

刺五加对大鼠尼古丁戒断焦虑样行为的调节作用

许胜伟¹, 李高歌¹, 陈心语¹, 陈依琳², 徐东方³, 吴桐^{4*}

1. 齐齐哈尔医学院精神卫生学院2021级精神医学2班, 黑龙江 齐齐哈尔 161000

2. 齐齐哈尔医学院药学院2022级药学2班, 黑龙江 齐齐哈尔 161000

3. 齐齐哈尔医学院基础医学院2022级临床医学9班, 黑龙江 齐齐哈尔 161000

4. 齐齐哈尔医学院精神卫生学院精神卫生研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161000

摘 要 : 目的: 探究刺五加对尼古丁戒断大鼠焦虑样行为的影响及其在杏仁核谷氨酸和 GABA 系统中的调节机制。方法: 采用皮下注射方法建立 SD 大鼠尼古丁戒断模型。通过高架十字迷宫 (EPM) 和旷场实验 (OFT) 测试焦虑行为, 检测血清皮质酮 (CORT) 及杏仁核中谷氨酸 (Glu)、GABA 的含量, 测定相关基因表达。结果: 尼古丁戒断大鼠的焦虑样行为显著增加, 表现为在 EPM 中开臂停留时间比例和进入次数比例降低, 在 OFT 中中央区域活动距离和持续时间缩短; 而刺五加干预组大鼠的焦虑样行为明显改善。ELISA 结果显示, 尼古丁戒断大鼠血清 CORT 水平显著升高, 刺五加干预能抑制这种升高。在杏仁核中, 尼古丁戒断显著增加了 Glu 的含量和谷氨酸受体 (GluA1) 的表达, 同时降低了 GABA 的含量和 GABA 合成酶 (GAD67) 以及 GABA 受体 (GABRA1) 的表达; 刺五加干预则通过降低 Glu 水平、上调 GABA 含量以及调节相关受体和转运体的表达, 恢复了杏仁核中谷氨酸和 GABA 系统的平衡。结论: 刺五加能够有效缓解尼古丁戒断大鼠的焦虑样行为, 其机制可能与调节杏仁核谷氨酸和 GABA 系统的平衡有关, 为抗焦虑治疗提供了新的实验依据和理论支持。

关 键 词 : 刺五加; 尼古丁; 戒断焦虑; 杏仁核

Regulatory Effect of Acanthopanax Senticosus on Nicotine Withdrawal Anxiety-Like Behavior In Rats

Xu Shengwei¹, Li Gaoge¹, Chen Xinyu¹, Chen Yilin², Xu Dongfang³, Wu Tong^{4*}

1. 2021 Grade Psychiatric Medicine Class 2, Mental Health College, Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161000

2. 2022 Grade Pharmacy Class 2, School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161000

3. 2022 Grade Clinical Medicine Class 9, School of Basic Medical Sciences, Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161000

4. Mental Health Research Institute, Mental Health College, Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161000

Abstract : Objective: To explore the effects of Acanthopanax senticosus(AS) on anxiety-like behaviors in nicotine-withdrawn rats and its mechanisms in amygdala glutamatergic and GABAergic systems. Methods: A nicotine withdrawal model was established in SD rats. Anxiety behaviors were assessed using EPM and OFT. Serum CORT, amygdala Glu, and GABA levels were measured, and related gene expressions were analyzed. Results: Nicotine withdrawal increased anxiety-like behaviors (reduced open-arm time/entries and central zone activity) and elevated serum CORT. AS intervention alleviated these behaviors and normalized CORT levels. In the amygdala, nicotine withdrawal increased Glu and glutamate receptor (GluA1) expression while decreasing GABA and GABA-related gene (GAD67, GABRA1) expression. AS restored balance by reducing Glu, increasing GABA, and modulating receptor/transporter expression. Conclusion: AS alleviates nicotine withdrawal-induced anxiety by regulating amygdala glutamatergic and GABAergic systems, offering potential for anti-anxiety therapy.

