

陈絮蒙, 田星, 郭亦杰, 等. 不同比例酸枣仁-茯苓水提物对大鼠焦虑样行为的影响 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 408–416. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030341

CHEN Xumeng, TIAN Xing, GUO Yijie, et al. Influence of the Aqueous Extracts of Ziziphi Spinosae Semen and *Poria cocos* with Different Ratios on Anxiety-related Behavior of Rats[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 408–416. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030341

· 营养与保健 ·

不同比例酸枣仁-茯苓水提物对大鼠 焦虑样行为的影响

陈絮蒙, 田 星, 郭亦杰, 尹珑桦, 唐志平, 曾 嵘*
(湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208)

摘 要:目的: 观察不同比例酸枣仁-茯苓混合后水提物的抗焦虑作用并探讨其机制。方法: 64 只 SD 大鼠随机分成 8 组: 正常对照组、模型组、帕罗西汀组、酸枣仁组、茯苓组、酸枣仁-茯苓 1:1 组、酸枣仁-茯苓 2:1 组、酸枣仁-茯苓 3:1 组。28 d 慢性束缚加孤养方法建立大鼠焦虑症模型, 动态观察动物基本形态及体质量变化, 造模第 8 d 起连续给药 21 d。高架十字迷宫及旷场实验评价大鼠焦虑样行为; 酶联免疫吸附法及荧光实时定量 PCR 检测大鼠血清、海马及杏仁核组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 含量及 mRNA 表达的相对量。结果: 与模型组相比, 不同比例酸枣仁-茯苓均能有效改善大鼠形态、体质量、焦虑样行为并调节血清及组织炎症因子水平 ($P<0.05$, $P<0.01$)。其中酸枣仁-茯苓 3:1 复配使用可极显著提高动物造模 28 d 后体质量 ($P<0.01$), 提高高架十字迷宫总穿臂次数、进入开放臂次数比例、开放臂停留时间比例 ($P<0.01$), 提高旷场水平运动次数、垂直运动次数 ($P<0.01$), 降低大鼠血清、海马及杏仁核组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平 ($P<0.01$) 及 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 效果优于酸枣仁-茯苓 1:1 或 1:2 复配及酸枣仁或茯苓单独使用。结论: 酸枣仁-茯苓复配使用能有效改善焦虑模型大鼠形态、体质量及行为学表现, 且酸枣仁-茯苓 3:1 配比效果最佳。其抗焦虑作用机制可能与降低外周与中枢炎症水平有关。

关键词:酸枣仁, 茯苓, 焦虑症, 炎症, 海马, 杏仁核

中图分类号: R964

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)02-0408-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030341



本文网刊:

Influence of the Aqueous Extracts of Ziziphi Spinosae Semen and *Poria cocos* with Different Ratios on Anxiety-related Behavior of Rats

CHEN Xumeng, TIAN Xing, GUO Yijie, YIN Longhua, TANG Zhiping, ZENG Rong*

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract: Objective: To observe the anti-anxiety effect of the water extracts of the mixture of Ziziphi Spinosae Semen (SZS) and *Poria cocos* (PC) with different ratios and to investigate the mechanism. Methods: Sixty-four SD rats were randomly divided into 8 groups, paroxetine group, SZS group, PC group, and the extracts with the different ratios of SZS to PC, which ranged from 1:1, 2:1 to 3:1. The anxiety model was established by chronic restraint and solitary which lasted for 28 days. During this period, the basic morphological features and body mass were observed. After 8 days of this treatment, paroxetine and different extracts were administrated. Elevated plus maze (EPM) and the open field test (OFT) were used to examine potential anxiolytic effects. It was determined by ELISA and quantitative real-time PCR for the total amount of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) in serum, hippocampus, and amygdala tissues of rats, and the relative amount of mRNA expression. Results: Compared with the control group, the experimental groups that employed different proportions of SZS and PC could effectively improve the condition of

收稿日期: 2022-03-29

基金项目: 湖南省自然科学基金 (2019JJ50454); 湖南省中医药科研计划项目 (2020080)。

作者简介: 陈絮蒙 (1986-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 功能性食品开发、中药有效成分研究, E-mail: 267231417@qq.com。

* 通信作者: 曾嵘 (1964-), 女, 本科, 教授, 研究方向: 中药有效成分研究与产品开发, E-mail: zengrong42@126.com。

morphological features, body mass, dysphoric behavior and regulate the level of inflammatory factors in serum and tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). Among them, the combination of SZS-PC 3:1 could significantly improve the body weight of animals after 28 days of modeling ($P<0.01$). This treatment increased the total time of arm penetrations. At the same time, the ratio of the times of rats to enter the open arm was elevated. So was the ratio of the open arm stay time in the elevated plus-maze ($P<0.01$). And this treatment increased horizontal and vertical movements in the open field ($P<0.01$). Meanwhile, this treatment decreased the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 ($P<0.01$), and mRNA expressions in serum, hippocampus, and amygdala tissue of rats ($P<0.05$, $P<0.01$). To sum up, the 3:1 group was better than SZS-PC 1:1 or 1:2 compound and SZS or PC alone. Conclusion: The combination of SZC and PC could effectively improve the condition of the treated rats, which includes the morphological features, body mass, and behavioral features. And the best group was 3:1 (SZS to PC). The mechanism of its anxiolytic effect might be related to the reduced levels of inflammation in peripheral and central areas.

