

白香丹胶囊对 PMDD 肝气逆证模型大鼠血清抗焦虑样作用机制研究

王 帅 郜彦鑫 张 洪 付晓杰 刘金虎 张 浩 王杰琼 宋春红

摘 要 **目的** 以经前烦躁障碍症 (premenstrual dysphoric disorder, PMDD) 肝气逆证模型大鼠为载体探索白香丹胶囊对模型大鼠焦虑样行为的影响,并初步探究其血清作用机制。**方法** 以居住入侵法制备 PMDD 肝气逆证模型大鼠并进行药物干预,给药后通过攻击行为测试、旷场实验、高架十字迷宫实验对 PMDD 肝气逆证模型大鼠焦虑样行为进行检测;腹主动脉取血并制备血清,使用 ELISA 法检测大鼠血清中孕酮(P)、四氢孕酮(ALLO)、 γ -氨基丁酸(GABA)的含量变化。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠攻击行为明显增加($P < 0.01$);旷场实验,总路程增加而在中央区停留的总时间减少($P < 0.01$);高架试验,进入开放臂的次数百分比和时间百分比均明显减少($P < 0.01$);血清中 P 水平、ALLO 含量、GABA 水平均显著下降($P < 0.05$)。与模型组比较,氟西汀组和白香丹组大鼠的攻击行为均明显减小($P < 0.01$);旷场实验,总路程减少而在中央区停留的总时间均明显增加($P < 0.01$);高架试验,进入开放臂的次数百分比和时间百分比均明显增加($P < 0.01$);血清中 P 水平、ALLO 水平、GABA 水平均显著上升($P < 0.05$)。**结论** 白香丹胶囊对 PMDD 肝气逆证模型大鼠有明显的抗焦虑样作用,并明显增加模型大鼠血清中的 P、ALLO、GABA 水平,据此推测该病证作用机制可能与调节体内 P、ALLO、GABA 的含量有关。

关键词 白香丹胶囊 PMDD 肝气逆证 焦虑

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.016

Anti-anxiety-like Mechanism of Baixiangdan Capsule on Serum of Rats with PMDD Liver-qi Syndrome. Wang Shuai, Gao Yanxin, Zhang Hong, et al. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong 250355, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of Baixiangdan Capsule on the anxiety-like behavior of model rats by using the model of pre-menstrual irritability and liver-qi syndrome. The mechanism of action was also explored. **Methods** The rats with PMDD liver-qi stagnation syndrome were prepared by residential invasion method and drug intervention was performed. After the administration, the anxiety behaviors of rats with PMDD liver-qi syndrome were tested by attack behavior test, open field test and elevated plus maze test for behavioral evaluation. The blood was taken from the posterior abdominal aorta and serum was prepared. The content of progesterone, tetrahydroprogesterone and γ -aminobutyric acid in the serum of rats was detected by ELISA method. **Results** Compared with the control, the attack behavior of the model group was significantly increased ($P < 0.01$), the total distances increased and the central residence time decreased ($P < 0.01$) in the open field text. The open arm entry and the open arm time of the elevated plus-maze test were significantly decreased ($P < 0.01$). Serum P levels, ALLO levels and GABA levels were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the attack behaviors of the FXT group and the BXD group were significantly reduced ($P < 0.01$), the total distances decreased and the central residence time increased significantly ($P < 0.01$) in the open field text. Open arm entry and the open arm time of the elevated plus-maze test increased significantly ($P < 0.01$). Serum P levels, ALLO levels and GABA levels increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Baixiangdan Capsule has obvious anti-anxiety-like effect on PMDD liver-qi syndrome model rats, and significantly increases the levels of P, ALLO and GABA in the serum of model rats. It is speculated that the mechanism of action may be related to the regulation of P, ALLO and GABA in vivo.

