

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 88-2314-B-039-013-

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：彭文煌 執行機構及單位名稱

中國醫藥學院

一、中文摘要

本研究以黑白室〈Black and white chambers〉及舉高型十字迷宮〈Elevated plus-maze〉之動物焦慮模式探討厚朴甲醇粗抽物及其活形成分厚朴酚 (magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol) 一次給藥和一星期給藥之抗焦慮作用，並用 buspirone 為正對照。

結果顯示，於黑白室之動物焦慮模式實驗中，厚朴甲醇粗抽物及其活形成分厚朴酚及和厚朴酚一次給藥及一星期給藥均可增加小鼠在白室的滯留時間、由白室第一次進入黑室的時間及二室間的穿梭次數，並減少了在黑室的滯留時間。於舉高型十字迷宮之動物焦慮模式實驗中，一次給藥組及一星期給藥組均可增加小鼠在開放臂之滯留時間及進入開放臂的次數，減少小鼠在封閉臂之滯留時間及進入封閉臂的次數，並可增加 5-HTP, PCPA, BUS 及 RIT 在開放臂之滯留時間及進入開放臂的次數，減少小鼠在封閉臂之滯留時間及進入封閉臂的次數。

高速液相層析儀檢測大鼠腦內單胺濃度顯示，厚朴酚及和厚朴酚可降低大鼠皮質 NE, DA 濃度及腦幹中 NE, DA, 5-HT 濃度，並增加大鼠皮質中 VMA 及 HVA 濃度及腦幹中 VMA, HVA 和 5-HIAA 濃度。

† 八十六年度及以前的一般國科會專題計畫亦可選擇適用，唯較特殊的計畫如產學計畫，國科會規劃案等，請先洽得國科會各學術處同意。

綜合以上

結果顯示厚朴甲醇粗抽物

及其活性成分厚朴酚及和厚朴酚一次給藥及一星期給藥具有抗焦慮作用，其抗焦慮作用機轉與降低大鼠皮質 NE, DA 濃度及腦幹中 NE, DA, 5-HT 濃度，並增加大鼠皮質中 VMA 及 HVA 濃度及腦幹中 VMA, HVA 和 5-HIAA 濃度有關。

關鍵詞：厚朴、厚朴酚 (magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol)、抗焦慮作用

Abstract

In this study, we investigated the anxiolytic effect of Magnoliae cortex, honokiol and magnolol after acute and one-week administration by black/white test and elevated plus-maze. Furthermore, we investigated the anxiolytic mechanism of honokiol and magnolol by combining 5-HTP, PCPA, BUS and RIT and detecting the changes of monoamines in the rats' brain.

In the black/white test, the methanol extract of Magnoliae cortex, honokiol and

magnolol after acute and one-week administration prolonged the first time entry, time spent in the white chamber and the total changes between the two chambers, shorten the time spent in the black chamber. In the elevated plus-maze test, the methanol extract of Magnoliae cortex, honokiol and magnolol after acute or one-week administration prolonged the arm entries and time spent in the open arms. The honokiol and magnolol decreased the levels of NE and DA in the cortex, the NE, DA and 5-HT in the brain stem, and increased the levels of VMA, HVA in the cortex and the levels of VMA, HVA and 5-HIAA in the brain stem.

These results suggested that the methanol extract of Magnoliae cortex, honokiol and magnolol after acute and one-week administration possessed anxiolytic effect. The anxiolytic mechanism of the honokiol and magnolol were related to the decrease in the levels of NE, DA in the cortex and NE, DA, 5-HT in the brain stem, and the increase in the levels of VMA, HVA in the cortex and the levels of VMA, HVA and 5-HIAA in the brain stem.

Keywords: Magnoliae cortex, Honokiol, Magnolol, Anxiolytic effect

二、緣由與目的

現今我國經濟突飛猛進，社會已由農業社會轉型為工商社會，工商業發達，競爭激烈，使得精神疾病患者日益增加，尤

其是焦慮不安的患者。焦慮直接或間接影響身體健康，進而降低工作效率，這些問題不僅是當代醫學之難題，亦是現代社會問題之一環。

焦慮係人類對外環境一種煩躁不安的行為情緒表現模式，一般認為係中樞神經系統對外在刺激所引起的一連串神經的變化，最終導致末梢心血管系統及運動神經的改變；而在中樞最初之管制情緒焦慮變化之區域為orbitofrontal cortex（又稱為limbic frontal lobe），主要負責將limbic system之情緒管制區訊息傳送至prefrontal cortex之計劃區；而在orbitofrontal cortex接受cortex之統合訊息後，便傳送至amygdala，amygdala一般被稱為害怕焦慮中樞（fear-anxiety center），由它管制一切對外之情緒變化，而主要之神經管制區為basolateral amygdala，再分經由下視丘之HACER區及medial區，管制末梢交感神經及運動神經，而引起心血管系統及外在反應之變化⁽¹⁾。而在神經傳遞物質之關係，早期均認為中樞benzodiazepine所扮演之角色極為重要；但在近期之研究中，benzodiazepine所扮演之角色則頗受質疑，今均認為benzodiazepine係經由控制下游(downstream)之神經傳遞物質而產生管制情緒之作用，在benzodiazepine治療焦慮方面，發現amygdala區之serotonin神經活性降低，因此在下游之神經傳遞物質中，咸認為serotonin最為重要；另在5-HT agonist之系列研究中，指出buspirone之抗焦慮作用係經由raphe之5-HT_{1A} autoreceptors，導致

serotonergic activity 降低，而非經由 benzodiazepine receptors(2-3)。因此焦慮症之整體中樞管制機轉，便在於中樞 limbic system 中之 amygdala 區 serotonin 之直接不正常變化所引起，而 benzodiazepine 則是間接調節 amygdala 區 serotonin 之活性所致。

現今臨床使用之抗焦慮藥物，大致可分成兩大類：Benzodiazepine 類與 non-benzodiazepine 類(4)；Benzodiazepine 類為現今臨床最常用之抗焦慮藥物，而在臨床上尚具有抗痙攣、鎮靜安眠及降低肌肉張力、治療癲癇等作用，雖在運用上頗具療效，但卻有甚多副作用，最主要者係在治療劑量下，常伴隨鎮靜之作用，導致嗜睡、紊亂及運動功能失調等中樞抑制之作用。其次在 non-benzodiazepine 類，又可分成兩小類：barbiturates 類及 5-HT agonists 類兩類；Barbiturates 類之作用與 benzodiazepine 類相近，但副作用則較 benzodiazepine 類多且嚴重，除導致鎮靜、嗜睡、紊亂及運動功能失調等中樞神經抑制作用外，對於肝臟代謝，特別是 cytochrome p-450 系統則有誘發作用。而 5-HT agonists 特別是 5-HT_{1A} agonists，為最近較受注意及發展之抗焦慮藥，因其無 benzodiazepine 類中及頭痛之副作用。綜觀現今臨床使用之抗焦慮藥物，其副作用及毒性仍大，雖有新近發展之 5-HT agonists，但尋找更具療效而毒性更低之藥物仍是值得探索的方向。

