

# 第一章 緒 言

焦慮在精神醫學上常被稱之為輕微障礙(minor disorder)。就精神醫療上每天所看的病患來說，輕微障礙佔罹患精神疾病之最大多數<sup>(1)</sup>。在台灣地區輕微障礙流行病學的盛行率為 24.2% <sup>(2)</sup>。由此可看出焦慮為相當普遍的精神障礙。

當一個人處於焦慮狀態時，其腦部會發生什麼變化，以及其變化是在腦的什麼部位發生是研究焦慮的人想了解的問題。倫敦大學精神研究院的Gray教授提出行為抑制系統學說<sup>(3)</sup>，實驗發現當動物面臨懲罰信號、失去獎賞信號或陌生環境時，這些訊息輸入腦部後經過行為抑制提高覺醒或增強注意。此三種訊息輸入腦部之行為抑制系統而引發焦慮，並且由此系統發布命令採取停看聽(行為抑制、提高警覺及注意以備採取應付措施)等表示焦慮狀態的行為。以巴比妥酸鹽等抗焦慮藥物給與動物可減少行為抑制系統輸出停看聽的指令。又切除腦中隔(septal area)或海馬(hippocampus)也可獲得類似抗焦慮藥物的效果<sup>(1)</sup>。

焦慮是由於壓力、不安及憂慮等情緒反應所造成的不愉快狀態，為一種不知源於何處之恐懼。而由於焦慮所造成的身心失調則為最普遍常見的精神不安的現象。另外嚴重的焦慮症狀與恐懼的症狀類似(如心跳加快、盜汗、發抖、心悸)，而這些現象的發生主要是由於交感神經的興奮所產生的。一般認為係中樞神經系統對外刺激所引起的一連串自主神經/周邊/荷爾蒙之反應。

一般而言，理想的抗焦慮藥物希望可以完全的抑制或去除所有的焦慮症狀，而不會影響大腦皮質之正常功能，及產生鎮靜作用<sup>(4)</sup>。臨床上治療焦慮之藥物，目前仍以benzodiazepine類藥物為主，具鎮靜安

眠、抗痙攣及高度肌肉鬆弛等作用<sup>(4)</sup>；但嗜睡及運動功能失調等中樞抑制作用<sup>(5)</sup>，與藥理上的依賴性等副作用<sup>(4)</sup>，使得benzodiazepine類藥物之長期使用具有爭議性。因此從中藥尋找並開發具抗焦慮療效且副作用較低之藥物，乃是值得探索與研究的方向。

黃連為毛茛科多年生草本植物黃連 *Coptis chinensis* FRANCH. 的根莖。首載於神農本草經列為上品，自古以來即為清熱解毒常用中藥之一。日華子本草記載：「治五勞七傷，益氣，止心腹痛，驚悸煩躁。」。小蘗鹼(berberine)為其主要活性成分<sup>(6)</sup>。現代藥理學研究證實黃連具有抗菌<sup>(7)</sup>、抗高血壓<sup>(8)</sup>、抗潰瘍<sup>(9)</sup>及中樞抑制<sup>(10)</sup>等作用，然有關黃連治驚悸煩躁之抗焦慮作用研究並未見有文獻報告發表。且Yamahara等人指出四氫小蘗鹼(tetrahydroberberine)具中樞抑制作用<sup>(11)</sup>。而此作用與小蘗鹼骨架之存在有很大關係<sup>(12)</sup>，因此擬進一步探討小蘗鹼之抗焦慮作用。

目前最廣泛被使用於研究焦慮的動物模式有二，一是依據嚙齒類動物厭惡高處及開放空間的天性而設計的舉臂式十字形迷宮(elevated plus-maze)<sup>(13)</sup> 模式，二是依嚙齒類動物害怕紅光及白光的天性而設計之黑白室(black and white test)模式<sup>(14)</sup>，本研究擬利用此二模式探討黃連甲醇粗抽物及其活性成分小蘗鹼之抗焦慮作用，並以現今臨床常用之抗焦慮藥物diazepam與buspirone作為正對照組，藉以評估其抗焦慮作用之療效。此外，並進一步併用影響中樞神經系統傳遞物質之藥物，及高速液相層析儀測定小蘗鹼對嚙齒類動物腦幹內單胺濃度變化之影響，期能闡明小蘗鹼抗焦慮作用之機轉。

## 第二章 總 論

### 第一節 黃連之藥理作用及臨床應用文獻考察

#### 一、藥理作用：

##### 1. 抗病原微生物：

- (1) 黃連及其有效成分小檗鹼具有廣譜抗病原菌作用，對多種革蘭氏陽性及陰性菌、結核桿菌及真菌均有抑制或殺死作用<sup>(15)</sup>。
- (2) 黃連水煎液 5mg/ml 與小檗鹼 0.5mg/ml 比較，無論在抑制菌株數或抑菌率方面，黃連均優於小檗鹼<sup>(16)</sup>。
- (3) 黃連及小檗鹼抗菌作用的機理可能是通過影響細菌代謝的中間過程產生的<sup>(17)</sup>。

##### 2. 抗病毒：

- (1) 黃連煎劑對流感病毒、B 型肝炎病毒皆有抑制作用<sup>(18)</sup>。
- (2) 小檗鹼對砂眼病毒具有抑制作用<sup>(19)</sup>。

##### 3. 抗阿米巴：

黃連煎劑和小檗鹼均具有抗阿米巴作用<sup>(20)</sup>。

##### 4. 抗炎：

黃連甲醇提取液及小檗鹼的抗炎作用可能與抑制中性粒細胞趨化、產生活性氧的功能，抑制自由基產生，降低 PLA<sub>2</sub> 活性，減少炎症組織中 PGE<sub>2</sub> 的產生等多種因素有關<sup>(21)</sup>。

##### 5. 中樞抑制：

- (1) 給小鼠腹腔注射黃連水溶液 100mg/kg，小檗鹼 10mg/kg 均使小鼠自發活動減少，作用持續在 85 分鐘以上。

(2)對戊巴比妥(pentobarbital)的催眠作用能產生協同效應，可縮短後者引起小鼠睡眠的潛伏期，並使睡眠時間延長<sup>(16)</sup>。

(3)小蘗鹼小劑量可使動物大腦皮質興奮，大劑量則抑制。

#### 6.抗心律失常：

小蘗鹼具有抗心律失常作用，能對抗乙醯膽鹼(acetylcholine)引起的兔心動過緩和 ST 段下移，增加心肌收縮力，降低心肌耗氧量。

#### 7.學習記憶：

小蘗鹼 0.4、4 μg/隻側腦室注射可改善東莨菪鹼致小鼠記憶獲得障礙及促進正常小鼠的記憶保持<sup>(22)</sup>。

#### 8.興奮或抑制心肌：

小蘗鹼小劑量興奮心臟，大劑量則抑制心臟，其對心肌的正性肌力作用為可逆性的<sup>(23)</sup>。

#### 9.降血壓：

小蘗鹼降血壓作用之機理與其擴張血管、抗腎上腺素(epinephrine)及抑制升壓反射抑制血管運動中樞有關<sup>(24)</sup>。

#### 10.抗血小板聚集：

小蘗鹼是一種有效的抗血小板藥物，它可抑制 ADP、花生四烯酸(arachidonic acid)、膠原(collagen)及鈣離子載體(A<sub>23187</sub>)誘發的家兔血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)的釋放<sup>(25)</sup>。

#### 11.解熱：

黃連注射液對發熱模型動物有降溫作用，其作用機理與中樞 cAMP 生成有關<sup>(26)</sup>。

12.降血糖：

黃連和小蘗鹼可抑制糖原新生和促進糖酵解，故有降低血糖作用<sup>(27)</sup>。

13.降血脂：

黃連水浸液和小蘗鹼均有降低動物血清膽固醇的作用<sup>(28)</sup>。

14.抗潰瘍及抗腹瀉：

黃連甲醇提取液對消化性潰瘍<sup>(29)</sup>及幽門螺旋桿菌引起之潰瘍<sup>(28)</sup>有效。

15.抗缺氧：

小劑量之鹽酸小蘗鹼能提高心肌細胞耐缺氧能力及對心肌缺氧性損傷具保護作用<sup>(30)</sup>。

16.提高機體非特異性免疫功能：

黃連膏可提高小鼠腹腔巨噬細胞激活率，提高小鼠腹腔巨噬細胞吞噬異物及消化異物功能<sup>(31)</sup>。

17.對乙酰膽鹼作用的影響：

藉由增加神經節後交感神經末端 acetylcholine(Ach)之釋放或抑制 cholinesterase 活性而增加 Ach 滯留，導致迴腸收縮<sup>(32)</sup>。

18.抗脂質過氧化：

黃連可使高血脂大鼠血清丙二醛含量降低，故具有明顯的抗脂質過氧化作用<sup>(33)</sup>。

19.鬆弛動脈平滑肌：

小蘗鹼能鬆弛正甲腎上腺素(norepinephrine)和高鉀、鈣引起的冠

狀動脈、主動脈等血管平滑肌收縮。說明其對 受體有選擇性阻斷作用<sup>(34)</sup>。

#### 20.抗腫瘤：

(1)鹽酸小檗鹼體外可抑制小鼠肉瘤 S180 細胞 DNA、RNA、蛋白質及脂肪合成<sup>(18)</sup>。

(2)黃連單用有殺傷鼻咽癌細胞的作用<sup>(35)</sup>。

#### 21.藥代動力學：

(1)小檗鹼口服不易吸收，血中濃度較低<sup>(15)</sup>。

(2)季銨型小檗鹼不易透過血腦屏障<sup>(36)</sup>。

(3)小檗鹼主要經過肝臟代謝。其原型及代謝產物均經腎臟排泄，但以原型排出者甚少<sup>(15)</sup>。

#### 22.毒性：

(1)小檗鹼口服不易吸收，因而口服給藥時毒性很小。小鼠腹腔注射鹽酸小檗鹼，半數致死量(LD<sub>50</sub>)為 24.3mg/kg<sup>(37)</sup>，灌胃給藥 LD<sub>50</sub> 為 392mg/kg<sup>(21)</sup>。

(2)最嚴重的毒性為心臟毒性，另外還有過敏反應<sup>(38)</sup>。

## 二、臨床應用：

### 1.細菌性痢疾：

黃連茯苓湯(黃連、茯苓、白芍、黃芩)水煎液，每日一劑，72例患者中 69 例痊癒<sup>(15)</sup>。

### 2.局部化膿性感染：

87 例有竇道的指骨骨髓炎，局部黃連水煎液(65g 生藥/1800ml)浸泡，每日 1 次，每次 1 3 小時，全部治癒<sup>(39)</sup>。

### 3.燒傷：

將無菌敷料蘸黃連煎液(30g 生藥/500ml)覆蓋創面，治療 度燒傷 26 例，用藥 12 23 日，均獲痊癒<sup>(40)</sup>。

### 4.焦慮症及失眠：

黃連阿膠湯或其加味治療焦慮症 42 例及頑固性失眠 64 例，均獲近期治癒<sup>(41)</sup>。

### 5.心律失常：

室性早搏和房性早搏患者 64 例，口服小蘗鹼，每次 0.6 1.0g，每日 3 4 次，平均療程 25 日。小蘗鹼對室早的總有效率為 67.9%，對房早的總有效率為 81.8% <sup>(42)</sup>。

### 6.高血壓：

黃連鹼 0.75 4g/day，口服，可治療急性腎炎性高血壓和高血壓伴有心絞痛及冠狀動脈機能不全者<sup>(43)</sup>。

7.糖尿病：

黃連石膏湯(石膏、知母、天花粉、葛根、黃連) 治療糖尿病 28 例，有效率達 89% ，空腹血糖下降接近或恢復正常<sup>(15)</sup>。

8 胃及十二指腸潰瘍萎縮性胃炎：

小蘗鹼口服，每次 0.5g，每日 3 次，20 30 日為一療程，治癒率 67.6% <sup>(44)</sup>。



## 第二節 黃連化學成分之考察

### 1.生物鹼(alkaloids)<sup>(15)</sup>：

小檗鹼(berberine) 、 黃連鹼(coptisine)

掌葉防己鹼(palmatine) 、 藥根鹼(jatrorrhizine)

表小檗鹼(epiberberine) 、 甲基黃連鹼(worenine)

非州防己鹼(columbamine) 、 木蘭花鹼(magnoflorine)

### 2.非生物鹼：

阿魏酸(ferulic acid)<sup>(15)</sup> 、 氯原酸(chlorogenic acid)<sup>(45)</sup>

### 第三節 焦慮與 serotonergic system 之關係

近年來有許多關於動物行為和治療焦慮症患者的研究顯示，serotonergic system 在恐懼和焦慮情緒行為的調節上扮演一重要之角色，包括睡眠、慾望、自主神經系統的調節等許多的行為<sup>(46-47)</sup>。

