

定志丸抗焦慮及鎮靜作用之研究

Studies on the anxiolytic effect of Ting-Chih-Wan

彭文煌

中國醫藥學院

摘要

本研究以黑白室及舉高型十字迷宮誘發焦慮模式來探討定志丸水及 95%乙醇提取物一次給藥及一週給藥之抗焦慮作用，並以 hexobarbital 誘發睡眠及測定大鼠自發運動量來探討定志丸水及 95%乙醇一次給藥及一週給藥之鎮靜作用，最後併用 DIZ, 5-HTP, PCPA, BUS 及 RIT 等影響焦慮的藥物，及以高效液相層析儀測定大鼠大腦皮質及腦幹中單胺濃度之變化來探討定志丸乙醇提取物抗焦慮作用之機轉。

結果顯示，在黑白室實驗中，定志丸水及 95%乙醇提取物一次給藥及一週給藥均可延長小鼠第一次由明室至暗室的時間、在明室滯留時間及兩室間的穿梭次數，並縮短在暗室的滯留時間。在舉高型十字迷宮實驗中，定志丸水及乙醇提取物一次給藥及一週給藥亦均可延長小鼠在開放臂進入次數及滯留時間。定志丸水提取物 (1.0 g/kg) 一次給藥及一週給藥均可延長 hexobarbital 誘發小鼠的睡眠時間及降低大鼠之自發運動量；定志丸 95%乙醇提取物一次給藥於較高劑量 (1.0 g/kg) 下才具有延長 hexobarbital 誘發小鼠的睡眠時間及降低大鼠之自發運動量。於舉高型十字迷宮試驗中，定志丸乙醇提取物會延長 PCPA, BUS 及 RIT 於開放臂的停留時間及進入次數，且縮短於封閉臂的停留時間及進入次數；延長 5-HTP 於開放臂縮短的停留時間及進入次數，且縮短於封閉臂延長的停留時間及進入次數。定志丸乙醇提取物於 0.1 g/kg 下可降低大鼠大腦皮質中 NE, DA 及腦幹中 NE, DA 及 5-HT 的濃度，並增加大腦皮質中 VMA, HVA 及腦幹中 VMA, HVA 及 5-HIAA 的濃度。

綜合以上結果顯示，定志丸水及 95%乙醇提取物一次給藥及一週給藥具有抗焦慮作用，定志丸水一次給藥及一週給藥，乙醇提取物一次給藥均具有鎮靜作用，定志丸之抗焦慮作用機轉可能與降低大腦皮質 NE, DA 及腦幹 NE, DA 及 5-HT 濃度有

關。

關鍵詞：定志丸、抗焦慮，黑白室試驗，舉高型十字迷宮

ABSTRACT

In this study, we investigated the anxiolytic effect of Ting-Chih-Wan after acute and one-week administration by black/white test and elevated plus-maze, the sedative effect of Ting-Chih-Wan after acute and one-week administration by hexobarbital-induced hypnosis and locomotor activity detection. Furthermore, we investigated the anxiolytic mechanisms of the ethanolic extract of Ting-Chih-Wan by combining DIZ, 5-HTP, PCPA, BUS and RIT, and detecting the changes of monoamines and its metabolites in the rats' brain.

In the black/white test, the water and ethanolic extracts of Ting-Chih-Wan after acute and one-week administration prolonged the first time entry, time spent in the white compartment and the total changes between the two compartments, shorten the time spent in the black compartment. In the elevated plus-maze test, the water and ethanolic extracts of Ting-Chih-Wan after acute and one-week administration prolonged the arm entries and time spent in the open arms and shorten the arm entries and time spent in the closed arms. The water extracts of Ting-Chih-Wan after acute and one-week administration and ethanolic extracts of Ting-Chih-Wan after acute administration prolonged the hexobarbital-induced sleeping time in mice and decreased the locomotor activity in the rats. The ethanolic of Ting-Chih-Wan potentiated the anxiolytic effects of PCPA, BUS and RIT and antagonized the anxiogenic effect of 5-HTP. The ethanolic extract of Ting-Chih-Wan 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 VMA, HVA and 5-HIAA in the brain stem.

These results suggested that the water and 95% ethanol extracts of Ting-Chih-Wan after acute and one-week administration possessed anxiolytic and sedative effects. The anxiolytic mechanism of the ethanolic extract of Ting-Chih-Wan was 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 NE, DA, 5-HIAA in the brain stem.

Keywords: Ting-Chih-Wan, Antianxiety, Black/white test, Elevated plus-maze

壹、前言

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。

焦慮係人類對外在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 類中樞抑制之副作用，使用上較無危險，但仍有一些其它的副作用，如噁心、嘔吐、嗜睡及頭痛之副作用。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。

國內在如何推動新藥開發的研討會中，多位學者及藥商均認為從中醫藥中研究與開發有效的新藥物是一項可行的嘗試，而且可能比一般的藥物開發省時省錢。由於中藥有許多寧心安神藥（如酸棗仁、柏子仁、遠志……），這些中藥材在中醫臨床上常被用於焦慮失眠患者，值得我們去開發研究，以便尋找新的抗焦慮藥物，以合乎臨床之所需。