厚朴，始載於本經，為木蘭科植物

厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. Et Wils. 的樹皮或根皮，具有除驚，去心煩之功效。治心火盛而又陰血不足以致心煩不眠者，宜與黃連、阿膠、白芍等伍用，如傷寒論之厚朴阿膠湯。名醫別錄記載：「……除驚，去留熱、心煩滿，厚腸胃」。傳統中醫師有用於治療焦慮症(5)(6)。現代藥理研究證實厚朴具有中樞抑制(7)；顯著的箭毒樣作用，對 strychnine、picrotoxin 及 pentylenetetrazol 等藥物誘發的痙攣有強烈的抑制作用，並能抑制腦幹網狀激活系統及下視丘激活系統(8)，其後從日本和厚朴中分離出 magnocurarine 具有鬆弛橫紋肌作用，magnolol 及 isomagnolol 具有中樞性肌肉鬆弛作用，其作用機轉主要是抑制脊髓興奮性傳遞物質 glycine 的作用，對 GABA 則無作用(6)；對小鼠離體腸管厚朴煎劑低劑量呈現興奮作用，劑量加大則轉為抑制作用(7)；厚朴對幽門結紮型及應激型二種急性胃潰瘍模型均有抗胃潰瘍作用(9)，厚朴 50% 乙醇抽出物對鹽酸-乙醇誘發胃黏膜潰瘍有顯著抑制作用。其活性成分之一主要為 magnolol 及 honokiol，厚朴酚的抗潰瘍及抗胃酸分泌作用是通過中樞的抑制作用所產生(10)及抗菌(11)等作用。Magnolol 及 honokiol 為厚朴的主要有效成分，現代藥理研究證實 magnolol 具有中樞抑制作用(12)；可調整中樞 serotonergic system 活性，抑制中樞 serotonin 之釋放(13)；是一種抗血小板聚集劑，可減少 thromboxane 形成及鈣的移動(14)；可經由釋放內皮驅動的釋放因子(endothelium-driven releasing

factor, EDRF)及抑制鈣內流入血管平滑肌而引起大鼠主動脈鬆弛(15);抗發炎作用(16)(17)及抗菌作用(18)。然有關厚朴除驚,去心煩之焦慮症狀的藥理作用並未見有探討。

因此本研究擬以黑白室 (Black & White) 及舉高型十字迷宮 (Elevated plus-maze) 等動物焦慮實驗模式,來探討厚朴甲醇粗萃取物及其活性成分 magnolol 及 honokiol 之抗焦慮作用,又併用影響中樞神經傳遞物質之藥物及測定大鼠腦中單胺濃度變化,以探討厚朴甲醇粗萃取物及其活性成分 magnolol 及 honokiol 抗焦慮作用與中樞 serotonergic system 之關係。並以現今臨床常用的抗焦慮藥物 buspirone 為正對照組,以評估其治療效價。

三、實驗材料與方法

一、實驗藥材之製備

本實驗所用之厚朴之基原鑑定如下:

1. 厚朴:為木蘭科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. Et Wils. 的樹皮或根皮。

將厚朴以甲醇浸潤之,在50°C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,即得厚朴甲醇粗萃取物。

二、實驗動物

本研究所使用之動物為:

1. Sprague-Dawley 系雄性大鼠,體重180~250 公克 (HPLC實驗實驗用)。

2. ICR 系雄性小鼠,體重 18~25 公克 (Black & White 及 Elevated plus-maze 實驗用)。

三、實驗方法

<1>、對明暗室測定 (Light/dark test) 之影響:

明暗室測定已用於鋸齒類動物焦慮狀態的測定,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(19)。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 (27X27 cm),另一個塗成黑色 (27X18 cm) 兩實驗箱間由47cm高的壁隔開,此壁底部有一開口 (7X7 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9X9cm格子。每實驗相各有其獨立照明,明室用100W白光燈泡 (燈光強度4400lux),暗室用40W紅光燈泡,兩燈泡離地板37cm高。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,實驗從下午二點至下午五點。

實驗分一次給藥組及一週給藥組,一次給藥組於厚朴甲醇粗萃取物及其活性成分 magnolol 及 honokiol 以不同劑量分別經由投藥給與小鼠後;一週給藥組每天給藥一次,連續給七天,於第七天給予小鼠不同劑量厚朴甲醇粗萃取物及其活性成分 magnolol 及 honokiol 後,再將小鼠置於洞口處,小鼠頭部面向暗室,記錄小鼠停留在每一室的總時間、於明暗室間的穿梭次數、第一次變換至另一實驗箱的時間、於兩室內越過線 (line crossings) 的次數(19)。

本實驗以buspirone(25 mg/kg, p.o.)作正對照，於給藥20分鐘後進行試驗(20)。並與下述物質分別併用：

<2>、對舉高型十字迷宮 (Elevated plus-maze) 誘發焦慮之影響：

本實驗主要是依Pellow氏於1985年發表用於評估焦慮的儀器(Elevated plus-maze)，是是目前最廣泛被使用的動物焦慮模式，其原理主要是依據鋸齒類動物厭惡高及開放空間的天性(21)。本儀器由兩個開放臂(40×10 cm)及兩個封閉臂(40×10×40 cm)，中以開放之正方形 (10×10 cm) 連接。

實驗分一次給藥組及一週給藥組，一次給藥組於厚朴甲醇粗萃取物及其活性成分magnolol及honokiol以不同劑量分別投藥給與大鼠後；一週給藥組每天給藥一次，連續給七天，於第七天給予大鼠不同劑量厚朴甲醇粗萃取物及其活性成分magnolol及honokiol後，將大鼠放入實驗箱中央，實驗動物頭部面對其中一個封閉臂，記錄大鼠進入開放臂及封閉臂總次數、滯留開放臂之時間為評估標準(22)。實驗者連續觀察 5分鐘，每隻大鼠只測定一次，每組20隻。實驗時間從上午八點至下午五點。本實驗以buspirone(25mg/kg, p.o.)作正對照，於給藥20分鐘後進行試驗。

