

## 沉香线香燃香调节多神经递质途径的抗焦虑/抑郁作用及机制

弓宝<sup>1</sup>, 王灿红<sup>1,2</sup>, 吴玉兰<sup>1</sup>, 刘洋洋<sup>1</sup>, 魏建和<sup>1,3</sup>

(1 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南省南药资源保护与开发重点实验室 & 国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室, 海口 570311; 2 岭南现代农业科学与技术广东省实验室茂名分中心, 茂名 525099; 3 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物物质基础与资源利用教育部重点实验室 & 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193)

**[摘要]** **目的:**探讨沉香线香(ALI)对小鼠焦虑模型和抑郁模型的作用及其机制。**方法:**采用间氯苯哌嗪(MCPP)和慢性不可预知性温和刺激(CUMS)法分别制作小鼠焦虑和抑郁模型,观察熏香后模型动物旷场活动(OFT)、明暗箱穿梭(LDT)、悬尾(TST)、游泳(FST)等行为学变化;ELISA法测定海马组织中五羟色胺(5-HT)、谷氨酸(Glu)、伽马氨基丁酸A受体(GABAA)水平;Western Blot法检测颗粒体蛋白(GRN2B)、代谢型谷氨酸受体5抗体(GRM5)、谷氨酸受体1(GluR1)及囊泡谷氨酸转运蛋白1(VGluT1)表达。**结果:**ALI可降低焦虑模型动物总活动路程和速度( $P < 0.05$ ),增加静止时间( $P < 0.05$ ),降低在暗箱中活动路程和速度( $P < 0.05$ );增加抑郁模型动物总路程和速度( $P < 0.05$ ),降低静止时间( $P < 0.05$ )和强迫游泳及悬尾不动时间( $P < 0.05$ );与焦虑模型组比较,中、高剂量组的Glu水平降低( $P < 0.05$ ),而GABAA,5-HT水平升高( $P < 0.05$ );与抑郁模型组比较,中、高剂量组5-HT和Glu水平升高( $P < 0.05$ ),GABAA水平降低( $P < 0.05$ );ALI熏香吸入能提高焦虑模型动物GRN2B,GRM5,GluR1,VGluT1蛋白表达;可提高抑郁模型动物GRN2B,GluR1,VGluT1蛋白表达,降低GRM5蛋白表达。**结论:**ALI对焦虑模型和抑郁模型的行为均有改善,其作用机制可能与调控5-HT,GABAA,Glu神经递质水平和影响GRN2B,GRM5,GluR1,VGluT1的蛋白表达有关。

**[关键词]** 沉香线香;燃香;抗抑郁;抗焦虑;多神经递质

**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)13-1368-09

## The anti-anxiety/depression effect and mechanism of agarwood line incense burning on regulating multi-neurotransmitter pathways

GONG Bao<sup>1</sup>, WANG Can-hong<sup>1,2</sup>, WU Yu-lan<sup>1</sup>, LIU Yang-yang<sup>1</sup>, WEI Jian-he<sup>1,3</sup>

(1 Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine & Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China; 2 Maoming Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Maoming 525099, China; 3 Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education & National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of agarwood line incense (ALI) burning on anxiety and

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(82204657);中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(2021-I2M-1-032);海南省重点研发计划项目(ZDYF2022SHFZ030);海南省科技厅海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC345);茂名市科技计划项目(2022S032)

**[作者简介]** 弓宝,男,副研究员,主要从事中药药效活性评价及产品开发研究。E-mail: gongbao0112@aliyun.com。共同第一作者:王灿红,女,助理研究员,主要从事中药药效活性评价及机制研究。E-mail: xinzhuangjianpo@163.com。

**[通讯作者]** 魏建和,男,博士生导师,研究员,主要从事药用植物基因资源与分子育种及次生代谢产物调控研究。联系电话:(010)57833016,E-mail: wjianh@263.net。

depression and its mechanism. **Methods:** Chronic unforeseeable mild stress (CUMS) was applied to induce depression-like model and M-chloropheniperazine (MCPP) was applied to induce anxiety model. By using open field test (OFT), light-dark transition test (LDT), tail suspension test (TST) and forced swim test (FST), changes of activity after inhaling the incense were measured to evaluate its effects of anti-anxiety and anti-depression. To investigate the mechanism, monoamine neurotransmitters in brain, such as 5-HT, Glu, and GABA, were observed by ELISA. The protein expression levels of GRN2B, GRM5, GluR1, VGLuT1 were evaluated by Western Blot. **Results:** Compared with the anxiety model group, the total distance and average velocity significantly reduced ( $P < 0.05$ ), the rest time increased ( $P < 0.05$ ), and the distance and average velocity in the black box reduced ( $P < 0.05$ ) in ALI inhalation group. Compared with the depression model group, the total distance and average velocity significantly increased ( $P < 0.05$ ), the rest time decreased ( $P < 0.05$ ), and the immobile time of TST and FST decreased ( $P < 0.05$ ) in the ALI group. The ALI inhalation increased the levels of 5-HT and GABA ( $P < 0.05$ ), decreased the level of Glu ( $P < 0.05$ ) in the brain tissues of the anxiety model group. ALI decreased the level of GABA ( $P < 0.05$ ), and increased the levels of 5-HT and Glu ( $P < 0.05$ ). ALI increased the protein expression levels of GRN2B, GRM5, GluR1, and VGLuT1 in hypothalamus of the rats in anxiety model group. ALI decreased the protein expression of GRM5 and increased the protein expressions of GRN2B, GluR1, and VGLuT1 in hypothalamus of the rats in depression model group. **Conclusion:** ALI has a significant anxiolytic and anti-depression effects, and the mechanism may be related to the regulation of the levels of 5-HT, Glu, GABA, and the protein expression of GRN2B, GluR1, and VGLuT1 in hypothalamus.