Key words: Ziziphi Spinosae Semen; *Poria cocos*; anxiety; inflammation; hippocampus; amygdala

随着经济社会的高速发展,心理健康已成为倍受关注的公共卫生问题。发作性或持续性的紧张、焦虑等情绪是常见的心理亚健康状态^[1-3]。长期对负性情绪消极适应而不及时调整,则可能逐步演变成焦虑症等精神官能症,严重危害患者身心健康^[4-6]。目前,焦虑症的防治及发病机制已成为研究热点。因此,抗焦虑功能食品的研发具有较高的社会价值。

酸枣仁为鼠李科落叶灌木或小乔木植物酸枣的干燥成熟种子,可养血宁神、安五脏。茯苓为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核,常用于心脾两虚、宁心安神^[7]。两者皆为药食同源之材,且没有特殊异味,开发功能食品的安全性及可行性较高。以酸枣仁、茯苓为主要成分的安神方剂最早出现于《金匱要略》记载中的酸枣仁汤^[8]。现代各家对此方进行修改,广泛用于焦虑症、抑郁症等情志病,称酸枣仁汤加减方^[8]。王艳等^[9]建立酸枣仁汤数据库,遴选酸枣仁汤共 218 方,统计酸枣仁汤中药物出现频次。结果显示酸枣仁、茯苓在酸枣仁汤中使用频次占比分别为 100%、84.6%,提示该方核心组成即酸枣仁及茯苓。

酸枣仁及茯苓长期以来作为宁心安神的保健食品一直被广泛研究应用^[10-13]。各国学者从酸枣仁中提取鉴别出的化学成分已有一百三十余种,主要为三萜类、皂苷类、黄酮类化合物^[14],多用于开发助眠安神类产品^[15]。而茯苓中主要化学成分为多糖类和三萜酸类化合物,可通过抗炎、保肝、调节免疫等药理作用,用于多种疾病的治疗和保健^[16]。目前,基于抗焦虑作用的酸枣仁-茯苓复配比例优化研究鲜有报道。本研究将酸枣仁-茯苓以不同比例混合并提取有效成分,通过慢性束缚加孤养方法建立大鼠焦虑症模型,评价不同比例酸枣仁-茯苓水提物对焦虑模型大鼠形态、体质量及行为学的改善作用,同时探讨其抗焦虑机制是否涉及炎症反应,以期为进一步开发药食同源抗焦虑功能食品提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酸枣仁、茯苓 药材购自湖南中医药大学第一附属医院,经湖南中医药大学曾嵘教授鉴定符合

2020 年版《中华人民共和国药典》相关规定;盐酸帕罗西汀 中美天津史克制药有限公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)、酶联免疫吸附测定法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒 武汉博士德生物工程有限公司;Trizol、逆转录试剂盒、荧光实时定量 PCR 试剂盒 大连宝生物生物工程技术公司;TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 荧光实时定量 PCR 引物 广州锐博生物技术有限公司,序列如表 1;SPF 级雄性 SD 大鼠 体质量 220~240 g,64 只,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产证号为 SCXK(湘)2021-004。本试验通过湖南中医药大学动物伦理委员会审查,在研究过程中遵循《实验动物管理条例》进行试验研究。

表 1 荧光实时定量 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequence of real-time PCR

引物名称		引物序列
TNF- α	Forward primer	5'-TGATCGGTCCCAACAAGGA-3'
	Reverse primer	5'-TGCTTGGTGGTTTGCTACGA-3'
IL-1 β	Forward primer	5'-TGCTGATGTACCAAGTTGGGG-3'
	Reverse primer	5'-CTCCATGAGCTTTGTACAAG-3'
IL-6	Forward primer	5'-GCCCTTCAGGAACAGCTATG-3'
	Reverse primer	5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'
GAPDH	Forward primer	5'-CCCCCAATGTATCCGTTGTG-3'
	Reverse primer	5'-TAGCCCAGGATGCCCTTAGT-3'

DLX-880 型酶联免疫仪 美国 BIO-TEK 公司;7300 Real time PCR system 美国 Applied Biosystem 公司;PCR 仪 德国 Biometra 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酸枣仁-茯苓水提物制备 酸枣仁、茯苓或酸枣仁-茯苓(按质量比 1:1、2:1、3:1 比例混合均匀且总质量相等),分别加 10 倍质量水煮沸,后保沸提取 2 h。过滤后将剩余药材继续加 8 倍水质量煮沸,后保沸提取 1 h。过滤后将 2 次所得的滤液合并,浓缩至提取液含对应生药量 1 g/mL。

1.2.2 实验动物组别设计、造模及给药 SD 大鼠随机分成 8 组,恒温恒湿环境适应性喂养一周并在期

间观察其综合情况(饲养环境:温度 $22\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50%~70%、日光照时长 12 h)。8 组分别为:正常对照组、模型组、帕罗西汀组、酸枣仁组、茯苓组、酸枣仁-茯苓 1:1 组、酸枣仁-茯苓 2:1 组、酸枣仁-茯苓 3:1 组,每组 8 只,每只体重在 $230\pm 10\text{ g}$ 之间。正常对照组不做任何处理,其余 7 组采用慢性束缚加孤养方法建模^[17-18],每日束缚 6 h,连续进行 28 d,一鼠一笼单独饲养。期间每天对大鼠的基本形态进行观察并每 7 天测量一次体质量。

造模 7 d 后,分别给予生理盐水、帕罗西汀($1.8\text{ mg/kg}\cdot\text{d}$)、酸枣仁提取物(含酸枣仁生药量 $2\text{ g/kg}\cdot\text{d}$)、茯苓提取物(含茯苓生药量 $2\text{ g/kg}\cdot\text{d}$)、酸枣仁-茯苓 1:1 提取物(含酸枣仁、茯苓生药量共 $2\text{ g/kg}\cdot\text{d}$,两者比例为 1:1)、酸枣仁-茯苓 2:1 提取物(含酸枣仁、茯苓生药量共 $2\text{ g/kg}\cdot\text{d}$,两者比例为 2:1)、酸枣仁-茯苓 3:1 提取物(含酸枣仁、茯苓生药量共 $2\text{ g/kg}\cdot\text{d}$,两者比例为 3:1),灌胃给药处理 21 d。正常对照组不做任何处理。

