

白芍提取物对大鼠海马原代培养神经元 5-羟色胺 3 受体介导离子通道的影响

马海娟¹, 李 芳², 宋春红³, 魏 盛³, 乔明琦^{3*}

1. 北京市第六医院 药剂科, 北京 100007

2. 北京市丰台区妇幼保健院 药剂科, 北京 100069

3. 山东中医药大学 中医药经典理论教育部重点实验室, 山东 济南 250355

摘 要: **目的** 探讨白芍提取物含药血清对原代培养海马神经元 5-羟色胺 3 受体 (5-HT₃R) 介导离子通道的影响。**方法** 采用孤养结合慢性温和刺激法复制抑郁情绪大鼠模型, 并采用旷场实验和糖水偏好实验进行模型评价, 以白芍提取物进行药物干预, 制备大鼠含药血清, 对原代培养的大鼠海马神经元干预 24 h 后, 利用 Western blotting 法检测各组神经元细胞 5-HT_{3A}R、5-HT_{3B}R 蛋白表达, 采用全细胞膜片钳技术检测各组神经元细胞 5-HT₃ 受体通道电流。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠旷场实验总路程、糖水偏好率均显著性降低 ($P < 0.01$); 模型组大鼠血清孵育的海马神经元 5-HT_{3A}R、5-HT_{3B}R 蛋白表达量均显著性升高 ($P < 0.05$), 模型组大鼠血清孵育的海马神经元电流密度值明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 白芍提取物组和氟西汀组旷场实验总得分明显提高 ($P < 0.05$), 糖水偏好率均明显增加 ($P < 0.01$); 白芍提取物组和氟西汀组大鼠含药血清孵育的海马神经元 5-HT_{3A}R、5-HT_{3B}R 蛋白表达量显著性降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 白芍提取物组和氟西汀组大鼠含药血清孵育的海马神经元电流密度值均明显减少 ($P < 0.01$)。**结论** 白芍提取物能改善抑郁情绪模型大鼠异常升高的 5-HT₃R 离子通道电流, 这可能是白芍发挥其抗抑郁情绪的中枢作用机制之一。

关键词: 抑郁情绪模型; 白芍提取物; 海马神经元; 全细胞膜片钳; 5-羟色胺 3 受体; 离子通道

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2017)06 - 1167 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.018

Effect of *Paeoniae Alba Radix* extract on 5-HT₃ receptor pathway in primarily cultured rat hippocampal neurons

MA Hai-juan¹, LI Fang², SONG Chun-hong³, WEI Sheng³, QIAO Ming-qi³

1. Department of Pharmacy, Beijing No. 6 Hospital, Beijing 100007, China

2. Department of Pharmacy, Fengtai Maternal & Children's Health Hospital of Beijing, Beijing 100069, China

3. Key Laboratory for Classical Theory of Traditional Chinese Medicine of the Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of *Paeoniae Alba Radix* extracts (PAREs) on 5-HT₃R mediated ion channels in primarily cultured hippocampal neurons of rats with depression. **Methods** An animal model of depression was successfully developed and evaluated in rats. PARE was used for drug intervention. Serum in each group was collected, inactivated and then added into the primary hippocampal neurons for 24 h. The protein expression levels of 5-HT_{3A}R and 5-HT_{3B}R in the neurons of each group were examined by Western blotting (WB). The 5-HT₃R channel current was recorded by a whole-cell patch clamp. **Results** Compared with normal rats, the rats with depression had significantly reduction in total distance of the open-field test (OFT) and sucrose preference ratio ($P < 0.01$). The hippocampal neurons treated with serum of depressive rats had significantly increased protein expression of 5-HT_{3A}R and 5-HT_{3B}R ($P < 0.05$) and current density value ($P < 0.05$) compared to those treated with normal rat serum. Compared with the depressive rats, the rats treated with PARE and fluoxetine had significantly increased OFT ($P < 0.05$) and sucrose preference ratio ($P < 0.01$). The primary hippocampal neurons cultured with serum from PARE and fluoxetine-treated rats had significantly reduction in protein expression of 5-HT_{3A}R and 5-HT_{3B}R ($P < 0.05$, 0.01, 0.001) and current density value ($P < 0.01$). **Conclusion** PARE can reduce the 5-HT₃R ion channel current density in the rats with depression. This may be its central mechanism in treating depression.