[Key words] agarwood line incense; burning incense; anxiolytic effect; antidepressant; multi-neurotransmitter

随着社会节奏的加快以及人们生活压力的增大,焦虑症和抑郁症发病率逐年升高,已成为危害人类健康的第二大疾病,且病因病机复杂多变,并伴有严重并发症,影响着人们的生理和心理健康<sup>[3]</sup>。焦虑症多以神经官能症并伴随自主神经紊乱为主要特征,会出现出汗、胸闷、忧虑等症状<sup>[1]</sup>;而抑郁症则主要表现为悲观、情绪低落、兴趣减低等,严重的可产生轻生、自杀等行为<sup>[2]</sup>。目前临床治疗用药的不良反应率较高、起效较慢,且因多采用联合用药方式,加重了患者的肝脏、肾脏负担<sup>[4-5]</sup>。沉香具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘、益气和神的功效<sup>[6]</sup>,是我国传统医学中常用的理气药,已有研究证实沉香提取物或其相关复方制剂具有较好的抗焦虑和抗抑郁作用<sup>[7-10]</sup>,课题组前期也证实了沉香挥发油腹腔注射具有较好的抗焦虑和抗抑郁作用<sup>[11]</sup>,熏香是沉香传统的使用方法,有良好舒缓情绪、镇静安神作用,有关沉香熏香吸入抗焦虑、抗抑郁作用尚无相关报道。因此,本研究选取沉香线香(agarwood line incense, ALI),采用燃烧熏香吸入方式研究其抗焦虑、抗抑郁作用及其分子机制,以期对沉香深入开发利用以及相关产品研发等提供参考和理论依据。

## 材料与方 法

### 1 药物与试剂

ALI 由中国医学科学院药用植物研究所海南分所沉香加工中心提取和制作;戊巴比妥钠(美国默

克公司,批号:2015011301);地西洋片(太原市振兴制药有限责任公司,批号:20200921);帕罗西汀片(中美天津史克制药有限公司,批号:H0950043);间氯苯哌嗪(罗恩试剂公司,批号:R031956);吐温 80(德国 BioFrox 公司,批号:EZ7890B148) 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)试剂盒(北京博胜经纬科技有限公司,批号:DRE30036); $\gamma$ -氨基丁酸 A( $\gamma$ -aminobutyric acid A, GABA<sub>A</sub>)受体试剂盒(北京博胜经纬科技有限公司,批号:DRE31319);谷氨酸(glutamic acid, Glu)试剂盒(北京博胜经纬科技有限公司,批号:DRE31114);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:HP201401);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,批号:BL521A);GluR1 一抗(碧云天生物技术有限公司,批号:AF2473);VGLuT1 一抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-11167R);山羊抗兔二抗(碧云天生物技术有限公司,批号:A0208)。

### 2 仪器

实验动物 CUMS JLBhev-CUMSM-4 造模箱(上海吉量软件科技有限公司);RD-1118-CO-M4 动物自主活动仪(上海欣软信息科技有限公司);RD-1112-OM-M4 动物旷场活动检测仪(上海欣软信息科技有限公司);RD-1119-FSTS-M4 动物悬尾/游泳实验测定仪(上海欣软信息科技有限公司);RD-1107-BWB-M4 动物明暗穿梭箱(上海欣软信息科技有限公司);动物自制熏香仪(有机玻璃制成的

50 cm × 50 cm × 40 cm 大箱结构,其内部放置 1 个 20 cm × 20 cm × 20 cm 镂空的圆柱体结构,中间可放置熏香香插;微孔板分光光度计[赛默飞世尔科技(上海)有限公司,序列号:1510-04123]。

### 3 动物

昆明雄性小鼠(20 ± 2) g,海南省药物研究所动物实验中心,合格证号:SCXK(琼)2019-0004;饲养于海南省药物研究所 SPF 级动物房,温度:20 °C ~ 25 °C,湿度:50% ~ 60%,光照周期:12 h,按体质量随机分组,每组 8 只,适应性喂养 3 d 后进行相关实验。

### 4 焦虑模型造模方法<sup>[11,15]</sup>

除空白组外,其他各组分别每只小鼠皮下注射间氯苯哌嗪(M-chlorophenipazine, MCPP, 8 mg · kg<sup>-1</sup>) 0.2 mL,连续 3 d,制备小鼠焦虑模型。

### 5 慢性不可预知性温和刺激(chronic mild unpredictable stimulation, CUMS)抑郁模型造模方法<sup>[12-14]</sup>

将小鼠置于 CUMS 造模箱中施以刺激,包括声刺激 1 min、足底电刺激 1 min、明/暗光刺激 2 min、禁食 24 h、禁水 24 h、睡眠剥夺 24 h 及束缚 3 h · d<sup>-1</sup>,共 7 种。为了随机不可预知性,每天选 1 ~ 2 种,相邻 2 d 不重复,连续刺激 28 d。

### 6 沉香熏香吸入对焦虑模型小鼠的行为学影响

取昆明小鼠 48 只,称重随机分为 6 组,分别为正常对照组,模型对照组,阳性对照组,低、中、高剂量 ALI 组[0.25 g 线香(相当于 100 mg · kg<sup>-1</sup>沉香醇提取物),0.5 g 线香(相当于 200 mg · kg<sup>-1</sup>沉香醇提取物),1 g 线香(相当于 400 mg · kg<sup>-1</sup>沉香醇提取物)],每组 8 只。除正常组外,其他组小鼠按照“4”项下方法制备焦虑模型,连续 3 d。阳性对照组每只小鼠腹腔注射 2 mg · kg<sup>-1</sup>地西洋 0.25 mL;ALI 各组在熏香仪中燃烧吸入给药,吸入时间为 1 h,连续给药 7 d。

**6.1 明暗箱穿梭(LDT)检测** 在 d 2, d 5 给药 1 h 后,进行 LDT 实验,将小鼠背对穿梭口,从明室放入,记录 5 min 内小鼠在暗室停留的时间和明暗室之间的穿梭次数等指标。

**6.2 旷场活动(OFT)检测** 在 d 3, d 6 给药 1 h 后,采用空场实验计算机实时检测分析处理系统,将小鼠沿桶壁放入空场,观察 10 min,系统自动记录动物的自发活动,如运动路程、运动时间等。

### 7 沉香熏香吸入对抑郁模型小鼠的行为学影响

取昆明小鼠 48 只,称重随机分为 6 组,分别为正常对照组,模型对照组,阳性对照组,低、中、高剂量 ALI 组[0.25 g 线香(相当于 100 mg · kg<sup>-1</sup>沉香醇