Keywords : Acanthopanax senticosus; nicotine; withdrawal anxiety; amygdala

尼古丁依赖是全球范围内的重大公共卫生问题^[1]。焦虑是导致尼古丁戒断复吸的主要因素之一。研究显示, 大约70%的吸烟者在戒烟期间会经历不同程度的焦虑症状^[2]。尽管一些药物用于尼古丁戒断焦虑的治疗, 但效果不佳, 许多患者仍会出现焦虑, 且具有药物副作用和依赖性限制。

基金项目: 齐齐哈尔医学院大学生创新创业训练计划项目: X202311230058

作者简介: 许胜伟 (2002.12-), 男, 汉族, 籍贯: 河北省沧州市, 本科在读, 研究方向: 精神医学;

通讯作者: 吴桐 (1984.01-), 女, 蒙古族, 籍贯: 黑龙江哈尔滨, 博士, 研究方向: 精神疾病分子机理, Email: wutong21th@126.com。

杏仁核 (Amygdala, AMY) 作) 是情绪调节的关键脑区^[3], AMY 中约 70% 的神经元是谷氨酸能神经元, 通常处于抑制状态以维持稳定^[4]。焦虑时, 谷氨酸能系统则会出现过度活跃的现象, 导致突触间隙中谷氨酸 (glutamate, Glu) 浓度显著升高, 从而增强神经元的兴奋性, 进而引发一系列焦虑样行为的表现。相对而言, GABA 作为主要抑制性神经递质, 通过与 GABA 受体结合, 增加氯离子内流, 使神经元超极化, 抑制神经活动。在尼古丁戒断期间, GABA 系统功能可能受到抑制, 削弱对谷氨酸能系统的平衡调节能力, 从而加剧焦虑表现^[5]。

刺五加作为传统中药, 广泛用于多种疾病的治疗。研究显示其具有抗焦虑潜力^[6]。本研究拟探讨刺五加如何通过调节谷氨酸和 GABA 系统缓解尼古丁戒断焦虑。

一、材料与方法

(一) 动物模型与分组

随机选取 40 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 230~250 克, 由齐齐哈尔医学院动物实验中心提供, 许可证号为 SYXK (黑) 2021-013。大鼠在恒温恒湿的独立通气系统中饲养, 温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 45%~55%。实验已获齐齐哈尔医学院伦理委员会批准 (批号: QMU-AECC-2023-33), 并遵循相关指南。适应性饲养 7 天后, 将大鼠分为 5 组: 生理盐水对照组 (Con)、尼古丁戒断模型组 (Nic)、刺五加低浓度干预组 (CI-L)、刺五加高浓度干预组 (CI-H) 和生理盐水注射 + 刺五加高浓度干预组 (CI-Con), 每组 8 只。模型组和干预组皮下注射 0.4mg/kg 尼古丁, 持续 7 天后停止注射 3 天以制备戒断焦虑模型。对照组和高剂量对照组给予生理盐水, 低剂量和高剂量治疗组在最后一次注射后 24 小时分别灌胃刺五加 5mg/kg/d 和 15mg/kg/d, 连续 3 天。末次给药 30 分钟后, 各组大鼠通过高架十字迷宫和旷场测试其焦虑行为。

(二) 行为学测试

1. 高架十字迷宫 (EPM)

EPM 装置由两条开臂和两条闭臂组成, 交叉形成中心区域。将大鼠置于中心区域, 头部朝向开臂, 自由探索 5 分钟。记录大鼠在开臂的停留时间比例和进入次数比例。开放臂时间为大鼠四爪均进入开臂开始, 至全部脱离开臂结束; 闭臂时间记录同理。进入开臂次数以大鼠四爪踏入开臂为一次, 闭臂次数记录同理。高架十字迷宫、旷场箱及动物行为视频分析系统购自上海软隆科技发展有限公司。

2. 旷场实验 (OFT)

旷场箱为 50cm×50cm 的黑色有机玻璃箱, 顶部装有红外摄像头。将大鼠轻放于箱中央, 自由活动 5 分钟。自动记录大鼠的活动轨迹、中央区域活动时间和总行程。

(三) 酶联免疫吸附 (Elisa) 试剂盒检测

行为学结束后, 处死大鼠并迅速收集 1~1.5ml 血液, 1500g 离心 15 分钟后收集血浆。根据大鼠图谱剥离大鼠大脑 AMY 并冻存至 -80°C 。取适量 AMY 称重后 1:10 加入生理盐水匀浆。使用 Elisa 试剂盒检测血清皮质酮 CORT (上海酶联生物科技有限公司) 及大脑 AMY 中的 Glu 和 GABA (武汉赛培生物科技有限公司), 严格按照说明进行测定。