Key words: depression model; *Paeoniae Alba Radix* extracts; hippocampal neuron; whole-cell patch clamps; 5-HT₃R; ion channels

收稿日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573854); 经前烦躁障碍 (PMDD) 肝气逆/郁病证大鼠模型鉴定与标准化

作者简介: 马海娟 (1980—), 女, 硕士, 主管中药师, 研究方向为中药临床药学。Tel: (010)64053072 E-mail: mhj725@163.com

*通信作者 乔明琦 (1955—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为肝藏象生理病理与情志致病机制研究。E-mail: qmingqi@163.com

白芍 *Paeonia laciflora* Pall. 为传统中药, 具有敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳的功效^[1]。肝性多郁, 养血柔肝解郁, 是白芍临床应用的一个重要特色^[2]。现代中医药研究表明, 白芍具有明显的抗抑郁作用^[3-4], 实验室前期研究表明白芍提取物通过调控经前期综合征抑郁情绪模型大鼠额叶 5-羟色胺 3A 受体 (5-HT_{3A}R) 和 5-羟色胺 3B 受体 (5-HT_{3B}R) 蛋白表达来改善模型大鼠的抑郁情绪^[5], 白芍提取物对抑郁模型大鼠 5-HT_{3A}R 蛋白表达有下调作用^[6], 并且对白芍提取物在大鼠血清及脑组织中的化学成分也有了较为确切的鉴定^[7], 但其对 5-HT₃R 通道的功能影响并没有深入的探讨。本研究继续以抑郁情绪模型大鼠为研究对象, 用白芍提取物含药血清进行药物干预, 观察 5-羟色胺 3 受体 (5-HT₃R) 介导的离子通道电流变化, 旨在探讨白芍提取物对 5-HT₃R 功能变化的影响, 从而更加深入地探讨白芍提取物干预抑郁情绪的分子机制。

1 材料

1.1 仪器及主要试剂

旷场监控装置 XRXvideo (上海欣软信息科技有限公司); 电泳仪、蛋白印迹转移装置 (SDS-PAGE, 美国伯乐公司); Pclamp10 记录分析软件、Multiclamp 700B 膜片钳放大系统、Micropipette puller P97 微电极拉制仪、Axon Digidata 1440A 数模/模数转换器 (美国 AXON 公司)。兔抗大鼠 5-HT_{3A}R 多克隆抗体 (Abcam 公司, ab51950), 羊抗大鼠 5-HT_{3B}R 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司, sc-51198), Anti-HT_{3B}R (MFG40388); 5-HT_{3A} 二抗 (Abcam 公司, ab-16248), 驴抗山羊 5-HT_{3B} 二抗 IgG-HRP (Santa Cruz 公司, sc-2020); 5-HT₃R 激动剂 phenylbiguanide (Sigma 公司, 164216), Neurobasal 培养基 (Gibco 公司, 21103-049); B27 (Gibco 公司, 17504-044), HEPES 缓冲液 (Carl Roth GmbH 公司, Art.9105.2)。

1.2 药品

白芍提取物 (含芍药苷 35%, 青岛阳光海川医药科技发展有限公司生产, 批号 20110527); 氟西汀 (礼来苏州制药有限公司生产, 批号 H20110742)。

1.3 实验动物

雄性 Wistar 大鼠, SPF 级, 体质量 180~200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2002-0003。新生 24 h Wistar 大鼠, 购自山东中医药大学实验动物中心, 动物许

可证号 SCXK (鲁) 2011-0003。

2 方法

2.1 旷场实验

分别在造模刺激第 0 天与第 28 天的同一时间段内进行旷场实验。将大鼠小心置于旷场正中格, 同时进行摄像记录大鼠在 3 min 内的行为变化, 以系统自动记录的参数水平得分 (穿越底面方块总数) 与垂直得分 (两前爪腾空或攀附墙壁的次数) 之和, 即大鼠活动总路程作为检测指标。

