘蛛香总缬草素的抗焦虑作用, 为蜘蛛香的开发利用和临床应用提供科学依据。

收稿日期: 2015-12-27

基金项目: 全军青年培养项目 (13QN098)

作者简介: 翟 欣 (1993—), 女, 硕士研究生, 主要从事生药活性物质基础及其品质评价研究。E-mail: 13675131502@163.com

孔周扬 (1990—), 男, 硕士研究生, 主要从事生药活性物质基础及其品质评价研究。

*通信作者 秦路平 (1966—), 男, 教授, 主要从事生药活性物质基础及其品质评价研究。E-mail: qinluping@126.com

郑承剑 (1984—), 男, 副教授, 主要从事生药活性物质基础及其品质评价研究。E-mail: zhengchengjian@smmu.edu.cn

[#]并列第一作者

1 材料

1.1 动物

ICR 雄性小鼠, 8 周龄, 体质量 18~24 g, 购买于上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号 SCXK(沪)2014-0007。动物于 20~24 °C, 湿度 60%~70%, 12 h/12 h 明暗的环境中适应性饲养 3 d 后开始实验。

1.2 药物

蜘蛛香药材购于贵州省贵阳市, 经第二军医大学药学院生药学教研室秦路平教授鉴定为败酱科缬草属植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根及根茎。地西洋 [批号 130330, 规格 2.5 mg, 江苏济川制药有限公司, 购于上海长海医院 (第二军医大学第一附属医院)]。

1.3 试剂

聚山梨酯-80、95%乙醇, 上海国药集团化学试剂有限公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS), 上海增博生物科技有限公司; 皮质酮、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 和 5-羟色胺 (5-HT) ELISA 试剂盒 (LDN, 德国, 购于上海 BioTNT 生物科技有限公司)。

1.4 仪器

RF-52C 型旋转蒸发仪及循环水式多用真空泵 SHB-III A (上海豫康科教仪器有限公司); D101 型大孔吸附树脂 (天津振天成有限公司); JLG Y-1 小鼠明暗箱实验视频分析系统、JLG Y-1 小鼠敞箱实验视频分析系统、JLG Y-1 小鼠高架十字迷宫实验视频分析系统、JLG Y-1 小鼠自发性活动实验视频分析系统 (上海吉星生物仪器设备有限公司); 1-15K 型台式高速冷冻离心机 (上海安亭仪器厂); 酶联免疫检测仪 (BIOTEK, 美国); 电动匀浆器 (IKA, 德国); CO₂ 恒温培养箱 (SANYO Electric Biomedical Corporation)。

2 方法

2.1 蜘蛛香提取物及蜘蛛香总缬草素的制备

2.1.1 蜘蛛香提取物 取蜘蛛香药材 1.6 kg, 自然干燥后粉碎, 过 60 目筛, 用 8 倍量 95%乙醇超声提取 3 次, 每次 1.5 h, 减压回收试剂至基本无醇味, 得到蜘蛛香提取物 (138 g)。临用时以 0.5%聚山梨酯-80 和适量蒸馏水配制成混悬液。

2.1.2 蜘蛛香总缬草素 准确称取 60 g 蜘蛛香药材粉末, 将药材粉末用水浸泡 24 h, 8 倍量 95%乙醇渗滤提取, 提取 3 次, 收集渗滤液, 35 °C 减压浓缩至 50 mL 浓缩液, 将此浓缩液上样于预处理过的 D101 300 mL 大孔树脂柱上样后用 8 BV 的 70%乙醇除杂后直接换用 85%乙醇冲洗, 收集 85%部位的洗脱液,

35 °C 减压浓缩, 得浸膏, 即为蜘蛛香总缬草素有效部位 (含缬草素、chlorovaltrate、jatamanvaltrate P、jatamanvaltrate Q 的质量分数之和为 52.4%)。临用时以 0.5%聚山梨酯-80 和适量蒸馏水配制成混悬液。

2.2 实验分组与给药

将 ICR 小鼠随机分为 8 组: 对照组 (等量蒸馏水与聚山梨酯-80 配制的混悬液), 地西洋阳性对照组 (2 mg/kg), 蜘蛛香提取物低、中、高剂量 (50、100、150 mg/kg, 按提取物浸膏计) 组, 蜘蛛香总缬草素低、中、高剂量 (30、60、90 mg/kg, 按总缬草素有效部位浸膏计) 组, 每组 10 只。各组均 ig 给药, 给药体积为 20 mL/kg, 每天 1 次, 连续给药 10 d。于末次给药 1 h (地西洋给药 0.5 h) 后, 于 15:00~23:00 进行行为学实验。所有实验小鼠饲养于第二军医大学动物房, 温度为 (24.0±0.5) °C, 湿度为 45%~50%, 通风环境良好。

