

引用:鲍晓虹,叶田园,程肖蕊.二十味肉豆蔻丸改善戊四唑致小鼠焦虑样行为和HPG轴的作用研究[J].中医药导报,2026,32(1):92-97.

# 二十味肉豆蔻丸改善戊四唑致小鼠焦虑样行为和HPG轴的作用研究\*

鲍晓虹,叶田园,程肖蕊

(山东中医药大学中医药创新研究院,山东 济南 250355)

[摘要] 目的:研究藏药二十味肉豆蔻丸对单次腹腔注射戊四唑(PTZ)诱导ICR小鼠焦虑样行为的影响,并从下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴角度初步探讨其作用机制。方法:单次腹腔注射PTZ后,灌胃给予ICR小鼠二十味肉豆蔻丸,采用O迷宫、高架十字迷宫、明暗箱、旷场实验检测其对PTZ诱导的焦虑样行为的影响,采用ELISA方法检测小鼠下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)、垂体促卵泡成熟素(FSH)、黄体生成素(LH)、血浆雄激素(T)和雌激素(E<sub>2</sub>)的含量。结果:单次腹腔注射PTZ能够引起小鼠焦虑样行为,二十味肉豆蔻丸可显著延长小鼠明暗箱实验中明箱停留时间、提高明箱停留时间百分比;在旷场实验中可显著延长小鼠运动总距离、增加进入中央区的次数、增加中央区运动距离、提高中央区运动距离百分比。二十味肉豆蔻丸可促进小鼠垂体中LH的分泌、增加血浆中T的含量。结论:二十味肉豆蔻丸可改善单次腹腔注射PTZ诱导的ICR小鼠焦虑样行为,其机制可能在于增强HPG轴功能,调节γ氨基丁酸(GABA)能神经传递。

[关键词] 焦虑;二十味肉豆蔻丸;下丘脑-垂体-性腺轴;戊四唑;小鼠

[中图分类号] R291.408 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2026)01-0092-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2026.01.015

## Effect of Ershiwei Roudoukou Wan (二十味肉豆蔻丸) on Anxiety-like Behavior and the HPG Axis in Mice Induced by Pentylenetetrazole

BAO Xiaohong, YE Tianyuan, CHENG Xiaorui

(Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan Shandong 250355, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of the Zang medicine Ershiwei Roudoukou Wan on anxiety-like behavior induced by a single intraperitoneal injection of pentylenetetrazole (PTZ) in ICR mice and to preliminarily explore its mechanism from the perspective of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. Methods: After modeling via a single intraperitoneal injection of PTZ, ICR mice were administered Ershiwei Roudoukou Wan by gavage. The effects on PTZ-induced anxiety-like behavior were assessed using the O maze, elevated plus maze, light-dark box, and open field test. The levels of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus, as well as follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in the pituitary, and plasma testosterone (T) and estradiol (E<sub>2</sub>) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results: A single intraperitoneal injection of PTZ induced anxiety-like behavior in mice. Treatment with Ershiwei Roudoukou Wan significantly increased the time spent in the light compartment and the percentage of time in the light compartment in the light-dark box test. In the open field test, it significantly increased the total movement distance, the number of entries into the central area, the movement distance within the central area, and the percentage of central area movement distance. Furthermore, Ershiwei Roudoukou Wan promoted the secretion of LH in the pituitary and increased the plasma T level. Conclusion: Ershiwei Roudoukou Wan can improve anxiety-like behavior in ICR mice induced by a single intraperitoneal injection of PTZ. The mechanism may involve enhancing the function of the HPG axis and regulating gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic neurotransmission.

[Keywords] anxiety; Ershiwei Roudoukou Wan; HPG axis; pentylenetetrazole; mice

\*基金项目:中央引导地方科技发展专项资金项目(YDZX2023003);西藏自治区科技计划重点研发计划(XZ202201ZY0026G)

通信作者:程肖蕊,女,教授,研究方向为中医药理学

藏药二十味肉豆蔻丸(国药准字Z20023260)用于治疗“宁隆”病引起的神志紊乱、烦躁、精神恍惚、失眠、头晕、健忘、耳鸣、颤抖、惊悸,为镇静安神药。该药由肉豆蔻、降香、沉香、石灰华、广枣、红花、藏茴香、丁香、大蒜(炭)、豆蔻、阿魏、草果、诃子、乳香、毛诃子、儿茶、余甘子、力嘎都、檀香、人工牛黄组成。现代研究表明,二十味肉豆蔻丸主要治疗妇科病、心脑血管疾病、内分泌疾病和藏医中的宁隆病<sup>[1]</sup>。