<3>、對大鼠腦內單胺及其代謝物濃度之影響：

厚朴甲醇粗萃取物之活性成分magnolol及honokiol給予大鼠後，將

大鼠斷頭，取出全腦，將此腦組織置於碎冰中保持冷凍。然後將腦組織分成 cortex 與 brain stem 二部分，在5ml 0.01N HCl與500 μ l 0.1M EDTA下以均質機研勻之，加入4g NaCl，並以12 ml n-butanol抽取，經振盪離心後，取得 n-butanol 層，再加入17 ml n-heptane 與400 μ 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 μ l 0.2M tris-Hcl 鹼性緩衝溶液 (pH8.5) 振盪抽取並離心，可得單胺代謝物(24)。分離所得腦內單胺 (NE, DA, 5-HT) 及其代謝物 (HVA, VMA, 5-HIAA)，以外標準法測定之。使用高速液態層析儀 (HPLC model 440, Solvent Delivery system M45) (Waters Associates) 及檢出器 (Electrochemical Detectors LC-4B) (Bioanalytical system Inc.) 測定之。分離所用Column為Lichrospher 100(RP-18 endcapped, 4mm×125mm) (E.Merck 50734)，移動相為加有PIC B7(Waters Associates)之methanol/water, 其流速為2.0 ml/min。分離溶出物面積係使用Data module M730 型記錄之。

<4>、併用影響中樞神經傳遞物質之藥物：探討厚朴甲醇粗萃取物之活性成分magnolol及honokiol抗焦慮作用與中樞serotonergic system之關

係

厚朴甲醇粗萃取物及其活性成分 magnolol 及 honokiol 給予，再與影響中樞神經傳遞物質 serotonergic system 之藥物分別併用，依前法（方法(2)），進行實驗：併用藥物如下：serotonin precursor--5-HTP (5、50 mg/kg, i.p.) 30分鐘前給予⁽²³⁾；serotonin synthesis inhibitor--*p*-Chlorophenylalanine (200 mg/kg, i.p.) 24小時前給予⁽²³⁾；5-HT_{1A} receptor agonist—Buspirone (0.05 mg/kg, i.p.) 30分鐘前給予⁽²⁴⁾；5-HT₂ receptor antagonist--Ritanserin (0.01 mg/kg, i.p.) 30分鐘前給予⁽²⁵⁾。

<5> 統計學分析：

本實驗所得之數據，黑白室實驗及舉高型十字迷宮，則以 non-parameter 統計，先以 Kruskal-Wallis 單因子變異數分析變異數，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。HPLC 實驗數據以 one-way ANOVA 分析其變異數，再以 Scheffe's multiple range test 檢定，統計並分析其間差異之顯著性，凡 P 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。

四、結果

1、對明暗室測定 (Light/dark test) 之影響：

由圖一至圖四結果顯示，厚朴甲醇抽取物，厚朴酚 (magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol) 對小鼠在黑白室中第一次由明室跑至暗室的時間、停留在明室的時間均有延長的作用，縮短在暗室的時間，增加

在兩室間的穿梭次數；每天給藥一次，連續給七天，對小鼠在黑白室中第一次由明室跑至暗室的時間、停留在明室的時間均有延長的作用，縮短在暗室的時間，增加在兩室間的穿梭次數。

2、對舉高型十字迷宮 (Elevated plus-maze)

誘發焦慮之影響：

圖五、圖六結果顯示，厚朴甲醇抽取物 (0.5, 1.0 g/kg) 一次給藥及一星期給藥均對小鼠在舉高型十字迷宮中開放臂進入次數及時間均有增加的作用，關閉臂的進入次數及時間均有減少的作用。

圖七、圖八結果顯示，厚朴酚 (magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol) 一次給藥均對小鼠在舉高型十字迷宮中開放臂進入次數及時間均有增加的作用，關閉臂的進入次數及時間均有減少的作用。

3、對大鼠腦內單胺及其代謝物濃度之影響：

如圖九結果顯示，厚朴酚 (magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol) 均可降低大鼠皮質 NE, DA 濃度及腦幹中 NE, DA, 5-HT 濃度，並增加大鼠皮質及腦幹中 VMA 及 HVA 濃度，腦幹中 5-HIAA 濃度。

4、併用影響中樞神經傳遞物質之藥物：

探討厚朴甲醇粗萃取物之活性成分 magnolol 及 honokiol 抗焦慮作用與中樞 serotonergic system 之關係

圖十～圖十七結果顯示，厚朴酚

(magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol) 於十字迷宮實驗中均可增強 buspirone (BUS), p-chlorophenylalanine (PCPA) 及 ritenserin (RIT) 誘發的開放臂進入次數及滯留時間增加, 及封閉臂進入次數及滯留時間減少; 並拮抗 5-hydroxytryptophan (5-HTP) 誘發的開放臂進入次數及滯留時間減少, 及封閉臂進入次數及滯留時間增加。

五、討論

首先, 在黑白室誘發小鼠焦慮模式之實驗中, 黑白室是利用老鼠在遇到明亮環境時, 其本身會去探索陌生環境的驅動力而設計出來的模式⁽²⁷⁾。Crawley & Goodwin 之研究發現, 由老鼠不喜歡開放且明亮環境的習性, 因此提出老鼠在黑白室中會誘發兩室間穿梭次數減少、第一次由白室至明室的時間較短及停留在黑室的時間較白室長之探索行為, 則此行為可用來當焦慮評估指標⁽²⁸⁾。已有研究指出 benzodiazepine 類, 如 chlordiazepoxide 及 diazepam 會延長小鼠在明室之滯留時間而具有抗焦慮活性, 此結果在 Crawley & Goodwin、Costall 及 Onarivi & Martin、Young & Johnson 等之研究中被證實⁽²⁸⁻³⁰⁾。另外, buspirone 在 Costall、Carli、Lopez-Rubalcava、Misslin 及 Sanchez 等之研究發現, 老鼠停留在明室之滯留時間延長, 而在暗室滯留時間會縮短⁽³¹⁻³³⁾。本研究之正對照組 buspirone 之實驗結果均與先前 Crawley 及 Costall 等之研究結果一致。而厚朴粗提取物及厚朴酚 (magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol) 可延長小鼠第一次由明室跑至暗室的時間、於明室之滯留時間

及兩室間穿梭次數, 且減少小鼠於暗室之滯留時間。此結果與本研究之正對照組之 buspirone 一致, 顯示厚朴粗提取物, 厚朴酚 (magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol) 應具有抗焦慮之作用。