DSM-IV(the fourth edition of the diagnostic and manual of mental disorders)把源發性焦慮症分為八類：(1) 伴隨或未伴隨廣場恐懼症之恐慌性焦慮症 (panic disorders)；(2)不具恐慌性焦慮症病史之廣場恐懼症 (3)社交恐懼症(social phobia)(4)單純性恐懼症(simple phobia) (5)強迫性官能症(obsessive-compulsive disorder ; OCD)；(6)創傷後壓力症(post traumatic stress disorder ; PTSD)；(7)廣泛性焦慮症(generalized anxiety disorder ; GAD) (8)非專一性焦慮症(unspecified anxiety disorder) 這八類型在症狀病因行為模式及治療上有重要之不同。

當面臨壓力時，生理學上會引發下視丘-腦下垂體-腎上腺皮質軸(hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis)之內分泌變化。臨床上 BZ 可抑制因壓力所引起 ACTH、cortisol、TSH、生長激素(growth hormone)之分泌<sup>(48)</sup>。而以 5-HT 的前驅物 l-tryptophan(100 mg/kg)高劑量下腹腔給予會引起泌乳素(prolactin) 和血漿中的生長激素的釋放<sup>(49)</sup>。在神經內分泌研究上 5-HT<sub>1A</sub> 接受體作用劑引起血漿中 ACTH、corticosteroids、prolactin 提高<sup>(50)</sup>，及生長激素增加<sup>(51)</sup>。

當我們將 5-HT 神經毒素(neurotoxins)或 5-HT 合成的抑制劑給予在矛盾衝突環境下的動物，動物顯示會有壓抑的行為產生<sup>(46,52)</sup>。大多數的文獻顯示增加 5-HT 的活性會產生動物的焦慮行為。相反的，減少

5-HT 的活性會產生抗焦慮<sup>(53)</sup>。

目前已知 5-HT 接受體 可分為 5-HT<sub>1</sub>、5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>3</sub>、5-HT<sub>4</sub>、5-HT<sub>5</sub>、5-HT<sub>6</sub>、5-HT<sub>7</sub> 等七大類，其中以 5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>1B</sub>、5-HT<sub>2A/2C</sub> 等受體與焦慮關係較密切<sup>(54)</sup>。

5-HT<sub>1</sub> 接受體分布相當廣泛，以突觸前的 5-HT<sub>1A</sub> 接受體(5-HT<sub>1A</sub> presynaptic receptors)最多，其為一種 autoreceptors 或稱 somatodendritic autoreceptors；主要是位於腦幹核縫上的 5-HT 細胞體上；而突觸後的 5-HT<sub>1A</sub> 接受體(5-HT<sub>1A</sub> postsynaptic receptors)則是集中在 limbic system (包括 hippocampus 和 amygdala) <sup>(55,56)</sup> 上。活化突觸前 5-HT<sub>1A</sub> 接受體可抑制 5-HT 神經細胞之 firing rate，減少 5-HT 的神經傳遞。突觸前 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors 及突觸後的 5-HT<sub>1A</sub> receptors 與 5-HT<sub>1A</sub> 部份致效劑或 5-HT<sub>1</sub> 拮抗劑結合後，會活化 Gi protein，而引起 K<sup>+</sup>通道打開，促使神經細胞膜過極化，進而減低 5-HT 神經傳導而產生抗焦慮活性。目前常用於研究 5-HT<sub>1A</sub> 接受體的藥物有 5-HT<sub>1A</sub> 接受體的部分作用劑 (如：buspirone) 及作用劑(如：8-OH DPAT)。Buspirone 有效用於治療廣泛性焦慮症<sup>(56)</sup>。而 8-OH DPAT 已知亦作用於 5-HT<sub>7</sub> 接受體。

早期研究證明全身或局部給予 LSD 會引起大鼠背側縫核 5-HT firing rate 之明顯抑制<sup>(57)</sup>，目前有研究發現 5-HT<sub>1A</sub> 作用劑 buspirone 也有相同作用，且這些作用可被 5-HT<sub>1A</sub> 選擇性拮抗劑 WAY100635 所阻斷<sup>(58)</sup>。而 8-OH DPAT 會增加大鼠大腦皮質和海馬迴 acetylcholine 之釋放<sup>(59)</sup>，最近有研究指出 5-HT<sub>1A</sub> 接受體位於中膈之 cholinergic 細胞體上<sup>(60)</sup>，可能投射至皮質區及海馬迴。微透析實驗中證明 8-OH DPAT 會增加許多腦區 noradrenaline 之釋放，包括下視丘、海馬迴、額葉皮質

及腹被膜區<sup>(61-62)</sup>。歸結上述，5-HT<sub>1A</sub> 接受體對於 5-HT 調節 noradrenergic 及 cholinergic pathways 扮演著重要角色。雖然 5-HT<sub>1A</sub> 接受體作用劑引發 5-HT cell firing 之抑制，一般認為係直接作用在 raphe，但最近的資料則提高突觸後 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor 參與之可能性<sup>(63-64)</sup>。而 5-HT<sub>1B</sub> 接受體被發現大量出現在嚙齒類動物中，現已有證據指出 5-HT<sub>1B</sub> 接受體與 5-HT<sub>1A</sub> 接受體一樣不但存在於突觸前終端 autoreceptors (presynaptic terminal autoreceptors) 亦存在於突觸後接受體 (postsynaptic receptors)<sup>(55)</sup>。5-HT<sub>1D</sub> 接受體則在其它種系動物(牛、豬、狗、人類)發現。現在一般接受 5-HT<sub>1D</sub> 接受體事實上是 5-HT<sub>1B</sub> 接受體之種系變異<sup>(65)</sup>。最近一份研究指出 5-HT<sub>1D</sub> 接受體在人類腦中分布於基底神經節(蒼白球及黑質)中腦導水管灰質及脊髓<sup>(66)</sup>。5-HT<sub>1D</sub> 接受體作用劑(如：sumatriptan)一般使用於偏頭痛(migraine)的治療。至於 5-HT<sub>1E</sub> 和 5-HT<sub>1F</sub> 接受體雖早已被發現，但它們的特性卻尚未清楚。

5-HT<sub>2</sub> 接受體為一種醣蛋白(glycoprotein)，含有 471 個胺基酸<sup>(67)</sup>，具有相當高密度的結構。其接受體有一部份位於細胞膜內，另部分位於細胞膜外，突觸後的 5-HT<sub>2</sub> 接受體主要存在皮質、下視丘和杏仁核 (amygdala)；而 5-HT<sub>2A</sub> 接受體則是位於皮質、帶狀核及一些邊緣系統區和部分的基底神經節的 5-HT 神經突觸後上；5-HT<sub>2C</sub> 接受體被發現存在於脈絡叢、邊緣系統和基底神經節上<sup>(55)</sup>。有研究指出，5-HT<sub>2A</sub> 藥物對 5-HT<sub>2C</sub> 接受體具有相同的親和力<sup>(68-69)</sup>；因此，5-HT<sub>2A/2C</sub> 接受體作用劑 mCPP，會引起焦慮作用<sup>(70-71)</sup>，而常用之 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受體拮抗劑 ritanserin，則具抗焦慮作用<sup>(72)</sup>。Ritanserin 常被用於治療廣泛性焦慮症 (GAD) 和心情不佳 (dysthymia) 的患者<sup>(73)</sup>。活化 5-HT<sub>2A</sub> 接受體會增加

cortisol、ACTH、renin 及 prolactin 之分泌<sup>(74)</sup>。而 5-HT<sub>2B</sub> 接受體分布於外側中隔、背側下視丘、杏仁核。5-HT<sub>2B</sub> 接受體作用劑 BW723C86 直接注射入杏仁核內側有抗焦慮作用<sup>(75)</sup>。5-HT<sub>2</sub> 接受體活化結果造成多種腦區神經興奮，而活化 5-HT<sub>2A</sub> 接受體造成之興奮反應，與減少鉀離子電導性相關<sup>(76)</sup>。在電生理研究中 5-HT<sub>2A</sub> 接受體牽涉到調節藍斑核之 noradrenergic 神經<sup>(54)</sup>。

5-HT<sub>3</sub> 接受體則在邊緣系統如杏仁核<sup>(55)</sup>等區域分布最多。5-HT<sub>3</sub> 接受體是 ligand-gated ion channel。1992 年 Martin 等證明活化 5-HT<sub>3</sub> 接受體可增強 5-HT 之釋放<sup>(77)</sup>。有研究指出活化 5-HT<sub>3</sub> 接受體會抑制 cortical acetylcholine 釋放<sup>(78)</sup>，且活化 5-HT<sub>3</sub> 接受體抑制 acetylcholine 釋放非直接作用<sup>(59,79)</sup>，而是經由 GABA<sup>(79-80)</sup>。電生理研究中則指出，5-HT<sub>3</sub> 接受體亦參與調節腦部之 dopamine 神經活性。其拮抗劑如 ondansetron 和 granisetron 已被運用於治療抗腫瘤藥物及放射線治療引起的噁心嘔吐，另外臨床上也有報導指出 ondansetron 具明顯之抗焦慮作用<sup>(81)</sup>。

首先指出 5-HT<sub>4</sub> 接受體可能參與焦慮的是 Costall 和 Naylor。5-HT<sub>4</sub> 接受體分布於 nigrostriatal 和 mesolimbic system<sup>(82-83)</sup>。有越來越多的證據指出 5-HT<sub>4</sub> 接受體也參與調節 dopamine 之釋放，而 5-HT<sub>4</sub> 接受體活化也造成海馬迴 5-HT 釋放增加<sup>(84)</sup>。1994 年 Consolo 等證明側腦室給予 5-HT<sub>4</sub> 接受體作用劑 BIMU1 和 BIMU8 將增加 acetylcholine 之釋放<sup>(85)</sup>。

## 第四節 焦慮之嚙齒類動物模式

舉臂式十字形迷宮(Elevated plus-maze)及黑白室試驗(Black/white test)為常用之嚙齒類動物焦慮模式，分別說明如下：

### 一、黑白室試驗 (Black/white test)<sup>(14)</sup>：

#### 1. 實驗儀器

此儀器不須實驗者親自觀察，為全自動化儀器，數據的取得較為容易且較為可靠，為目前嚙齒類動物焦慮狀態的測定最常用之儀器<sup>(13,86)</sup>。此儀器由大小不同的二實驗箱所組成，一個實驗箱塗成白色 (27 × 27 cm)，另一個塗成黑色 (27 × 18 cm)，兩實驗箱間由 47 cm 高的壁隔開，此壁底部有一開口 (7 × 7 cm)，每實驗箱底部均有其相同大小及顏色的可移動地板，地板上用線畫出 9 × 9 cm 格子。每實驗箱各有其獨立照明，白室用 60 W 白光燈泡 (燈光強度為 4400 lux)，黑室用 60 W 紅光燈泡，兩燈泡離地板 37 cm 高。

#### 2. 實驗流程：

- (1) 將小鼠置於白室中央，小鼠頭部背向黑室。
- (2) 測試 5 分鐘。

#### 3. 評估指數：

- (1) 記錄小鼠停留在黑白室的總時間。
- (2) 小鼠第一次由白室跑至黑室的時間。
- (3) 小鼠在兩室間的穿梭次數。

評估指數	焦慮	抗焦慮
黑室滯留之時間		
白室滯留之時間		
第一次由白室跑至 黑室的時間		
兩室間的穿梭次數		

## 二、舉臂式十字形迷宮 (Elevated plus-maze)<sup>(13)</sup>

### 1. 實驗儀器：

此儀器由兩個開放臂 (30 × 5 cm) 及兩個封閉臂 (30 × 5 × 15 cm), 中以開放之正方形 (5 × 5 cm) 相連接, 距離地面 50 cm 高所組成。

### 2. 實驗流程：

將小鼠放入正方形處, 面向開放臂, 連續測定 5 分鐘。

### 3. 評估指數

- (1) 進入開放臂及封閉臂時間。
- (2) 進入開放臂及封閉臂次數。

評估指數	焦慮	抗焦慮
進入開放臂時間和次數		
進入封閉臂時間和次數		

## 第三章 實驗材料與方法

### 第一節 實驗材料

#### 一、藥材之基原與製備

1. 本實驗所使用之黃連藥材經鑑定，其基原為：

毛茛科植物黃連 *Coptis chinensis* FRANCH. 的根莖。

將黃連藥材，以甲醇浸潤之，在 50℃ 下迴流抽取四 五次，每次約四小時，合併抽取液，經減壓濃縮乾燥後，即得黃連甲醇粗抽物。

2. Berberine Chloride 購自 Sigma Chemical Co

#### 二、實驗動物

本研究採用之動物為 中國醫藥學院動物中心 所提供 Sprague-Dawley 系雄性大鼠，體重 220 250 公克（自發運動量及腦內單胺濃度測定實驗用）。ICR 雄性小鼠，體重 20 25 公克（舉臂式十字形迷宮、黑白室、hexobarbital 誘發睡眠實驗用）。