2.3 指标测定

2.3.1 明暗箱实验 明暗箱实验装置 (45 cm×27 cm×27 cm) 包括明箱与暗箱 2 部分, 2 箱之间由一个带光电装置的区域分开, 实验动物箱为 1 个聚丙烯塑料盒, 明暗箱各占 1 半, 2 箱之间有一个 7.5 cm×7.5 cm 的门洞供动物穿过, 将此聚丙烯塑料盒置于一带电装置的较大暗盒中, 明箱上部照以亮光, 实验开始时将小鼠置于明箱中央, 背朝隔壁, 观察 5 min 内小鼠在明暗箱之间穿过的次数及在明箱中的滞留时间。

2.3.2 敞箱实验 实验装置为 1 个正四边形聚丙烯塑料盒 (45 cm×45 cm×45 cm×45 cm); 将此装置置于装有视频监控的较大暗盒中, 实验时将小鼠置于敞箱中央, 观察 5 min 内小鼠在中央区的停留时间。

2.3.3 高架十字迷宫实验 高架十字迷宫包括 2 个 50 cm×10 cm 的相对开臂和 2 个 50 cm×10 cm 的相对闭臂, 闭臂上部敞开, 开臂四周均敞开, 开臂与闭臂之间中央有一个 10 cm×10 cm 的相对开阔部。迷宫离地面高 50 cm。将小鼠置于中央开阔部, 头朝闭臂。观察者在离迷宫中心 1 m 以外记录 5 min 内小鼠进入开臂与闭臂的次数和在两臂滞留的时间 (以四肢全部入臂或出臂为标准)。计算小鼠进入开臂的次数与时间分别占总次数 (两臂次数之和) 和总时间 (在两臂滞留时间之和) 的百分比 (占比)。

2.3.4 自发性活动实验 实验装置类似于敞箱实验装置, 为 1 个正四边形聚丙烯塑料盒 (45 cm×45 cm×45 cm×45 cm); 将此装置置于装有视频监

控的较大暗盒中,实验时先将小鼠放置于此实验装置中使其熟悉环境 5 min,然后记录下一个 5 min 内小鼠的自发活动次数。

2.3.5 小鼠血清中皮质酮测定 行为学实验结束后立即摘眼球取血,取室内静置 2 h 的全血置于离心机内,3 000 r/min 离心 15 min,取血清,−80 ℃ 储存待测。ELISA 测定血清皮质酮的量,按照试剂盒的操作步骤进行,酶标仪上以 (450±10) nm 为测定波长,测定 A 值。

2.3.6 小鼠脑组织中 NE、DA 及 5-HT 测定 行为学实验结束后小鼠脱臼处死,冰砂上操作,取小鼠大脑,分离海马组织,称质量,于液氮中保存备用。测定前将海马组织用 PBS 溶液制备成 10% 匀浆液 (1 g 组织加入 10 mL PBS),然后置于 −20 ℃ 过夜。经反复冻融 2 次处理后,匀浆液于 4 ℃、5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,通过 ELISA 试剂盒测定 NE、DA 和 5-HT 的量。按照试剂盒的操作步骤进行,酶标仪上测定吸光度 (A) 值。

2.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 抗焦虑的行为学实验结果

3.1.1 对小鼠在明箱停留时间与穿箱次数的影响 小鼠在明暗箱中的活动情况由视频监控录像记录,统计结果见表 1。与对照组相比,地西洋组能显著增加小鼠在明箱停留时间和穿箱次数 ($P < 0.05$),蜘蛛香提取物中剂量组与总缬草素中剂量组均能显著增加小鼠在明暗箱中的穿箱次数 ($P < 0.05$),蜘蛛香提取物与总缬草素其余各剂量组也能增加小鼠在明箱停留时间和穿箱次数,但与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。

3.1.2 对小鼠在敞箱实验中央区停留时间的影响 结果见表 2。与对照组相比,地西洋能够显著增加小鼠在中央区停留的时间 ($P < 0.05$),蜘蛛香提取物中剂量组和总缬草素中剂量组也能够显著增加小鼠在中央区的停留时间 ($P < 0.05$)。其余各组均有增加小鼠在中央区的停留时间的趋势,但与对照组相比,差异不显著 ($P > 0.05$)。

3.1.3 对小鼠高架十字迷宫实验进入开臂次数与停留时间的影响 结果见表 3。与对照组相比,地西洋能够显著增加小鼠进入开臂次数的占比和开臂停留时间占比 ($P < 0.05$),蜘蛛香提取物与总缬