其次, 在舉臂式十字形迷宮誘發焦慮模式之實驗中, Montgomery 在其研究中指出, 此實驗是利用老鼠對處在較高的地方及開放的空間, 會引起恐懼因而誘發焦慮而設計出來的模式⁽³⁴⁾。Pellow 等之研究發現, 舉臂式十字形迷宮是一個簡單且迅速, 可用來測定藥物有無抗焦慮或致焦慮作用, 且此模式對小鼠及大鼠均有作用⁽³⁵⁾。在 Pellow、Lister 及 Rodgers 等之研究指出, 以評估老鼠於開放臂之進入次數及滯留時間, 當作焦慮作用的指標⁽³⁵⁻³⁷⁾。先前在 Pellow 等之研究已經證實舉臂式十字形迷宮可用來測定 benzodiazepine 類的抗焦慮活性; 而在 Rodgers 和 Cole 同樣指出, 給予 diazepam 及 benzodiazepine 受體作用劑, 如 chlordiazepoxide 及 bretazenil, 可明顯增加進入開放臂次數及延長在開放臂滯留時間⁽³⁸⁾。而 buspirone 在 Lee & Rodgers, Dunn, Kostowski 及 Soderpalm 等人之研究一致發現, 可增加小鼠停留在開放臂滯留時間及進入開放臂次數, 顯示 buspirone 在舉臂式十字形迷宮焦慮模式有抗焦慮作用⁽³⁹⁻⁴²⁾。厚朴粗提取物, 厚朴酚 (magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol) 可增加小鼠在開放臂之滯留時間及進入次數, 顯示厚朴粗提取物, 厚朴酚 (magnolol) 及和厚朴酚 (honokiol) 應具有抗焦慮之作用。

由於情緒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密不可分的關係⁽⁴³⁾。有文獻指出將 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⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾；其次，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⁽⁴⁷⁾。此外，1990 年 Golembiowska 指出 ipsapirone 之抗焦慮作用是經由減少 5-HT 的 turnover rate，增加 NE、DA 之 turnover rate 所引起⁽⁴⁸⁾；ipsapirone 會經由活化 5-HT_{1A} autoreceptors 及減少神經終端 5-HT 的 turnover rate，進而減弱 raphe 對 locus coeruleus 之控制，使得 NE 神經細胞產生去抑制(disinhibition)作用，並增加 NE 之 turnover rate⁽⁴⁹⁾；又 substantia nigra 中的 DA 神經亦受 raphe 神經核的控制，當此控制被 Ipsapirone 抑制時，substantia nigra 中的 DA 神經細胞亦會產生去抑制作用，且 DA 之 turnover rate 亦有增加之現象。由此可知腦幹中 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⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾。再者，本所謝明村教授等研究指出，當皮質中 NE、DA 之濃度減少及 NE、DA 之 turnover rate 增加時，腦幹中 5-HT、NE、DA 之濃度減少及 5-HT、NE、DA 之 turnover rate 增加時，會產生鎮靜作用⁽⁵²⁾。因此，本研究進一步利用生物化學方法(高速液相層析暨電化學法)探討厚朴酚(magnolol)及和厚朴酚(honokiol)對實驗動物皮質及腦幹中單胺及其代謝物之濃度變化之影響，實

驗結果顯示厚朴酚(magnolol)及和厚朴酚(honokiol)均可降低大鼠皮質 NE、DA 濃度及腦幹中 NE、DA、5-HT 濃度，並增加大鼠皮質及腦幹中 VMA 及 HVA 濃度，腦幹中 5-HIAA 濃度。故可推知厚朴酚(magnolol)及和厚朴酚(honokiol)之抗焦慮作用，可能降低大鼠皮質 NE、DA 濃度及腦幹中 NE、DA、5-HT 濃度，並增加大鼠皮質及腦幹中 VMA 及 HVA 濃度，腦幹中 5-HIAA 濃度。

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^(53,54)。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⁽⁵⁵⁾，因此，本研究併用 5-HT 前驅物(5-hydroxytryptophan; 5-HTP)，5-HT 合成抑制劑(p-chlorophenylalanine; PCPA) 5-HT_{1A} 部份致效劑(如 buspirone; BUS)、5-HT₂ 拮抗劑(ritanserin; RIT)等 5-HT 受體之拮抗劑或致效劑，並以舉高型十字迷宮作為誘發小鼠焦慮模式，進一步探討 5-HT 受體在厚朴酚及和厚朴酚抗焦慮作用所扮演之角色，進一步闡明其抗焦慮作用之作用機轉。

雖然 5-HT₁ 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_{1A} 接受體(5-HT_{1A} presynaptic receptors)，為一種

autoreceptors 或稱為 somatodendritic autoreceptors；5-HT_{1A} 突觸後接受體 (5-HT_{1A} postsynaptic receptors) 則是集中在 limbic system (包括 hippocampus 和 amygdala) (54,57)。活化突觸前 5-HT_{1A} autoreceptors 可抑制細胞之 firing rate，進而減少 5-HT 的神經傳遞；反之，若活化突觸後 5-HT_{1A} 受體則會導致邊緣系統的神經活性抑制。

已知突觸前 5-HT_{1A} autoreceptors 及突觸後的 5-HT_{1A} receptors 與 5-HT_{1A} 部份致效劑或 5-HT₁ 拮抗劑結合後，會活化 Gi protein，而引起 K⁺ 通道打開，促使神經細胞膜過極化，進而減低 5-HT 神經傳導而顯出抗焦慮活性(24)。BUS 為 5-HT_{1A} 之部份致效劑，低劑量時與 5-HT 神經突觸前之 5-HT_{1A} 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 之合成及 turnover rate，而產生抗焦慮作用(58)。由於 Cosall 等研究指出 BUS 於 0.06~2.0 mg/kg (i.p.) 時具抗焦慮作用(30)；因此，本研究選用不影響小鼠在黑室及白室滯留時間之劑量之 BUS (0.05 mg/kg; i.p.) 來和厚朴酚及和厚朴酚併用；實驗結果發現，厚朴酚及和厚朴酚可增加 5-HTP，BUS 及 PCPA 在開放臂的滯留時間及進入次數，並縮短封閉臂的滯留時間及進入次數。顯示厚朴酚及和厚朴酚之抗焦慮作用可能與 5-HT 之合成及興奮突觸前和突觸後 5-HT_{1A} 受體有關。

突觸後的 5-HT₂ 受體 (Postsynaptic

5-HT₂ receptors) 主要存在於在皮質層、下視丘和杏仁核等處。RIT 為 5-HT₂ 之拮抗劑，腹腔給予 1 mg/kg 時會延長小鼠在白室之滯留時間而縮短在黑室之滯留時間(59)。本研究使用不影響小鼠在黑室之滯留時間及白室之滯留時間之 RIT (0.01 mg/kg; i.p.) 與厚朴酚及和厚朴酚併用；實驗結果顯示，厚朴酚及和厚朴酚可增強 RIT 在開放臂的滯留時間及進入次數，並縮短封閉臂的滯留時間及進入次數。故可推知，厚朴酚及和厚朴酚之抗焦慮作用與阻斷 5-HT₂ 受體之活性亦有關。