#### 三、實驗試藥

1. Diazepam 購自 Siu Guan Chemical Work。

2. N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperaziny]ethyl]-N-(2-pyridinyl)

cyclohexane carboxamide (WAY-100635)、8-Hydroxy-2-(di-n-

aminopropyl)tetralin (8-OH DPAT)、(±)1-(2,5-dimethoxy-4-

iodophenyl)-2-aminopropane (DOI)、4-(2'-methoxy-phenyl)

-1-[2'-(n-2''-pyridinyl)-p-iodobenzamido]-ethyl-piperazine HCl

(p-MPPI)、ritanserin (RIT) 均購自 R.B.I。



3. Buspirone HCl (BUS)、norepinephrine HCl (NE)、dopamine HCl (DA)、5-hydroxytryptamine HCl (serotonin, 5-HT)、vanillyl-mandelic acid (VMA)、homovanillic acid (HVA)、5-hydroxy-indole-3-acetic acid (5-HIAA)均購自 Sigma Chemical Co。

## 第二節 實驗方法

### 一、抗焦慮實驗：

#### (一)、黃連粗抽物及小蘗鹼對黑白室誘發焦慮之影響：

分別口服給予小鼠不同劑量黃連甲醇粗抽物(0.1, 0.5 g/kg)及小蘗鹼(0.02, 0.1, 0.5 g/kg)；60分鐘後，再將小鼠置於白室中央，小鼠頭部背向黑室，記錄小鼠停留在每一室的總時間<sup>(14,87)</sup>，小鼠第一次由明室跑至暗室的時間及小鼠在兩室間的穿梭次數。本實驗以diazepam (1.0 mg/kg, i.p.)及buspirone (2.0 mg/kg, i.p.)作為正對照組，於給藥30分鐘後進行試驗。每隻動物測試5分鐘，並於每隻動物測試完後將地板擦拭乾淨。實驗進行時間從下午一點至五點。

#### (二)、黃連粗抽物及小蘗鹼對舉臂式十字形迷宮誘發焦慮之影響：

分別口服給予小鼠不同劑量黃連甲醇粗抽物(0.1, 0.5 g/kg)及小蘗鹼(0.02, 0.1, 0.5 g/kg)；60分鐘後，將小鼠放入正方形 plus 中，連續測定5分鐘，以進入開放臂及封閉臂之次數及滯留開放臂及封閉臂之時間為評估標準<sup>(13)</sup>。本實驗以diazepam(1.0 mg/kg, i.p.)及buspirone (2.0 mg/kg, i.p.)作為正對照組，於給藥30分鐘後進行試驗。實驗時間從下午一點至五點。

### 二、鎮靜實驗：

#### (一)、對hexobarbital誘發睡眠時間之影響：

口服給予小鼠不同劑量黃連甲醇粗抽物(0.1, 0.5 g/kg)及小蘗鹼(0.1, 0.5 g/kg)；60分鐘後，再分別腹腔注射 hexobarbital (100 mg/kg, i.p.)，誘發睡眠，觀察記錄從注射 hexobarbital後至小鼠之翻正反射

(righting reflex) 消失時間 (onset) 及從翻正反射消失至恢復的時間 (sleeping time, duration)<sup>(88)</sup>。對照組給予 vehicle。

## (二)、對大鼠自發運動量之影響：

口服給予大鼠不同劑量黃連甲醇粗抽物(0.1, 0.5 g/kg)及小蘗鹼(0.1, 0.5 g/kg)。運動量之測定是使用「動物運動量測定裝置」(1-Opto-Varimex-3 Animal Activity Meter, USA), 偵測其水平走動之活動量的變化。於口服給藥 55 分鐘後放入此裝置內適應 5 分鐘, 再開始記錄, 觀察並連續記錄30分鐘<sup>(89)</sup>。每組 6 隻

## 三、小蘗鹼抗焦慮作用機轉之探討：

### (一)、對大鼠腦幹單胺及其代謝物濃度之影響

口服給予大鼠小蘗鹼(0.1, 0.5g/kg), 每組 6 隻, 60 分鐘後, 將大鼠斷頭犧牲, 取出全腦, 將腦幹(brain stem)取出, 置於碎冰中保持冷凍。依 Shibuya T. 之方法, 在 5ml 0.01N HCl 與500  $\mu$ l 0.1M EDTA 下以均質機研勻後, 加入 4 g NaCl, 並以 12 ml *n*-butanol 抽取, 經振盪離心後, 取得 *n*-butanol層, 再加入 17ml *n*-heptane 與 400 $\mu$ l 0.025N HCl 酸性溶液振盪之, 則單胺移入酸性水溶液層。上述餘留*n*-heptane 層續以 200 $\mu$ l 0.2 M Tris-HCl 鹼性緩衝溶液 (pH8.5) 振盪抽取並離心, 可得單胺代謝物<sup>(89)</sup>; 對照組給予等體積之saline。

以上分離所得腦幹單胺 (NE, DA, 5-HT) 及其代謝物 (HVA, VMA, 5-HIAA) 濃度, 以外標準法測定之。使用高速液相層析儀 (HPLC PM80; Bioanalytical system Inc.) 及檢出器 (Electrochemical

Detectors LC-4C; Bioanalytical system Inc.) 測定之。分離所用之 Column 為 Lichrospher 100 (RP-C18 endcapped, 4 mm × 125 mm) (E. Merck 50734), 移動相為加有 PIC B7 (Waters Associates) 之 methanol/water (測單胺濃度時為 7 : 93, 測定代謝物濃度時為 2 : 98), 流速為 2.0 ml/min。實驗結果以 Data module M746 型 (Waters) 記錄器記錄之。

(二) 併用影響中樞 GABAergic 及 serotonergic system 之藥物對小藥鹼抗焦慮作用之影響：

小藥鹼 (0.1g/kg) 口服給予小鼠 60 分鐘後, 再與影響中樞 GABAergic 及 serotonergic system 之藥物分別併用, 依前法 (舉臂式十字形迷宮試驗), 進行實驗。

併用藥物如下：

- (1) Diazepam (0.5mg/kg, i.p.) 30 分鐘前給予<sup>(90)</sup>。
- (2) Buspirone (5-HT<sub>1A</sub> receptor partial agonist; 0.05 mg/kg, i.p.) 30 分鐘前給予<sup>(91)</sup>。
- (3) WAY-100635 (5-HT<sub>1A</sub> selective antagonist; 0.3mg/kg, s.c.) 30 分鐘前給予<sup>(92)</sup>。
- (4) 8-OH DPAT (5-HT<sub>1A</sub> selective agonist; 0.75mg/kg, i.p.) 30 分鐘前給予<sup>(93)</sup>。
- (5) *p*-MPPI (5-HT<sub>1A</sub> selective antagonist; 0.5 mg/kg, i.p.) 30 分鐘前給予<sup>(94)</sup>。
- (6) DOI (5-HT<sub>2</sub> selective agonist; 1.5mg/kg, i.p.) 30 分鐘前給予<sup>(95)</sup>。

(7) Ritanserin (5-HT<sub>2</sub> selective antagonist; 0.01 mg/kg, i.p.) 30 分鐘前給予<sup>(96)</sup>。

(8) 對照組均給予vehicle。

#### 四、統計學分析

本實驗所得之數據，大鼠腦幹單胺及其代謝物濃度；舉臂式十字形迷宮及大鼠自發運動量均以 One-way ANOVA 分析其變異數，再以 Scheffe' s test 檢定其間差異之顯著性，而於黑白室實驗之時間數據，則以無母數 (non-parameter) 統計，以 Kruskal-Wallis 單因子變異數分析，再以 Mann-Whitney *U*-test 檢定其間差異之顯著性；凡 *P* 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。

## 第四章 實驗結果

### 一、對黑白室測定 (black/white test) 之影響：

由圖一結果顯示，口服黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼(0.1, 0.5 g/kg)對小鼠在黑白室中第一次由明室跑至暗室的時間均有延長的作用。

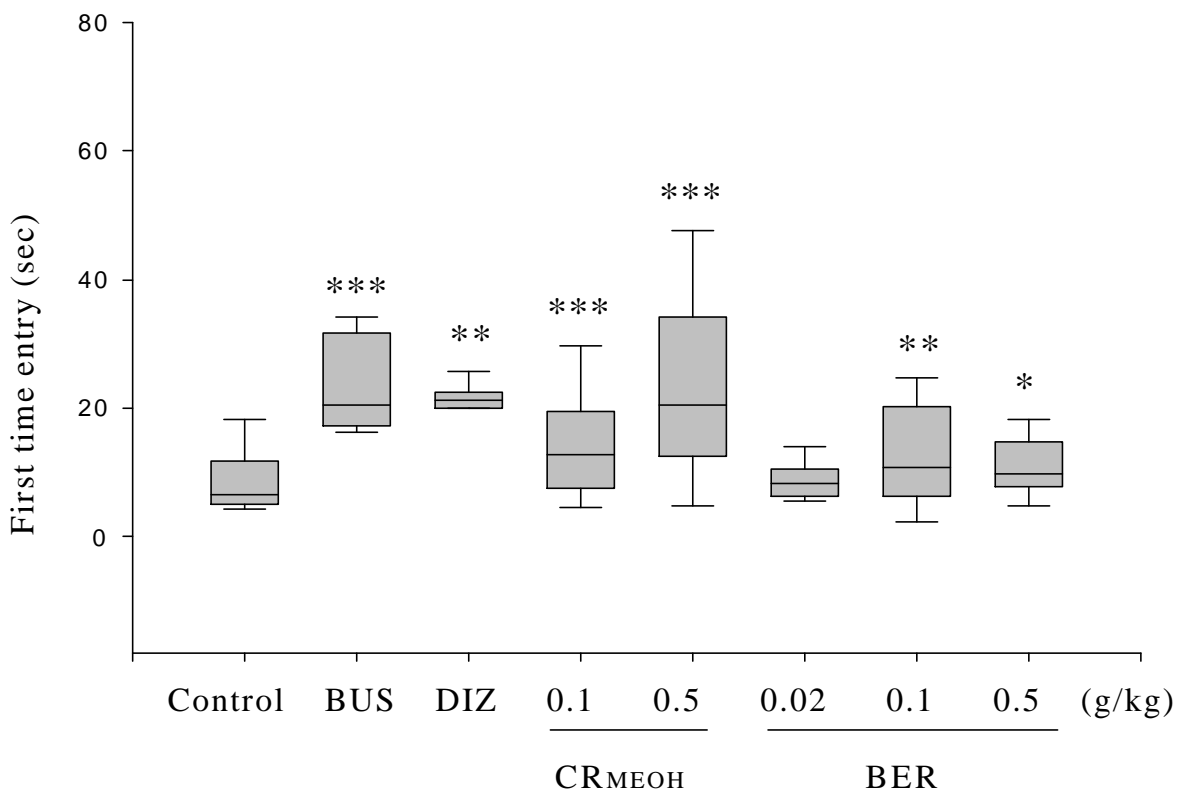


Fig 1. Effects of BUS, DIZ, methanol extract of Coptis rhizome (CRMEOH), berberine (BER) after acute treatment on the first time entry in the black & white test in mice. BUS : buspirone , 2.0 mg/kg , i.p ; DIZ : diazepam , 1.0 mg/kg, i.p., \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H following by Mann-Whitney *U* test).