2.2 糖水偏好实验

分别在造模刺激第 0 天与第 28 天的同一时间段内进行糖水偏好实验。实验前 24 h 大鼠禁食禁水, 实验中给予 0.8% 蔗糖水溶液和去离子水 (12 h 倒换一次位置), 让其自由饮用, 24 h 后称量糖水和去离子水质量, 计算大鼠糖水消耗量和大鼠糖水偏好率。

糖水偏好率 = 糖水消耗量 / (糖水消耗量 + 水消耗量)

2.3 抑郁情绪模型大鼠造模及含药血清制备

将大鼠饲养于温度和光线可控的房间内, 使其自由进食、饮水, 适应环境 7 d, 通过旷场实验和糖水偏好实验结果评定选取相似的 24 只大鼠, 随机分为 4 组, 分别为对照组、模型组、氟西汀阳性对照组 (氟西汀组)、白芍提取物组 (白芍组), 每组 6 只。对照组和模型组每天 ig 给予生理盐水 5 mL/kg, 对照组无任何干预刺激, 而其他 3 组用孤养结合慢性温和刺激法造模^[8], 氟西汀组在造模同时每天 2 次 ig 给予氟西汀 10 mg/kg (相当于成人临床 8 倍剂量), 白芍组则在造模同时每天 2 次 ig 给予白芍提取物 0.36 g/kg^[5,7] (相当于成人临床 8 倍剂量), 连续给药 28 d。

利用旷场实验和糖水偏好实验结果对模型进行评价。末次给药 3.8 h 后, 即白芍提取物中白芍皂苷血药浓度达高峰时^[9], 进行麻醉 (1% 戊巴比妥钠溶液分别 ip 麻醉 4 组大鼠), 取血 (腹主动脉), 静置 (30 min), 离心 (3 000 r/min, 20 min), 分离, 合并分装血清, 并密封保存 (冰箱 -70 °C)。用前须滤菌 (0.45 μm 微孔滤膜) 并灭活 (56 °C, 30 min)。

2.4 海马神经元细胞原代培养及分组

取新生 24 h Wistar 大鼠, 无菌条件下小心分离出海马组织, 置于 10 mL 含冰 PBS 中, 用 PBS 清洗 2 遍, 吸干 PBS, 加入预温 0.125% 胰酶中消化 10~20 min (37 °C 培养箱, 5 min 摇晃 1 次)。取出, 吸去酶液, 加入冰 PBS 终止消化, 用 PBS 清洗 2~

3 次后静置 2 min, 弃上清液, 加入 1 mL DMEM 轻轻吹打 3 次后, 留上清液 (弃掉未被消化的组织), 滴加在多聚赖氨酸包被过的 6 孔培养板上, 培养 4 h 后, 轻摇, 吸走死细胞和碎片, 每皿用 DMEM 再清洗 1 次后, 继续培养, 24 h 后, 更换为 NBG 培养基 (Neurobasal-B27-L-Glutamine 100 : 2 : 1) (37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养), 以后每隔 2 天换 1 次, 每次半数更换, 培养 1 周。于细胞培养液中分别加入对照组大鼠血清、模型组大鼠血清、氟西汀组大鼠血清及白芍组大鼠血清进行干预, 至最终体积分数为 10%, 继续培养, 24 h 后进行 5-HT_{3A}R、5-HT_{3B}R 的蛋白表达检测和 5-HT_{3R} 通道的膜片钳实验。

2.5 Western blotting 法测定海马神经元细胞 5-HT_{3A}R、5-HT_{3B}R 蛋白表达

分组裂解血清干预 24 h 的神经元细胞, 提取海马神经元总蛋白, -20 °C 保存, 用 BCA 法测定样品蛋白含量, 每组取 10 μg 海马神经元总蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, 湿法转移至 NC 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭, 分别与相应的一抗 (Anti-5-HT_{3A}, 1 : 200; Anti-5-HT_{3B}, 1 : 5 000) 和 β-actin 一抗 (1 : 1 500) 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 5 min; 再加入用封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的相应二抗 (Anti-5-HT_{3A}, 1 : 10 000; Anti-5-HT_{3B}, 1 : 10 000), 室温孵育 2 h, 然后 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。增强化学发光 (ECL) 检测杂交信号, 显影, 定影。以 5-HT_{3A}R 和 5-HT_{3B}R 与内参 β-actin 的灰度比值作为所测样品中相应指标的相对表达量。