綜合以上結果顯示，厚朴甲醇提取物及厚朴酚及和厚朴酚不論在黑白室或舉臂式十字形迷宮誘發小鼠焦慮等模式中均具明顯之抗焦慮作用。厚朴酚及和厚朴酚作用機轉可能與活化突觸前 5-HT_{1A} 受體，降低突觸後 5-HT_{1A} 及 5-HT₂ 受體之活性，進而減少腦幹中 5-HT 之 turnover rate 所引起。並與降低大鼠皮質 NE, DA 濃度及腦幹中 NE, DA 濃度有關。

六、參考文獻

1. Robert B. Graham: Physiological psychology. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, A Division of Wadsworth, Inc. 1990;517-24.
2. Meller E, Goldstein M, Bohmaker K: Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of serotonin synthesis: Possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxytryptamine_{1A} agonists. Mole

- Pharmacol 1990;37:231-7.
3. Carli M, Prontera C, Samanin R: Evidence that central 5-hydroxytryptamine neurons are involved in anxiolytic activity of buspirone. *Br J Pharmacol Exp Ther* 1989;96:329-36.
 4. Rang HP, Dale MM: Anxiolytic and hypnotic drugs. In: *Pharmacology*, Churchill Livingstone Inc., New York, 1991, 628-41.
 5. Wang JP, Ho TF, Chang LC, Chen CC: Anti-inflammatory effect of magnolol, isolated from *Magnolia officinalis*, on A23187-induced pleurisy in mice. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*. 47(10):857-60, 1995.
 6. 渡邊和夫；厚朴及辛夷成分的藥理。藥學通報20(9): 522-524, 1985。
 7. 陰健；中藥現代研究與臨床應用，學苑出版社，北京，492-496，1993。
 8. 唐冰：厚朴的研究與臨床應用。中國中藥雜誌 15(8): 55-57, 1990。
 9. 胡麗萍、傅寶慶、趙藍湘、郭喜寶、顧月紅；厚朴及其炮炙品對大鼠急性實驗性胃潰瘍的作用。中草藥22(11): 509-510, 1991。
 10. 渡邊和夫等；國外醫學中醫中藥分冊(1): 54, 1981。
 11. Namba T, Tsunozuka M, Hattori M: Dental caries prevention by traditional chinese medicine. *J Med Plant res* 44: 100-106, 1982.
 12. Watanabe K, Watanabe HY, Goto Y, Yamamoto N, Yoshizaki M: Studies on the active principles of magnolia bark. Centrally acting muscle relaxant activity of magnolol and honokiol. *Jpn J Pharmacol* 25(5):605-7, 1975.
 13. Tsai TH, Lee TF, Chen CF, Wang LC: Modulatory effects of magnolol on potassium-stimulated 5-hydroxytryptamine release from rat cortical and hippocampal slices. *Neurosci Lett* 186(1):49-52, 1995.
 14. Teng CM, Chen CC, Ko FN, Lee LG, Huang TF, Chen YP, Hsu HY: Two antiplatelet agents from *Magnolia officinalis*. *Thrombosis Research*. 50(6):757-65, 1988.
 15. Teng CM, Yu SM, Chen CC, Huang YL, Huang TF: EDRF-release and Ca^{++} -channel blockade by magnolol, an antiplatelet agent isolated from Chinese herb *Magnolia officinalis*, in rat thoracic aorta. *Life Sci* 47(13):1153-61, 1990.
 16. Wang JP. Hsu MF. Raung SL. Chen CC. Kuo JS. Teng CM: Anti-inflammatory and analgesic effects of magnolol. *N-S Arch Pharmacol* 346(6): 707-12, 1992.
 17. Wang JP, Raung SL, Chen CC, Kuo JS, Teng CM: The inhibitory effect of magnolol on cutaneous permeability in mice is probably mediated by a nonselective vascular hyporeactivity to mediators. *N-S Arch Pharmacol* 348(6): 663-9, 1993.
 18. 季宇彬；中藥有效成分藥理與應用。黑

- 龍江科學技術出版社，哈爾濱，
292-293，1995。
19. Griebel G, Moreau JL, Jenck F, Misslin R, Martin JR Acute and chronic treatment with 5-HT reuptake inhibitors differentially modulate emotional responses in anxiety models in rodents. *Psychopharmacology* 1994; 113: 463-470.
 20. Ogawa N, Hara C, Takaki S: Anxiolytic Activity of SC-48274 compared with those of buspirone and diazepam in experimental anxiety models. *Japan J Pharmacol* 1993; 61: 115-21.
 21. Montgomery KC The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol* 1955; 48: 254-260.
 22. Pellow S, File SE: Anxiolytic and axiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:525-9.
 23. Sanchez C: Serotonergic mechanisms involved in the exploratory behaviour of mice in a fully automated two-compartment black and white test box. *Pharmacol. Toxicol.* 1995;77:71-78.
 24. Moser PC: An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology* 1989;99:48-53.
 25. 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;116:2989-2999.
 26. Shibuya T, Sato K, Saiafsky B (1982) Simultaneous measurement of biogenic amines and related compounds by high performance liquid chromatography (HPLC). *Int J Clin Pharmacol* 20:297-301.
 27. 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.
 28. Young R, Johnson DN: A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem & Behav* 1991; 40:739-43.
 29. Sanchez C: Serotonergic mechanisms involved in the exploratory behaviour of mice in a fully automated two-compartment black and white test box. *Pharmacol Toxicol* 1995; 77:71-8.
 30. 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(3):777-85.
 31. Lopez-Rubalcava C, Saldívar A, Fernandez-Guasti A: Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics. *Pharmacol Biochem & Behav*