(四) qPCR 测定杏仁核基因表达

采用 trizol 法提取剩余 AMY 组织总 RNA, 利用 inNova UScript II First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (with gDNA Removal) 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA, 采用 2× inNova Taq SYBR® Green qPCR PreMix 试剂盒进行 qPCR 扩增基因。引物序列如表 1 所示, 由上海生工生物科技有限公司合成。扩增条件: 预变性 94°C 3 min, 变性 94°C 15 s, 退火 60°C 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 利用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值计算基因的相对表达量。

表 1 引物序列

基因	引物序列 5' -3'
GluR1	正向引物: CCCCTTCCAAGAGAAACAAGA
	反向引物: GATTGTGGTCTTCCCTCCCCTC
GAD67	正向引物: CTCCTGTGGCTGAATCGAG
	反向引物: GGCTACGCCACACCAAGTAT
GABRA1	正向引物: GGCCAGAGTGGTGCAAGTTA
	反向引物: GCGCAAACCGATGTGAAAT
GAPDH	正向引物: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	反向引物: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

(五) 统计分析

采用 GraphPad Prism 9.0 统计软件进行数据分析, 所有数据均采用均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 Tukey 法进行检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

(一) 刺五加改善大鼠尼古丁戒断焦虑样行为

在 EPM 测试中, Nic 组大鼠的开臂进入次数和持续时间显著下降, 而 CI-LOW 组和 CI-H 组有效抑制了这种下降。OFT 结果显示, Nic 组大鼠在中央区域的活动距离、停留时间和总活动路程均显著缩短, CI-LOW 组和 CI-H 组则提高了焦虑活动指数 ($P < 0.05$)。CI-Con 组与 Con 组的行为指数无明显差异, 表明刺五加能改善大鼠的尼古丁戒断焦虑行为, 但单独给药不影响行为学。

表2 刺五加对大鼠高架十字迷宫和旷场实验行为学的影响 (n=8)

分组	EPM开臂进入次数 百分比 (%)	EPM开臂滞留时间 百分比 (%)	OF中央区域 总路程 (mm)	OF中央区域停留 总时间 (s)	OF活动总路程 (mm)
Con组	42.82 ± 4.56	51.30 ± 3.58	240.67 ± 22.18	10.32 ± 2.12	1513.24 ± 105.20
Nic组	12.34 ± 0.83**	11.87 ± 1.92**	87.56 ± 12.14**	3.20 ± 1.16**	452.36 ± 48.42**
CI-L组	21.52 ± 2.58**	20.62 ± 2.85**	126.54 ± 19.87**	4.57 ± 2.03**	662.74 ± 89.78**
CI-H组	28.96 ± 3.86**	28.92 ± 3.05**	185.18 ± 22.59**	6.39 ± 2.52**	985.18 ± 102.09**
CI-Con组	43.24 ± 4.38##	50.64 ± 4.21##	232.61 ± 25.14##	9.98 ± 2.32##	1475.46 ± 123.54##
F	155.4	307.2	98.91	18.61	182.8
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

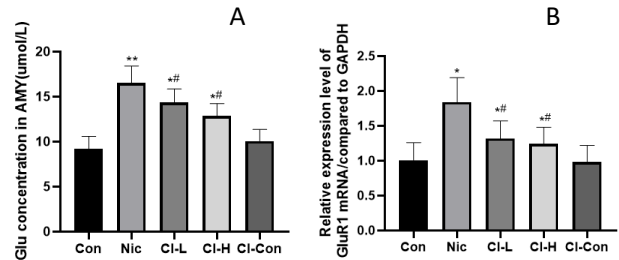
注: *表示与 Con组相比 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 。#表示 Nic组相比 $P < 0.05$; ##表示 $P < 0.01$ 。

(二) 刺五加对各组大鼠血清 CORT 的影响

血清 CORT 水平升高是大鼠焦虑的激素指示。与 CON 组 (117.42 ± 20.72 ng/ml) 相比, Nic 组大鼠 CORT 显著升高 (324.82 ± 38.26 ng/ml), 表明尼古丁戒断加剧焦虑。同时, 两种剂量的刺五加均能抑制 CORT 增加, 支持其抗焦虑作用 [$F=4.45, P < 0.01$]。