2.6 全细胞膜片钳技术记录

所充电极内液成分、灌流用外液成分、全细胞膜片钳记录模式及给药方式 (细胞旁 Y 管快速灌流给药苯基双胍 (Phenylbiguanide, 10 μmol/L) 与文献报道方法^[10]相同, 在倒置显微镜下随时观察整个过程的电阻变化, 破膜前后进行电容补偿, 形成全细胞模式后, 选择纳入实验中的细胞, 每组选取 6 个细胞进行 5-HT_{3R} 通道膜片钳实验。用 PClamp10.0 软件记录采集 5-HT_{3R} 电流数据, 并储存于计算机。

2.7 统计方法

大鼠旷场实验数据及糖水偏好实验数据采用双因素方差分析, PClamp 10.0 用于全细胞膜片钳 5-HT_{3R} 电流记录, 电流密度数据采用单因素方差分析, 用 GraphPad Prism 5.0 统计作图软件进行统计

学处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 旷场实验结果

造模刺激开始前各组大鼠旷场实验总分无显著性差异, 模型组大鼠经过 28 d 慢性应激后, 与对照组相比, 旷场实验总分显著性降低 ($P < 0.01$)。与模型组大鼠相比, 造模同时给予白芍提取物和氟西汀药物组的大鼠, 旷场实验总分显著性升高 ($P < 0.05$), 且与对照组相比无明显差异。结果见图 1。

3.2 糖水偏好实验结果

造模刺激前各组大鼠糖水偏好率无显著性差异, 模型组大鼠经过 28 d 慢性应激之后, 与对照组相比, 大鼠糖水偏好率显著性减少 ($P < 0.01$)。与模型组大鼠相比, 造模同时给予白芍提取物和氟西汀药物的大鼠, 糖水摄入偏好率明显增加 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

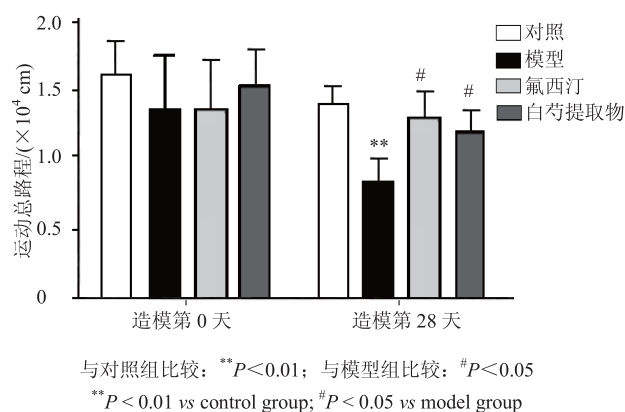


图 1 各组大鼠造模前后旷场实验总路程比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 Comparison on overall distance in open-field test of each group before and after modeling ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