提取物),0.5 g 线香(相当于 200 mg · kg<sup>-1</sup>沉香醇提取物),1 g 线香(相当于 400 mg · kg<sup>-1</sup>沉香醇提取物)]每组 8 只。正常组给予生理盐水,其他组按照“5”项下方法进行造模,在造模 21 d 后,从 d 22 开始给受试药物。阳性对照组每只小鼠腹腔注射 10 mg · kg<sup>-1</sup>帕罗西汀 0.25 mL;ALI 各组在熏香仪中燃烧吸入给药,吸入时间为 1 h,连续给药 7 d。

**7.1 自主活动检测** 分别在 d 22, d 25, d 28 给药 1 h 后,利用自主活动仪计算机实时检测分析处理系统进行实验,将小鼠放入自主活动箱,适应 3 min 后开始测试,用录像设备进行实验过程录制,记录各组小鼠 10 min 内在中央格静止时间、穿格运动的总路程以及平均速度,2 次实验之间,用低浓度乙醇溶液喷洒、清洁场箱内壁及底面。测试时保持周围环境安静。

**7.2 悬尾(TST)实验** 分别在 d 23 和 d 26 刺激后,将小鼠距尾尖 1 cm 处用胶布固定并将小鼠倒挂在挂钩上,使其呈倒悬状态,小鼠挣扎时的张力变化信号通过传感器、信号调理单元和采集传输电路传输到计算机。悬尾计算机在线检测系统自动记录小鼠在 6 min 内的累积不动时间和运动时间,统计后 4 min 悬尾不动时间和运动时间。

**7.3 强迫游泳(SWT)实验** 分别在 d 24 和 d 27 刺激后,利用强迫游泳实时检测分析处理系统进行实验。设置实验参数、几何和照度定标后,将小鼠放在恒温游泳仪中(高 20 cm,直径 18 cm,水深 12 cm,水温 23 °C ~ 25 °C)。系统自动记录 6 min 内小鼠的活动状态,并计算后 4 min 内小鼠的累计不动时间。

### 8 脑组织中相关神经递质及功能蛋白检测方法

**8.1 Elisa 检测小鼠脑组织神经递质水平** 末次给药后,称重,异氟烷麻醉,记录体重。脱颈椎处死小鼠,迅速于冰上断头取脑,用生理盐水冲掉血液,滤纸擦干后称重。剥离脑海马组织后待处理,其余脑组织加 9 倍量的 4 °C 生理盐水,冰浴手动匀浆,移至离心管中离心(3 000 r · min<sup>-1</sup>, 15 min, 4 °C),取上清液分装,置于 -20 °C 保存备用。按照试剂盒相关操作步骤得到标准曲线,将测定样品中 Glu, 5-HT, GABA<sub>A</sub> 的吸光度(OD)值代入,分别计算小鼠脑组织中 Glu, GABA<sub>A</sub>, 5-HT 的含量。

### 8.2 Western blot 法检测小鼠脑组织中蛋白表达

考虑到海马组织体积小、重量轻,单只小鼠海马组织不够用于提取蛋白,所以蛋白提取时将每组 8 只小鼠的海马组织混合在一起,加入 1:9(m/v)量的 0.9% NaCl 溶液充分匀浆、离心,弃去上清液,组织沉淀中加入 RIPA 裂解液,充分混匀,4 °C 孵育裂解

30 min, 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min, 取上清得到蛋白。蛋白定量, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 酶标仪测定海马体脑组织中的蛋白浓度。根据待测的蛋白分子量, 选择适合的分离胶浓度配胶, 加上样量为 20 μL 并电泳, 再转膜至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加入一抗 β-actin (1:2 000)、谷氨酸受体 N2B (GRN2B, 1:1 000)、促代谢型谷氨酸受体 5 (GRM5, 1:1 000)、谷氨酸受体 1 (GluR1, 1:1 000)、囊泡谷氨酸转运蛋白 1 (VGLUT1, 1:1 000)。4 ℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h, ECL 化学发光试剂盒避光孵育, 凝胶成像仪成像并拍照。

## 9 数据处理

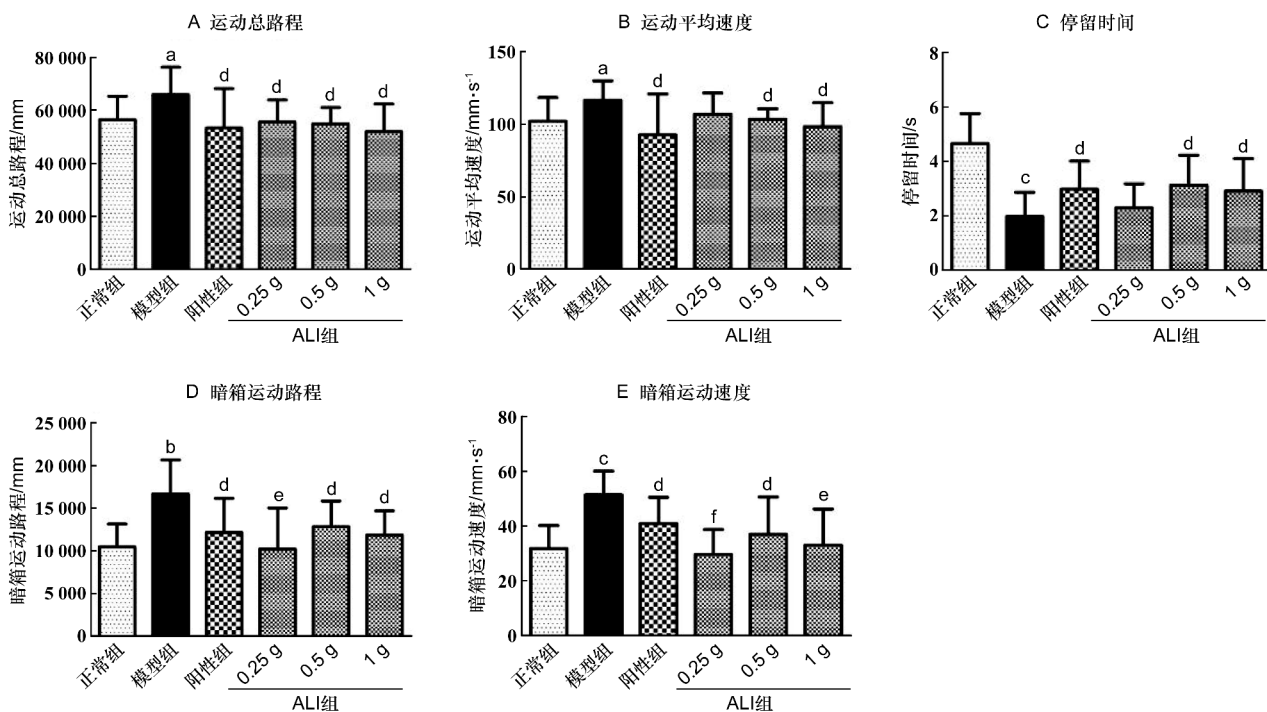
实验所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组数据运用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 组间数据采用 one-way ANOVA 分析。组间比较的结果柱形图使用 Graph-Pad Prism 8.0 软件进行绘制。当统计数据  $P < 0.05$  时, 认为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 沉香熏香吸入抗焦虑作用