(三) 刺五加对 AMY 谷氨酸能系统的调节

尼古丁戒断显著增加了杏仁核中谷氨酸 (Glu) 含量 ($p < 0.001$), 表明谷氨酸能神经元兴奋性增强。刺五加干预后, 谷氨酸水平显著降低 ($p < 0.01$), 提示其降低 AMY Glu 水平。分析显示, 尼古丁戒断导致谷氨酸受体 GluR1 表达上调 ($p < 0.05$), 而刺五加处理下调这些受体表达 ($p < 0.05$), 表明刺五加可能通过调控谷氨酸受体表达, 减少神经元过度兴奋。

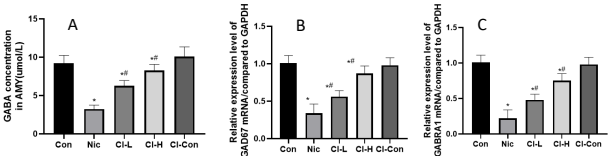


> 图1 刺五加对 AMY 内谷氨酸能系统的影响

注: A: ELISA 测定 AMY 内谷氨酸浓度; B: qPCR 测定 AMY 内 GluR1 表达水平。*表示与 Con 组相比 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 。#表示 Nic 组相比 $P < 0.05$; ##表示 $P < 0.01$ 。

(四) 刺五加对 AMY GABA 能系统的调节

尼古丁戒断显著降低了杏仁核中 GABA 的含量, 表明 GABA 能神经元的抑制功能减弱。刺五加干预后, GABA 水平显著升高, 提示其可能通过增强 GABA 合成或减少降解来恢复 GABA 能系统功能。分析发现, 尼古丁戒断导致 GABA 合成酶 GAD67 表达下调, 而刺五加处理则显著上调 GAD67 表达, 表明其可能促进 GABA 合成, 增强抑制功能。此外, GABA 受体 GABRA1 在戒断组中显著下降, 而刺五加干预显著上调这些受体的表达, 支持其通过增强 GABA 信号传递恢复杏仁核抑制功能。这些结果表明, 刺五加通过多靶点调控 GABA 能系统, 缓解尼古丁戒断引起的抑制功能减弱。



> 图2 刺五加对 AMY 内 GABA 能系统的影响

注: A: ELISA 测定 AMY 内 GABA 浓度; B-C: qPCR 测定 AMY 内 GAD67, GABRA1 表达水平。*表示与 Con 组相比 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 。#表示 Nic 组相比 $P < 0.05$; ##表示 $P < 0.01$ 。

三、讨论

本研究通过行为学实验和分子生物学技术, 探讨了刺五加对尼古丁戒断诱导的大鼠焦虑样行为的调节作用及其机制。结果表明, 刺五加通过调控 AMY 中 Glu 和 GABA 系统的平衡, 显著缓解了尼古丁戒断引起的焦虑样行为。这一发现为刺五加在抗焦虑治疗中的应用提供了新的科学依据, 并为开发基于天然药物的尼古丁戒断焦虑治疗策略提供了理论支持。

首先, 行为学实验结果证实, 尼古丁戒断显著增加了大鼠的焦虑样行为, 表现为高架十字迷宫 (EPM) 中开臂探索时间减少和旷场实验 (OFT) 中中央区域活动时间缩短。刺五加干预后, 这些行为学指标显著改善, 表明刺五加具有显著的抗焦虑作用。这一结果与先前的研究一致, 表明刺五加通过调节神经递质系统, 能够有效缓解焦虑样行为^[8]。研究表明, 刺五加可能通过调节下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴) 的功能, 降低血清皮质酮 (CORT) 水平, 从而减少应激反应对焦虑行为的促进作用^[9], 本研究结果也观察到了刺五加对血清皮质酮的调节作用。值得注意的是, 刺五加的作用可能不仅限于单一递质系统的调节, 而是通过多靶点协同作用实现。