造模第 28 d 对各组大鼠进行行为学评价,组间交叉进行。所有动物均提前 3 h 进入行为学测试室适应环境;实验结束后麻醉大鼠,心脏灌注后颈动脉插管取血,3000 g 离心 10 min 取上清,分离血清, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用;处死大鼠后于冰上分离海马及杏仁核。加入液氮研碎后另加入 1 mL Trizol,常温静置 5 min 后吹打。加入 0.2 倍 Trizol 体积的氯仿,剧烈震荡后室温静置 10 min。12000 g 离心 15 min,取上清。加入与吸出上清同体积的氯仿,剧烈震荡后室温静置 10 min。12000 g 离心 10 min 后去上清。加入 1 mL 75% 酒精,剧烈震荡漂洗沉淀。7500 g 离心 5 min 后去上清。加入 1 mL 100% 酒精,剧烈震荡漂洗沉淀。7500 g 离心 5 min 后去上清。室温 15~20 min 自然风干。加入 DEPC 水溶解 RNA 沉淀,提取组织总 mRNA, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用;加入液氮研碎后加入 30 μL 细胞裂解液 RIPA(含 1% 蛋白酶抑制剂苯甲磺酰氟),静置 30 min;超声裂解后,12000 g 离心 20 min 取上清,提取组织总蛋白, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 动物行为学评价

1.2.3.1 高架十字迷宫实验 高架十字迷宫包括闭合臂和开放臂各两条。每条臂长 50 cm、宽 10 cm,闭合臂和开放臂交汇平台宽 $10\text{ cm}\times 10\text{ cm}$ 。开放臂的边缘高 1 cm,闭合臂的边缘高 40 cm。设备距地面 50 cm 高,台面为黑色。

将大鼠从中央区面向闭合臂放入迷宫,记录大鼠 5 min 内在迷宫内活动的情况。观察指标:进入闭合臂次数、进入开放臂次数、闭合臂停留时间、开放臂停留时间。计算大鼠总穿臂次数、进入开臂的次数比例和在开臂停留时间比例。每只大鼠测定完成后彻底清洁,避免气味残留,影响实验结果。

1.2.3.2 旷场实验 使用 $100\text{ cm}\times 100\text{ cm}\times 50\text{ cm}$ 大

小的立方体敞箱,四周及箱底为黑色,用白线划分成面积相等的 25 块。

将大鼠置于敞箱底面的中心方格,以穿越底面的格数为水平运动次数,以后肢直立次数(前爪腾空或攀附箱壁)为垂直运动次数。每只大鼠测定时间为 5 min。每只大鼠测定完成后彻底清洁,避免气味残留,影响实验结果。

1.2.4 炎症因子水平及表达测定 按夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒检测方法检测大鼠血清及海马、杏仁核组织中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平。

大鼠海马或杏仁核组织总 RNA 用逆转录试剂盒合成 cDNA,稀释 25 倍。以 2 μL 稀释后的 cDNA 为模版,以 GAPDH 为内参对照,荧光实时定量 PCR 仪扩增基因片段,同时设置无 cDNA 的阴性对照。荧光实时定量 PCR 反应参数: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火与延伸 31 s,共 40 个循环。PCR 过程中实时收集荧光信号。7300 System SDS Software 分析数据,通过 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值定量样本中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 mRNA 表达的相对值。

1.3 数据处理

所有数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差。组间差异采用 SPSS 22.0 统计软件 One-Way ANOVA 和 Newman-Keul-S Student test 检验分析。双侧 $P<0.05$ 认为有统计学差异。

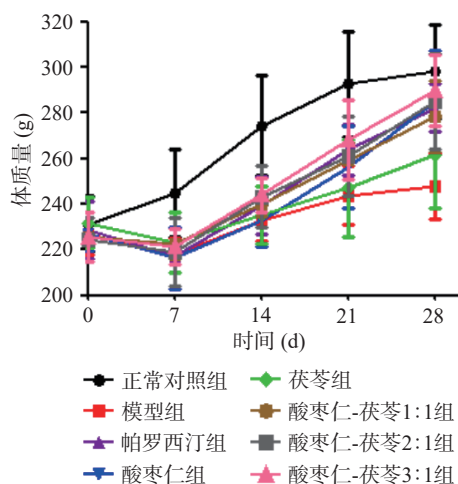
2 结果与分析

2.1 大鼠形态及体质量变化

基本形态和体重作为大鼠生长过程中的重要指标,反映了焦虑对大鼠带来的影响。第 0 d,各组大鼠反应敏捷、皮光毛亮、积极好动、不易激惹;造模 7 d 后,造模各组大鼠相较于正常对照组大鼠开始出现对于外界刺激回应减少和摄食减少的现象;造模 28 d 即给药 21 d 后,模型组大鼠精神不振、毛发凌乱、蜷缩于箱角、烦躁易怒;帕罗西汀、酸枣仁、茯苓及不同比例酸枣仁-茯苓均能不同程度改善慢性应激给大鼠带来的形态变化。其中帕罗西汀组及酸枣仁-茯苓 3:1 组大鼠精神状况较好、不易惹怒、对外界刺激积极回应、进食正常,与模型组大鼠相比,基本形态的改变最为明显。

如图 1 所示,第 0 d,各组大鼠体质量无明显差异;造模 7 d 后,造模各组大鼠体质量增重情况较正常对照组大鼠显著减少($P<0.01$),除正常对照组外各造模组体重无显著性差异($P>0.05$);造模 28 d 后,模型组大鼠较正常对照组大鼠体质量持续下降,结果有极显著性差异($P<0.01$),帕罗西汀组、酸枣仁组、酸枣仁-茯苓 1:1 组、酸枣仁-茯苓 2:1 组、酸枣仁-茯苓 3:1 组动物体质量较模型组显著增加($P<0.01$)。

大鼠摄食减少、体重减轻,精神不振、毛发凌乱、蜷缩于箱角、烦躁易怒等症状与焦虑症患者烦躁、心慌、寝食难安、消瘦等症状类似。相较于对照组,模型组大鼠出现了明显的焦虑样外型改变,帕罗

图 1 不同时间各组大鼠体重($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Fig.1 Weight of rats at different stages($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

西汀组、酸枣仁组及酸枣仁-茯苓各比例复配组能改善慢性束缚刺激给大鼠带来的形态改变及体重减轻现象,说明其对缓解大鼠焦虑情绪有积极改善作用,其中帕罗西汀组及酸枣仁-茯苓 3:1 组效果最为明显。