由圖二結果顯示，口服黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼(0.1, 0.5 g/kg) 對小鼠在黑白室中停留在明室的時間均有延長的作用；在暗室的時間則均有縮短的作用。

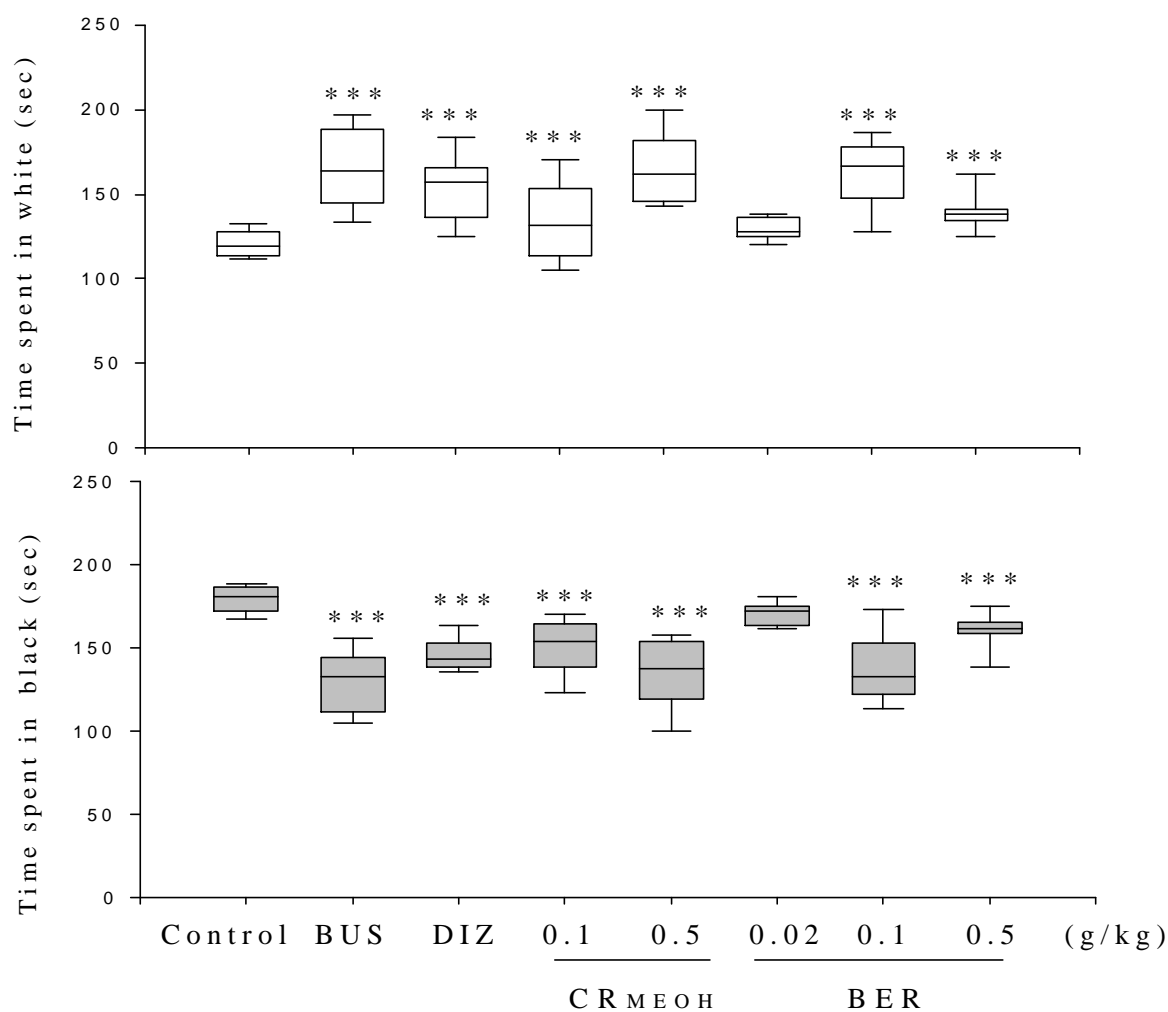


Fig 2. Effects of BUS, DIZ, methanol extract of Coptis rhizome (CRMEOH), berberine (BER) after acute treatment on the time spent in white and black compartments in the black & white test in mice. BUS : buspirone , 2.0 mg/kg , i.p. ; DIZ : diazepam , 1.0 mg/kg, i.p., \*\*\* $P < 0.001$  as compared with the control group (Kruskal-Wallis H following by Mann-Whitney  $U$  test).

由圖三結果顯示，口服黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼(0.1, 0.5 g/kg) 對小鼠在黑白室中兩室間的穿梭次數均有增加的作用。

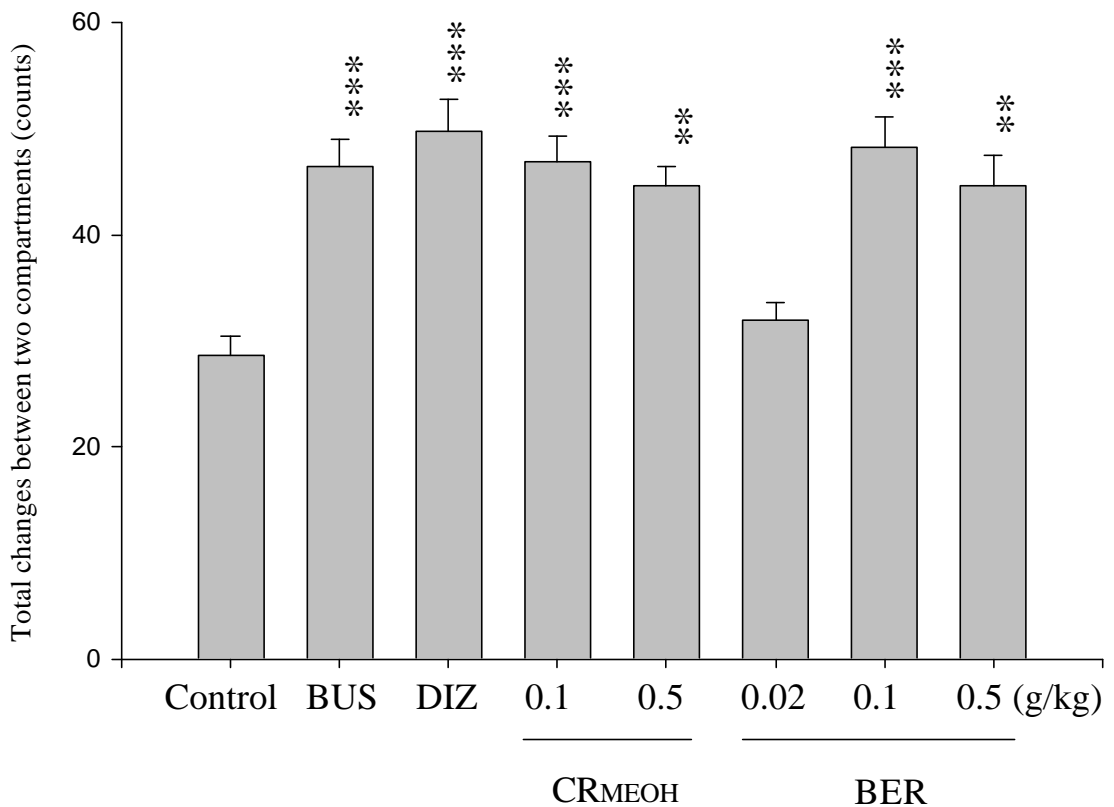


Fig 3. Effects of BUS,DIZ, methanol extract of Coptis rhizome (CRMEOH) , berberine (BER) after acute treatment on the total changes between two compartments in black & white test in mice. BUS : buspirone ,2.0 mg/kg , i.p.; DIZ : diazepam , 1.0 mg/kg,i.p. , \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 as compared with the control group (One-way ANOVA following by Scheffe's test).



## 二、對舉臂式十字形迷宮 (Elevated plus-maze) 誘發焦慮之影響：

圖四結果顯示，口服黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼(0.1, 0.5 g/kg)對小鼠在十字迷宮中開放臂進入次數及時間均有增加的作用，封閉臂的進入次數及時間則有減少的作用。

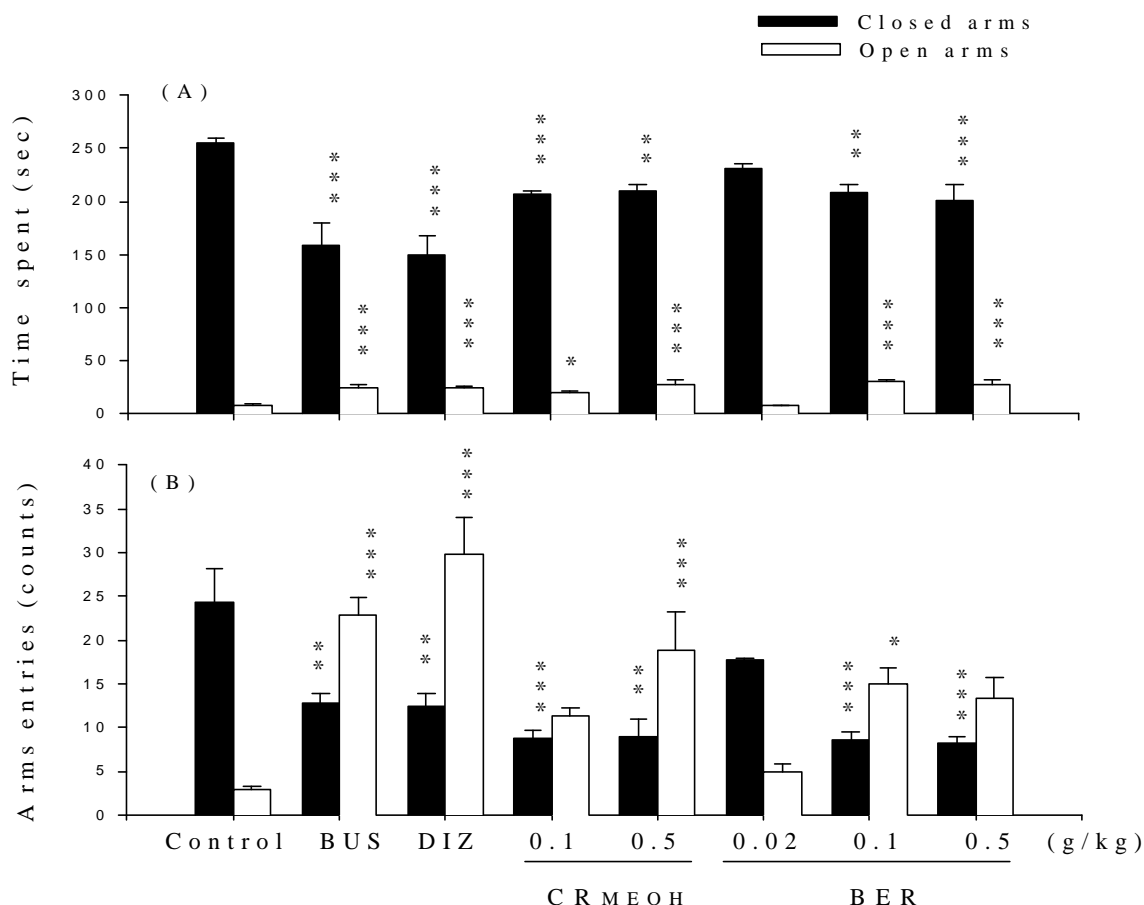


Fig 4. Effects of BUS, DIZ, methanol extract of Coptis rhizome (CRMEOH) and berberine(BER)on (A) the arms entries and (B) the time spent in the closed arms and open arms of the elevated plus-maze during a 5-min test in mice. BUS : buspirone , 2.0 mg/kg , i.p;. DIZ: diazepam,1.0mg/kg , \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 as compared with the control group

### 三、對 Hexobarbital 誘發睡眠時間之影響：

如圖五結果顯示，口服黃連甲醇粗抽物及小檗鹼(0.5g/kg)對 hexobarbital 誘發的睡眠時間均有延長作用。

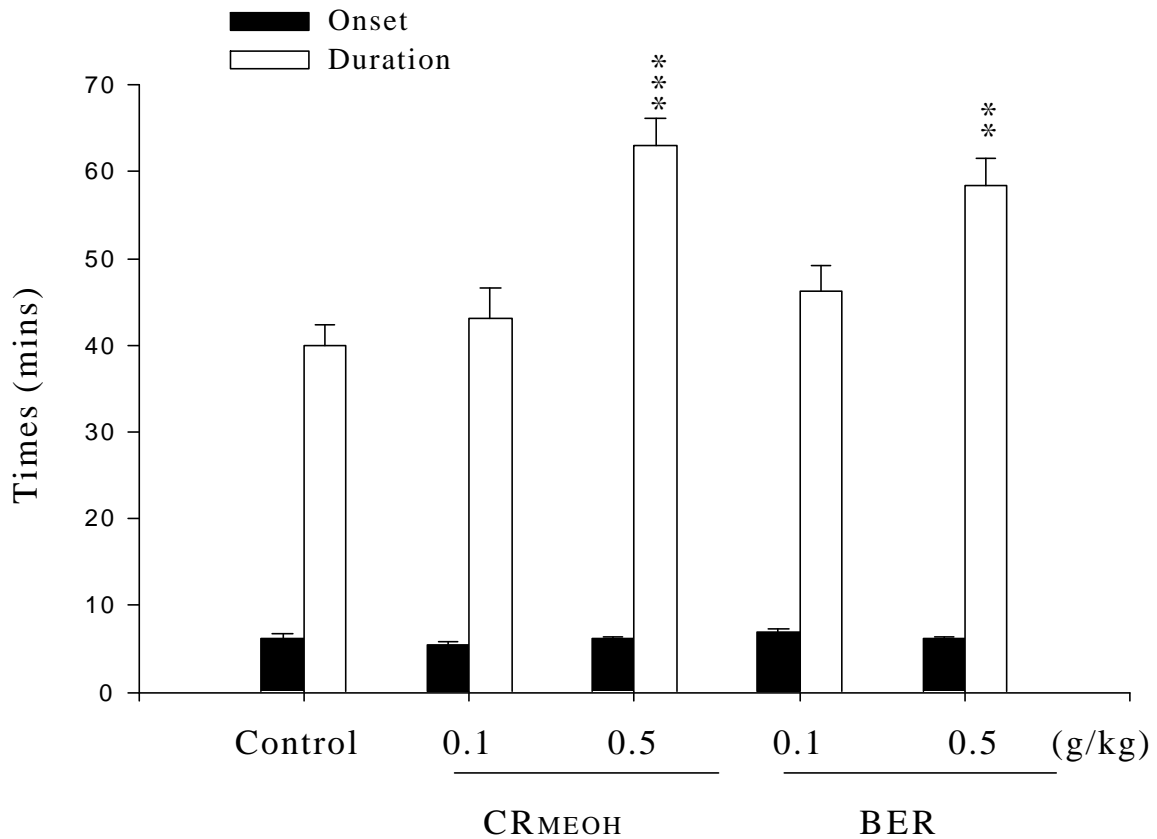


Fig 5 .Effects of methanol extract of Coptis rhizome (CRMEOH) , berberine (BER) on the hexobarbital-induced hypnosis in mice. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 as compared with the control group (One-way ANOVA following by Scheffe's test).