焦虑症是常见的精神疾病,目前临床并无理想处置措施。焦虑症通常持续6个月或以上,表现为过度的焦虑、担忧、恐惧、紧张并伴有疲劳、易怒、睡眠和饮食障碍等。随着生活压力的增加,焦虑症的患病率不断攀升,严重影响患者的躯体、心理及社会功能。焦虑障碍中国是精神障碍造成负担的主要原因<sup>[2]</sup>。二十味肉豆蔻丸的临床适应证中神志紊乱、烦躁、精神恍惚、失眠、惊悸与焦虑症的临床表现相似,其是否具有防治焦虑症的作用目前尚未见报道。因此,本文研究二十味肉豆蔻丸是否具有改善焦虑样行为的作用,以开发该上市药的新适应证,并为临床防治焦虑症提供候选药物。

戊四唑(pentylenetetrazole,PTZ)为四唑衍生物,是γ氨基丁酸(γ aminobutyric acid,GABA)及其受体复合物的抑制剂,因其具有潜在的促焦虑作用而被广泛应用于制备焦虑动物模型中。其机制与GABA能神经传递的苯二氮䓬受体调节焦虑相关<sup>[3]</sup>。另外,PTZ可通过外源性转运系统透过血脑屏障进入脑内<sup>[4]</sup>。研究发现,慢速静脉滴注PTZ[1.5 mg/(kg·min)]对狗的脑电图表现出明显的阵发性影响,与阵挛性惊厥相关的阵发性活动发生在输液开始后17~36 min之间(平均24 min)<sup>[5]</sup>。PTZ也可诱导雄性DBA/Z、Swiss小鼠焦虑样行为。在高架十字迷宫实验中,PTZ能显著减少小鼠进入开臂的次数、开臂停留时间、开臂次数/总次数、开臂时间/总时间<sup>[6-7]</sup>;在明暗箱实验中,与空白组比较,PTZ组减少明箱停留时间<sup>[8]</sup>;在旷场实验中,与空白组比较,PTZ组运动总距离显著减少<sup>[9-10]</sup>。因此,本研究采用PTZ诱导建立ICR小鼠焦虑模型,探究二十味肉豆蔻丸对焦虑的改善作用。

下丘脑-垂体-性腺(hypothalamus-pituitary-gonadal,HPG)轴的紊乱与焦虑发生密切相关,恢复HPG轴稳态可以对焦虑症起到较好的治疗作用<sup>[11]</sup>。HPG轴依据性别的不同又可分为下丘脑-垂体-卵巢轴(hypothalamic-pituitary-ovarian axis,HPO)和下丘脑-垂体-睾丸轴(hypothalamic-pituitary-testicular axis,HPT)。下丘脑产生促性腺素释放激素(gonadotropin-releasing hormone,GnRH),刺激垂体分泌卵泡刺激激素(follicle-Stimulating Hormone,FSH)和黄体生成素(luteinizing Hormone,LH),卵巢可合成和分泌孕酮(progesterone,P)、雌激素[主要是雌二醇(estriadiol,E<sub>2</sub>)]以及雄激素[主要是睾酮(testosterone,T)];睾丸可合成和分泌T和E<sub>2</sub>等性激素。性激素又可对GnRH、FSH和LH进行负反馈调节<sup>[11]</sup>。

临床和研究表明HPG轴的紊乱与焦虑密切相关,血清总T水平与焦虑症的风险增加相关<sup>[12]</sup>。Wistar焦虑大鼠模型血浆中T和FSH水平显著降低<sup>[13]</sup>。卵巢切除或围绝经期的大鼠焦虑程度明显升高<sup>[14-15]</sup>,并伴随血浆P和T水平的降低<sup>[15]</sup>。本研究从调节HPG轴的角度初探二十味肉豆蔻丸的作用机制。

## 1 材 料

1.1 实验动物 90只SPF级5周龄雄性ICR小鼠,体质量为31.4~35.4 g,购于北京维通利华实验动物有限公司。动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006;动物质量合格证号:1100112211064484。小鼠饲养温度(22±2)℃、湿度40%~50%,12 h/12 h黑白循环,自由饮饮水,适应性饲养7d后进行实验。所有行为学实验都安排在实验当天09:00:00—17:00:00进行。本实验动物经山东中医药大学实验动物伦理委员会审批(批准号:SDUTCM20210606002)。

1.2 药物与试剂 二十味肉豆蔻丸(西藏神猴药业有限责任公司,批号:20210501);地西洋片(山东信谊制药有限公司,批号:200703,规格:2.5 mg/片);PTZ(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号:74404A);小鼠GnRH酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(批号:CSB-E08152m)、小鼠FSH ELISA试剂盒(批号:CSB-E06871m)、小鼠LH ELISA试剂盒(批号:CSB-E12770m)、小鼠雄激素酶ELISA试剂盒(批号:CSB-E05101m)和小鼠雌激素ELISA试剂盒(批号:CSB-E07280m)均购自武汉华美生物工程有限公司;小鼠GABA ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:H168-1-2);BCA蛋白定量试剂盒(上海雅伦生物医药科技有限公司,批号:ZJ102)。