2.2 各组大鼠行为学实验结果

焦虑症属于精神类疾病,病因机制复杂。慢性束缚加孤养是目前探讨焦虑症发病机制和研究抗焦虑药物作用机制的一种常用造模方法,可诱导动物压力相关行为^[17-18]。该模型尚无固定的造模评价指标,一般通过行为学综合评定。高架十字迷宫和旷场试验是评估啮齿类动物心理常用的实验方法,反映动物对新环境的探究趋势和紧张程度,通常用于评价大鼠焦虑样行为^[19]。如表 2、表 3 所示,造模 28 d 后模型组大鼠高架十字迷宫总穿臂次数、进入开放臂次数比例、开放臂停留时间比例,旷场水平运动次数、垂直运动次数较正常对照组大鼠均极显著降低($P<0.01$),表明慢性束缚加孤养方法成功诱导大鼠出现焦虑样行为。

与模型组比较,帕罗西汀组、酸枣仁-茯苓 3:1 组高架十字迷宫总穿臂次数、进入开放臂次数比例、开放臂停留时间比例均极显著提高($P<0.01$),酸枣仁-茯苓 2:1 组总穿臂次数、开放臂停留时间比例显著提高($P<0.05$, $P<0.01$),酸枣仁组、茯苓组及酸枣

仁-茯苓 1:1 组开放臂停留时间比例显著提高($P<0.05$, $P<0.01$)。

与模型组比较,帕罗西汀组、酸枣仁-茯苓 3:1 组旷场水平运动次数、垂直运动次数均极显著提高($P<0.01$),酸枣仁组及酸枣仁-茯苓 2:1 组水平运动次数显著提高($P<0.05$, $P<0.01$)。

通过文献回顾对近年来治疗焦虑症的中药方剂进行分析,酸枣仁、茯苓出现的频率远远超其它药物^[8-9],推测酸枣仁、茯苓应为抗焦虑方剂主要的活性成分来源,两药间可能具有协同增效的作用。而市售抗焦虑中药方剂及保健品中,酸枣仁-茯苓比例并不完全一致,因此本研究基于酸枣仁-茯苓常见临床配比,评价不同比例下酸枣仁-茯苓的抗焦虑作用。在高架十字迷宫实验中,开放臂几乎无边缘保护,类似于人类位于悬崖边;而旷场实验,则是通过动物水平和垂直运动次数,观察进入开阔环境后动物的探究行为和紧张度。在本研究中,所有药物干预组大鼠在开放臂停留时间的比例均显著提高($P<0.05$, $P<0.01$),说明酸枣仁、茯苓均可有效减少动物恐惧和不安情绪。仅帕罗西汀和酸枣仁-茯苓 3:1 复配可同时极显著提高大鼠高架十字迷宫总穿臂次数和进入开放臂次数比例($P<0.01$)、旷场水平运动次数和垂直运动次数($P<0.01$),说明酸枣仁-茯苓 3:1 对提高动物探究特性和减少恐惧、焦虑心理效果最佳。

2.3 各组大鼠炎症水平

与健康个体相比,焦虑症患者炎性细胞因子水平显著升高^[20-21]。研究发现,持续的应激状态可激活免疫细胞诱导炎症因子的产生,引发炎症风暴^[22-24]。炎症反应又将介导细胞凋亡或焦亡,造成功能组织损伤并诱发疾病^[25-27]。多项研究显示炎症因子参与调节动物情绪和行为,可在焦虑、躁狂、抑郁等多种精神类疾病发展中发挥重要作用^[28-30]。海马与杏仁核是脑内独立的两个功能核团,海马负责记忆与学习、杏仁核负责情绪调节及加工,两者共同参与情感、行为的产生和内分泌整合调节过程并介导焦虑样行为的发生^[31-33]。因此本研究,分别检测了酸枣仁-茯苓水提取物对动物整体、海马、杏仁核炎症因子水平的影

表 2 各组大鼠高架十字迷宫试验结果

Table 2 Extracts on behavioristics in the elevated cross maze test of rats

组别	总穿臂次数(次)	入开放臂次数比例(%)	开放臂停留时间比例(%)
正常对照组	12.75±2.19	41.50±4.72	33.42±4.78
模型组	7.50±1.77**	30.77±5.85**	17.29±3.80**
帕罗西汀组	11.13±2.47 ^{##}	38.23±4.26 ^{##}	28.33±3.75 ^{##}
酸枣仁组	9.00±1.31	35.11±4.34	22.83±2.93 ^{##}
茯苓组	8.63±1.92	33.62±5.44	21.95±2.70 [#]
酸枣仁-茯苓1:1组	9.50±1.20	33.98±4.74	21.79±2.82 [#]
酸枣仁-茯苓2:1组	9.75±2.49 [#]	34.59±3.81	23.92±4.41 ^{##}
酸枣仁-茯苓3:1组	10.63±2.20 ^{##}	37.95±4.39 ^{##}	29.79±3.77 ^{##}

注:数据表示为平均值±标准差, $n=8$;与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$;表3同。