#### 1.1 对焦虑模型小鼠行为学的影响 OFT 实验是

利用动物个体处在陌生空旷环境下的恐惧而造成焦虑行为的实验, 由顶部摄像机捕捉动物的活动行为, 以动物活动次数、进入中央区次数和停留时间等指标进行动物行为评价, 通常抗抑郁药物会增加动物在中央区域活动路径和停留时间<sup>[16]</sup>; LDE 实验是利用动物对明亮地方具有天然的厌恶和好奇倾向而设计出来的<sup>[17]</sup>, 以暗箱中活动时长、穿箱次数、在明暗箱的活动时长以及活动频次等为检测指标, 通常高焦虑水平的动物在明箱中活动的时间和频次会显著低于低焦虑水平的动物<sup>[18]</sup>。从图 1 可以看出, 在 OFT 实验中, 与正常组比较, 造模后模型组在旷场中央活动 ( $P < 0.05$ ), 活动速度加快 ( $P < 0.05$ ), 停留时间显著减少 ( $P < 0.05$ ), 表明造模成功; 与模型组比较, 阳性给药组及 ALI 熏香组均能显著降低小鼠总活动路程和活动速度 ( $P < 0.05$ ), 增加在中央活动区域停留时间 ( $P < 0.05$ )。在 LDE 实验中, 与模型组比较, 阳性给药组及 ALI 熏香组能够显著降低焦虑模型小鼠在暗箱中的活动路程和速度 ( $P < 0.05$ )。上述结果均表明, ALI 熏香吸入可显著降低焦虑模型动物的运动总路程和活动速度, 延长焦虑小鼠的停留时间, 同时降低焦虑模型小鼠在暗箱中的运动路程和速度。



与空白组比较, a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , c:  $P < 0.001$ ; 与模型对照组相比, d:  $P < 0.05$ , e:  $P < 0.01$ , f:  $P < 0.001$  (下同)

图 1 ALI 熏香吸入对焦虑模型动物 OFT 和 LDE 行为学的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

**1.2 对焦虑模型小鼠脑组织中神经递质 Glu, GABA<sub>A</sub>, 5-HT 水平的影响** 研究表明,中枢神经网络功能失调是焦虑症发病的神经生物学基础<sup>[19]</sup>,其中单胺类神经递质浓度水平的改变与焦虑症的发生相关<sup>[20]</sup>,因此本研究选择 Glu, GABA<sub>A</sub>, 5-HT 这 3 个相关的神经递质作为观察指标。结果如图 2 所示,与正常组比较,模型组脑组织中 Glu 水平显著升高

( $P < 0.01$ ), GABA<sub>A</sub> 和 5-HT 水平显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),说明造模成功;与模型组比较,阳性给药组和 ALI 组中、高剂量组的 Glu 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), GABA<sub>A</sub>, 5-HT 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ )。从以上结果可以看出,ALI 熏香对焦虑模型动物 Glu, GABA<sub>A</sub>, 5-HT 递质水平有调控作用。

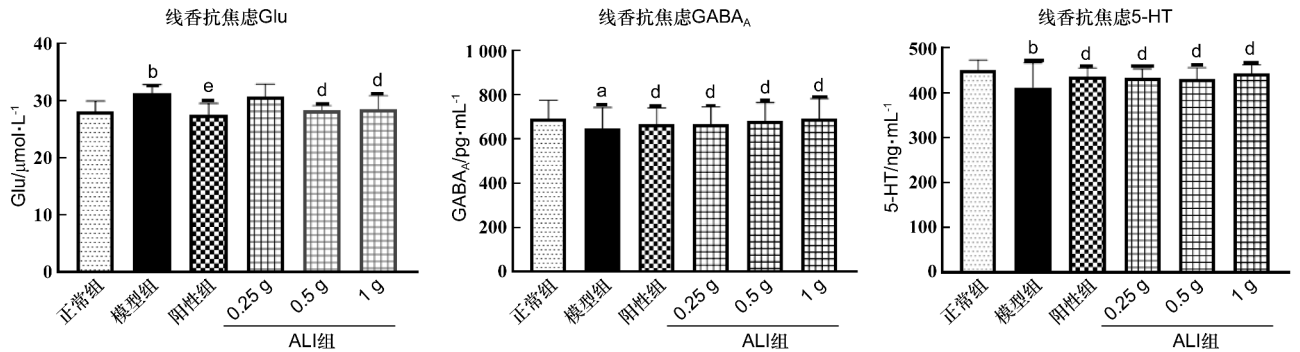


图 2 ALI 熏香吸入对焦虑模型小鼠脑组织 5-HT, GABA<sub>A</sub>, Glu 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

**1.3 对焦虑模型小鼠脑组织中 GRN2B, GRM5, GluR1, VGluT1 蛋白表达的影响** 研究表明, *N*-甲基-*D*-门冬氨酸受体 N2B (glutamate receptor N2B, GluN2B) 是谷氨酸受体的 2B 亚基,在神经元可塑性、情绪调节过程中发挥着重要作用<sup>[21]</sup>,GluN2B 亚基主要分布于前脑区如海马和纹状体,与焦虑、抑郁等情绪调节密切相关<sup>[22]</sup>;GRM5 基因与精神类疾病的发生有一定的关联<sup>[23]</sup>;Glu 参与大脑多种生理活动,过量会引起神经死亡,过低会引起精神类疾病的发生,GLuR1 和 VGluT1 与 GLu 的兴奋性表达以及维持其含量平衡有关<sup>[24]</sup>,见图 3。