1.3 实验仪器 XR-XZR209型O迷宫系统、XR-XG201型高架十字迷宫系统、XR-XG201型明暗箱系统和自主活动箱和旷场系统(Tracking Master V3.0)均购自上海欣软公司;MT90126728型全波长酶标仪和ST8R型离心机均购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司;FYL-YS-280型实验室恒温冰箱购自北京福意联电器公司;EKUP-II-40E型超纯水机购于四川宜科纯水设备有限公司;L-MPI-S-A型微孔板恒温振荡器购自常州朗博仪器制造有限公司;BD-GDB1型组织研磨仪购自无锡博弗瑞德生物科技有限公司。

1.4 分组、造模和给药 5周龄雄性ICR小鼠,适应性饲养1周后,根据自主活动性及体质量最终选择72只实验小鼠,随机分为对照组、模型组、阳性药组和二十味肉豆蔻丸高、中、低剂量组,每组12只。实验分组和给药剂量见表1。二十味肉豆蔻丸临床用量为2~3 g/次,2次/d,故药物的临床用量为6 g/d。在本实验中,将小鼠灌胃中剂量设为临床等效剂量<sup>[16-17]</sup>,按照体表面积换算系数9.1,人的平均体质量按70 kg计算,临床剂量作为小鼠的给药中剂量为 $6 \text{ g} / 70 \text{ kg} \times 9.1 = 0.78 \text{ g/kg}$ ,给药体积为0.1 mL/10 g,1次/d。采用O迷宫、高架十字迷宫、明暗箱、旷场实验检测其对PTZ诱导的焦虑样行为的作用,具体实验流程见图1。

表1 分组及给药剂量

组别	n	给药量/d	灌胃试剂
对照组	12	-	超纯水
模型组	12	-	超纯水
阳性药组	12	2.00 mg/kg	地西洋溶液
二十味肉豆蔻低剂量组	12	0.39 g/kg	二十味肉豆蔻丸水溶液
二十味肉豆蔻中剂量组	12	0.78 g/kg	二十味肉豆蔻丸水溶液
二十味肉豆蔻高剂量组	12	1.56 g/kg	二十味肉豆蔻丸水溶液

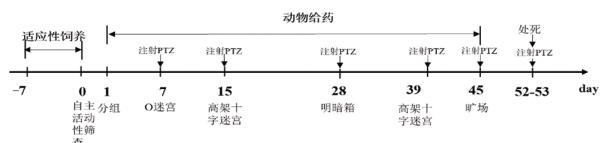


图1 二十味肉豆蔻丸改善戊四唑致小鼠焦虑样行为的作用研究实验流程

**1.5 行为学实验** 行为学检测当天对照组、给药组动物于末次灌胃1.5 h后进行行为学实验,阳性药组于末次灌胃1 h后进行行为学实验。行为学实验前0.5 h对照组腹腔注射生理盐水,模型组、阳性药组、二十味肉豆蔻丸给药组采用PTZ(30 mg/kg)单次腹腔注射。成年雌性Lewis大鼠静脉注射PTZ,根据药代动力学研究发现20 mg/kg PTZ的总清除率为 $(5.36 \pm 0.34)$  mL/(min·kg),终末半衰期为 $(116 \pm 25)$  min,表观容积分布为 $(896 \pm 134)$  mL/kg。血清蛋白结合可忽略不计(小于10%)<sup>[18]</sup>。推测PTZ在大鼠体内药物的清洗期为10 h左右,因此每次行为学检测间隔5 d以上。

(1)O迷宫实验:随机将小鼠放入任一开臂区中间,头面对圆心,记录两臂区进入时间及进入次数。释放后记录以下指标:进入开放臂次数(open arm entry,OE),开放臂停留时间(open arm time,OT)。上述指标计算出:开臂次数百分比,开臂时间百分比。行为学测试总时间为5 min。

(2)高架十字迷宫实验:将小鼠置于中央平台中央,头部正对开放臂入高架十字迷宫,释放后记录进入开放臂次数(open arm entry,OE)和开放臂停留时间(open arm time,OT)。由上述指标计算开臂次数百分比和开臂时间百分比。行为学测试总时间为5 min。

(3)明暗箱实验:将小鼠从明箱放入,头朝暗箱,然后拿掉隔板,观察进入明箱次数、明箱停留时间、明箱次数/总次数、明箱停留时间/总时间。行为学测试总时间为5 min。

(4)旷场实验:实验时随机将小鼠置于箱体中央,释放后记录中央区穿梭次数运动总距离、中央区停留时间、中央区运动距离、运动总距离。行为学测试总时间为10 min。

每只小鼠测试完成后,将行为学仪器清理干净,喷洒75%酒精消除异味,再进行下1只小鼠实验。

**1.6 ELISA检测** 摘眼球取血(血液在含有肝素钠的EP管中冰上静置30 min后,3 500×g,平均有效离心半径约为11.2 cm,离心15 min,取上清,分装冻存于-80 ℃),断头,取下丘脑、垂体,取出后用PBS清洗,放入EP管中-80 ℃冻存。下丘脑、垂体组织BCA蛋白定量后,按照ELISA试剂盒的说明书进行操作,检测小鼠HPG轴激素和GABA含量的变化。