Key words Baixiangdan capsule; PMDD liver-qi; Anxiety

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81403294、81603510);国家级大学生创新创业训练计划项目(201810441020);山东省中医药科技发展计划项目(2015-021)

作者单位:250355 济南,山东中医药大学药学院(王帅、郜彦鑫、张洪、付晓杰、刘金虎、王杰琼),中医药经典理论教育部重点实验室(张浩、王杰琼、宋春红)

通讯作者:王杰琼,副教授,电子信箱:jieqiong2016@126.com;宋春红,副教授,电子信箱:sch-64552@126.com

经前烦躁障碍症 (premenstrual dysphoric disorder, PMDD), 是指女性月经来临前一周反复出现的一系列情感、躯体及社会人际交往方面的综合症状, 具有月经来临后症状减轻月经结束后症状消失的特点, 是经前期综合征 (premenstrual syndrome, PMS) 的严重亚型之一^[1]。PMDD 肝气逆证作为 PMDD 的主要证候之一, 除具有 PMDD 的一般症状外, 主要表现为急躁易怒、小腹坠胀、焦虑、心烦等症状, 极大地影响女性的正常经期生活^[2,3]。近年来, 大量国内外相关研究表明, PMDD 肝气逆证的发生可能与患者体内雌、孕激素及抑制性氨基酸神经递质 γ -氨基丁酸的表达异常有关。实验室前期动物实验研究表明, 白香丹胶囊能提高 PMDD 肝气逆证大鼠的行为学得分, 但其作用机制尚待深入研究^[4]。本研究在实验室前期行为学评价的基础上, 进一步检测给药后大鼠血清中孕酮 (P)、四氢孕酮 (ALLO)、 γ -氨基丁酸 (GABA) 的含量变化, 研究白香丹胶囊对 PMDD 肝气逆证模型大鼠血清中 P、ALLO、GABA 的影响, 进一步明确白香丹胶囊对 PMDD 肝气逆证在血清中的具体作用机制, 为临床应用及进一步的机制研究奠定基础。

材料与方法

1. 实验动物: SPF 级雌性健康未孕 Wistar 大鼠, 体质量 135 ± 15 g, 200 只, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证编号: SCXK (京) 2018-0001。实验前适应性饲养 7 天, 每天正常抓握所有大鼠, 每次每只大鼠抓握时间不少于 5min。饲养环境恒温 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 恒湿 $60\% \pm 5\%$ RH, 昼夜颠倒 (12h/12h) 每天 22:00 时开灯、次日 8:00 时关灯, 食物和水正常摄取。所有操作均在 ≤ 25 lx 的暗淡红色灯光下进行。

2. 仪器与试剂: 电子天平 (ZA102R4, 德国赛多利斯集团); 大鼠受孕期分析仪 (MK-11, 日本 Muromachi); SuperMaze 动物行为分析系统 (上海欣软信息科技有限公司); 大鼠高架十字迷宫实验箱体 (上海欣软信息科技有限公司); 大鼠旷场实验箱体 (上海欣软信息科技有限公司); 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司); 青霉素 (山东鲁抗医药股份有限公司; 批号: 140602); 白香丹胶囊 (山东中医药大学天然药物实验室制; 批号: 20171030); 盐酸氟西汀分散片 (常州四药制药有限公司; 批号 H20170462); 孕酮 ELISA 检测试剂盒 (武汉华美生物科技有限公司; 产品编号: C013218011); 四氢孕酮 ELISA 检测试剂盒 (武汉伊艾博科技有限公司; 产品编号: 8A296J); γ -

氨基丁酸 ELISA 检测试剂盒 (武汉基因美生物科技有限公司; 产品编号: GR201801-1)。

3. 居住入侵法制备 PMDD 肝气逆证模型大鼠: (1) 实验大鼠动情周期的确定: 根据大鼠受孕期分析仪来判断雌性大鼠动情周期: 阴道电阻值 $\geq 3\text{Kohm}$ 的雌性大鼠处于接受期 (约 1 天), 阴道电阻值 $< 3\text{Kohm}$ 的雌性大鼠处于非接受期 (约 3 天), 动情周期规律的大鼠符合一定的规律, 即一个动情周期 (约 4 天) 的电阻值变化为高、低、低、低。将连续两个动情周期 (约 8 天) 阴道电阻值变化符合上述规律的雌性大鼠作为动情周期规律大鼠。(2) 居住入侵诱导实验: 动情周期规律大鼠作为实验的居住鼠, 动情周期不规律大鼠作为实验的入侵鼠, 并对入侵鼠行双侧卵巢摘除手术, 手术恢复 14 天, 待其痊愈后, 进行居住入侵诱导实验。昼夜颠倒后在 14:30~17:30 时大鼠处于夜间兴奋状态, 因此每天实验时间均为该时间段, 并在居住鼠饲养环境中进行。对居住鼠进行连续 4 天 (一个完整动情周期) 的居住入侵诱导实验。待所有居住鼠居住入侵实验结束后, 采用盲法对实验过程进行评定。