表3 各组大鼠旷场试验结果

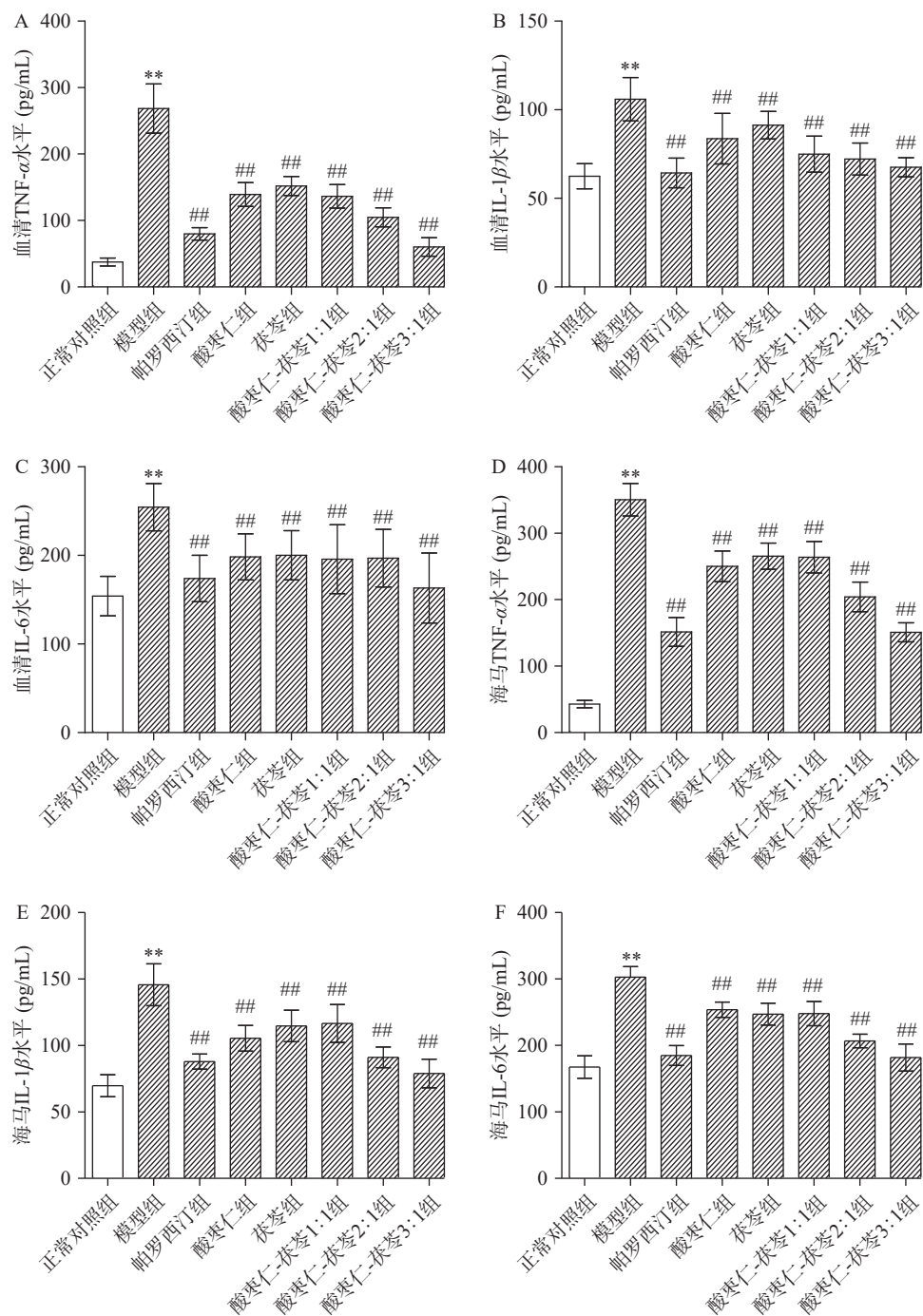
Table 3 Extracts on behavioristics in the open field test of rats

组别	水平运动次数(次)	垂直运动次数(次)
正常对照组	88.00±15.14	18.13±4.09
模型组	39.88±8.18**	9.00±2.73**
帕罗西汀组	62.13±11.27 ^{##}	14.63±3.96 ^{##}
酸枣仁组	54.13±11.01 [#]	12.00±3.30
茯苓组	49.75±8.45	10.50±2.39
酸枣仁-茯苓1:1组	50.13±8.15	10.38±2.62
酸枣仁-茯苓2:1组	54.62±10.51 ^{##}	11.63±2.88
酸枣仁-茯苓3:1组	64.38±12.21 ^{##}	14.13±3.94 ^{##}

响。结果如图2、图3,焦虑模型组大鼠的血清中炎症因子水平、海马及杏仁核组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平及 mRNA 表达均显著升高($P<0.05$,

$P<0.01$), 确证炎症因子参与了大鼠焦虑症的形成发展过程。

与模型组比较,帕罗西汀、酸枣仁、茯苓及各比例酸枣仁-茯苓均能显著改善大鼠血清、海马及杏仁核组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平($P<0.05$, $P<0.01$), 提示酸枣仁、茯苓可能通过降低外周及中枢炎症水平发挥抗焦虑作用。此外,虽各给药组大鼠血清、海马及杏仁核组织中炎症因子水平较模型组大鼠均差异显著($P<0.05$, $P<0.01$),但仍能观察到不同组别药物的抗炎效果有较为明显的区别(图2)。这一作用区别,可以在海马及杏仁核组织中炎症因子 mRNA 表达变化(图3)中得到印证。各组给药均能降低海马及杏仁核组织中炎症因子 mRNA 表达,但仅帕罗西汀及酸枣仁-茯苓 3:1 组结果较模型组有