如图 3 结果所示,与模型组相比较,阳性给药组和 ALI 熏香组均可增强 GRN2B, GRM5, GluR1, VGluT1 蛋白表达,说明 ALI 熏香抗焦虑作用机制可能与增强和维持 Glu 的兴奋性信息表达与含量平衡有关。

**2 沉香熏香吸入抗抑郁作用**

**2.1 对抑郁模型小鼠行为学的影响** OFT 实验通过研究给药前后啮齿类动物在行为学上的变化,对抗抑郁效果进行评价<sup>[25]</sup>,SWT 实验和 TST 实验都是经典的评价抑郁状态改善情况的实验<sup>[26-27]</sup>。OFT 实验结果见图 4A ~ 图 4C,与正常组比较,抑郁模型组运动总路程和运动速度减少 ( $P < 0.05$ ),静止时间增加 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,阳性对照组可以显著增加抑郁模型组动物运动总路程和运动速度 ( $P < 0.05$ ),减少抑郁模型动物静止时间 ( $P < 0.05$ );ALI 各组均可增加抑郁模型动物总路程和运动速度,减少静止时间,其中 ALI 中剂量组差异显著 ( $P < 0.05$ )。SWT 实验和 TST 实验结果见图 4D 和图 4E,与正常组比较,抑郁模型组强迫游泳不动时间、悬尾不动时间均有所增加且差异显著 ( $P < 0.05$ ),说明造模成功;与抑郁模型组比较,阳性给药组和 ALI 组对抑郁模型动物强迫游泳及悬尾不动时间均有显著的减少 ( $P < 0.05$ )。以上结果说明,ALI 组均能减少抑郁模型动物强迫游泳和悬尾的不动时间。

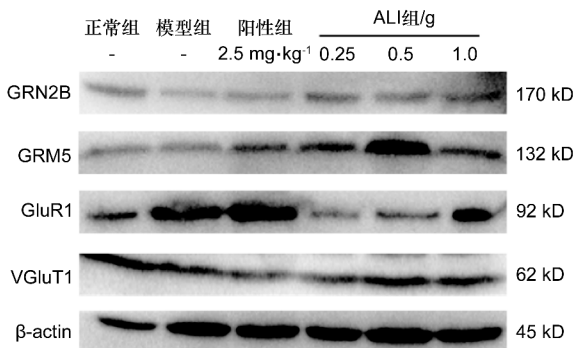


图 3 ALI 熏香吸入对焦虑模型小鼠脑组织中 GRN2B, GRM5, GluR1 和 VGluT1 蛋白表达的影响

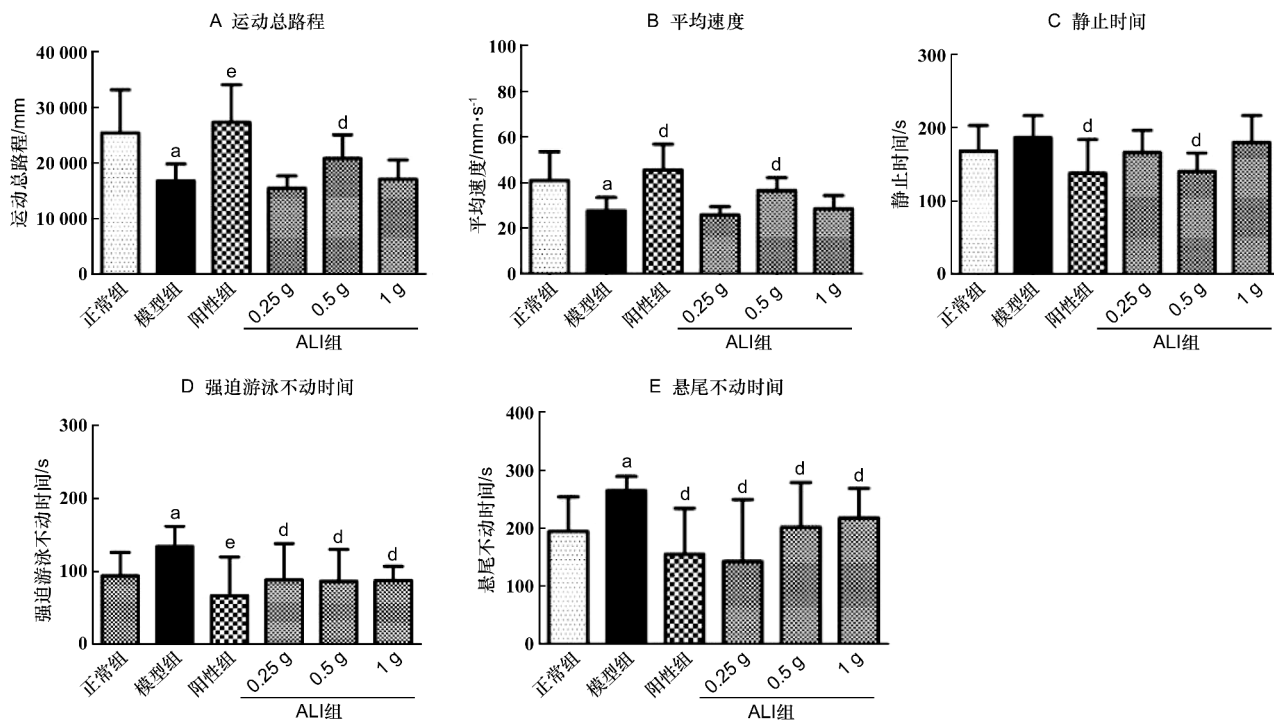


图4 ALI熏香吸入对抑郁模型小鼠OFT,FST,TST,SWT行为学评价的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