表2 O迷宫实验行为学实验检测二十味肉豆蔻丸对PTZ建立ICR小鼠焦虑行为的改善作用( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	运动总距离/m	开臂运动距离百分比	进入开臂次数	开臂次数/百分比	开臂停留时间/s	开臂停留时间百分比
对照组	10	7.04±0.67	27.68±7.36	39.60±6.87	50.19±0.30	109.90±30.81	36.63±10.27
模型组	9	5.57±1.00 <sup>b</sup>	18.55±8.77 <sup>a</sup>	30.11±10.23 <sup>a</sup>	50.07±0.21	76.48±37.10 <sup>a</sup>	25.49±12.37 <sup>a</sup>
阳性药组	8	8.01±0.62 <sup>c</sup>	33.67±4.70 <sup>c</sup>	38.50±2.26	50.11±0.26	135.20±23.87 <sup>c</sup>	45.08±7.96 <sup>c</sup>
二十味肉豆蔻低剂量组	10	5.15±0.74	18.44±6.42	24.40±9.64	50.16±0.34	72.54±36.37	24.18±12.13
二十味肉豆蔻中剂量组	8	5.37±1.00	22.99±8.05	31.25±5.63	50.20±0.37	80.15±34.14	26.72±11.38
二十味肉豆蔻高剂量组	9	5.60±1.00	24.20±8.10	29.00±8.60	50.48±0.64	94.29±27.62	31.43±9.20

注:与对照组比较,<sup>a</sup>P<0.05,<sup>b</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>c</sup>P<0.05。

**1.7 统计学方法** 采用GraphPad Prism 8.0.1软件分析,所有数据均采用“均数±标准差”( $\bar{x} \pm s$ )的表达方式。两组间比较采用t检验(Student's t-test),多组间比较采用单因素方差分析和邓尼特多重比较检验(one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test)。所有组别数据均按平均值±2倍标准差范围进行异常值剔除,超出该范围的数据判定为异常值并予以排除。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 二十味肉豆蔻丸对PTZ诱导的焦虑样行为的改善作用** 二十味肉豆蔻丸给药7 d后,通过O迷宫实验检测其对PTZ诱导小鼠焦虑样行为的改善作用。结果表明,与对照组比较,模型组小鼠运动总距离、开臂运动距离百分比、开臂进入次数、开臂停留时间和开臂停留时间百分比显著降低( $P<0.05$ )。该结果提示,PTZ在30 mg/kg剂量下可诱导ICR小鼠产生焦虑样行为。与模型组比较,阳性药组运动总距离、开臂运动距离百分比、开臂停留时间和开臂停留时间百分比显著提高( $P<0.05$ ),二十味肉豆蔻丸高、中、低剂量组与模型组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。该结果提示,给药7 d后地西洋对PTZ诱导的焦虑样行为有改善作用。(见表2)

二十味肉豆蔻丸给药15 d后,通过高架十字迷宫实验检测其对PTZ诱导小鼠焦虑样行为的改善作用。结果表明,与对照组小鼠比较,模型组进入开臂次数显著降低( $P<0.05$ )。该结果提示,PTZ在30 mg/kg剂量下可诱导ICR小鼠产生焦虑样行为。与模型组小鼠比较,阳性药组进入开臂次数显著提高( $P<0.05$ ),而二十味肉豆蔻丸高、中、低剂量组无显著提高( $P>0.05$ )。该结果提示,给药15 d后地西洋对PTZ诱导的焦虑样行为有改善作用。(见表3)

表3 高架十字迷宫行为学实验检测二十味肉豆蔻丸对PTZ建立ICR小鼠焦虑行为的改善作用( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	进入开臂次数	开臂次数/百分比	开臂停留时间/s	开臂停留时间百分比
对照组	10	19.90±5.00	40.99±9.02	56.25±19.59	23.57±8.39
模型组	9	13.44±3.50 <sup>a</sup>	34.93±8.66	44.66±17.89	21.13±9.96
阳性药组	8	20.38±5.50 <sup>b</sup>	40.98±4.92	62.53±17.03	28.89±8.42
二十味肉豆蔻低剂量组	9	15.56±2.07	39.00±7.70	58.81±28.17	25.34±11.13
二十味肉豆蔻中剂量组	11	11.64±4.15	37.25±6.27	46.43±24.20	18.72±10.28
二十味肉豆蔻高剂量组	8	16.13±5.06	43.50±9.15	52.84±18.38	25.70±14.18