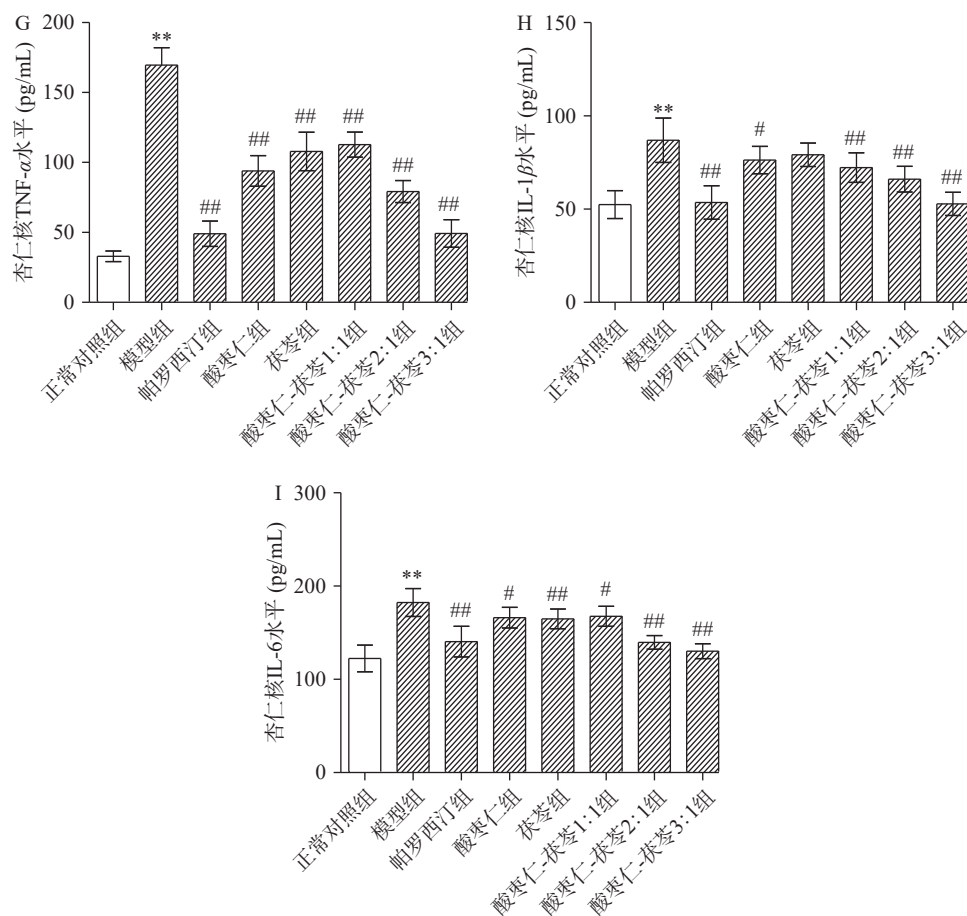
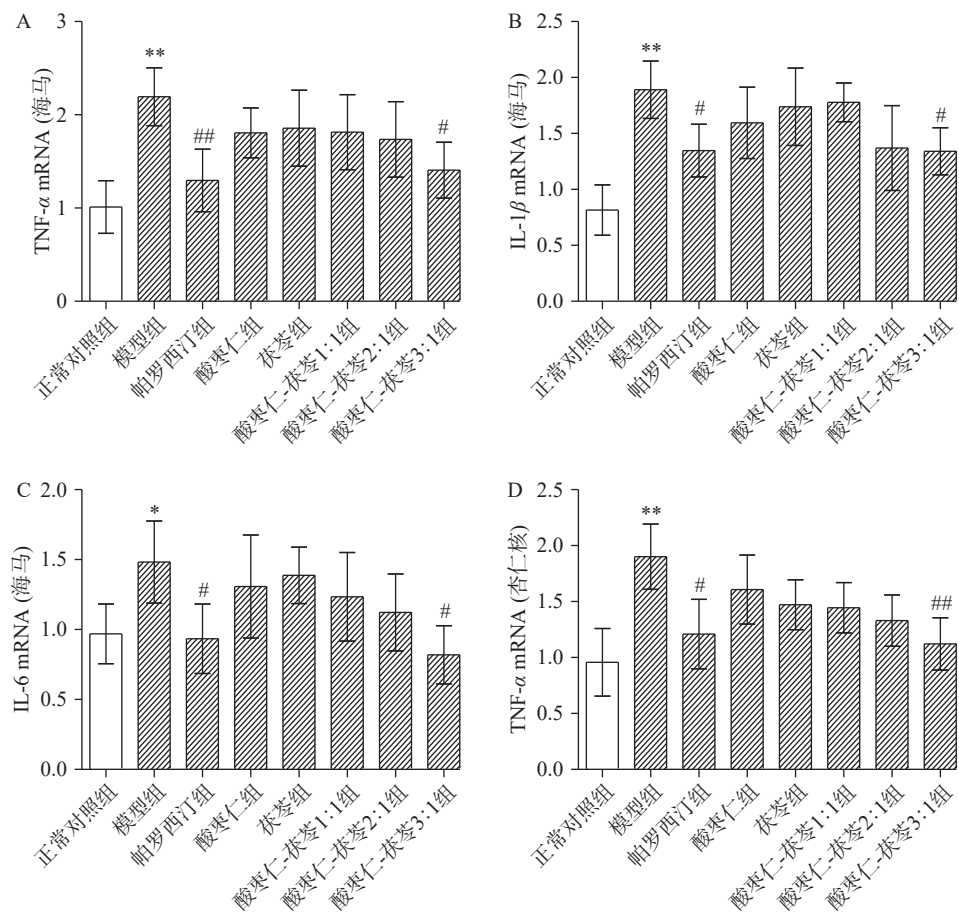


图2 各组大鼠血清及组织炎症因子水平 (pg/mL)

Fig.2 Levels of inflammatory factors in serum and tissue of rats (pg/mL)

注: 数据表示为平均值±标准差, n=8; 与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 图3同。



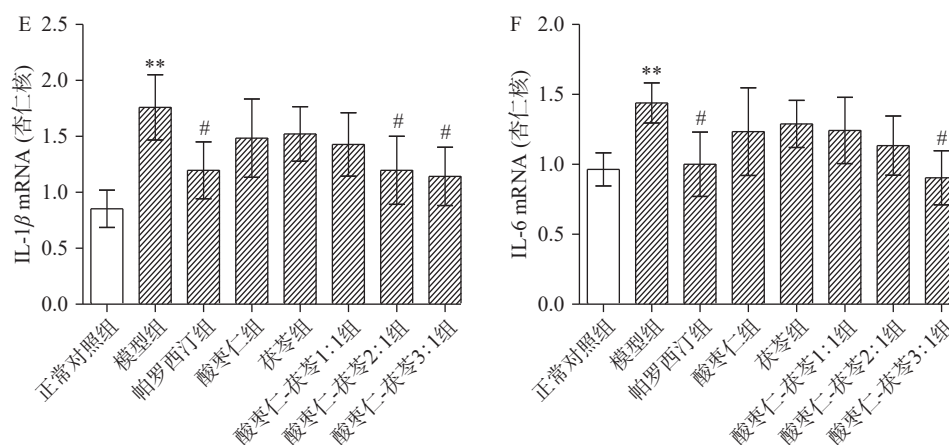


图3 各组大鼠海马及杏仁核组织炎症因子 mRNA 表达

Fig.3 Expression of inflammatory factor mRNA in hippocampus and amygdala of rats

显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$)。研究显示,在持续应激状态下,免疫细胞激活,诱导凋亡相关微粒蛋白移位至胞浆,活化 Caspase-1,进而将 IL-1 β 前体剪切成活化状态并释放。IL-1 β 的释放将进一步激活炎症相关通路,导致 IL-6 等更多炎症因子的产生,引发炎症反应。炎症反应的发生又将激活免疫细胞,如此循环反复,造成炎症风暴并诱发疾病^[23-24]。因此,相较于 mRNA 表达,组织中炎症因子水平可更为灵敏地反映动物的免疫炎症状态。这可能是造成酸枣仁组、茯苓组、酸枣仁-茯苓 1:1 组和酸枣仁-茯苓 2:1 组动物海马和杏仁核组织中炎症因子 mRNA 表达较模型组无显著性差异($P>0.05$),但血浆、海马和杏仁核组织中炎症因子水平较模型组有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$)的原因之一。