4. 实验动物分组及给药: 居住入侵实验结束后, 根据各居住鼠的行为测试得分高低排列。将得分前 75% 的大鼠平均分为 3 组, 即 PMDD 肝气逆证模型组 (Model)、白香丹胶囊干预组 (BXD) 和盐酸氟西汀分散片干预组 (FXT), 并将得分后 25% 的大鼠作为空白对照组 (Control)。于每日 8:30 时按 1ml/100g 灌胃给药, 连续给药 28 天。BXD 组大鼠给予白香丹胶囊, 给药量为 $0.2\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$; FXT 组大鼠给予盐酸氟西汀分散片, 给药量为 $2.7\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$; 模型组及正常组大鼠给予同等体积的纯水。

5. 行为学评价: 行为学评价于非接受期进行, 末次给药 1h 后进行攻击行为测试、旷场实验和高架十字迷宫实验。采用攻击行为测试来评价大鼠给药后激怒行为, 采用旷场实验和高架十字迷宫实验来评价大鼠的焦虑样行为。(1) 攻击行为测试: 对所有的居住鼠进行 4 天 (一个完整动情周期) 的攻击行为测试, 具体方法同居住入侵诱导实验。(2) 旷场实验: 于大鼠的夜间进行, 具体方法为轻捏待测大鼠颈背部皮肤并将其置于黑色的旷场箱 (规格: $50\text{cm} \times 50\text{cm} \times 40\text{cm}$) 的中央, 用 Supermaze 3.0 动物行为分析系统记录、跟踪待测大鼠 6min 内的自由活动行为。观察的指标包括总路程、中央区停留的总时间。为避免大鼠间气味的相互干扰, 每只大鼠测定结束后应用乙醇

将旷场箱擦拭干净后,再进行下一只老鼠的检测。

(3)高架十字迷宫实验:待测大鼠跑完旷场实验后,轻捏其颈背部皮肤并将其放于十字高架迷宫的中央区,且保证大鼠头部朝向任一开臂并允许其自由探索。用 Supermaze 3.0 动物行为分析系统记录、跟踪大鼠 5min 内自由活动行为。观察的指标包括进入两开臂的次数(OE)、进入两开臂的时间(OT)、进入两封臂的次数(CE)、进入两封臂的时间(CT)。

6.取材并检测:生殖内分泌激素的测定于待测大鼠全部完成行为学评价后(确保待测大鼠此时仍处于非接受期),10%水合氯醛(35mg/kg)腹腔麻醉,大鼠腹主动脉取血,血样静置 30min 后 3500r/min 离心 10min,将离心后的上层血清转移至 EP 管中。采用 ELISA 法分别测定各组大鼠血清中 P、ALLO、GABA 的含量,操作按试剂盒说明书进行。

7.统计学方法:实验数据用 GraphPad Prism 6 统计做图软件分析,实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.攻击行为测试:与正常组大鼠比较,模型组大鼠攻击行为明显增加($P < 0.01$);与模型组大鼠比

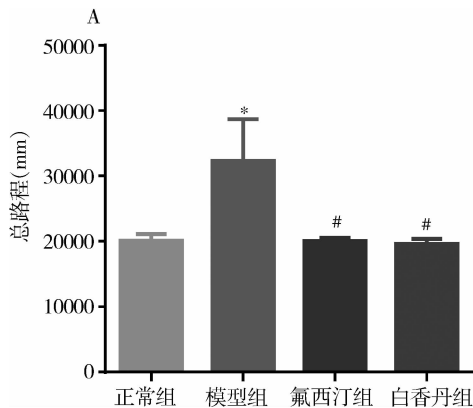


图2 各组大鼠旷场实验得分($\bar{x} \pm s, n = 12$)

与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$

3.高架十字迷宫实验:与正常组比较,模型组大鼠进入开放臂的次数百分比和时间百分比均明显减少($P < 0.01$);与模型组比较,FXT组和BXD组大鼠进入开放臂的次数百分比和时间百分比均明显增加($P < 0.01$);与FXT组比较,BXD组大鼠进入开放臂的次数百分比和时间百分比均略有增加,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见图3。