注:与对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>b</sup>P<0.05。

二十味肉豆蔻丸给药28 d后,通过明暗箱实验检测其对PTZ诱导小鼠焦虑样行为的改善作用。结果表明,与对照组小鼠比较,模型组的明箱停留时间、明箱停留时间百分比明显

降低( $P<0.05$ )。与模型组小鼠比较,阳性药组进入明箱次数、明箱次数百分比、明箱停留时间、明箱停留时间百分比明显提高( $P<0.05$ );二十味肉豆蔻丸低剂量组小鼠的进入明箱停留时间、明箱停留时间百分比均明显提高( $P<0.05$ )。结果表明,给药28 d后地西洋与二十味肉豆蔻丸低剂量组对PTZ诱导的焦虑样行为均有改善作用。(见表4)

表4 明暗箱行为学实验检测二十味肉豆蔻丸对PTZ建立ICR小鼠焦虑行为的改善作用( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	进入明箱次数	明箱次数百分比	明箱停留时间/s	明箱停留时间百分比
对照组	8	14.25±3.66	48.74±0.83	107.70±25.64	35.96±8.56
模型组	10	10.40±4.99	47.37±2.10	70.32±36.68 <sup>a</sup>	23.47±12.24 <sup>a</sup>
阳性药组	11	21.55±5.87 <sup>b</sup>	49.14±0.66 <sup>c</sup>	133.90±19.18 <sup>b</sup>	44.72±6.40 <sup>b</sup>
二十味肉豆蔻低剂量组	10	14.30±2.83	48.96±0.93	123.50±12.48 <sup>b</sup>	41.21±4.17 <sup>b</sup>
二十味肉豆蔻中剂量组	10	10.80±4.52	47.89±1.69	80.35±22.39	26.82±7.47
二十味肉豆蔻高剂量组	9	10.00±2.00	48.52±1.49	99.11±28.91	33.07±9.64

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

二十味肉豆蔻丸给药39 d后,通过高架十字迷宫实验检测其对PTZ诱导小鼠焦虑样行为的改善作用。结果表明,与对照组小鼠比较,模型组开臂停留时间、开臂停留时间百分比显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,阳性药组在开臂停留时间、开臂停留时间百分比显著提高( $P<0.05$ ),二十味肉豆蔻丸高、中、低剂量组均无显著提高( $P>0.05$ )。(见表5)

表5 高架十字迷宫行为学实验检测二十味肉豆蔻丸对PTZ建立ICR小鼠焦虑行为的改善作用( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	进入开臂次数	开臂次数百分比	开臂停留时间/s	开臂时间百分比
对照组	10	8.60±2.27	25.17±8.42	36.16±15.27	14.97±6.20
模型组	10	6.60±3.60	23.27±9.91	14.61±14.66 <sup>a</sup>	5.99±6.16 <sup>a</sup>
阳性药组	10	9.60±4.30	22.08±8.96	38.91±26.67 <sup>b</sup>	17.17±12.73 <sup>b</sup>
二十味肉豆蔻低剂量组	10	8.40±4.60	26.22±9.82	29.20±13.23	13.25±7.42
二十味肉豆蔻中剂量组	11	6.82±2.89	25.37±8.80	27.58±23.58	11.22±10.38
二十味肉豆蔻高剂量组	9	7.89±2.47	25.60±6.35	29.63±13.17	11.93±5.12

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

表6 旷场行为学实验检测二十味肉豆蔻丸对PTZ建立ICR小鼠焦虑行为的改善作用( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	运动总距离/m	进入中央区次数	进入中央区时间/s	进入中央区距离	中央区运动距离/百分比
对照组	9	42.93±10.10	76.11±21.17	46.66±17.66	7.09±2.44	16.22±2.63
模型组	9	30.89±8.27 <sup>a</sup>	39.22±15.30 <sup>b</sup>	29.93±15.92	3.66±1.52 <sup>b</sup>	11.58±1.72 <sup>a</sup>
阳性药组	8	46.44±7.26 <sup>d</sup>	80.63±16.49 <sup>d</sup>	52.87±15.52 <sup>c</sup>	7.5±1.63 <sup>d</sup>	16.18±2.55
二十味肉豆蔻低剂量组	9	39.64±8.99	61.22±33.04	41.66±24.20	5.78±3.10	13.70±5.84
二十味肉豆蔻中剂量组	8	34.33±4.92	49.25±13.06	37.07±15.23	4.80±1.45	13.75±3.24
二十味肉豆蔻高剂量组	10	40.82±8.80 <sup>c</sup>	72.70±23.20 <sup>d</sup>	50.52±18.62	6.84±2.20 <sup>d</sup>	16.89±4.47 <sup>c</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