#### 四、對大鼠運動量之影響：

如圖六所顯示，口服黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼(0.5 g/kg) 對大鼠自發運動量均有抑制作用。

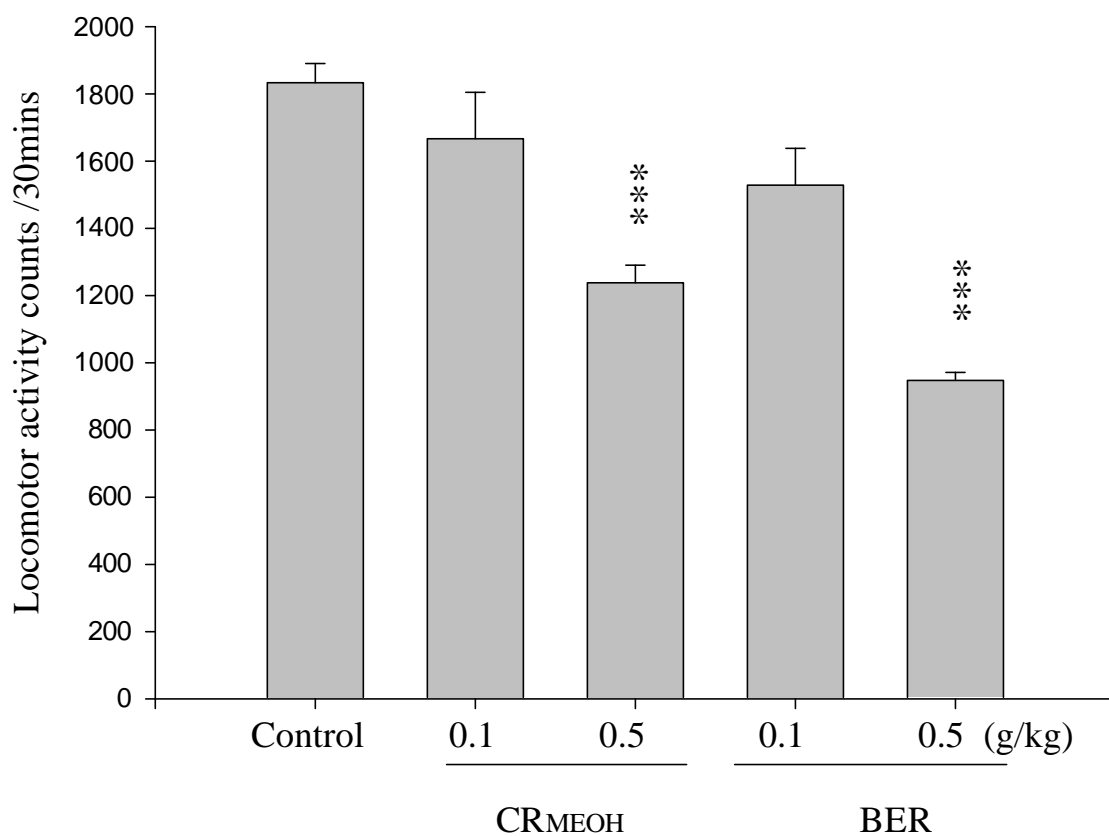


Fig 6. Effects of methanol extract of Coptis rhizome (CRMEOH) , berberine (BER) on the locomotor activity in rats. \*\*\*P < 0.001 as compared with the control group (One-way ANOVA following by Scheffe's test).

## 五、對大鼠腦幹單胺及其代謝物濃度之影響：

如圖七結果顯示，口服小檗鹼(0.1, 0.5 g/kg)均可減少大鼠腦幹中 norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT)的濃度，增加 vallinilmandelic acid (VMA), homovallinilmandelic acid (HVA), 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA)的濃度及 NE, DA, 5-HT 之 turnover rate。

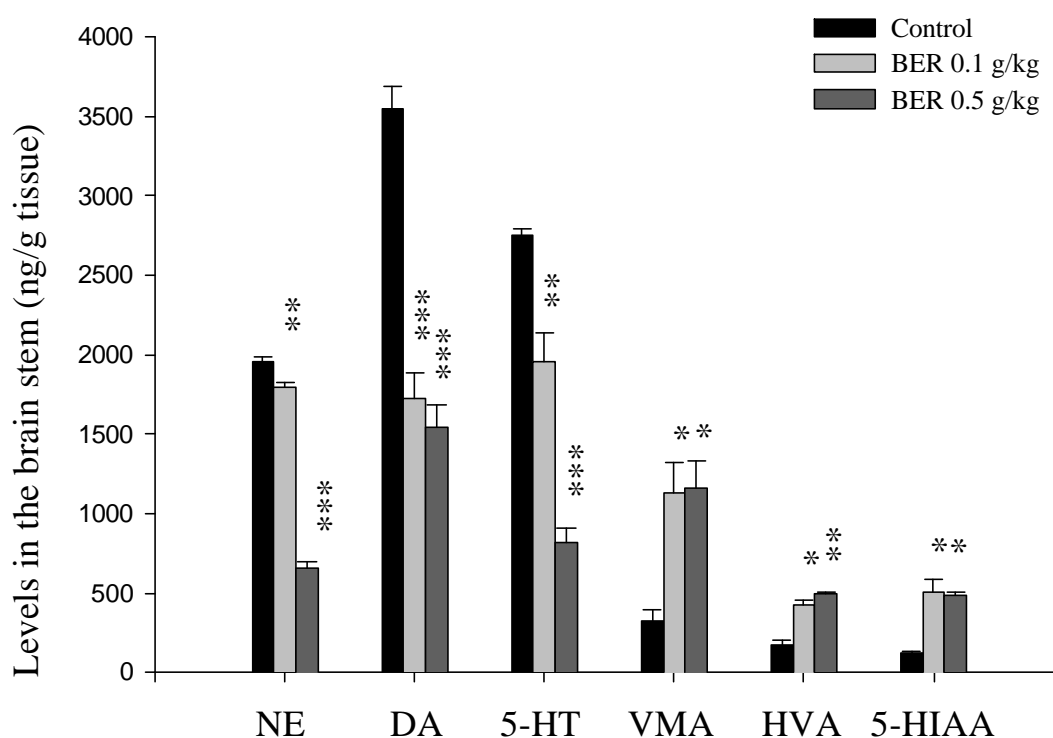


Fig 7. Effect of berberine (BER) on the levels of monoamines and its metabolites in the brain stem of rats.\*P <0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 as compared with the control group, respectively. (One-way ANOVA following by Scheffe's test).

六、併用影響中樞 GABAergic 及 serotonergic system 之藥物以探討小藥鹼抗焦慮作用之機轉：

如表一所示，口服小藥鹼於 0.1 g/kg 劑量時，顯著減少小鼠在封閉臂之滯留時間與進入次數及增加小鼠在開放臂之滯留時間與進入次數；benzodiazepine 類藥物 diazepam 在 0.5mg/kg 劑量下並不影響小鼠在封閉臂及開放臂之滯留時間與進入次數，於併用小藥鹼後亦不影響 diazepam 誘發之封閉臂及開放臂滯留時間與進入次數。

5-HT<sub>1A</sub> 之部份致效劑 buspirone 於 0.05 mg/kg 劑量下並不影響小鼠在封閉臂及開放臂之滯留時間與進入次數，但併用小藥鹼後則可縮短誘發之封閉臂滯留時間與進入次數、延長誘發之開放臂滯留時間與進入次數。且縮短 5-HT<sub>1A</sub> 拮抗劑 WAY-100635 於 0.3mg/kg 所增加之封閉臂滯留時間與進入次數及延長所減少之開放臂滯留時間與進入次數。

5-HT<sub>1A</sub> 拮抗劑 *p*-MPPI 於 0.5 mg/kg 劑量下並不影響小鼠在封閉臂及開放臂之滯留時間與進入次數，但併用小藥鹼後則可縮短誘發之封閉臂滯留時間與進入次數及延長誘發之開放臂滯留時間與進入次數，且可縮短 5-HT<sub>1A</sub> 拮抗劑 8-OH DPAT 於 0.75 mg/kg 所增加之封閉臂滯留時間與進入次數及延長所減少之開放臂滯留時間與進入次數。

5-HT<sub>2</sub> 拮抗劑 ritanserin 於 0.01 mg/kg 劑量下並不影響小鼠在封閉臂及開放臂之滯留時間與進入次數，但併用小藥鹼後則可縮短誘發之封閉臂滯留時間與進入次數及延長誘發之開放臂滯留時間與進入次數。而 5-HT<sub>2A</sub> 致效劑 DOI 於 1.5 mg/kg 劑量下，可增加小鼠在封閉臂之滯留時間與進入次數並減少小鼠在開放臂之滯留時間與進入次數，但併用小藥鹼後則可縮短所增加之封閉臂滯留時間與進入次數及延長

所減少之開放臂滯留時間與進入次數。

Table 1. Effect of berberine (BER) on DIZ-, BUS-, WAY-100635-, 8-OHDPAT-, *p*-MPPI-, DOI-, RIT-induced time spent, arm entries in the plus-maze during a 5-min test.

	Closed arms		Open arms	
	Arm entries	Time spent(sec)	Arm entries	Time spent(sec)
Control	32.29 ± 3.59	225.50 ± 5.12	4.27 ± 0.52	5.17 ± 1.22
BER 0.1 g/kg	19.67 ± 1.52	200.60 ± 3.36	19.20 ± 2.35	23.43 ± 2.94
DIZ	25.17 ± 1.78	213.00 ± 6.10	12.17 ± 0.83	15.83 ± 2.88
DIZ + BER	26.83 ± 1.90	224.00 ± 6.15	15.83 ± 3.16	14.50 ± 3.28
BUS	41.50 ± 2.50	206.20 ± 7.02	4.40 ± 1.74	12.60 ± 1.72
BUS + BER	17.75 ± 1.658**	160.67 ± 10.04**	32.11 ± 3.77***	32.00 ± 1.00***
WAY100635	31.33 ± 1.33	225.50 ± 6.51	2.50 ± 0.50	5.43 ± 1.04
WAY + BER	11.30 ± 1.65***	152.33 ± 10.93***	13.00 ± 2.00*	37.83 ± 3.82***
8-OHDPAT	38.00 ± 6.54	233.55 ± 4.12	3.17 ± 0.49	5.00 ± 1.13
8-OHDPAT+BER	9.86 ± 1.96***	182.57 ± 4.96***	16.33 ± 1.20***	28.40 ± 3.44***
<i>P</i> -MPPI	31.89 ± 2.93	221.14 ± 4.41	7.33 ± 0.88	16.13 ± 1.69
<i>P</i> -MPPI + BER	14.00 ± 2.07**	186.33 ± 11.96**	12.50 ± 4.52	34.50 ± 7.06**
DOI	45.67 ± 7.69	203.50 ± 3.50	3.14 ± 0.74	5.25 ± 1.32
DOI + BER	16.67 ± 1.76**	152.50 ± 5.50**	15.33 ± 2.44***	20.83 ± 2.36**
RIT	36.00 ± 6.00	221.50 ± 7.42	5.29 ± 0.68	12.25 ± 1.11
RIT + BER	14.00 ± 1.53*	165.00 ± 7.13***	15.25 ± 3.09**	28.75 ± 7.43*

The values are mean ± S.E.M. from 12 mice for each group.

\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, as compared with the DIZ-, BUS-, WAY-100635-, 8-OHDPAT-, *p*-MPPI-, DOI-, RIT- group respectively.