4.血清中指标检测:与正常组比较,模型组大鼠

较,FXT组大鼠和BXD组大鼠的攻击行为均明显减小($P < 0.01$),详见图1。

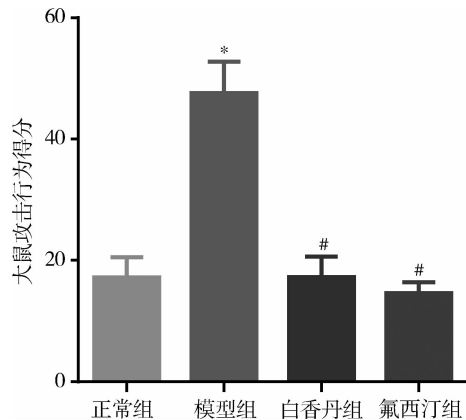
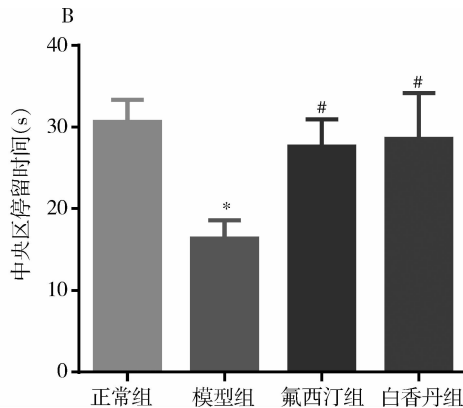


图1 各组大鼠攻击行为测试得分($\bar{x} \pm s, n = 12$)

与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$

2.旷场实验:与正常组比较,模型组大鼠总路程增加($P < 0.01$),而在中央区停留的总时间减少($P < 0.01$);与模型组比较,FXT组和BXD组大鼠总路程均明显减少($P < 0.01$),而在中央区停留的总时间均明显增加($P < 0.01$);与FXT组比较,BXD组大鼠总路程稍有增加,在中央区停留的总时间也稍有增加,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见图2。



血清中P水平显著下降($P < 0.05$),ALLO水平显著下降($P < 0.05$),GABA水平显著下降($P < 0.05$);与模型组比较,FXT组和BXD组大鼠血清中P水平均显著上升($P < 0.05$),ALLO水平均显著上升($P < 0.05$),GABA水平显著上升($P < 0.05$);与FXT组比较,BXD组大鼠血清中P水平略有上升,ALLO水平略有下降,GABA水平略有下降,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见图4及表1。