其次, 分子机制研究表明, 尼古丁戒断导致杏仁核中谷氨酸水平显著升高, 谷氨酸受体 GluR1 表达升高, 提示谷氨酸能神经元的过度兴奋可能是焦虑行为的重要机制。刺五加通过下调谷氨酸受体表达, 显著降低了谷氨酸信号传导, 抑制了谷氨酸能神经元。这一发现与先前的研究一致, 表明谷氨酸能系统的过度激活与焦虑行为密切相关^[10]。

此外, 尼古丁戒断还导致杏仁核中 GABA 水平显著降低, GABA 合成酶 GAD67 和受体 GABRA1 的表达下调, 提示 GABA 能神经元的抑制功能减弱。刺五加通过上调 GAD67 和 GABA 受体的表达, 显著提高了 GABA 水平, 恢复了 GABA 能系统的功

能。这一结果进一步支持了刺五加通过增强 GABA 能信号传递，缓解杏仁核抑制功能减弱的作用机制。GABA 作为主要的抑制性神经递质，其功能恢复对于维持谷氨酸 -GABA 系统的平衡至关重要。

综上所述，刺五加通过多靶点调控杏仁核中谷氨酸和 GABA 系统，显著缓解了尼古丁戒断诱导的焦虑样行为。这一研究不仅揭示了刺五加的抗焦虑机制，还为开发基于天然药物的尼古丁戒

断焦虑治疗策略提供了新的思路。与现有抗焦虑药物相比，刺五加具有天然来源、副作用小、多靶点协同的优势。例如，传统苯二氮䓬类药物虽能快速缓解焦虑，但长期使用易导致依赖性和认知功能损害，而刺五加通过调节递质平衡和抗氧化途径，可能减少此类风险。此外，刺五加与其他天然成分（如贯叶连翘或缬草）的联合使用可能产生协同效应，值得进一步探索。

参考文献

[1]Chellian R, Behnood-Rod A, Bruijnzeel DM, et al.. Rodent models for nicotine withdrawal. *J Psychopharmacol*. 2021;35(10):1169–1187.

[2]Wu B, Tao X, Liu C, et al. Vitamin D3 reduces hippocampal NR2A and anxiety in nicotine withdrawal mice. *Transl Neurosci*. 2021;12(1):273–281. Published 2021 Jan 1.

[3]Kjærstad HL, Macoveanu J, Knudsen GM, et al. Neural responses during down-regulation of negative emotion in patients with recently diagnosed bipolar disorder and their unaffected relatives. *Psychol Med*. 2023;53(4):1254–1265.

[4]Sun YH, Hu BW, Tan LH, et al. Posterior Basolateral Amygdala is a Critical Amygdaloid Area for Temporal Lobe Epilepsy. *Adv Sci (Weinh)*. 2024;11(48):e2407525.

[5]Pollack MH, Jensen JE, Simon NM, Kaufman RE, Renshaw PF. High-field MRS study of GABA, glutamate and glutamine in social anxiety disorder: response to treatment with levetiracetam. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(3):739–43.

[6]赵容杰, 王玉花, 赵正林, 等. 刺五加对酒精戒断焦虑的作用及机制 [J]. 牡丹江医学院学报, 2021, 42(03):32–36.

[7]焦宇, 李丽波, 王玉花, 等. 薄荷精油对尼古丁戒断大鼠焦虑行为的治疗作用及其机制 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2021, 42(13):1105–1110.

[8]Miyazaki S, Oikawa H, Takekoshi H, Hoshizaki M, Ogata M, Fujikawa T. Anxiolytic Effects of Acanthopanax senticosus HARMS Occur via Regulation of Autonomic Function and Activate Hippocampal BDNF-TrkB Signaling. *Molecules*. 2018 Dec 31;24(1):132.

[9]Chang RS, Cerit H, Hye T, Durham EL, Aizley H, Boukezzzi S, Haimovici F, Goldstein JM, Dillon DG, Pizzagalli DA, Holsen LM. Stress-induced alterations in HPA-axis reactivity and mesolimbic reward activation in individuals with emotional eating. *Appetite*. 2022 Jan 1;168:105707.

[10]Wang Y, Wu LH, Hou F, et al. Mitochondrial calcium uniporter knockdown in hippocampal neurons alleviates anxious and depressive behavior in the 3XTG Alzheimer's disease mouse model. *Brain Res*. 1840:149060. doi:10.1016/j.brainres.2024.149060.