(One-way ANOVA following by Scheffé's test)

## 第五章 討論

本研究以黑白室(black and white test)<sup>(14)</sup>及舉臂式十字迷宮(elevated plus-maze)<sup>(13)</sup>誘發動物焦慮之模式，來探討黃連及其主要成分小蘗鹼之抗焦慮作用，並以常用之抗焦慮藥物diazepam及buspirone為正對照組，藉以評估其抗焦慮作用之療效。

首先，黑白室誘發小鼠焦慮模式為 1980 年 Crawley 和 Goodwin 等學者利用老鼠不喜歡陌生、明亮環境及喜好探索陌生環境之習性所設計之實驗模式<sup>(97)</sup>，研究中發現當老鼠處於此黑白室儀器中會誘發焦慮行為的產生，包括老鼠於黑白兩室間穿梭次數減少，第一次由白室至黑室的時間縮短及停留在黑室的時間較白室長等探索行為的改變，故可利用這些行為之變化程度作為致焦慮或抗焦慮藥物之評估指標<sup>(98-100)</sup>。許多研究報告指出抗焦慮藥物 benzodiazepine 類藥物（如：chlordiazepoxide 及 diazepam）及 buspirone<sup>(14,99,101)</sup>等，在此誘發小鼠焦慮之研究模式中，均可延長老鼠在白室之停留時間，而縮短在黑室滯留時間<sup>(102-104)</sup>；此與本研究之正對照組 DIZ 及 BUS 實驗結果相同。而口服給予黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼於 (0.1, 0.5 g/kg)劑量下均可延長小鼠於白室之滯留時間，減少於黑室之滯留時間，並可延長小鼠第一次由白室跑至黑室的時間及增加其於兩室間的穿梭次數；可推知黃連甲醇粗抽物和小蘗鹼對黑白室誘發小鼠焦慮之實驗模式確具有抗焦慮之作用。

其次，在舉臂式十字形迷宮誘發小鼠焦慮模式之實驗方面，此實驗乃是 1955 年 Montgomery 等學者利用當老鼠處於較高處及開放空間時會引起恐懼，因而誘發焦慮的產生，所設計之實驗模式，此模式對大鼠及小鼠均有作用<sup>(13)</sup>。舉臂式十字形迷宮實驗中一般常以老鼠在開放臂及封閉臂之進入次數及滯留時間，作為評估焦慮作用的指標<sup>(105-107)</sup>。許多研究報告證實 benzodiazepine 類藥物及 buspirone<sup>(108-110)</sup> 可明顯增加小鼠進入開放臂次數及延長滯留時間<sup>(111-112)</sup>；此與本研究之正對照組 diazepam 及 buspirone 之實驗結果一致。而分別口服給予小鼠黃連甲醇粗抽物 (0.1, 0.5 g/kg)、小蘗鹼 (0.1, 0.5 g/kg)，實驗結果顯示均可明顯增加小鼠之開放臂進入次數及滯留時間；及減少小鼠之封閉臂進入次數及滯留時間；顯示黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼對於舉臂式十字形迷宮誘發小鼠焦慮之模式亦具有抗焦慮作用。

此外，由於黑白室及舉臂式十字型迷宮誘發小鼠焦慮模式均牽涉動物之運動行為與鎮靜作用，為釐清此二作用是否對黃連甲醇粗抽物和小蘗鹼之抗焦慮作用實驗結果有所影響，因此本研究利用動物之自發運動量活性測定及 hexobarbital 誘發睡眠之鎮靜實驗等實驗模式，進一步探討黃連甲醇粗抽物和小蘗鹼對大鼠自發運動量及鎮靜作用之影響。實驗結果顯示，口服給予黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼於 0.5 g/kg，可顯著降低大鼠之自發運動量及延長 hexobarbital 誘發之睡眠時間；而口服給予黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼於 0.1g/kg 劑量下，對於大鼠之自發運動量及 hexobarbital 誘發之睡眠時間均無明顯之影響。一般而言，許多抗焦慮藥物（如 benzodiazepine 類藥物）在低劑量下具抗焦慮作用，但在高劑量時亦會呈現鎮靜作用<sup>(5)</sup>。由此可知，在黑白室及舉臂式十字



形迷宮實驗中，黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼口服 0.5 g/kg 之較大劑量，可能與其鎮靜作用產生有關；而口服較低劑量之黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼於 0.1 g/kg，在上述二誘發小鼠焦慮模式中之抗焦慮活性，則非由鎮靜作用所致。綜合上述實驗結果發現，黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼產生抗焦慮作用之劑量相同，推測其原因可能是小蘗鹼為黃連抗焦慮作用的主要活性成分之一，或可能是小蘗鹼口服不易吸收<sup>(15)</sup>，因此需較大劑量才能產生相等之作用，此推測仍有待進一步探討。

由於情緒的變化及控制與位於腦幹中邊緣系統內的神經化學物質(如 5-HT、NE、DA 等)及其代謝物的含量有關<sup>(113)</sup>。相關文獻指出 5-HT 直接注入腦幹中會誘發焦慮產生，而減低腦幹中 5-HT 之濃度則會產生抗焦慮作用<sup>(114)</sup>。腦幹中 DA 過多或 locus coeruleus 之 NE 神經被活化時亦會引起焦慮之產生<sup>(5)</sup>。腦幹中 5-HT、NE、DA 等單胺神經傳遞物質與其代謝物濃度之變化在焦慮的產生與治療上扮演一重要性之角色<sup>(115)</sup>。又本所謝明村教授等研究指出，當腦幹中 5-HT、NE、DA 之濃度減少及 5-HT、NE、DA 之 turnover rate 增加會產生鎮靜作用<sup>(116)</sup>。因此，本研究利用高速液相層析法探討小蘗鹼對實驗動物腦幹中單胺及其代謝物濃度變化之影響。實驗結果顯示，口服給予 0.1, 0.5 g/kg 小蘗鹼均可減少腦幹 NE、DA、5-HT 之濃度及增加 VMA、HVA 和 5-HIAA 之濃度；並使 5-HT、NE、DA 之 turnover rate 增加。故可推知，小蘗鹼在 0.1g/kg 之抗焦慮作用及 0.5 g/kg 導致之鎮靜作用可能是經由減少腦幹中 5-HT、NE、DA 之濃度及增加 5-HT、NE、DA 之 turnover rate 有關。

為釐清小蘗鹼之抗焦慮作用是否涉及 GABAergic system，因此我們在舉臂式十字形迷宮試驗併用 benzodiazepine 類藥物 diazepam 作探討。Diazepam 於 0.5 mg/kg 劑量下並不影響小鼠在封閉臂及開放臂之滯留時間與進入次數。併用小蘗鹼亦不影響 DIZ 誘發小鼠進入開放臂及封閉臂之滯留時間與進入次數。1994 年 Wang 教授研究指出四氫小蘗鹼之中樞抑制作用與 GABA receptor 無關<sup>(117)</sup>，所以推論小蘗鹼之抗焦慮作用可能與 GABAergic system 無關。

近年來關於動物行為和治療焦慮症患者的研究顯示，serotonergic system 在恐懼和焦慮情緒行為的調節上扮演一重要之角色。減少腦內 serotonergic system 活性，會產生抗焦慮作用；增加腦內 serotonergic system 活性則會產生焦慮作用<sup>(46,52-53)</sup>。據 Berendsen、Broekkamp 及 Sanchez 等研究顯示，5-HT 各類型受體與動物焦慮研究模式中誘發焦慮之行為均有關連<sup>(14,118)</sup>，其中以 5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>1B</sub>、5-HT<sub>2A/2C</sub> 幾類受體與焦慮關係較為密切<sup>(54)</sup>；因此，本研究併用突觸前 5-HT<sub>1A</sub> 致效劑及拮抗劑 (BUS 和 WAY100635)、突觸後 5-HT<sub>1A</sub> 致效劑及拮抗劑 (8-OH DPAT 和 *p*-MPPI)、5-HT<sub>2</sub> 致效劑及拮抗劑 (DOI 和 RIT)，並以舉臂式十字形迷宮試驗作為誘發小鼠焦慮模式，進一步探討 5-HT 受體在小蘗鹼抗焦慮作用所扮演之角色，進一步闡明小蘗鹼抗焦慮作用之作用機轉。

雖然 5-HT<sub>1</sub> receptors 分佈極廣，但主要為存在於腦幹縫核(dorsal raphe nucleus) 5-HT 細胞體突觸前之 5-HT<sub>1A</sub> 接受體 (5-HT<sub>1A</sub> presynaptic receptors)，為一種 autoreceptors 或稱為 somatodendritic autoreceptors；5-HT<sub>1A</sub> 突觸後接受體 (5-HT<sub>1A</sub> postsynaptic receptors) 則

是集中在 limbic system (包括 hippocampus 和 amygdala)<sup>(55)</sup>。活化突觸前 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors 或阻斷突觸後 5-HT<sub>1A</sub> receptor 都將減少 5-HT 的神經傳遞<sup>(119)</sup>。

已知突觸前 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors 及突觸後的 5-HT<sub>1A</sub> receptors 與 5-HT<sub>1A</sub> 部份致效劑或 5-HT<sub>1</sub> 拮抗劑結合後，會活化 Gi protein，而引起 K<sup>+</sup>通道打開，促使神經細胞膜過極化，進而減低 5-HT 神經傳導而產生抗焦慮活性<sup>(120)</sup>。BUS 為突觸前 5-HT<sub>1A</sub> 之部份致效劑，低劑量時與 5-HT 神經突觸前之 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors 結合後，會引起 5-HT 神經傳導減低及降低邊緣區 5-HT 神經活性，減少 5-HT 之釋放，而產生抗焦慮作用<sup>(121)</sup>。而 WAY-100635 則是突觸前 5-HT<sub>1A</sub> 受體拮抗劑，其致焦慮作用是經由競爭性阻斷突觸前 5-HT<sub>1A</sub> 受體原有的抑制性，而使 5-HT 大量釋放，導致焦慮的產生<sup>(122)</sup>。由於 Costall 等研究指出 BUS 於 0.06–2.0 mg/kg (i.p.) 時具抗焦慮作用<sup>(99)</sup>；因此，本研究選用不影響小鼠在開放臂及封閉臂滯留時間與進入次數之劑量之 BUS (0.05 mg/kg; i.p.) 及引起焦慮劑量之 WAY-100635 (0.3mg/kg;s.c.) 與小蘗鹼 (0.1 g/kg; p.o.) 併用；實驗結果發現，小蘗鹼可增加 BUS 在開放臂滯留時間與進入次數，縮短封閉臂滯留時間與進入次數；且縮短 WAY-100635 增加之封閉臂滯留時間與進入次數，及延長所減少之開放臂滯留時間與進入次數；顯示小蘗鹼之抗焦慮作用可能與興奮突觸前 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor 有關。

其次，*p*-MPPI 為專一性 5-HT<sub>1A</sub> 受體拮抗劑<sup>(123)</sup>，具抗焦慮作用<sup>(95)</sup>，為目前研究 5-HT<sub>1A</sub> 受體與焦慮關係之重要拮抗劑<sup>(120)</sup>；1997 年，Cao 和 Rodgers 報告指出 *p*-MPPI 腹腔給予 1.5–4.5 mg/kg 時具抗焦慮作用

<sup>(95)</sup>，其抗焦慮作用是經由阻斷突觸後 5-HT<sub>1A</sub> 受體，減低 5-HT 神經傳遞所致<sup>(123)</sup>。此外，8-OH DPAT 為 5-HT<sub>1A</sub> 之致效劑其作用機轉可能是經由活化突觸後 5-HT<sub>1A</sub> 受體而導致焦慮產生<sup>(124)</sup>。本研究亦使用不影響小鼠在白室及黑室滯留時間劑量之 *p*-MPPI (0.5 mg/kg; i.p.) 及引起焦慮劑量之 8-OH DPAT (0.75mg/kg; i.p.)與小蘗鹼(0.1 g/kg; p.o.) 併用；結果顯示，小蘗鹼可增加 *p*-MPPI 開放臂滯留時間與進入次數，及縮短封閉臂滯留時間與進入次數；且可縮短 8-OH DPAT 所增加之封閉臂滯留時間與進入次數，延長 8-OH DPAT 減少之開放臂滯留時間與進入次數；顯示小蘗鹼之抗焦慮作用機轉可能與阻斷 5-HT 神經突觸後 5-HT<sub>1A</sub> 受體有關。

突觸後的 5-HT<sub>2</sub> 受體 (Postsynaptic 5-HT<sub>2</sub> receptors) 主要存在於皮質層、下視丘和杏仁核等處。RIT 為 5-HT<sub>2</sub> 之拮抗劑，腹腔給予 1 mg/kg 時會延長小鼠在開放臂之滯留時間與進入次數而縮短在封閉臂之滯留時間與進入次數<sup>(59)</sup>；DOI 為 5-HT<sub>2</sub> 之部份致效劑，在腹腔給予 1.5mg/kg 時則會產生致焦慮的作用。本研究使用不影響小鼠在封閉臂及開放臂滯留時間劑量之 RIT (0.01 mg/kg; i.p.)及會引起焦慮劑量之 DOI(1.5mg/kg; i.p.)與小蘗鹼 (0.1 g/kg; p.o.) 併用；實驗結果顯示，小蘗鹼可增強 RIT 開放臂滯留時間與進入次數，及縮短封閉臂滯留時間與進入次數；但可縮短 DOI 增加之封閉臂滯留時間與進入次數，延長所減少之開放臂滯留時間與進入次數。故可推知，小蘗鹼之抗焦慮作用與阻斷突觸後 5-HT<sub>2</sub> 受體之活性有關。