**2.2 对抑郁症模型小鼠脑组织中5-HT, GABA<sub>A</sub>, Glu递质水平的影响** 现代研究表明<sup>[28-29]</sup>, 抑郁患者脑组织中兴奋型或抑制型的单胺类神经递质水平会发生变化, 与抑郁症密切相关的神经递质有5-HT、GABA<sub>A</sub>、Glu、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, AD)等。本研究选取5-HT、GABA<sub>A</sub>、Glu这3种神经递质进行检测, 结果如图5所示, 与正常组相比, 抑郁模型组的5-HT和

Glu水平显著降低( $P < 0.05$ ), GABA<sub>A</sub>水平显著升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 说明造模成功; 与模型组相比, 阳性对照组和ALI中、高剂量组均能显著提高抑郁模型动物5-HT和Glu水平( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 显著降低抑郁模型动物GABA<sub>A</sub>水平( $P < 0.05, P < 0.01$ )。以上结果说明ALI熏香能调控抑郁模型组动物脑组织中神经递质5-HT、Glu、GABA<sub>A</sub>的水平。

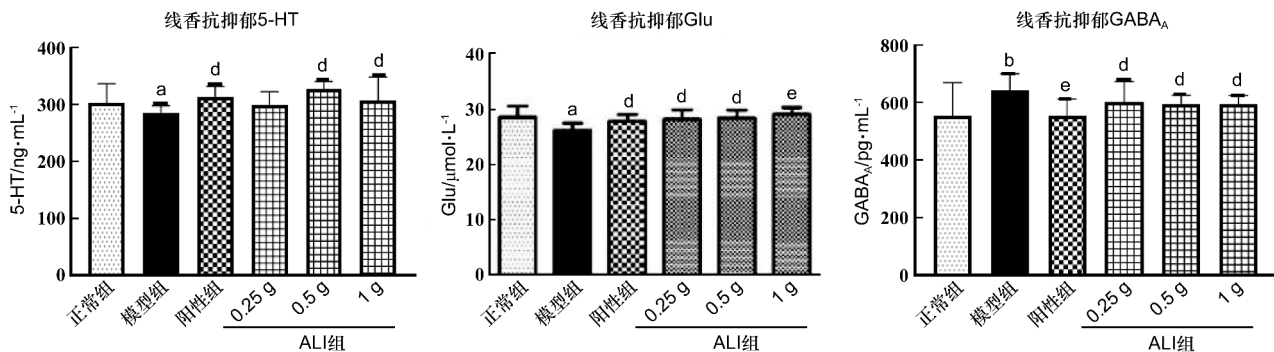


图5 ALI熏香吸入对抑郁模型小鼠脑组织5-HT, GABA<sub>A</sub>, Glu的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

**2.3 对抑郁模型动物海马体脑组织GRN2B, GRM5, GluR1, VGluT1蛋白表达的影响** 重点ALI后, 选取抑郁模型动物脑组织中, 与细胞生长及精神类疾

病相关的GRN2B, GRM5, GluR1, VGluT1蛋白进行分析, 结果见图6, 与模型组比较, 阳性给药组和ALI组可增强GRM5, GluR1, VGluT1蛋白的表达, 而

GRN2B 蛋白的表达降低,说明 ALI 熏香抗抑郁的作用机制可能与降低 GRN2B 蛋白表达、增强 GRM5 蛋白的表达以及加强或维持 Glu 的兴奋性信息传递有关。

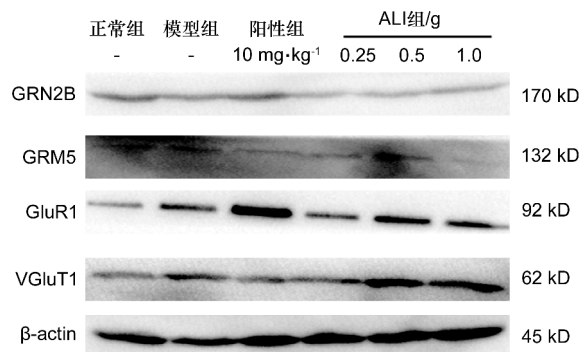


图 6 ALI 熏香吸入对抑郁模型小鼠脑组织 GRN2B, GRM5, GluR1, VGluT1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

## 讨 论

据报道,全球患有抑郁症的人群约占 4.7%,患有焦虑症的人群约占 7.3%<sup>[30]</sup>,发病时具有复杂性、类型多样性、伴发症状较多、高复发性等特点<sup>[31]</sup>,现有的临床疗效一直不佳,单独使用一种药物治愈率较低,所以临床多采用联合用药的方式进行治疗<sup>[32]</sup>。据临床报道,抑郁症和焦虑症往往同时存在<sup>[33-35]</sup>,因此有时研究者也把抑郁和焦虑共有的病症称为“焦虑抑郁”综合征<sup>[36]</sup>。西方医学多认为,抑郁症和焦虑症的发生与患者体内中枢神经系统中单胺类神经递质的浓度水平发生变化有关,临床多采用促进相关神经递质分泌或抑制其再摄取等方法进行治疗<sup>[4,37]</sup>。而在我国传统医学里,抑郁症和焦虑症皆与情志有关,与中医的“七情”紧密相关,在治疗方面多采用理气疏肝、养心安神、滋阴降火等方法治疗<sup>[38-39]</sup>。因为采用中医药治疗抑郁症和焦虑症讲究从整体观念出发进行辨证论治,相对西药治疗具有不良反应少、安全性较高的特点,因此中药治疗一直受到广泛关注<sup>[40-41]</sup>。

沉香为传统理气类中药,历代本草记载有“清人神、宁心安神、益气和神”的作用。课题组前期研究已证实,沉香挥发油注射给药有较好的镇静、抗焦虑及抗抑郁作用<sup>[11]</sup>,但给药方式与传统熏香使用不同,本研究采用与传统熏香相近的燃烧熏香吸入方

式研究线香的抗焦虑及抗抑郁作用。结果发现 ALI 熏香吸入均有显著抗焦虑和抗抑郁作用。研究证实了沉香传统使用具有“益气和神”的现代抗焦虑和抗抑郁作用,为沉香用于神经系统疾病防治的临床应用及创新医药产品研制等提供有力依据。