表7 二十味肉豆蔻丸对PTZ诱导的ICR小鼠HPG轴的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	GnRH/(pg/mL)	FSH/(mIU/mL)	LH/(mIU/mL)	T/(pg/mL)	E <sub>2</sub> /(pg/mL)	雄/雌激素
对照组	19 496.00±5 372.00	530.00±50.88	6 867.00±3 544.00	587.50±91.85	45.53±7.60	15.59±5.81
模型组	18 662.00±7 814.00	583.50±95.49	202.60±64.88 <sup>a</sup>	484.80±171.30	36.06±11.88	15.40±6.19
二十味肉豆蔻低剂量组	17 231.00±3 209.00	593.60±238.00	2 487.00±1 518.00	607.30±132.70	32.03±2.99	14.35±5.29
二十味肉豆蔻中剂量组	16 100.00±3 101.00	656.10±147.80	5 306.00±3 424.00 <sup>c</sup>	686.00±129.60	39.00±8.10	16.79±3.41
二十味肉豆蔻高剂量组	19 280.00±7 618.00	682.10±137.10	286.10±71.58	761.40±285.90 <sup>b</sup>	40.42±13.87	22.07±6.48

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。<sup>n=5~12</sup>。

二十味肉豆蔻丸给药45 d后,通过旷场实验评价其对PTZ诱导小鼠焦虑样行为的改善作用。结果表明,与对照组小鼠比较,模型组运动总距离、进入中央区次数、进入中央区距离、中央区运动距离百分比显著降低( $P<0.05$ )。与模型组小鼠比较,阳性药组的运动总距离、进入中央区次数、中央区停留时间、中央区运动距离显著提高( $P<0.05$ );二十味肉豆蔻高剂量组小鼠的运动总距离、进入中央区次数、中央区运动距离、中央区运动距离百分比显著提高( $P<0.05$ )。结果提示,给药45 d后地西洋和二十味肉豆蔻高剂量组均对PTZ诱导的焦虑样行为有改善作用。(见表6)

综上,明暗箱与旷场实验的结果表明,二十味肉豆蔻丸提前给药7 d,可预防PTZ导致的焦虑样行为。

2.2 二十味肉豆蔻丸对PTZ诱导ICR小鼠焦虑行为的HPG轴激素水平的影响 通过ELISA实验检测二十味肉豆蔻丸对PTZ诱导小鼠HPG轴激素GnRH(下丘脑)、FSH(垂体)、LH(垂体)、E<sub>2</sub>(血浆)和T(血浆)分泌的影响。结果表明,与对照组小鼠比较,模型组小鼠垂体中LH的含量显著降低( $P<0.01$ )。与模型组小鼠比较,二十味肉豆蔻丸中剂量组垂体中LH显著升高( $P<0.01$ ),高剂量组血浆中T含量显著升高( $P<0.05$ )。(见表7)

### 3 结 论

藏医《四部医典》认为“宁隆症”的病因病机是脏腑功能紊乱,侵入心脏发生气滞血瘀,从而出现心悸、胸痛、胸闷、头痛、健忘、神志不安,抑郁不乐,有时不问则胡言乱语,有时问之则不愿置答,闻不悦耳之语则惊恐不安、易怒等症的疾病。中医古籍中虽无焦虑病名的记载,但焦虑症状与脏躁病、郁证、卑憇相似,多由脏腑气机逆乱,郁滞化火、夹痰夹瘀上逆蒙蔽清窍所致。历代医家对焦虑症的论治一般从气、火、痰、郁等论治。患有焦虑症患者大多伴有自主神经功能失调,其表现为心慌、出汗、胸闷、呼吸急促、皮肤潮红或苍白等症状,与二十味肉豆蔻丸适应证类似。藏医多用辛、甘、热、润的药物对治隆病,以平衡水土、综合调降、协

调三因<sup>[19]</sup>,故推测二十味肉豆蔻丸能防治焦虑症。本研究在成功用PTZ(30 mg/kg)稳定建立ICR雄性小鼠的焦虑样行为模型的基础上,发现二十味肉豆蔻丸能显著改善受试小鼠在明暗箱和旷场实验中所表现的焦虑样行为,提示二十味肉豆蔻丸具有防治焦虑症的潜力。

GABA是抑制性神经递质<sup>[20]</sup>,通过与突触后膜的GABA受体结合发挥生物学作用。GABA能神经系统是焦虑症病理生理中发挥重要作用的介质<sup>[21]</sup>,GABA维持神经元兴奋和抑制之间的平衡<sup>[22]</sup>,突触间隙GABA及其突触后受体异常会导致焦虑症。目前已上市的治疗焦虑症的GABA受体激动剂有苯二氮类(有西洋类、唑仑类以及二钾氯氮、氯氟乙酯和利眠宁)和非苯二氮类(包括巴比妥类和甲丙氨酯)。焦虑伴随着下丘脑、前额叶皮质、杏仁核和海马GABA水平的降低<sup>[23-25]</sup>,焦虑行为与GABA水平异常密切相关。基于GABA能异常的动物可用于建立稳定焦虑样行为动物模型。