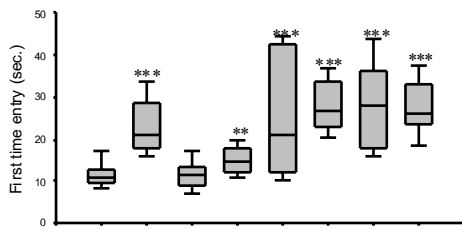
- 1992; 43(2):433-40.
32. Onaivi ES, Martin BR: Neuropharmacological and physiological validation of a computer-controlled two-compartment black and white box for the assessment of anxiety. *Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry* 1989; 13(6):963-76.
 33. Misslin R, Griebel G, Saffroy-Spittler M, Vogel E: Anxiolytic and sedative effects of 5-HT_{1A} ligands, 8-OH-DPAT and MDL 73005EF, in mice. *Neuroreport* 1990; 1(3-4):267-70.
 34. Montgomery KC: The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol.* 1955; 48:254-60.
 35. 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(3):149-67.
 36. Lister RG: The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92(2):180-5.
 37. 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.
 38. Cole JC, Rodgers RJ: An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behav Pharmacol* 1993; 4: 573-80.
 39. Rodgers RJ, Cole JC: The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper SJ, Hendrie CA, eds. *Ethology and psychopharmacology.* Chichester: John Wiley and Sons 1994; 9-44.
 40. Dunn RW, Corbett R, Fielding S: Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. *Eur J Pharmacol* 1989; 169(1):1-10.
 41. Kostowski W, Dyr W, Kizascik P, Jarbe T, Archer T: 5-Hydroxytryptamine_{1A} receptor agonists in animal models of depression and anxiety. *Pharmacol & Toxicol* 1992; 71(1):24-30.
 42. Soderpalm B, Hjorth S, Engel JA: Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and L-5-HTP in Montgomery's conflict test. *Pharmacol, Biochem & Behav* 1989; 32(1):259-65.
 43. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS: Consciousness and behavior. In: *Human physiology: The mechanisms of body function.* Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS(eds), USA, Mc Graw-Hill, 1994; 369-82.
 44. 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(9):2287-94.
45. 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.
 46. Higgins GA, Jones BJ, Oakley NR, Tyers MB: Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT₃ receptor antagonists. *Psychopharmacology* 1991; 104(4):545-51.
 47. Stahl SM: *Essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications*. New York, Cambridge university press, 1996;167-215.
 48. Golembiowska K: Ipsapirone, a new anxiolytic drug, stimulates catecholamine turnover in various regions of the rat brain. *Pol J Pharmacol Pharm* 1990; 42:143-50.
 49. Segal M: Serotonergic innervation of the locus coeruleus from the dorsal raphe and its action on responses to noxious stimuli. *J Physiol* 1979; 286:401-15.
 50. Verge D, Daval G, Patey A, Gozlan H, el Mestikawy S, Hamon M: Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT_{1A} subtype. *Eur J Pharmacol* 1985; 113(3):463-4.
 51. Beninger RJ, The role of dopamine in locomotor and learning. *Brain Res Rev* 1983; 6:173-96.
 52. Hsieh MTT, 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.
 53. Wise CD, Berger BD, Stein L: Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science* 1972; 177: 180-183.
 54. Crow TJ, Deakin JFW: Affective change and the mechanism of reward and punishment: a neuro-hormonal hypothesis. In: Perris G, Struwe G, Jansson B, Cooper JR, Bloom F, Roth RH (eds.) *Developments in Psychiatry* (Vol. 5) Elsevier, Amsterdam 1981; 536-541.
 55. Berendsen HHG, Broekkamp CLE: Behavioural evidence for functional interactions between 5-HT-receptor subtypes in rats and mice. *Brit J Pharmacol* 1990; 101: 667-673.
 56. Baldwin D, Rudge S: The role of serotonin in depression and anxiety. *Int Clin Psychopharmacol*. 1995; 9 (Suppl 4) : 41-45.
 57. Griebel G: 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther* 1995; 65: 319-395.
 58. Sharp T, Bramwell SR, Grahame-Smith

DG: 5-HT1A agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. *Brit J Pharmacol* 1989 ; 96: 283-290.

59. 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.

(A) 1 day



(B) 7 days

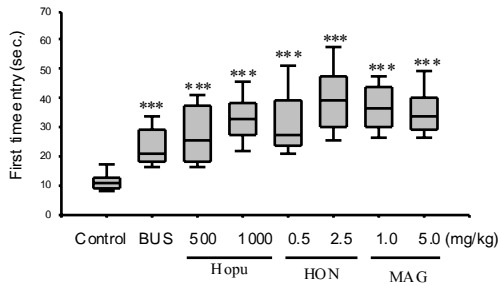


Fig 1. Effects of Magnoliae cortex (Hopu), honokiol (HON) and magnolol (MAG) after one day (A) and seven days (B) administration on the first time entry from white to black chambers in the black and white test. **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H test followed by Mann-Whitney U-test).

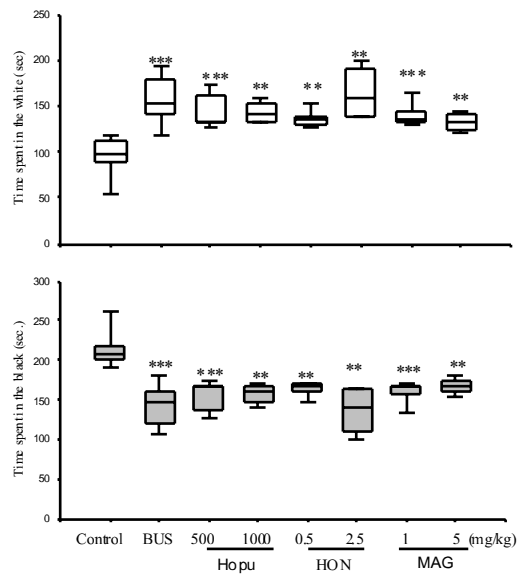


Fig 2. Effects of Hopu, magnolol (MAG) and honokiol (HON) on the time spent in the white and black chambers of black and white test in mice. **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H followed by Mann-Whitney U test).

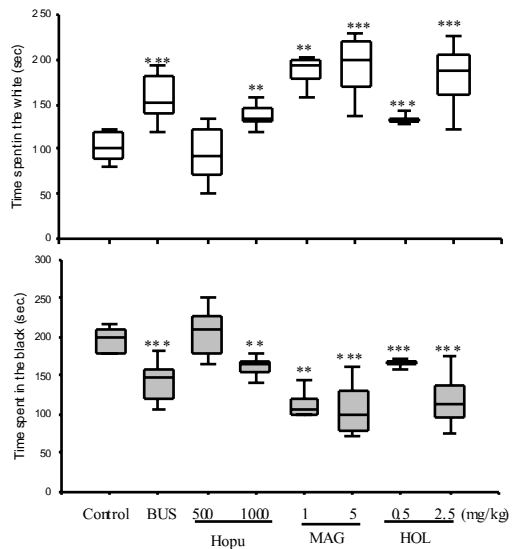


Fig 3. Effects of Hopu, honokiol (HON) and magnolol (MAG) after 7 days administration on the time spent in the white and black chambers of black and white test in mice. BUS: buspirone. **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H followed by Mann-Whitney U test).

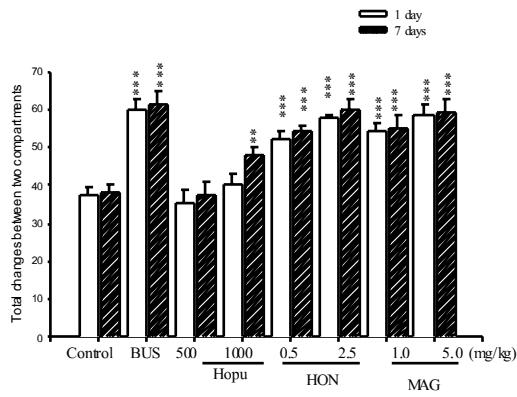


Fig 4. Effects of Magnoliae cortex (Hopu), honokid (HON) and magnolol (MAG) after one day and seven days administration on the total changes between the two chambers in the black and white test. **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H test followed by Mann-Whitney U-test).