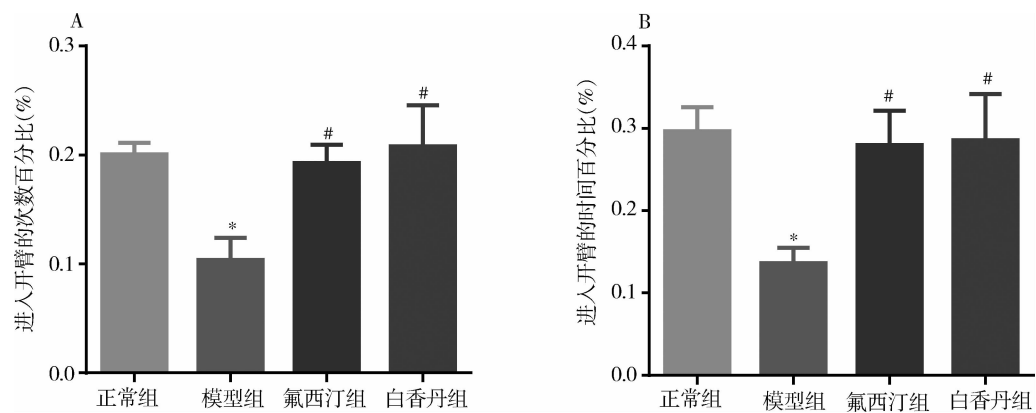


图 3 各组大鼠高架十字迷宫实验得分 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$

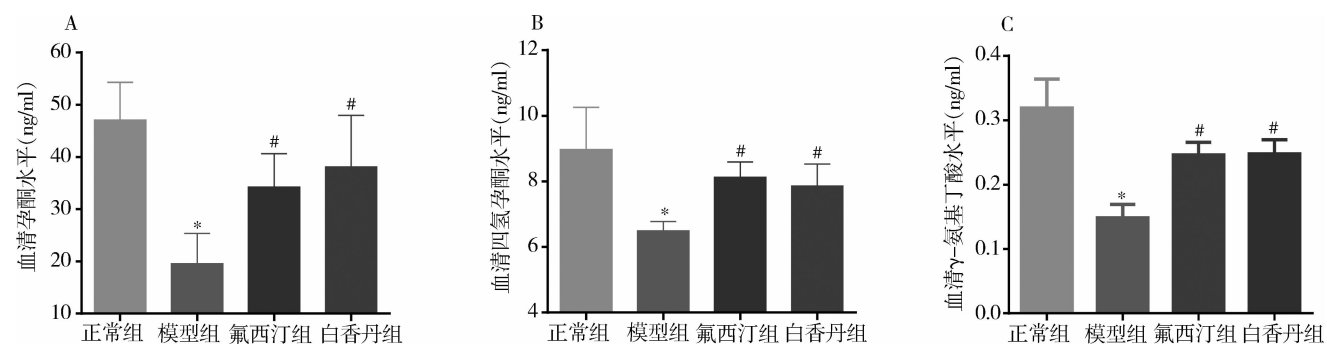


图 4 各组大鼠血清指标水平 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

表 1 各组大鼠血清指标水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药量	孕酮 (ng/ml)	四氢孕酮 (ng/ml)	γ - 氨基丁酸 (ng/ml)
正常组	12	相等剂量	47.11 ± 3.226	8.975 ± 0.5251	47.11 ± 3.226
模型组	12	相等剂量	19.56 ± 2.359 *	6.497 ± 0.1135 *	19.56 ± 2.359 *
氟西汀组	12	2.7mg/(kg · d)	34.28 ± 2.840 #	8.130 ± 0.1895 #	34.28 ± 2.840 #
白香丹组	12	0.2g/(kg · d)	38.14 ± 4.029 #	7.863 ± 0.3330 #	38.14 ± 4.029 #

与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

讨 论

PMDD 肝气逆证作为 PMDD 的亚型之一,突出表现为急躁易怒、心烦、焦虑、小腹坠胀等症状,严重损害了女性的身心健康,给社会带来了沉重负担。近年来有关 PMDD 肝气逆证的发病机制研究逐渐深入,越来越多的研究表明该疾病的发病机制与机体某些调节激素及神经递质的水平异常有关。

大量研究发现,性激素水平改变与女性情绪密切相关^[5]。PMDD 与卵巢黄体分泌的孕酮关系密切^[6]。乔明琦等^[7]研究证实 PMDD 肝气逆证患者 E₂、P 卵泡期分泌峰的低水平与黄体期分泌峰的阙如,推测其是 PMDD 肝气逆证微观机制之一,这与笔者研究结果一

致,PMDD 肝气逆证模型大鼠血清中 P 含量明显降低,药物干预后明显增加,行为学症状得以改善,血清中 P 含量明显增加。表明模型大鼠体内 P 含量的紊乱是诱发 PMDD 肝气逆证发生的重要机制,白香丹胶囊可以通过提高模型大鼠体内 P 的含量来发挥作用。ALLO 作为另一类重要的神经类固醇,被认为是强效 GABA_A 受体激动剂,其血清水平能够反映月经周期的孕酮变化^[8,9]。

Schüle 等^[10]研究表明,减少 ALLO 在外周血或脑脊液水平与焦虑症、严重抑郁症、经前焦虑障碍或攻击行为密切相关,ALLO 降低会诱发焦虑症状的出现,症状改善后其含量会有所增加,这与本研究结果

一致,模型大鼠血清中 ALLO 含量呈现大致相同的变化,模型组大鼠与对照组比较,ALLO 水平显著性下降,经过白香丹胶囊治疗后,其 ALLO 水平显著增加。也与 ALLO 在实验动物身上体现出麻醉和抗焦虑特性的研究一致^[11,12]。但也有研究证明 ALLO 水平降低对个体是有益的,可能是因为 ALLO 在杏仁核反应中存在双峰效应有关^[13]。对于 PMDD 患者与正常对照组 ALLO 血清水平存在一定差异的结论,有待于进一步研究^[14]。

γ -氨基丁酸(GABA)是已知重要的抑制性神经递质,有抑制攻击性行为的作用。调查显示有攻击性倾向的人,外周血与攻击性史呈负相关^[15]。研究证实,GABA 可以有效抑制 HPA 轴功能亢进,进行负反馈调节,改善情绪障碍类疾病,当焦虑症状出现时 GABA 含量显著性下降^[16]。本研究中模型大鼠血清中 GABA 含量显著性下降,给予白香丹胶囊后,血清中 GABA 含量明显增加,与对照组 GABA 水平比较,差异无统计学意义。冯玉等^[17]研究证实,白香丹胶囊通过提高 GABA 的水平而对 PMS 肝气逆证大鼠血清和大脑皮质神经中枢有一定的抑制作用。可知 GABA 水平异常是 PMDD 肝气逆证的重要病理机制,也是白香丹胶囊的重要作用靶点。