綜合以上結果顯示，黃連甲醇粗抽物及小蘗鹼於 0.1g/kg 不論在黑白室或舉臂式十字形迷宮誘發小鼠焦慮模式中均具明顯之抗焦慮作用。而小蘗鹼之抗焦慮作用機轉則可能與活化突觸前 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor，降低突觸後 5-HT<sub>1A</sub> 及 5-HT<sub>2</sub> 受體之活性，進而減少腦幹中 5-HT 之濃度有關。

## 第六章 結 論

一、本研究以黑白室及舉臂式十字形迷宮二種動物焦慮模式，探討黃連之抗焦慮作用，獲得結果如下：

1. 黑白室誘發焦慮模式：口服黃連甲醇粗抽物(0.1, 0.5g/kg)及小蘗鹼(0.1, 0.5g/kg)均可延長小鼠第一次由白室跑至黑室時間及延長小鼠在白室之滯留時間，減少在黑室之滯留時間並增加兩室間的穿梭次數，顯示具有抗焦慮作用。
2. 舉臂式十字形迷宮：口服黃連甲醇粗抽物(0.1, 0.5g/kg)及小蘗鹼(0.1, 0.5g/kg)均可增加小鼠在開放臂之滯留時間與進入次數，及減少小鼠在封閉臂之滯留時間與進入次數，顯示具有抗焦慮作用。

二、為排除鎮靜作用對黃連抗焦慮作用之影響，進行對大鼠自發運動量及 hexobarbital 誘發睡眠時間之測定，獲得結果如下：

1. Hexobarbital誘發睡眠時間測定：口服黃連甲醇粗抽物(0.5g/kg)及小蘗鹼(0.5g/kg)均會延長hexobarbital誘發的睡眠時間。
2. 自發運動量測定：口服黃連甲醇粗抽物(0.5g/kg)及小蘗鹼(0.5g/kg)均會引起大鼠運動量降低。

三、本研究以舉臂式十字形迷宮動物焦慮模式，併用改變GABAergic及serotonergic system 神經活性藥物，並測定腦幹單胺及其代謝物濃度之變化，以探討小蘗鹼之抗焦慮作用機轉，獲得結果如下：

1. 小蘗鹼 (0.1, 0.5 g/kg)均可減少腦幹 NE、DA、5-HT濃度及增加HVA、VMA、5-HIAA之濃度及NE、DA、5-HT之turnover rate。
2. 小蘗鹼並未影響 diazepam 之抗焦慮作用，推論小蘗鹼抗焦慮作用可能與 GABAergic 受體無關。
3. 小蘗鹼可增強突觸前 5-HT<sub>1A</sub> 之部分致效劑 buspirone 及突觸後 5-HT<sub>1A</sub> 受體拮抗劑 *p*-MPPI 之抗焦慮作用，拮抗突觸前 5-HT<sub>1A</sub> 受體拮抗劑 WAY-100635 及突觸後 5-HT<sub>1A</sub> 受體作用劑 8-OH DPAT 誘發之焦慮作用，顯示小蘗鹼抗焦慮作用與活化突觸前5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor 及拮抗突觸後5-HT<sub>1A</sub> 受體有關。
- 4.小蘗鹼可增強5-HT<sub>2</sub>拮抗劑ritanserin之抗焦慮作用，而拮抗5-HT<sub>2</sub>致效劑DOI誘發之焦慮作用，顯示小蘗鹼抗焦慮作用與拮抗5-HT<sub>2</sub>受體有關。

綜合以上結果，顯示黃連及小蘗鹼 0.1g/kg 不論在黑白室或舉臂式十字形迷宮誘發小鼠焦慮模式中均具明顯之抗焦慮作用，而小蘗鹼之抗焦慮作用機轉則可能與活化突觸前 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor 及降低突觸後 5-HT<sub>1A</sub> 及 5-HT<sub>2</sub> 受體之活性，進而減少腦幹中 5-HT 之濃度有關。

## 參考文獻

1. 胡海國、林信男：生物精神醫學，國立台灣大學醫學院出版委員會編審，台北 1995；pp.80-2。
2. Cheng TA. A community study of minor psychiatric morbidity in Taiwan. *Psychol Med.* 1988; 18(4): 953-68.
3. Gray J. The neuropsychology of anxiety. In : Breckon B(ed), *Emotion and emotional disorder; reports on First Maudsley Conference on developments in psychiatry.* Roche, Basle, 1988; pp.20-22.
4. 楊聖信、許桂森、林君穎、張國治合譯：人體藥理學，藝軒出版社，台北 1994；pp.353-9。
5. Stahl SM. Anxiolytics and Sedative-Hypnotics, Neuroscientific basis and practical applications. In : Stahl SM, *Essential psychopharmacology.* Cambridge University press, New York ,1996; 167-215.
6. Lee MK, Kim HS. Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the roots of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells. *Planta Med.* 1996; 62(1): 31-4.
7. Franzblau SG, Cross C. Comparative in vitro antimicrobial activity of Chinese medicinal herbs. *J Ethnopharmacol.* 1986; 15(3): 279-88.
8. Chen HC, Hsieh MT. Hemodynamic effects of "san-huang-hsieh- hsin-tang" in patients with essential hypertension. *Am J Chin Med.* 1986; 14(3-4): 153-6.
9. Takase H, Imanishi K, Miura O, Yumioka E. A possible mechanism for the gastric mucosal protection by oren-gedoku-to (OGT), a traditional herbal medicine. *Jpn J Pharmacol.* 1989; 51(1): 17-23.
10. Yamahara J. Behavioral pharmacology of berberine-type alkaloids. (1) Central depressive action of *Coptidis rhizoma* and its constituents. *Folia*



- Pharmacol Jpn. 1976; 72(7): 899-908.
11. Yamahara J. Behavioral pharmacology of berberine-type alkaloids. (2) Central depressant effects of tetrahydroberberine (THB) and related compounds. Folia Pharmacol Jpn. 1976; 72(7): 909-27.
  12. Yamahara J, Konoshima T, Sakakibara Y, Ishiguro M, Sawada T. Central depressant action of tetrahydroberberine and its derivatives. Chem Pharm Bull. 1976; 24(8): 1909-12.
  13. Montgomery KC. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. J Comp Physiol Psychol. 1955; 48: 254-60.
  14. Sanchez C. Serotonergic mechanisms involved in the exploratory behaviour of mice in a fully automated two-compartment black and white text box. Pharmacol Toxicol. 1995; 77(1): 71-8.
  15. 王本祥：現代中藥藥理學，天津科學技術出版社，天津 1998；pp.302-10。
  16. 西安醫學院附屬一院：黃連黃柏及小檗鹼對痢疾桿菌及金黃色葡萄球菌抗生作用的觀察。西安醫學院學報 1958；5：40-2。
  17. 包幼迪：黃連抗菌機制的研究。微生物學報 1959；7(3)：361-4。
  18. 蔡永敏、王黎、張國泰：最新中藥藥理與臨床應用，華夏出版社，北京 1999；pp.54-6。
  19. 楊鑒英、劉燕玲、劉錫瑩：中藥抗乙型肝炎病毒的實驗研究。中西醫結合雜誌 1989；9(8)：494-5。
  20. 張覃沐：黃連鹼及漢防己甲素之抗阿米巴作用。中華醫學雜誌 1957；43(8)：627-9。
  21. 蔣激揚、耿東升、劉發、吐爾遜江.托卡依：黃連素的抗炎作用與機制。中國藥理學通報 1998；14(5)：434-7。
  22. 郭樹仁、羅衛芳、劉天培：小檗鹼對小鼠學習記憶及開場行為的影

- 響。中藥藥理與臨床 1997 ; 13(2) : 17-9。
- 23.王 玉、劉烈炬、方達超：小檗鹼對離體心臟傳導性能的影響。中國藥理學報 1991 ; 12(1) : 40-4。
- 24.陶岳多、徐樹英：黃連素臨床應用進展。臨床醫學 1998 ; 18(5) : 32-3。
- 25.黃才國、儲鍾祿、楊志銘：小檗鹼對兔血小板 TXA<sub>2</sub>和血漿中 PGI<sub>2</sub>生成的影響。中國藥理學報 1991 ; 12(6) : 526-8。
- 26.劉自強、王英武、胡景新：黃連注射液對家兔白細胞致熱原性發熱和腦脊液中 cAMP 含量變化的影響。中國病理生理學雜誌 1991 ; 7(3) : 264-6。
- 27.陳其明：黃連及小檗鹼降血糖作用的研究。藥學學報 1986 ; 21(6) : 401。
- 28.范寒雲、張同霞、王春豔：黃連素的新用途。中國農村醫學 1995 ; 23(7) : 60-1。
- 29.牛奎之、高維智：小檗鹼的藥理和臨床應用。中國農村醫學 1996 ; 24(1) : 51-3。
- 30.陳欽銘、葉於聰、海平：小檗鹼對培養心肌細胞缺氧性損傷的保護作用。中藥藥理與臨床 1993 ; 9(2) : 34-7。
- 31.王光德：幾種漢方處方對胃機能的藥理學研究。國外醫學：中醫中藥分冊 1988 ; 10(5) : 36。
32. Shin DH, Yu H, Hsu WH. A paradoxical stimulation effect of berberine on guinea pig ileum contractility: Possible involvement of acetylcholine release from the postganglionic parasympathetic nerve and cholinesterase inhibition. Life Sci. 1993; 53: 1495-1500.
- 33.宋魯成、陳克忠、朱家雁：黃連對大鼠高血脂質過氧化物高血脂及體外血形成的影響。陝西中醫 1996 ; 17(3) : 137-8。
- 34.羅來源、方達超、程斌：小檗鹼對大鼠肛尾肌和兔主動脈條腎上腺

- 素 $\alpha$ 受體的阻斷作用。中國藥理學報 1986 ; 7(5) : 407。
- 35.唐發清：黃連及其複方對人鼻咽癌細胞殺傷動力學研究。湖南中醫學院學報 1995 ; 15(4) : 41-4。
- 36.渡邊和夫：黃連的藥理。現代東洋醫學 1981 ; 2(2) : 37。
- 37.李秀蘭、徐爾真：外用中藥抗感染作用研究對小鼠腹腔巨噬細胞激活和吞噬作用的觀察。中西醫結合雜誌 1986 ; 6(8) : 486。
- 38.王浴生主編：中藥藥理與應用，人民衛生出版社，北京 1983 ; pp.1023。
- 39.黃友熊：黃連液浸浴法治療指骨骨髓炎 87 例。中西醫結合雜誌 1985 ; 5(10) : 604。
- 40.石文傑、呂樹田：黃連煎劑治療燒傷 26 例。河北中醫 1989 ; 11(5) : 28。
- 41.譚天埠：黃連阿膠湯治療焦慮症 42 例療效分析。黑龍江中醫藥 1984 ; (4) : 41。
- 42.汪永孝、姚秀娟：小檗鹼抗實驗性心律失常的作用。第四軍醫大學學報 1986 ; 7(3) : 205-8。
- 43.陳繼烈：單用黃連素及併用黃連素與蛇根制劑治療高血壓病的初步報告。中華內科雜誌 1960 ; 8 : 117-9。
- 44.韋正步：小檗鹼臨床應用概況。西北藥學雜誌 1998 ; 13(4) : 178-9。
- 45.澤田德之助：黃連的化學。現代東洋醫學 1981 ; 2(2) : 48。
- 46.Chopin P, Briley M. Animal models of Anxiety : The effects of compounds that modify 5-HT neurotransmission. TIPS. 1987; 8: 383-91.
- 47.Critchley MA, Handley SL. Effects in the X-maze anxiety model of agents acting at 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. Psychopharmacology. 1987; 93(4): 502-6.
- 48.De Souza EB. Neuroendocrine effects of benzodiazepines. In:

- benzodiazepines, therapeutic, biologic and psychosocial issues. The McLean Hospital Symposium, Chicago, 1988; 23.
49. Heninger GR, Charney DS. Monoamine receptor systems and anxiety disorders. *Psychiatr Clin North Am.* 1988; 11(2): 309-26.
  50. Gartside SE, Cowen PJ, Hjorth S. Effects of MDL 73005EF on central pre- and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor function in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1990; 191(3): 391-400.
  51. Cowen PJ, Anderson IM, Gartside SE. Endocrinological responses to 5-HT. *Ann N-Y Acad Sci.* 1990; 600: 250-7.
  52. Geller I, Blum K. The effects of 5-HTP on para-Chlorophenylalanine (*p*-CPA) attenuation of "conflict" behavior. *Eur J Pharmacol.* 1970; 9(3): 319-24.
  53. Gardner CR. Recent developments in 5-HT-related pharmacology of animal models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986; 24: 1479-85.
  54. Nicholas M, Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 1999; 38(8): 1083-152.
  55. Griebel G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders : more than 30 years of research. *Pharmacol Ther.* 1995; 65(3): 319-95.
  56. Baldwin D, Rudge S. The role of serotonin in depression and anxiety. *Int Clin Psychopharmacol.* 1995; 4: 41-5.
  57. Haigler HJ, Aghajanian GK. Lysergic acid diethylamide and serotonin : a comparison of effects on serotonergic neurons and neurons receiving a serotonergic input. *J Pharmacol Exp Ther.* 1974; 188(3): 688-99.
  58. Corradetti R, Le PE, Laaris N. Electrophysiological effects of N-(2-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl)-N-(2-pyridinyl)cyclohex