刘佳星等^[34]基于 UPLC-TOF-MS/MS 技术对抗焦虑经典方剂-酸枣仁汤的化学成分进行分析,共推断和鉴别出 134 个化合物,其中 41 个化合物来源于酸枣仁、11 个化合物来源于茯苓。已有研究表明黄酮类化合物是酸枣仁镇静安神、抗焦虑的主要活性成分^[35],而三萜酸类化合物则是茯苓抗惊厥、镇静催眠的主要活性成分^[36]。王茜等^[37]基于网络药理学对复方酸枣仁汤药效物质进行筛选,针对关键靶点进行通路富集分析,结果显示酸枣仁汤中黄酮类化合物、三萜酸类化合物与 TNF- α 信号转导通路的研究较多,其机制涉及 MAPK8、CASP3 等多个靶点。这将为酸枣仁-茯苓抗炎机制的进一步研究,提供理论依据和可能的方向。

3 结论

焦虑症致病因素复杂且并发症较多,其防治及发病机制一直是该领域研究的热点。本研究使用慢性束缚加孤养方法建立大鼠焦虑症模型,酸枣仁-茯苓水提物能有效改善焦虑模型大鼠形态、体质量及行为学表现,发挥抗焦虑作用。此外酸枣仁-茯苓水提物能有效降低血清、海马及杏仁核组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平,推测其抗焦虑作用可能与降低外周与中枢炎症水平有关。酸枣仁-茯苓

3:1 复配使用可极显著提高动物造模 28 d 后体质量($P<0.01$),提高高架十字迷宫总穿臂次数、进入开放臂次数比例、开放臂停留时间比例($P<0.01$),提高旷场水平运动次数、垂直运动次数($P<0.01$),降低大鼠血清、海马及杏仁核组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平($P<0.01$)及 mRNA 表达($P<0.05$, $P<0.01$),效果优于酸枣仁-茯苓 1:1 或 1:2 复配及酸枣仁或茯苓单独使用。

本研究从抗炎的角度初步探讨了酸枣仁-茯苓抗焦虑的作用,为酸枣仁、茯苓抗焦虑功能食品的开发提供了新思路 and 理论依据。酸枣仁-茯苓复配抗焦虑的具体作用机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] BUCKNER J D, MORRIS P E, ABARNO C N, et al. Biopsychosocial model social anxiety and substance use revised[J]. *Current Psychiatry Reports*, 2021, 23(6): 1-9.
- [2] CHOI K W, KIM Y K, JEON H J. Comorbid anxiety and depression: Clinical and conceptual consideration and transdiagnostic treatment[J]. *Anxiety Disorders*, 2020: 219-235.
- [3] GRISHAM J R, ROBERTS L, CEREJA S, et al. The role of distress tolerance, anxiety sensitivity, and intolerance of uncertainty in predicting hoarding symptoms in a clinical sample[J]. *Psychiatry Research*, 2018, 267: 94-101.
- [4] NIILEKSELA C R, GHOSH A, JANIS R A. Dynamic changes in generalized anxiety and depression during counseling[J]. *Journal of Counseling Psychology*, 2021, 68(1): 112.
- [5] BAUDON P, JACHENS L. A scoping review of interventions for the treatment of eco-anxiety[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(18): 9636.
- [6] PETROVA N N, PALKIN Y R, FADDEEV D V, et al. Comorbidity of depression and anxiety in clinical practice[J]. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii Imeni SS Korsakova*, 2021, 121(4): 31-37.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. [National Pharmacopoeia Committee Pharmacopoeia of the people's Republic of China: Volume I[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.]
- [8] 胡亚洁, 赵晓锦, 宋咏梅, 等. 基于 CNKI 数据库的酸枣仁汤