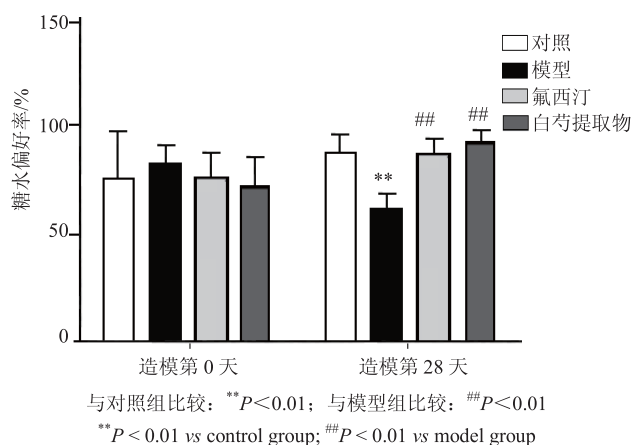
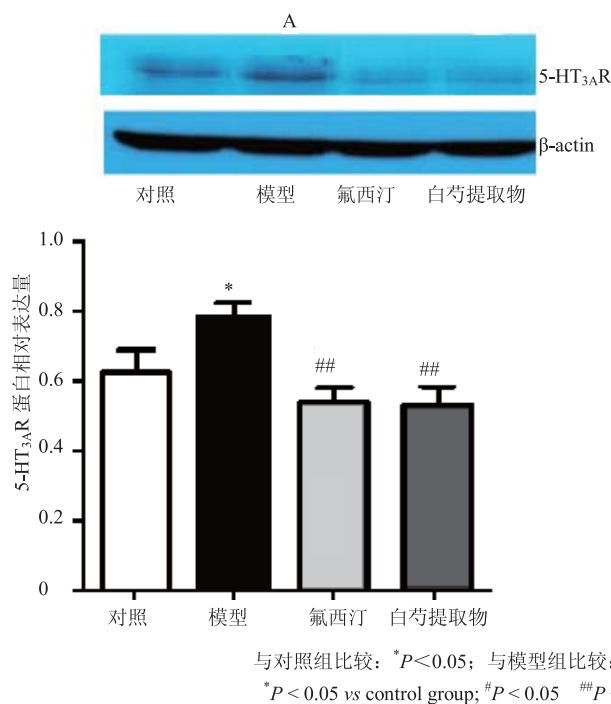


图 2 各组大鼠造模前后糖水偏好率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 2 Comparison on sucrose-preference rate in sucrose-preference test of each group before and after modeling ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 含药血清对海马神经元细胞 5-HT_{3A}R 和 5-HT_{3B}R 蛋白表达的影响

各组海马神经元细胞 5-HT_{3A}R 蛋白表达结果见图 3-A, 与对照组相比, 模型组大鼠血清孵育的海马神经元细胞 5-HT_{3A}R 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 白芍提取物和氟西汀含药血清孵育的海马神经元细胞 5-HT_{3A}R 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。



各组海马神经元细胞 5-HT_{3B}R 蛋白表达结果见图 3-B, 与对照组相比, 模型组大鼠血清孵育的海马神经元细胞 5-HT_{3B}R 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 白芍提取物和氟西汀含药血清孵育的海马神经元细胞 5-HT_{3B}R 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。

3.4 全细胞膜片钳电流结果

各组海马神经元电流密度值见图 4: 与对照组

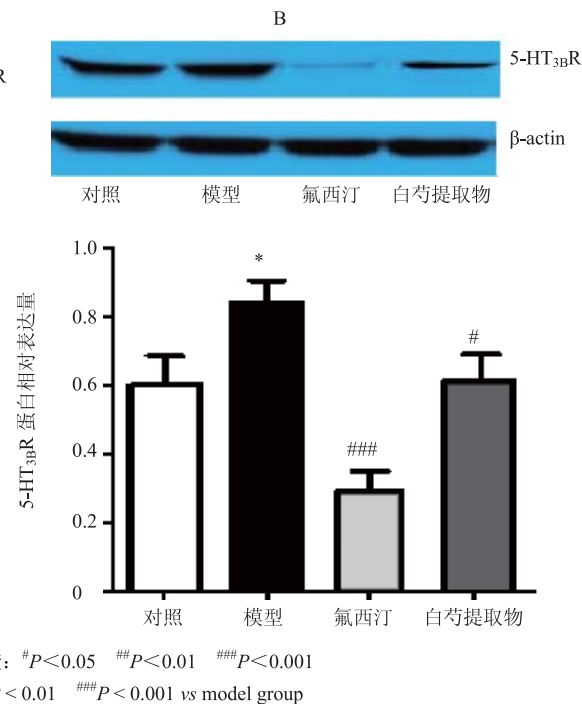


图 3 白芍提取物含药血清对海马神经元细胞 5-HT_{3A}R (A) 和 5-HT_{3B}R (B) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of drug-containing serum of PAREs on protein expression of 5-HT_{3A}R (A) and 5-HT_{3B}R (B) in hippocampal neurons ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