表 1 蜘蛛香提取物与总缬草素对小鼠明暗箱实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of crude extract and valeportriates from *Valerianae Rhizoma* on light/dark transition test in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	明箱停留 时间/s	穿箱次数
对照	—	125.38±34.63	37.16±17.70
地西洋	2	166.17±48.65*	78.25±35.06*
蜘蛛香提取物	50	134.00±25.70	46.70±22.23
	100	151.67±32.46	59.27±12.65*
	150	144.92±35.60	45.12±9.84
蜘蛛香总缬草素	30	134.04±34.49	52.62±18.86
	60	135.69±36.07	76.80±36.77*
	90	142.39±41.13	50.45±19.32

与对照组比较: * $P < 0.05$, 表 2 和 3 同

* $P < 0.05$ vs control group, Tables 2 and 3 are same

表 2 蜘蛛香提取物与总缬草素对小鼠敞箱实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of crude extract and valeportriates from *Valerianae Rhizoma* on open field test in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	中央区停留时间/s
对照	—	19.21±8.74
地西洋	2	39.04±24.90*
蜘蛛香提取物	50	31.40±19.69
	100	36.86±23.18*
	150	33.32±20.13
蜘蛛香总缬草素	30	30.29±18.70
	60	37.62±10.62*
	90	34.02±23.64

表 3 蜘蛛香提取物与总缬草素对小鼠高架十字迷宫实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of crude extract and valeportriates from *Valerianae Rhizoma* on everted plus maze test in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	开臂进入次数 占比/%	开臂停留时间 占比/%
对照	—	34.99±9.42	2.98±1.46
地西洋	2	47.17±9.67*	7.57±3.25*
蜘蛛香提取物	50	43.87±16.29	4.86±2.84
	100	43.13±14.44	4.96±3.52
	150	44.09±18.74	4.61±3.16
蜘蛛香总缬草素	30	40.62±18.79	2.50±2.50
	60	40.44±10.70	3.89±3.17
	90	44.45±10.95	3.56±2.53

草素各剂量组有增加小鼠进入开臂次数占比和开臂停留时间占比的作用趋势。

3.1.4 对小鼠自发性活动的影响 结果见表 4。地西洋组能够明显减少小鼠的自发性活动次数，与对照组相比，差异显著 ($P < 0.01$)。蜘蛛香提取物与总缬草素各剂量组也能够显著减少小鼠的自发性活动次数，与对照组相比，差异显著 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.2 抗焦虑作用机制相关指标测定结果

表 5 结果表明，与对照组相比，地西洋组和蜘蛛香提取物中剂量组能够显著降低小鼠血清皮质酮水平和脑海马组织中 NE、DA、5-HT 的量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；蜘蛛香提取物低剂量组能够显著降低小鼠脑海马组织中 DA 和 5-HT 的量 ($P < 0.05$)；蜘蛛香提取物高剂量组显著降低小鼠脑海马

表 4 蜘蛛香提取物与总缬草素对小鼠自发性活动实验的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effects of crude extract and valeportriates from *Valerianae Rhizoma* on spontaneous activity test in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	活动次数
对照	—	47.50 ± 13.15
地西洋	2	32.00 ± 12.13**
蜘蛛香提取物	50	30.10 ± 14.32**
	100	33.00 ± 7.38**
	150	30.10 ± 8.85**
蜘蛛香总缬草素	30	23.91 ± 5.66***
	60	31.60 ± 11.07**
	90	24.40 ± 7.12***

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

表 5 蜘蛛香提取物与总缬草素对小鼠血清皮质酮及脑海马组织 NE、DA、5-HT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effects of crude extract and valeportriates from *Valerianae Rhizoma* on levels of corticosterone in serum and NE, DA, and 5-HT in hippocampus of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	皮质酮/(μg·mL ⁻¹)	NE/(pg·mL ⁻¹)	DA/(pg·mL ⁻¹)	5-HT/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	16.05 ± 3.88	31.71 ± 10.10	1 511.81 ± 501.54	29.56 ± 10.87
地西洋	2	11.07 ± 3.34*	19.29 ± 6.91**	859.33 ± 164.63***	16.25 ± 4.63**
蜘蛛香提取物	50	11.81 ± 5.63	23.68 ± 9.66	1 019.90 ± 339.29*	18.18 ± 6.54*
	100	11.02 ± 4.58*	20.20 ± 8.33*	1 027.68 ± 190.47*	16.00 ± 4.12**
	150	13.18 ± 5.83	20.23 ± 5.99*	1 174.06 ± 312.34	22.02 ± 8.40
蜘蛛香总缬草素	30	12.08 ± 3.43	21.18 ± 7.26*	872.52 ± 221.18*	21.78 ± 9.79
	60	10.91 ± 5.41*	23.29 ± 4.94*	1 042.67 ± 314.45*	22.44 ± 6.07
	90	11.10 ± 4.14*	25.08 ± 10.46	1 467.84 ± 265.25	23.06 ± 9.10