CUMS 动物模型是目前被认为高度接近抑郁症症状的造模方式<sup>[42]</sup>,其动物模型会出现兴趣丧失(自发、探索行为能力降低)、绝望行为(强迫游泳和悬尾不动时间增加)等一系列的反应<sup>[43]</sup>,行为学实验是神经精神药物研究中常见的检测方法之一,主要评价给药后是否对动物的行为产生影响<sup>[44]</sup>。ALI 熏香吸入可显著降低焦虑模型动物的运动总路程和活动速度,延长焦虑小鼠的停留时间,同时降低焦虑模型小鼠在暗箱中的运动路程和速度,说明 ALI 熏香对于焦虑模型动物的行为学有改善作用。此外 ALI 熏香各组均可增加抑郁模型动物总路程和运动速度,减少静止时间,这些结果说明,ALI 熏香吸入对抑郁模型动物的行为学有改善作用。

现代研究对抑郁症和焦虑症发病的机制多偏向单胺类神经递质学说<sup>[45]</sup>,认为是脑内神经突触间隙单胺类神经递质水平发生异常而导致的疾病,如 5-HT, DA, NE, GABA, Glu 等均参与情绪变化。据研究报告,大多抑郁症患者 5-HT 水平含量较低<sup>[46]</sup>,焦虑症患者 5-HT, GABA 递质水平偏低<sup>[47-48]</sup>。本研究选取 Glu, 5-HT, GABA<sub>A</sub> 这 3 种神经递质进行递质水平的测定,发现 ALI 中、高剂量组能降低焦虑模型 Glu 水平,升高 GABA<sub>A</sub>, 5-HT 水平,而对于抑郁模型动物,能提高 5-HT 和 Glu 水平,降低 GABA<sub>A</sub> 水平。结果说明,ALI 熏香抗焦虑、抗抑郁作用可能与 Glu, GABA<sub>A</sub>, 5-HT 递质水平调控有关。

研究表明 GluN2B 是谷氨酸受体的亚基,在神经元可塑性、情绪调节过程中发挥着重要作用<sup>[21]</sup>; GRM5 基因与精神类疾病的发生有一定的关联性<sup>[22]</sup>; AMPA 受体与抑郁症的发病机制密切相关<sup>[49-50]</sup>,升高抑郁动物模型脑内 AMPA 受体 GluR1, GluR2 表达水平及 GluR1 磷酸化水平,可以逆转 CUMS 模型动物出现的抑郁样行为<sup>[51-52]</sup>。VGluT1 广泛分布于谷氨酸囊泡膜上,在囊泡膜离子浓度改变条件下,协助谷氨酸在囊泡间转运,对维持机体谷氨酸含量平衡起到重要作用<sup>[53-54]</sup>。实验考察了 ALI 熏香对焦虑模型及抑郁模型动物 GRN2B, GRM5, GluR1, VGluT1 蛋白表达的影响,结果表明,ALI 熏香抗焦虑作用可能与增强脑组织中 GRN2B 和

GRM5 蛋白表达,间接提高 Glu 的兴奋性信息传递有关;ALI 熏香抗抑郁作用可能与降低 GRN2B 亚基和 GRM5 蛋白的表达,间接提高 GLu 的兴奋性信息传递有关。