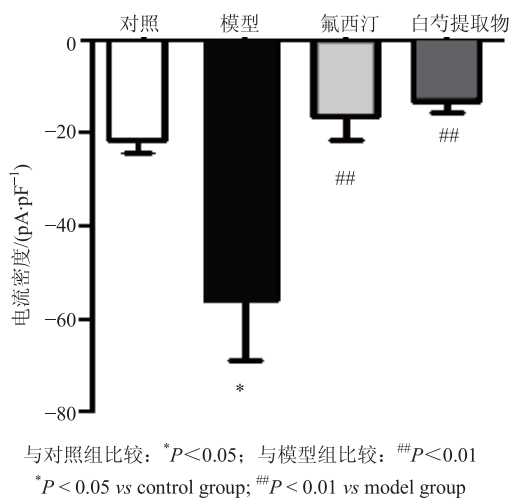


图 4 海马神经元细胞 5-HT₃R 电流密度值分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Current density analysis of hippocampal neurons ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

相比, 模型组大鼠血清孵育的原代海马神经元细胞 5-HT₃R 电流密度明显增大 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 白芍提取物和氟西汀含药血清所孵育的海马神经元细胞 5-HT₃R 电流密度明显减少 ($P < 0.01$)。

4 讨论

中枢神经系统 5-HT₃R 参与抑郁情绪、焦虑情绪和药物戒断症状等病理过程^[11], 最新文献报道^[12]经前期综合征经前期的抑郁情绪与额叶和海马的 5-HT₃R 密切相关, 由此可见 5-HT₃R 参与调节精神情志的变化, 脑内海马 5-HT₃R 功能发生紊乱可能导致一系列不良情绪反应如抑郁、焦虑等。本研究采用糖水偏好实验和旷场实验检测了模型大鼠的抑郁行为, 成功复制了抑郁情绪患者的临床表现, 抑郁情绪模型大鼠血清孵育的海马神经元细胞 5-HT_{3A}R、5-HT_{3B}R 蛋白表达明显升高, 并且该模型血清能激活

5-HT₃R 通道电流,由此推测抑郁情绪的发病机制可能与 5-HT_{3A}R、5-HT_{3B}R 蛋白表达水平异常有关,也可能与 5-HT₃R 通道电流变化异常有关。

现代中医药研究常用白芍来治疗抑郁样情绪障碍^[13],白芍通过抑制炎症反应^[14]、减少钙内流、清除活性氧^[15]、拮抗神经细胞的受损死亡,发挥了神经保护作用,继而介导了白芍的抗抑郁样作用。有研究者发现芍药苷能够阻断 Na⁺通道电流^[16],还可以通过抑制钙超保护 NMDA 诱导的 PC12 细胞死亡^[17],这提示白芍可能通过阻断钠离子通道电流和拮抗钙离子来发挥体内抗抑郁的作用;又有研究发现芍药苷可有效抑制动作电位波诱导的 I_{Ca-L},且可以产生微弱的电压依赖性 Na⁺和延迟整流 K⁺的抑制^[18]。本实验研究发现白芍提取物的含药血清孵育的海马神经细胞 5-HT_{3A}R、5-HT_{3B}R 蛋白表达明显降低,并且拮抗了抑郁情绪模型血清孵育的海马神经元 5-HT₃R 通道电流,根据以上分析,白芍提取物抗抑郁的作用机制可能是通过下调 5-HT_{3A}R、5-HT_{3B}R 蛋白表达发挥其纠正抑郁情绪的作用,也可能是通过拮抗 Na⁺、K⁺、Ca²⁺离子通道而影响 5-HT₃R 电流通道发挥其治疗抑郁情绪障碍的作用。由此可见,白芍提取物对 5-HT₃R 电流的作用揭示了白芍对神经元和神经内分泌功能的潜在机制。