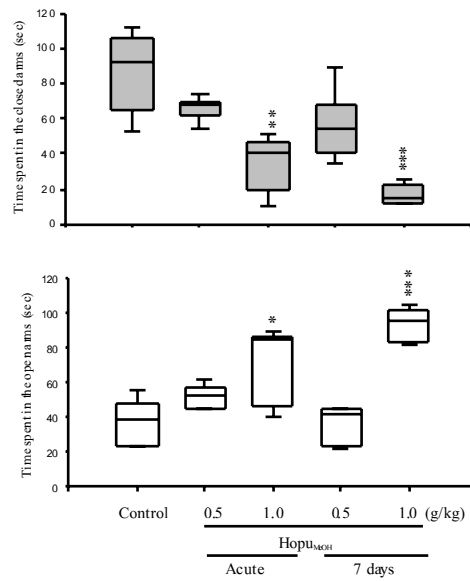


Fig 6. Effects of methanol extract of Magnoliae cortex (Hopu) on the time spent in the open arms and closed arms of elevated plus maze in mice. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H test followed by Mann-Whitney U test).

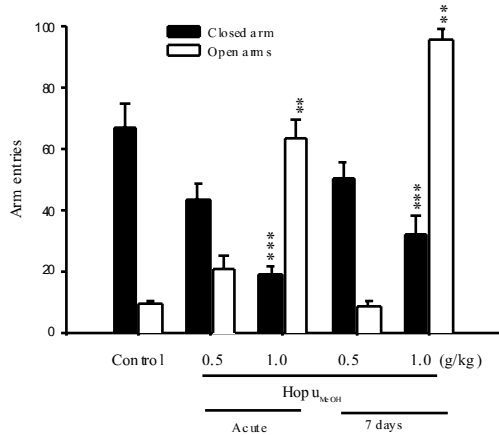


Fig 5. Effects of methanol extract of Magnoliae cortex (Hopu) on the arm entries in the elevated plus maze in mice. **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

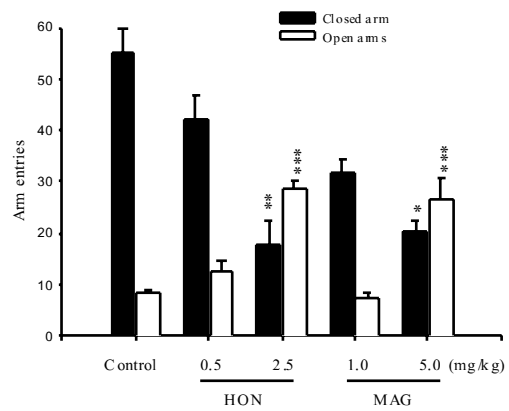


Fig 7. Effects of honokid (HON) and magnolol (MAG) on the arm entries in the elevated plus maze in mice. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

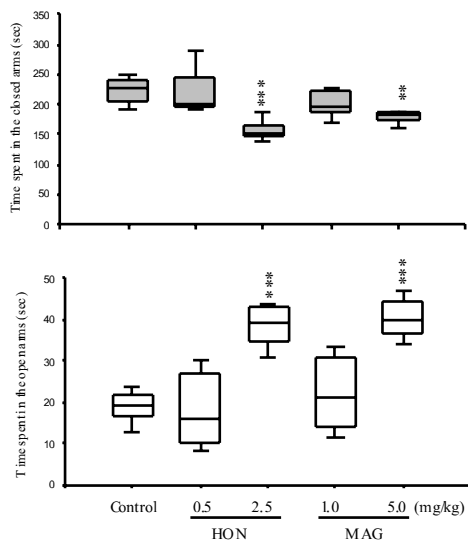


Fig 8. Effects of honokiol (HON) and magnolol (MAG) on the time spent in the closed arms and open arms of elevated-plus maze in mice. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test)

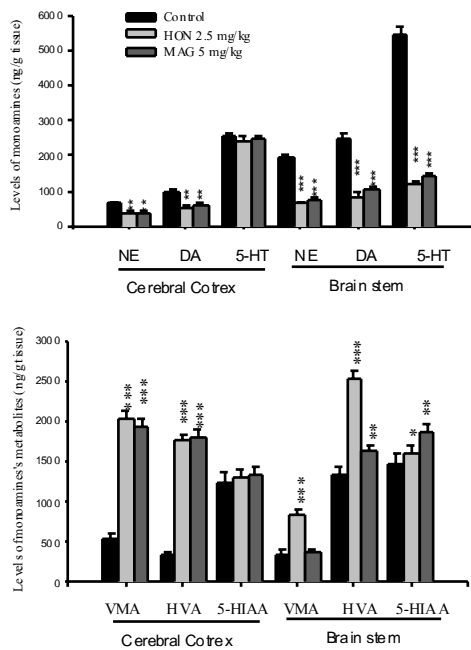


Fig 9. Effects of magnolol (MAG) and honokiol (HON) on the levels of monoamine and its metabolites in the cerebral cortex or brain stem of rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared with the control group, respectively (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

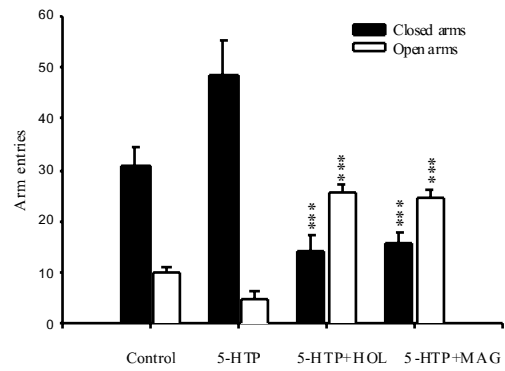


Fig 10. Effects of honokiol (HON) and magnolol (MAG) on the 5-HTP-induced arm entries in the elevated plus-maze in mice. *** $P < 0.001$ as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

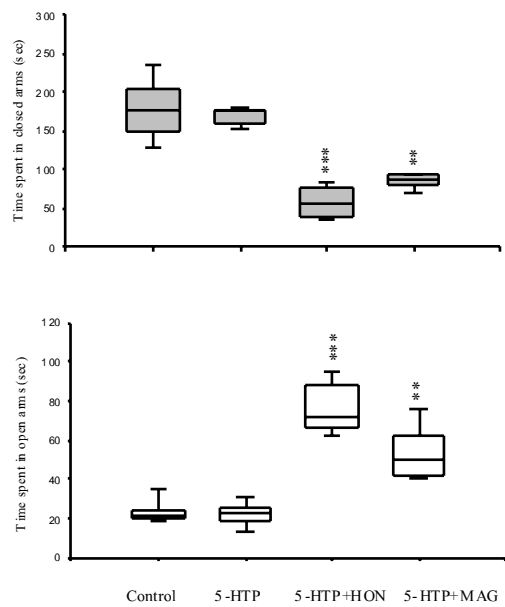


Fig 11. Effects of honokiol (HON) and magnolol (MAG) on the 5-HTP-induced time spent in the closed arms and open arms in the elevated plus-maze in mice. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared with the control group (Kruskal-Wallis H test followed by Mann-Whitney U test).