综上所述,ALI 熏香吸入对 MCPP 诱导的焦虑样行为和 CUMS 诱导的抑郁样行为均有较好的改善作用,其作用机制可能与调控 5-HT, GABA<sub>A</sub>, Glu 神经递质水平,影响 GRN2B, GRM5, GluR1, VGLuT1 的蛋白表达有关。本研究可为焦虑、抑郁等神经障碍疾病的医药研究和临床防治等提供新的治疗途径。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 兰嘉琦,赵春阳,吴镭,等. 抗焦虑障碍药物非临床药效学评价体系探索[J]. 药学报, 2021, 56(4): 949-965.
- [2] LI L, YU AL, WANG ZL, et al. Chaihu-Shugan-San and absorbed meranzin hydrate induce anti-atherosclerosis and behavioral improvements in high-fat diet ApoE<sup>-/-</sup> mice via anti-inflammatory and BDNF-TrkB pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108893.
- [3] 刘欢乐,卫拂晓,秦雪梅,等. 中西药联合用药抗抑郁研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3776-3783.
- [4] 汤洋. 中西医结合治疗抑郁症的临床分析[J]. 中国医药指南, 2018, 16(8): 176
- [5] 张齐,武丽,高月,等. 抑郁症、焦虑症模型大鼠情绪加工神经环路 5-HT、5-HT1A 含量变化以及加味温胆汤的双向调节作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(12): 62-65.
- [6] 弓宝,杨云,刘洋洋,等. 常用植物黏合剂物种基原鉴定、制香性能与燃烧性能评价[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(23): 1995-2000.
- [7] 尹大力. 沉香味喃衍生物 AF-5 的抗焦虑作用和新药开发 [C]//中国化学会第八届天然有机化学学术研讨会论文集. 济南, 2010: 59.
- [8] 易智彪. 一种具有抗焦虑作用的沉香精油巴布剂及其制备方法: CN105395525B[P]. 2018-07-31.
- [9] 侯金良,张媛媛,张浩,等. 沉香片剂小鼠口鼻吸入给药抗焦虑和催眠功效实验研究[J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(1): 113-119.
- [10] 史圣华,金星,莫日根. 广枣七味散、十三味槟榔散、沉香四味散抗抑郁作用的实验研究[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(5): 41-43.
- [11] WANG S, WANG CH, YU ZX, et al. Agarwood essential oil ameliorates restrain stress-induced anxiety and depression by inhibiting HPA axis hyperactivity [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3468.
- [12] 张齐,武丽,高月,等. 抑郁症、焦虑症模型大鼠情绪加工神经环路 5-HT、5-HT1A 含量变化以及加味温胆汤的双向调节作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(12): 62-65.
- [13] LI KW, YAN L, ZHANG YP, et al. Seahorse treatment improves depression-like behavior in mice exposed to CUMS through reducing inflammation/oxidants and restoring neurotransmitter and neurotrophin function [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112487.
- [14] CHAI C, JIN BR, YUAN Q, et al. Study on serum metabolomics and hippocampus signaling pathway to evaluate the anti-depressant effect of Zhi-zi-chi decoction on CUMS mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 9(1): 79-81.
- [15] XIE WJ, MENG XB, ZHAI YD, et al. Panax notoginseng saponins: a review of its mechanisms of antidepressant or anxiolytic effects and network analysis on phytochemistry and pharmacology [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 940.
- [16] PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463(1-3): 3-33.
- [17] CRAWLEY JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1985, 9(1): 37-44.
- [18] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [19] 郑天歌,张青杰,贾靖仪,等. 新型抗焦虑药物研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(9): 1188-1196.
- [20] 陈兆斌,张博,刘秀敏,等. 焦虑症发病机制的研究进展 [J]. 天津中医药, 2018, 35(4): 316-320.
- [21] 佚名. 杨巍教授和罗建红教授团队揭示 N-甲基-D-门冬氨酸受体 GluN2B 磷酸化修饰介导抑郁症新机制 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2021, 50(4): 528.
- [22] 柴潇潇,王秀丽. N-甲基-D-门冬氨酸受体 2B 亚基在抑郁症形成机制中作用的研究进展 [J]. 河北医药, 2014, 36(21): 3323-3325.
- [23] 栾萌. GRM5 基因与精神分裂症的关联研究 [D]. 济南: 济南大学, 2011.
- [24] 刘晓,洪浩. 谷氨酸-谷氨酰胺循环在抑郁症发病机制中作用的研究进展 [J]. 今日药学, 2022, 32(3): 206-210.
- [25] 尉强,杨楠,刘雁勇. 常见啮齿类动物行为学实验在抑郁症研究中的应用 [J]. 西藏科技, 2020(6): 10-13.
- [26] PORSOLT RD, BERTIN A, JALFRE M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1977, 229(2): 327-336.
- [27] STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology*, 1985, 85(3): 367-370.
- [28] 王春芳,田文国,陈金鹏,等. 中药抗抑郁作用及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2890-2901.
- [29] 张碧涛,李媛媛,辛泰然,等. 逍遥散治疗抑郁症的研究进展 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 2022: 1-13.
- [30] 田洋丽,杨肇熙,张剑昭,等. 体质指数在焦虑症与抑郁症关系中的调节效应研究 [J]. 中国全科医学, 2022, 25(11): 1368-1372.
- [31] 许秀峰. 抑郁症的多学科协同治疗 [J]. 中华精神科杂志, 2013, 46(2): 114-115.
- [32] 黄飞,姜祥智,徐勇,等. 联合用药治疗抑郁症的效果和安全性 [J]. 齐鲁医学杂志, 2016, 31(1): 79-81.
- [33] HUNT C, ISSAKIDIS C, ANDREWS G. DSM-IV generalized anxiety disorder in the Australian National Survey of Mental Health and Well-Being [J]. *Psychol Med*, 2002, 32(4): 649-659.
- [34] GORMAN JM. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders [J]. *Depress Anxiety*, 1996, 4(4): 160-168.
- [35] 胡文悦,韩振蕴,张斐妹,等. 混合性焦虑抑郁障碍患者证候体质研究 [J]. 世界中医药, 2022, 17(16): 2332-2335.
- [36] CHOI KW, KIM YK, JEON HJ. Comorbid anxiety and depression: clinical and conceptual consideration and transdiagnostic treatment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1191: 219-235.
- [37] 曾婕,洪浩. 兴奋性谷氨酸转运蛋白 2 作为抑郁治疗靶点的研究进展 [J]. 今日药学, 2021, 31(6): 401-404.
- [38] 周仲瑛. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 392-400.
- [39] 阮淑芳,徐伏莲,何佩华,等. 基于多学科协作门诊抑郁障碍全程药物治疗管理效果研究 [J]. 今日药学, 2021, 31(6): 465-469.
- [40] 徐倩. 中西医结合治疗抑郁症伴焦虑症的临床疗效 [J]. 中国卫生标准管理, 2021, 12(10): 120-121.
- [41] 朱文娟,袁国桢. 中西医结合治疗抑郁症的临床研究现状 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(27): 3075-3078.

- [42] 田萍, 张薇, 李开言, 等. 地黄对慢性不可预知温和应激模型大鼠抑郁样行为及海马单胺类神经递质的影响[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4691-4697.
- [43] 王钦, 蔡萧君, 李宇, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠海马 BDNF/TrkB/CREB 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 37.
- [44] 买文丽, 王琼, 刘新民, 等. 小鼠自主活动实验中的评价指标[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(3): 172-175, 244.
- [45] SCHIENLE A, HETTEMA JM, CÁCEDA R, *et al.* Neurobiology and genetics of generalized anxiety disorder[J]. *Psychiatr Ann*, 2011, 41(2): 113-123.
- [46] 许鹏, 周童, 孙易娜, 等. 通督安神方对抑郁模型大鼠治疗作用及其机制研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 542-546.
- [47] KUMAR JR, RAJKUMAR R, LEE LC, *et al.* Nucleus incertus contributes to an anxiogenic effect of buspirone in rats: involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 110(Pt A): 1-14.
- [48] 谢正, 王娜, 李恒芬, 等. 5-羟色胺 1A 受体基因 C(-1019)G (rs6295) 单核苷酸多态性与中国汉族人群焦虑障碍的关联分析[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(11): 29-33.
- [49] BAO HK, SUN LJ, ZHU Y, *et al.* Lentinan produces a robust antidepressant-like effect via enhancing the prefrontal Dectin-1/AMPA receptor signaling pathway[J]. *Behav Brain Res*, 2017, 317: 263-271.
- [50] XIAO D, LIU L, LI YJ, *et al.* Licorisoﬂavan A exerts antidepressant-like effect in mice: involvement of BDNF-TrkB pathway and AMPA receptors[J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(9): 2044-2056.
- [51] HOU XY, HU ZL, ZHANG DZ, *et al.* Rapid antidepressant effect of hydrogen sulfide: evidence for activation of mTORC1-TrkB-AMPA receptor pathways [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(8): 472-488.
- [52] SUZUKI A, MURAKAMI K, TAJIMA Y, *et al.* TAK-137, an AMPA receptor potentiator with little agonistic effect, produces antidepressant-like effect without causing psychotomimetic effects in rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2019, 183: 80-86.
- [53] TAKATA K, KASAHARA T, KASAHARA M, *et al.* Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 173(1): 67-73.
- [54] 俞晓燕, 孙子林. GLUT1 的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(30): 3411-3414.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-02-13