临床研究表明,E<sub>2</sub>、P和T这类性激素与焦虑症发病密切相关,如临床研究表明女性患焦虑症的风险大约是男性的两倍<sup>[26]</sup>,而男性较高的血清总T水平与焦虑症的风险增加相关<sup>[12]</sup>。在21 d慢性束缚应激建立的Wistar焦虑大鼠模型中,高架十字迷宫实验检测大鼠焦虑样行为,与对照组比较,慢性束缚应激可显著减少大鼠进入开臂时间和开臂进入次数百分比,且ELISA实验发现血浆中T和FSH水平显著降低<sup>[13]</sup>。成年Long-Evans雌鼠进行卵巢切除后,旷场实验中进入中心区的时间和次数显著降低,反映其焦虑程度明显升高<sup>[14]</sup>。在围绝经期Wistar大鼠模型中,在高架十字迷宫实验中,大鼠进入开臂次数减少,表明焦虑增加。同时卵泡数量减少、封闭卵泡增加,过渡性卵泡耗竭伴有血浆P和T水平的降低<sup>[15]</sup>。

临床研究表明,5-羟色胺再摄取抑制剂联合电针可改善围绝经期焦虑抑郁障碍,下调血清中LH水平<sup>[27]</sup>。针刺或针刺与中药结合可改善多囊卵巢综合征伴随焦虑抑郁状态患者焦虑症状,降低患者血清中LH水平、T水平<sup>[28-30]</sup>。本研究发现,腹腔注射PTZ建立的焦虑样行为与小鼠垂体中LH水平相关,给药二十味肉豆蔻丸后对HPG的小鼠垂体中LH和血浆中T含量有升高的作用。推测二十味肉豆蔻丸可能通过垂体中LH和血浆中T含量的变化调控焦虑样行为。现有的焦虑与LH、T激素水平相关性研究多与围绝经期或多囊卵巢综合征有关,与本课题研究的受试对象有差异,实验数据存在一定局限性。但临床和实验研究发现LH、T水平与焦虑症状有密切联系。

综上,二十味肉豆蔻丸可通过增强HPG轴功能进而增加下丘脑中GABA的含量来发挥防治焦虑症的作用。

## 参考文献

- [1] 侯路娥,赵宏伟,齐冬梅,等.藏药二十味肉豆蔻丸源流考证与现代研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2023,37(S1):40-48.
- [2] DENG Y, SUN S W, WU S X, et al. Burden and trends of mental disorders in China from 1990 to 2019: Findings from the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol,2024,59(9):1563-1576.
- [3] STEPHENS D N, KEHR W, SCHNEIDER H H, et al. Beta-carbolines with agonistic and inverse agonistic properties at benzodiazepine receptors of the rat [J]. Neurosci Lett,1984,47(3):333-338.
- [4] MORIKI Y, SUZUKI T, FURUISHI T, et al. In vivo evidence for the efflux transport of pentazocine from the brain across the blood-brain barrier using the brain efflux index method[J]. J Drug Target,2005,13(1):53-59.
- [5] DÜRMÜLLER N, GUILLAUME P, LACROIX P, et al. The use of the dog electroencephalogram (EEG) in safety pharmacology to evaluate proconvulsant risk [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007,56(2):234-238.
- [6] RODGERS R J, COLE J C, ABOUALFA K, et al. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze[J]. Pharmacol Biochem Behav,1995,52(4):805-813.
- [7] PALTIAN J J, DOS REIS A S, DE OLIVEIRA R L, et al. The anxiolytic effect of a promising quinoline containing selenium with the contribution of the serotonergic and GABAergic pathways: Modulation of parameters associated with anxiety in mice[J]. Behav Brain Res,2020,393:112797.
- [8] DE ANGELIS L, FURLAN C. The anxiolytic-like properties of two selective MAOIs, moclobemide and selegiline, in a standard and an enhanced light/dark aversion test[J]. Pharmacol Biochem Behav,2000,65(4):649-653.
- [9] HERRERA -RUIZ M, GONZÁLEZ -CARRANZA A, ZAMILPA A, et al. The standardized extract of Loeselia mexicana possesses anxiolytic activity through the γ-amino butyric acid mechanism[J]. J Ethnopharmacol,2011,138(2):261-267.
- [10] SIMON P, DUPUIS R, COSTENTIN J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions[J]. Behav Brain Res,1994,61(1):59-64.
- [11] 李乐瑶,赵宏伟,齐冬梅,等.神经内分泌免疫调节网络在焦虑症发病机制中的作用[J].精神医学杂志,2022,35(2):207-211.
- [12] ASSELMANN E, KISCHE H, HARING R, et al. Prospective associations of androgens and sex hormone-binding globulin with 12-month, lifetime and incident anxiety and depressive disorders in men and women from the general population[J]. J Affect Disord, 2019, 245:905-911.
- [13] 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]. Hum Exp Toxicol, 2021,40(11):1852-1866.