综上所述,本研究证实白香丹胶囊可提高 PMDD 肝气逆证模型大鼠血清中 P、ALLO、GABA 水平,为探究 PMDD 肝气逆证模型大鼠脑区发病机制的研究奠定了基础。由此推测 PMDD 肝气逆证的发病可能与机体中枢系统中上述指标的含量下降有关,而白香丹胶囊可以通过提升 P、GABA、ALLO 的水平发挥治疗作用。由于技术水平有限,本研究未能深入探讨其在脑区的水平差异,有待于在今后开展的研究中证实。

参考文献

- 赵飞,乔明琦,杨焕新,等.“病症结合”辩证经前烦躁症[J]. 中华中医药杂志,2018,33(4):1419-1422
- 孙文君,乔明琦,王海军. 关于经前烦躁障碍症亚型的理论探讨[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(10):2071-2073
- 高明周,高冬梅,王杰琼,等. 经前期综合征心理学研究进展[J]. 医学研究生学报,2018,31(9):977-980
- 宗绍波,朱德豪,魏盛. 白香丹胶囊对经前期综合征肝气逆证模型大鼠学习记忆功能的影响[J]. 中国药理学通报,2015,31(2):284-289
- Spencer JJ, Waters EM, Romeo RD, *et al.* Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampus function[J]. Neuroendocrinol, 2008,29(2):219-237
- Bäckström T, Andreen L, Birzniece V, *et al.* The role of hormones and hormonal treatments in premenstrual syndrome[J]. CNS Drugs, 2003, 17(5):325-342
- 乔明琦,张惠云,于艳红,等. 经前期综合征肝气逆证患者月经周期血清雌二醇,孕酮含量的动态变化[J]. 中医杂志,2006,47(4):295-296
- 蒋湘云,尚超,李雷,等. 四氢孕酮:抑郁和焦虑障碍治疗的潜在新靶点[J]. 神经药理学报,2016,2(6):26-28
- Bixo M, Andersson A, Winblad B, *et al.* T Bäckström: progesterone, 5alpha-pregnane-3, 20-dione and 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one in specific regions of the human female brain in different endocrine states[J]. Brain Res, 1997,764:173-178
- Schüle C, Nothdurfter C, Rupprecht R. The role of allopregnanolone in depression and anxiety[J]. Prog Neurobiol,2014,113:79-87
- Akwa Y, Purdy RH, Koob GF, *et al.* The amygdala mediates the anxiolytic-like effect of the neurosteroid allopregnanolone in rat[J]. Behav Brain Res, 1999, 106(1):119-125
- Norberg L, Bäckström T, Wahlström G. Anaesthetic effects of pregnanolone in combination with allopregnanolone, thiopental, hexobarbital and flurazepam: an EEG study in the rat[J]. Bri J Anaesth, 1999, 82(5):731-737
- Martinez PE, Rubinow DR, Nieman LK, *et al.* 5 alpha-Reductase inhibition prevents the luteal phase increase in plasma allopregnanolone levels and mitigates symptoms in women with premenstrual dysphoric disorder[J]. Neuropsychopharmacology, 2016, 41(4):1093-1102
- Wang M, Seippel L, Purdy RH, *et al.* Relationship between symptom severity and steroid variation in women with premenstrual syndrome: study on serum pregnenolone, pregnenolone sulfate, 5 alpha-pregnane-3, 20-dione and 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(3):1076-1082
- 刘玉,杨德兰. 攻击行为的生物学研究进展[J]. 重庆医学,2004,33(10):1583-1585
- Van Broekhoven F, Bäckström T, Van Luijckelaar G, *et al.* Effects of allopregnanolone on sedation in men, and in women on oral contraceptives[J]. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32(5):555-564
- 冯玉,张惠云. 白香丹胶囊对经前期综合征肝气逆证大鼠血清及大脑皮层中 γ -氨基丁酸和谷氨酸的影响[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(4):746-747

(收稿日期:2018-12-22)

(修回日期:2018-12-28)