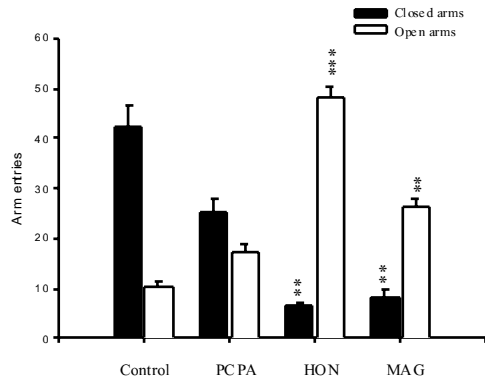


Fig 12. Effects of honokiol (HON) and magnolol (MAG) on the PCPA-induced arm entries in the elevated plus-maze in mice. **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffé's test).

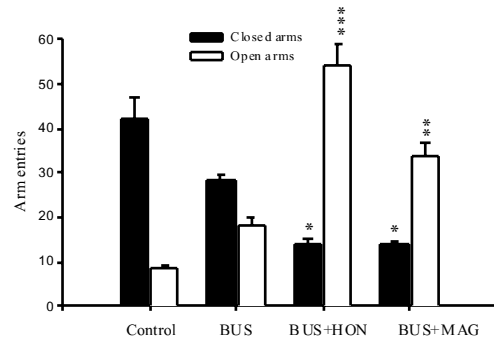


Fig 14. Effects of honokiol (HON) and magnolol (MAG) on the buspirone-induced arm entries in the elevated plus-maze in mice. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffé's test).

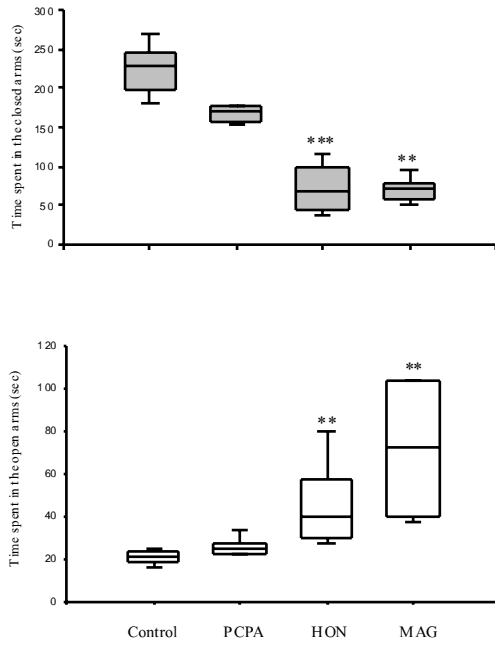


Fig 13. Effects of honokiol (HON) and magnolol (MAG) on the PCPA-induced time spent in the closed arms and open arms in the elevated plus-maze in mice. **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H test followed by Mann-Whitney U test).

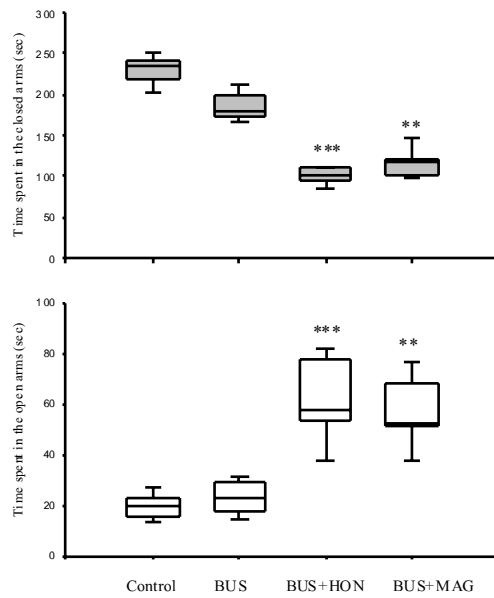


Fig 15. Effects of honokiol (HON) and magnolol (MAG) on the buspirone-induced time spent in the closed arms and open arms in the elevated plus-maze in mice. **P < 0.05, ***P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H test followed by Mann-Whitney U test).

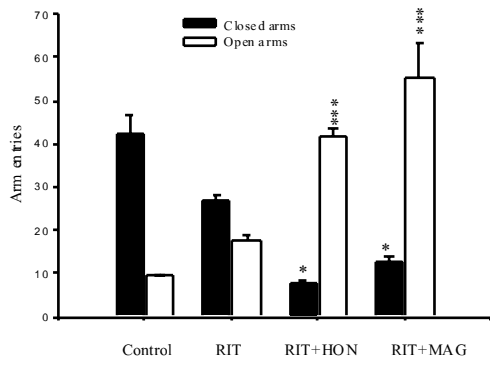


Fig 16. Effects of honokiol (HON) and magnolol (MAG) on the ritanserin-induced arm entries in the elevated plus-maze in mice. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffé's test).

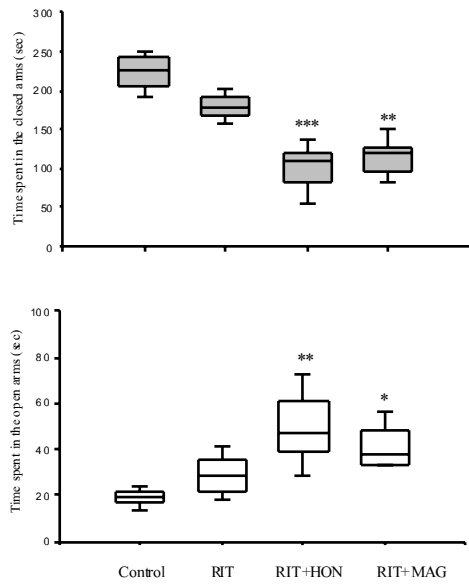


Fig 17. Effects of honokiol (HON) and magnolol (MAG) on the ritanserin-induced time spent in the closed arms and open arms in the elevated plus-maze in mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared with the control group (Kruskal-Wallis H test followed by Mann-Whitney U test).