- [14] ESTRADA C M, GHISAYS V, NGUYEN E T, et al. Estrogen signaling in the medial amygdala decreases emotional stress responses and obesity in ovariectomized rats[J]. Horm Behav, 2018, 98:33–44.
- [15] REIS F M C V, PESTANA-OLIVEIRA N, LEITE C M, et al. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats[J]. Psychoneuroendocrinology, 2014, 49:130–140.
- [16] 朱晓旭.酸枣仁汤抗焦虑作用的实验研究[D].北京:北京中医药大学,2002.
- [17] 王守勇.酸枣仁汤组分配伍的抗焦虑作用及机理[D].北京:北京中医药大学,2003.
- [18] RAMZAN I M, LEVY G. Kinetics of drug action in disease states. XIV. Effect of infusion rate on pentylenetetrazole concentrations in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats at onset of convulsions[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1985, 234(3):624–628.
- [19] 孙洪昊,任小巧.基于数据挖掘的藏医治疗隆病的用药规律探索与分析[J].中医药导报,2022,28(12):143–147, 164.
- [20] LYDIARD R B. The role of GABA in anxiety disorders[J]. J Clin Psychiatry, 2003, 64(Suppl 3):21–27.
- [21] NEMEROFF C B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders[J]. Psychopharmacol Bull, 2003, 37(4):133–146.
- [22] ZHONG H Q, RONG J, YANG Y, et al. Neonatal inflammation via persistent TGF- $\beta$ 1 downregulation decreases GABA(a)R expression in basolateral amygdala leading to the imbalance of the local excitation-inhibition circuits and anxiety-like phenotype in adult mice[J]. Neurobiol Dis, 2022, 169:105745.
- [23] ZHANG D D, LI H J, ZHANG H R, et al. Poria cocos water-soluble polysaccharide modulates anxiety-like behavior induced by sleep deprivation by regulating the gut dysbiosis, metabolic disorders and TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Food Funct, 2022, 13(12):6648–6664.
- [24] ZHOU B Q, JIN G, PANG X Q, et al. Lactobacillus rhamnosus GG colonization in early life regulates gut-brain axis and relieves anxiety-like behavior in adulthood[J]. Pharmacol Res, 2022, 177:106090.
- [25] SUWALUK A, CHUTABHAKDIKUL N. Altered development of prefrontal GABAergic functions and anxiety-like behavior in adolescent offspring induced by prenatal stress[J]. Brain Sci, 2022, 12(8):1015.
- [26] LI S H, GRAHAM B M. Why are women so vulnerable to anxiety, trauma-related and stress-related disorders? The potential role of sex hormones[J]. Lancet Psychiatry, 2017, 4(1):73–82.
- [27] 宋桂霞,王华琪,杨俊,等.5-羟色胺再摄取抑制剂联合电针对围绝经期焦虑抑郁障碍的疗效[J].宁夏医科大学学报,2022,44(12):1240–1244.
- [28] 欧治菲.针药结合治疗脾虚痰湿型PCOS高雄激素血症的临床观察[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2022.
- [29] 陈诺筠.五子逍遥散联合针刺治疗多囊卵巢综合征合并抑郁焦虑状态的临床观察[D].福州:福建中医药大学, 2023.
- [30] 蔡金星.醒神调焦针刺法治疗多囊卵巢综合征伴随焦虑抑郁状态的临床疗效观察[D].南京:南京中医药大学, 2024.

(收稿日期:2025-03-21 编辑:时格格)

## (上接第81页)

- [15] LIU X, XIAO X, HAN X, et al. A new therapeutic trend: Natural medicine for ameliorating ischemic stroke via PI3K/Akt signaling pathway[J]. Molecules, 2022, 27(22):7963.
- [16] OYEFESO F A, MUOTRI A R, WILSON C G, et al. Brain organoids: A promising model to assess oxidative stress-induced central nervous system damage[J]. Dev Neurobiol, 2021, 81(5):653–670.
- [17] ASGARI TAEI A, DARGAHI L, KHODABAKHSH P, et al. Hippocampal neuroprotection mediated by secretome of human mesenchymal stem cells against experimental stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2022, 28(9):1425–1438.
- [18] MOSTAJERAN M, EDVINSSON L, AHNSTEDT H, et al.

Repair-related molecular changes during recovery phase of ischemic stroke in female rats[J]. BMC Neurosci, 2022, 23(1):23–35.

- [19] DUAN J L, CUI J, YANG Z F, et al. Neuroprotective effect of Apelin 13 on ischemic stroke by activating AMPK/GSK-3 $\beta$ /Nrf2 signaling[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1):24–40.
- [20] LIU H X, WU X, LUO J N, et al. Adiponectin peptide alleviates oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation after cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating AMPK/GSK-3 $\beta$ [J]. Exp Neurol, 2020, 329(1): 113302.

(收稿日期:2024-06-19 编辑:李海洋)