- exane carboxamide(WAY100635) on dorsal raphe serotonergic neurons and CA1 hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 278: 679-88.
59. Bianchi C, Siniscalchi A, Beani L. 5-HT<sub>1A</sub> agonists increase and 5-HT<sub>3</sub> agonists decrease acetylcholine efflux from the cerebral cortex of freely-moving guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* 1990; 101(2): 448-52.
60. Kia HK, Brisorgueil MJ, Daval G, Langlois X, Hamon M, Verge D. 5-HT<sub>1A</sub> receptors are expressed by a subpopulation of cholinergic neurons in the rat medial septum and diagonal band of Broca - a double immunocytochemical study. *Neuroscience.* 1996; 74(1): 143-54.
61. Done CJ, Sharp T. Biochemical evidence for the regulation of central noradrenergic activity by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors : microdialysis studies in the awake and anaesthetized rat. *Neuropharmacology.* 1994; 33(3-4): 411-21.
62. Chen NH, Reith ME. Monoamine interactions measured by microdialysis in the ventral tegmental area of rats treated systemically with (+/-)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin. *J Neurochem.* 1995; 64(4): 1585-97.
63. Jolas T, Schreiber R, Laporte AM, Chastanet M, De VJ, Glaser T, Adrien J, Hamon M. Are postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat? *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 272(2): 920-9.
64. Hajos M, Hajos-Korcsok E, Sharp T. Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT<sub>1A</sub> receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol.* 1999; 126(8): 1741-50.
65. Hartig PR, Hoyer D, Humphrey PP, Martin GR. Alignment of receptor

- nomenclature with the human genome : classification of 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptor subtypes. *TIPS*. 1996; 17(3): 103-5.
66. Castro ME, Pascual J, Romon T, del Arco C, del Olmo E, Pazos A. Differential distribution of [<sup>3</sup>H]sumatriptan binding sites (5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>1F</sub> receptors) in human brain: focus on brainstem and spinal cord. *Neuropharmacology*. 1997; 36(4-5): 535-42.
67. Janssen P. Serotonin receptors: from ligands to sequence. Presented at the 2nd International Symposium on Serotonin. Houston Texas, 17, USA, 1992.
68. Hoyer D. Molecular pharmacology and biology of 5-HT<sub>1C</sub> receptors. *TIPS*. 1988; 9: 89-94.
69. Hoyer D, Waeber C, Schoeffter P, Palacios JM, Dravid A. 5-HT<sub>1C</sub> receptor-mediated stimulation of inositol phosphate production in pig choroid plexus. A pharmacological characterization. *N-S Arch Pharmacol*. 1989; 339(3): 252-8.
70. Whitton P, Curzon G. Anxiogenic-like effect of infusing 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) into the hippocampus. *Psycho-pharmacology*. 1990; 100(1): 138-40.
71. Griebel G, Misslin R, Pawlowski M, Vogel E. m-Chlorophenylpiperazine enhances neophobic and anxious behaviour in mice. *Neuroreport*. 1991; 2(10): 627-9.
72. Barnes NM, Cheng CH, Costall B, Ge J, Kelly ME, Naylor RJ. Profiles of interaction of R(+)/S(-)-zacopride and anxiolytic agents in a mouse model. *Eur J Pharmacol*. 1992; 218: 91-100.
73. Leonard BE. Pharmacological differences of serotonin reuptake inhibitors and possible clinical relevance. *Drugs*. 1992; 43(Suppl 2): 3-9.
74. Vande KL, Rittenhouse PA, Li Q, Levy AD. Serotonergic regulation of

- renin and prolactin secretion. *Behav Brain Res.* 1996; 73(1-2): 203-8.
75. Duxon MS, Flanigan TP, Reavley AC, Baxter GS, Blackburn TP, Fone KC. Evidence for the expression of the 5-HT<sub>2B</sub> receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1997; 76(2): 323-29.
76. Aghajanian GK. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. In: Bloom FR, Kupfer DJ(eds), *Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress.* Raven, New York, 1995; 1451-9.
77. Martin KF, Hannon S, Phillips I, Heal DJ. Opposing roles for 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the control of 5-HT release in rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol.* 1992; 106(1): 139-42.
78. Barnes JM, Barnes NM, Costall B, Ironside JW, Naylor RJ. Identification and characterization of 5-HT<sub>3</sub> recognition sites in human brain tissue. *J Neurochem.* 1989; 53(6): 1787-93.
79. Ramirez MJ, Cenarruzabeitia E, Lasheras B, Del RJ. Involvement of GABA systems in acetylcholine release induced by 5-HT<sub>3</sub> receptor blockade in slices from rat entorhinal cortex. *Brain Res.* 1996; 712(2): 274-80.
80. Diaz AM, Ramirez MJ, Lasheras B, Del RJ. Differential interaction between 5-HT<sub>3</sub> receptors and GABAergic neurons inhibiting acetylcholine release in rat entorhinal cortex slices. *Brain Res.* 1998; 801(1-2): 228-32.
81. Bill DJ, Fletcher A, Glenn BD, Knight M. Behavioural studies on WAY100289, a novel 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, in two animal models of anxiety. *Eur J Pharmacol.* 1992; 218(2-3): 327-34.
82. Grossman CJ, Kilpatrick GJ, Bunce KT. Development of a radioligand binding assay for 5-HT<sub>4</sub> receptors in guinea-pig and rat brain. *Br J*

- Pharmacol. 1993; 109(3): 618-24.
83. Waeber C, Sebben M, Grossman C, Javoy AF, Bockaert J, Dumuis A. [3H]-GR113808 labels 5-HT<sub>4</sub> receptors in the human and guinea-pig brain. *Neuroreport*. 1993; 4(11): 1239-42.
84. Ge J, Barnes NM. 5-HT<sub>4</sub> receptor-mediated modulation of 5-HT release in the rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol*. 1996; 117(7): 1475-80.
85. Consolo S, Arnaboldi S, Giorgi S, Russi G, Ladinsky H. 5-HT<sub>4</sub> receptor stimulation facilitates acetylcholine release in rat frontal cortex. *Neuroreport*. 1994; 5(10): 1230-2.
86. Handley SL. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther*. 1995; 66(1): 103-48.
87. Young R, Johnson DN. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991; 40: 739-43.
88. Fujomori H. Potentiation of barbital hypnosis as an evaluation method for central nervous system depressant. *Psychopharmacology*. 1965; 7: 374-7.
89. Sanberg PR, Hagenmeyer SH, Henault MA. Automated measurement of multivariate locomotor behavior in rodents. *Neurobehav Toxicol Teratol*. 1985; 7: 87-94.
90. Thiebot MH, Soubrie P, Hamon M, Simon P. Evidence against the involvement of serotonergic neurons in the anti-punishment activity of diazepam in the rat. *Psychopharmacology*. 1984; 82(4): 355-9.
91. Moser PC. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology*. 1989; 99(1): 48-53.
92. Lin X, Roger A, Jean DV, Michael JR. Effect of repeated ipsapirone treatment on hippocampal excitatory synaptic transmission in the freely



- behaving rat: role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors and relationship to anxiolytic effect. *Eur J Pharmacol.* 1997; 323: 59-68.
93. Misslin R, Griebel , Martine SS, Elise V. Anxiolytic and sedative effects of 5-HT<sub>1A</sub> ligands, 8-OH DPAT and MDL73005EF, in mice. *Neuroreport.* 1990; 1: 267-70.
94. Cao BJ, Rodgers RJ. Anxiolytic-like profile of *p*-MPPI, a novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze. *Psychopharmacology.* 1997; 129: 365-71.
95. Chaouloff F, Kulikov A, Mormede P. Repeated DOI and SR46349B treatments do not affect elevated plus-maze anxiety despite opposite effects on cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol.* 1997 ; 334(1): 25-9.
96. Costall B, Naylor RJ. Behavioural interactions between 5-hydroxytryptophan, neuroleptic agents and 5-HT receptor antagonists in modifying rodent responding to aversive situations. *Br J Pharmacol.* 1995; 116: 2989-99.
97. Crawley JN, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980; 13: 167-70.
98. Young R, Johnson DN. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol Biochemical Behav.* 1991; 40: 739-43.
99. Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 32: 777-85.
100. Onaivi ES, Martin BR. Neuropharmacological and physiological validation of a computer-controlled two-compartment black and white

- box for the assessment of anxiety. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiat.* 1989; 13: 963-76.
101. Carli M, Prontera C, Samanin R. Evidence that central 5-hydroxytryptaminergic neurones are involved in the anxiolytic activity of buspirone. *Br J Pharmacol.* 1989; 96: 829-36.
102. Corda MG, Biggio G. Proconflict effect of GABA receptor complex antagonists reversal by diazepam. *Neuropharmacology.* 1986; 25: 541-4.
103. Rabow LE, Russek SJ, Farb DH. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA<sub>A</sub> receptor research. *Synapse.* 1995; 21: 189-274.
104. Sieghart W. Structure and pharmacology of GABA<sub>1A</sub> receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 1995; 47: 181-234.
105. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth.* 1985; 14: 149-67.
106. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 1987; 92: 180-5.
107. Rodgers RJ, Cole JC, Cobain M, Daly P, Doran PJ, Eells JR, Wallis P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behav Pharmacol.* 1992; 3: 621-34.
108. Dunn RW, Corbett R, Fielding S. Effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol.* 1989; 169: 1-10.
109. Kostowski W, Dyr W, Krzascik P, Jarbe T, Archer T. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists in animal models of depression and anxiety. *Pharmacol Toxicol.*

- 1992; 71: 24-30.
110. Soderpalm B, Hjorth S, Engel JA. Effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and L-5-HTP in Montgomery's conflict test. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 32: 259-65.
  111. Aghajanian GK, Bloom FE. Localization of tritiated serotonin in rat brain by electron-microscopic autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther.* 1967; 156: 23-30.
  112. Thiebot MH, Hamon M, Soubrie P. Attenuation of induced-anxiety in rats by chlordiazepoxide: role of raphe dorsalis benzodiazepine binding sites and serotonergic neurons. *Neuroscience.* 1982;7: 2287-94.
  113. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS. Consciousness and behavior, In: Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS(eds), *Human physiology. The mechanisms of body function.* Mc Graw-Hill, USA, 1994 ; 369-82.
  114. Thiebot MH, Soubrie P, Hamon M, Simon P. Evidence against the involvement of serotonergic neurons in the anti-punishment activity of diazepam in the rat. *Psychopharmacology.* 1984; 82: 355-9.
  115. Beninger RJ. The role of dopamine in locomotor and learning. *Brain Res Rev.* 1983; 6: 173-96.
  116. Hsieh MT, Peng WH, Hsieh CC. Effects of DL-tetrahydropalmatine on motor activity and the brain monoamine concentration in rats. *Chin J Physiol.* 1994; 37: 79-82.
  117. Wang XL, Jin GZ, Zhou TC. On the central inhibition action of tetrahydroberberine without relevance to GABA receptors. *Acta Physiologica Sinica.* 1994; 46:505-8.
  118. Berendsen HHG, Broekkamp CLE. Behavioural evidence for functional interactions between 5-HT-receptor subtypes in rats and mice. *Br J Pharmacol.* 1990; 101: 667-73.

119. Bill DJ, Fletcher A. Correlation of in vivo functional and anxiolytic effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligands in the mouse. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 151p.
120. Jacobs BL, Fornal CA. Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 563-78.
121. Sharp T, Bramwell SR, Grahame-Smith DG. 5-HT<sub>1A</sub> agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. *Br J Pharmacol.* 1989; 96: 283-90.
122. Collinson N, Dawson GR. On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-OH DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT<sub>1A</sub> partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, WAY100635. *Psychopharmacology.* 1997; 132(1): 35-43.
123. Allen AR, Singh A, Zhuang ZP, Kung HF, Lucki L. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist *p*-MPPI blocks receptors mediated by postsynaptic and presynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997; 57: 301-7.
124. Handley SL, Mcblane JW, Critchley MAE, Njunge K. Multiple serotonin mechanism in animal models of anxiety : environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res.* 1993; 58(1-2): 203-10.