- 文献学分析研究[J]. 山东中医药大学学报, 2020, 44(1): 23–29. [HU Yajie, ZHAO Xiaojing, SONG Yongmei, et al. Literature analysis of Suanzaoren decoction based on CNKI database[J]. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 44(1): 23–29.]
- [9] 王艳, 张卓铭, 张红丽. 酸枣仁汤拟方初衷及药物组成和补泻机制研究[J]. 山西中医学院学报, 2017, 18(3): 69–70. [WANG Yan, ZHANG Zhuoming, ZHANG Hongli. Study on the original intention, drug composition and reinforcing and reducing mechanism of Suanzaoren decoction[J]. Journal of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, 2017, 18(3): 69–70.]
- [10] 钟亚东, 潘猛, 徐德昌, 等. 茯苓-山药复配米稀和猴头菇饼干对功能性消化不良大鼠的改善作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 355–362. [ZHONG Yadong, PAN Meng, XU Dechang, et al. Ameliorative effect of *Poria cocos*-yam riched rice paste and *Hericium erinaceus* biscuit on rats with functional dyspepsia[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 355–362.]
- [11] LI L B, KIM Y W, WANG Y H, et al. Methanol extract of semen Ziziphi Spinosae attenuates ethanol withdrawal anxiety by improving neuropeptide signaling in the central amygdala[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 19(1): 1–15.
- [12] GU C, ZHAO Z L, ZHU X, et al. Aqueous extract of semen ziziphi spinosae exerts anxiolytic effects during nicotine withdrawal via improvement of amygdaloid CRF/CRF1R signaling[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018: 2419183.
- [13] SINGH A, ZHAO K. Treatment of insomnia with traditional Chinese herbal medicine[J]. *International Review of Neurobiology*, 2017, 135: 97–115.
- [14] 闫艳, 张敏, 崔小芳, 等. 酸枣仁化学成分体内过程及其质量标志物研究思路探讨[J]. 中草药, 2019, 50(2): 299–309. [YAN Yan, ZHANG Min, CUI Xiaofang, et al. Discussion on research ideas for process *in vivo* of chemical compositions from Ziziphi Spinosae Semen and its quality marker[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(2): 299–309.]
- [15] 闫玺镁. 基于酸枣仁汤的中药保健品宁心安神口服液研究与开发[D]. 太原: 山西中医药大学, 2020. [YAN Ximei. Research and development of Chinese medicine health product Ningxi-an Shen oral liquid based on Suanzaoren decoction[D]. Taiyuan: Shanxi University of Chinese Medicine, 2020]
- [16] 蔡成龙. 茯苓皮总三萜脂质体的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2021. [CAI Chenglong. Study on total triterpene liposomes of *Poria cocos* cortex[D]. Jinan: Shandong University of Chinese Medicine, 2021]
- [17] CHIBA S, NUMAKAWA T, NINOMIYA M, et al. Chronic restraint stress causes anxiety-and depression-like behaviors, down-regulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex[J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2012, 39(1): 112–119.
- [18] BAGHERI Y, FATHI E, MAGHOUL A, et al. Effects of *Achillea tenuifolia* Lam. hydro-alcoholic extract on anxiety-like behavior and reproductive parameters in rat model of chronic restraint stress[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2021, 40(11): 1852–1866.
- [19] 孙世光. 基于“行为组学”模式焦虑动物模型评价技术体系构建[D]. 济南: 山东中医药大学, 2016. [SUN Shiguang. Animal models of anxiety: A behavioral "omics" perspective[D]. Jinan: Shandong University of Chinese Medicine, 2016.]
- [20] HOU R, YE G, LI Y, et al. Effects of SSRIs on peripheral inflammatory cytokines in patients with generalized anxiety disorder[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2019, 81: 105–110.
- [21] KEY K V, MUDD-MARTIN G, MOSER D K, et al. Inflammatory genotype moderates the association between anxiety and systemic inflammation in adults at risk for cardiovascular disease[J]. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 2022, 37(1): 64–72.
- [22] ZHENG Z H, TU J L, LI X H, et al. Neuroinflammation induces anxiety-and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2021, 91: 505–518.
- [23] 王小燕, 谭子虎, 喻小明, 等. 基于 Nlrp3/ASC/Caspase-1 通路探讨加味薯蓣丸对 APP/PS1 痴呆小鼠神经炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(3): 8–14. [WANG Xiaoyan, TAN Zihu, YU Xiaoming, et al. Effect of modified Shuyuwan on neuroinflammation in APP/PS1 dementia mice based on Nlrp3/ASC/caspase-1 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2021, 27(3): 8–14.]
- [24] MANGAN M S J, OLHAVA E J, ROUSH W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(8): 588–606.
- [25] BAKHTIARI-DOVVOMBAYGI H, IZADI S, MOGHADAM M Z, et al. Beneficial effects of vitamin D on anxiety and depression-like behaviors induced by unpredictable chronic mild stress by suppression of brain oxidative stress and neuroinflammation in rats[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2021, 394(4): 655–667.
- [26] ROCHA-GOMES A, TEIXEIRA A E, DE OLIVEIRA D G, et al. LPS tolerance prevents anxiety-like behavior and amygdala inflammation of high-fat-fed dams' adolescent offspring[J]. *Behavioural Brain Research*, 2021, 411: 113371.
- [27] BEHESHTI F, HASHEMZEH M, HOSSEINI M, et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in depression-and anxiety-like behaviors chronically induced by lipopolysaccharide in rats: Evidence from inflammation and oxidative stress[J]. *Behavioural Brain Research*, 2020, 392: 112720.
- [28] TROUBAT R, BARONE P, LEMAN S, et al. Neuroinflammation and depression: A review[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2021, 53(1): 151–171.
- [29] BEUREL E, TOUPS M, NEMEROFF C B. The bidirectional relationship of depression and inflammation: Double trouble[J]. *Neuron*, 2020, 107(2): 234–256.
- [30] ENNS M W, BERNSTEIN C N, KROEKER K, et al. The association of fatigue, pain, depression and anxiety with work and activity impairment in immune mediated inflammatory diseases[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198975.

- [31] MEI L, ZHOU Y, SUN Y, et al. Acetylcholine muscarinic receptors in ventral hippocampus modulate stress-induced anxiety-like behaviors in mice[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2020, 13: 235.
- [32] PI G, GAO D, WU D, et al. Posterior basolateral amygdala to ventral hippocampal CA1 drives approach behaviour to exert an anxiolytic effect[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1–15.
- [33] BACH D R, HOFFMANN M, FINKE C, et al. Disentangling hippocampal and amygdala contribution to human anxiety-like behavior[J]. *Journal of Neuroscience*, 2019, 39(43): 85.
- [34] 刘佳星, 魏洁, 武锦春, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的酸枣仁汤颗粒化学成分分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(12): 1–12. [LIU Jiaying, WEI Jie, WU Jingchun, et al. Identification of chemical constituents in suanzaoren tang granules by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2021, 27(12): 1–12.]
- [35] 张婷, 张岩, 王文彤, 等. 酸枣仁中黄酮成分及其药理作用研究进展[J]. *天津药学*, 2018, 30(1): 69–74. [ZHANG Ting, ZHANG Yan, WANG Wentong, et al. Progress of research on flavonoid components and their pharmacological effects in Ziziphi Spinosea Semen[J]. *Tianjin Pharmacy*, 2018, 30(1): 69–74.]
- [36] GAO Y, YAN H, JIN R, et al. Antiepileptic activity of total triterpenes isolated from *Poria cocos* is mediated by suppression of aspartic and glutamic acids in the brain[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54(11): 2528–2535.
- [37] 王茜, 杨肖, 张倩, 等. 基于网络药理学的复方酸枣仁汤的药效物质筛选及其含量测定[J]. *药科学报*, 2021, 56(11): 3130–3140. [WANG Qian, YANG Xiao, ZHANG Qian, et al. Screening and determination of effective components in compound suanzaoren decoction based on network pharmacology[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2021, 56(11): 3130–3140.]