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

组织中 NE 的量 ($P < 0.05$)。与对照组相比，总缬草素低剂量组可以显著降低小鼠脑海马组织中 NE、DA 的量 ($P < 0.05$)；总缬草素中剂量组能显著降低小鼠血清皮质酮水平和小鼠脑海马组织中 DA、5-HT 的量 ($P < 0.05$)；总缬草素高剂量组能显著降低小鼠血清皮质酮水平 ($P < 0.05$)。

4 讨论

传统的抗焦虑实验模型有高架十字迷宫、明暗箱、敞箱、饮水冲突实验、自主活动实验、孔板实验、包埋实验和小鼠期待性焦虑实验等^[8]，本研究选取经典明暗箱、敞箱、高架十字迷宫和自主活动 4 种模型^[7-10]进行蜘蛛香提取物及蜘蛛香总缬草素的抗焦虑作用研究。所选实验模型均是利用新异环境的光线等原因造成焦虑刺激的行为，由于这些模

型引起的焦虑状态可以使动物不需要特殊的训练，就可使动物处于类似于人类焦虑的生理状态，故这些模型方法快速简便，被常用来评价药物的抗焦虑作用。地西洋为目前临床应用最为广泛的抗焦虑药，具有选择性高、起效快、副作用相对较少等特点，本实验选取地西洋为阳性对照药物。在进行动物行为学实验时间的选择上，考虑到实验小鼠的生活习性，在 8:00~12:00 小鼠常处于活动较少的时间段，故本实验选择小鼠活动较为频繁的时间段 15:00~23:00 进行行为学实验，避免因为小鼠本身生活习性的影响而使实验小鼠的活动次数减少。为再次尽可能避免实验时间对行为学实验的影响，实验过程中采取对每个剂量组随机交叉轮流测试的方法进行行为学测试。

在明暗箱实验中,蜘蛛香提取物中剂量组与总缬草素中剂量组可明显增加小鼠的穿箱次数,并且其余各剂量组也均有增加小鼠在明箱停留时间和穿箱次数的趋势。在敞箱实验中,蜘蛛香提取物中剂量组与总缬草素中剂量组可明显增加小鼠在中央区的停留时间。在高架十字迷宫实验中,地西洋能够显著增加小鼠进入开臂次数的百分比和在开臂停留时间百分比,但蜘蛛香提取物与总缬草素各剂量组均无显著性效果。在自发性活动实验中,蜘蛛香提取物与总缬草素各剂量组均能够显著减少小鼠的自发性活动次数,即对小鼠的中枢神经有抑制作用,可以抑制其自主活动,提示蜘蛛香提取物及总缬草素在发挥抗焦虑作用的同时也发挥了其明显的镇静催眠作用。4 种行为学实验结果表明蜘蛛香提取物和总缬草素对正常小鼠的焦虑症状均有一定程度的改善,且中剂量效果显著。

本实验主要针对丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴系统和脑组织神经递质两方面进行蜘蛛香提取物及总缬草素抗焦虑作用机制的研究。实验结果显示蜘蛛香提取物和总缬草素能够降低小鼠血清皮质酮的量,并下调脑内海马组织中 NE、DA 和 5-HT 的水平。

本研究表明蜘蛛香提取物及总缬草素均有抗焦虑作用,且作用机制与 HPA 和神经递质有关,总缬草素可能为蜘蛛香抗焦虑作用的有效部位,但关于蜘蛛香具体作用物质基础及作用机制有待深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] You J S, Peng M, Shi J L, *et al.* Evaluation of anxiolytic activity of compound *Valeriana jatamansi* Jones in mice [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2012, 12: 223.
- [3] Itoh N, Yonehara S, Ishii A, *et al.* The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis [J]. *Cell*, 1991, 66(2): 233-243.
- [4] Shen T, Li G, Wang X, *et al.* The genus *Commiphora*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(2): 319-330.
- [5] 闫智勇, 张天娥, 彭佳, 等. 蜘蛛香对焦虑模型大鼠行为学及脑组织神经递质含量的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(3): 67-69.
- [6] 黄宝康, 郑汉臣, 秦路平. 缬草属植物的镇静催眠作用及机制 [J]. *药实践杂志*, 2007, 25(3): 134-136.
- [7] 王延丽, 刘勇, 石晋丽, 等. 缬草素抗焦虑作用及其机制的初探 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(4): 501-504.
- [8] 陈奇, 邓文龙, 张世玮, 等. *中药药理研究方法学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [9] 彭敏, 石晋丽, 郑虎占. 抗焦虑中药实验研究进展 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2011, 18(10): 106-108.
- [10] 彭敏, 石晋丽, 郑虎占, 等. 蜘蛛香抗焦虑复方的抗焦虑作用及其机制 [J]. *中草药*, 2011, 42(11): 2283-2286.