尽管含药血清在很大程度上可以模拟白芍提取物在体内的代谢过程,本实验室前期研究表明白芍提取物经过大鼠 ig 给药后,血清内化学成分有芍药苷、芍药内酯苷及其代谢产物等,并且证实芍药苷、芍药内酯苷能通过血脑屏障进入脑内^[7],但是血清中化学成分的代谢途径及产物复杂,不一定所有的成分都能通过血脑屏障而在中枢发挥作用,所以无法完全代替含药脑脊液来培养原代海马神经元细胞,在以后的研究中还需要利用白芍提取物的含药脑脊液继续探讨白芍抗抑郁的中枢作用机制,或者利用白芍内单一化学成分(芍药苷或芍药内酯苷)来揭示白芍在 5-HT₃R 水平抗抑郁的中枢作用机制。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李秀玉. 《傅青主女科》白芍应用辨析 [J]. 北京中医, 1999(3): 16.
- [3] 王景霞, 张建军, 李 伟, 等. 白芍提取物治疗抑郁症的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 183-184.
- [4] 路腾飞, 于泽胜, 姚 璐, 等. 柴胡白芍药对慢性温和不可预知性应激抑郁模型大鼠行为学的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2137-2141.

- [5] 李 芳, 宋春红, 魏 盛, 等. 白芍提取物对经前期综合征肝气郁证模型大鼠额叶 5-HT_{3A/3B}R 分布与蛋白表达的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(11): 2267-2271.
- [6] 葛庆芳, 姜英凤, 张惠云, 等. 舒郁胶囊对原代大鼠海马神经元 5-HT_{3A/3B} 受体表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 136-139.
- [7] 李 芳, 朱付全, 宋春红, 等. HPLC-ESI-MSⁿ 法鉴定大鼠口服白芍提取物后血清及脑内的化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2475-2481.
- [8] Wei S, Zhang H Y, Gao J, *et al.* Impact of social isolation and resident intruder stress on aggressive behavior in the male rat [J]. *Neural Regen Res*, 2010, 5(15): 1175-1179.
- [9] 王海苹. PMS 肝气逆证模型大鼠含药血清对体外原代培养大鼠大脑皮层神经元活力及 5-HT_{1A} 受体影响 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2005.
- [10] 李 芳, 王杰琼, 宋春红, 等. 柴胡提取物对大鼠海马原代培养神经元 5-HT₃ 受体介导离子通道的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(11): 2224-2228.
- [11] Delgado M, Caicoya A G, Greciano V, *et al.* Anxiolytic-like effect of a serotonergic ligand with high affinity for 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 511(1): 9-19.
- [12] Li F, Feng J Z, Gao D M, *et al.* Shuyu Capsules relieve premenstrual syndrome depression by reducing and expression in the rat brain [J]. *Neural Plasticity*, 2016, 2016(22): 1-11.
- [13] Wang Y L, Wang J X, Hu X X, *et al.* Antidepressant-like effects of albiflorin extracted from *Radix paeoniae Alba* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 9-15.
- [14] Zhang LL, Wei W, Wang Q T, *et al.* Regulatory effects of Paeoniflorin on G protein-coupled signaling of synoviocytes in collagen-induced arthritis rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2008, 24(3): 330-335.
- [15] Li C R, Zhou Z, Zhu D, *et al.* Protective effect of paeoniflorin on irradiation-induced cell damage involved in modulation of reactive oxygen species and the mitogen-activated protein kinases [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(2): 426-438.
- [16] Zhang G Q, Hao X M, Chen S Z, *et al.* Blockade of paeoniflorin on sodium current in mouse hippocampal CA₁ neurons [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(12): 1248-1252.
- [17] Mao Q Q, Zhong X M, Li Z Y, *et al.* Paeoniflorin protects against NMDA-induced neurotoxicity in PC12 cells via Ca²⁺ antagonism [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(5): 681-685.
- [18] Tsai T Y, Wu S N, Liu Y C, *et al.* Inhibitory action of L-type Ca²⁺ current by paeoniflorin, a major constituent of peony root, in NG108-15 neuronal cells. [J]. *Europ J Pharmacol*, 2005, 523(1/3): 16-24.