定志丸為張子和所創之定志丸，由人參二兩、遠志二兩、茯神二兩、柏子仁二兩及酸棗仁二兩所組成，具有益氣補心、安神定驚之功效，主治心氣不足所致驚悸恍惚、夜臥不安，健忘等症(5)。方中人參用於補脾益肺，生津止渴，安神益智；茯神用於寧心安神；遠志用於寧心安神，祛痰開竅；酸棗仁及柏子仁用於養心安神(6)。現代藥理學研究證實人參有抑制神經系統之雙相性調節效果，故能安神定志(7)；茯神有鎮靜作用(8)；遠志有催眠及抗驚厥作用(9)；酸棗仁具有鎮靜、催眠作用，鎮痛、抗驚厥、降溫作用(10)。儘管如此，有關定志丸主治心氣不足所致驚悸恍惚、夜臥不安等焦慮症狀之現代藥理學研究尚且闕如。

因此本研究擬使用依據鋸齒類動物厭惡高及開放空間的天性而設計的Elevated plus-maze 及鋸齒類動物害怕紅光及白光的天性而設計之 Light-Dark task 來誘發焦慮，老鼠在此環境下會產生與焦慮有關之 conflict behaviors，是目前最廣泛被使用於研究焦慮的動物模式，探討定志丸對這兩實驗模式所誘發之 conflict behaviors 的影響，又現今臨床所用之抗焦慮藥，一般在治療劑量或比治療劑量稍高之劑量下，會有鎮靜安眠之作用，如 diazepam；因此本研究除探討定志丸之抗焦慮作用外，亦擬探討定志丸鎮靜安眠劑量與抗焦慮劑量之關係。並以現今臨床常用的抗焦慮藥物 diazepam 為正對照組，以評估其治療效價。並以現今臨床常用的抗焦慮藥物 diazepam 為正對照組，以評估其治療效價。

貳、材料與方法

一、實驗藥材之製備

本實驗所用之定志丸組成藥材基原如下：

1. 人參：為五加科植物人參 *Panax ginseng* C.A. Meyer 的乾燥根。
2. 遠志：為遠志科草本植物遠志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的乾燥根。
3. 酸棗仁：為鼠李科植物酸棗 *Ziziphus jujuba* Mill. 的乾燥成熟種子。

4. 柏子仁：為柏科植物側柏 *Biota orientalis* (L.) Endl. 的乾燥成熟種仁。

5. 茯神：為多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的菌核。

將人參、遠志、茯神、柏子仁及酸棗仁依 2:2:2:2 比例混合，分別以水或乙醇浸潤之，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，即得定志丸水及乙醇粗萃取物。

二、實驗動物

ICR 系雌性小鼠，體重 18～24 公克 (Black & White、Elevated plus-maze、hexobarbital 誘發睡眠實驗用)。

Sprague-Dawley 系雌性大鼠，體重 180～240 公克 (自發運動量實驗及腦內單胺含量測定實驗用)。

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⁽¹¹⁾。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。每實驗箱各有其獨立照明，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。

實驗分一次給藥組及一週給藥組，一次給藥組於定志丸水或乙醇粗萃取物及各層分離物以不同劑量分別經由口服給與小鼠後；一週給藥組每天給藥一次，連續給七天，於第七天口服給予小鼠不同劑量定志丸水或乙醇粗萃取物後，再將小鼠置於明室中央，小鼠頭部面向暗室，由於小鼠不喜明室及紅光的習性，小鼠在明暗室環境中會有焦慮症狀產生，如停留在暗室的時間及活動量較停留在明室的時間及活動量為長、兩室間的穿梭次數減少、第一次由明室進入暗室的時間短等，因此本實驗記錄小鼠停留在明、暗室的總時間，明、暗室間的穿梭次數，第一次由明室進入暗室的時間⁽¹¹⁾。每隻動物只測一次，每次測試 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。本實驗以 diazepam (5 mg/kg, ip) 作正對照，於給藥 20 分鐘後進行試驗⁽¹²⁾。

<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舉高型十字迷宮儀器，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，老鼠喜歡探索，但若處於開放空間 (如開放臂)，則會因為恐懼而誘發動物焦慮⁽¹³⁾。本儀器由兩個開放臂 (open arms;

40× 10 cm)及兩個封閉臂(close arms; 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，一次給藥組於定志丸水或乙醇粗萃取物以不同劑量分別經由口服投藥給與大鼠後；一週給藥組每天給藥一次，連續給七天，於第七天口服給予大鼠不同劑量定志丸水或乙醇粗萃取物後，將小鼠放入開放臂與封閉臂交叉中央，實驗動物頭部面對其中一個封閉臂，記錄小鼠進入開放臂及封閉臂總次數、滯留開放臂及封閉臂之時間，開放臂及封閉臂的活動時間為評估標準⁽¹⁴⁾。每隻小鼠只測定一次，每次觀察 5 分鐘，每組 20 隻。實驗時間從下午二點至下午五點。本實驗以 diazepam (1mg/kg, ip)作正對照，於給藥 20 分鐘後進行試驗⁽¹⁵⁾。

<3>對 hexobarbital 誘發睡眠時間之影響：

實驗分一次給藥組及一週給藥組，一次給藥組於定志丸水或乙醇粗萃取物以不同劑量分別經由口服給與小鼠後；一週給藥組每天給藥一次，連續給七天，於第七天口服給予小鼠不同劑量定志丸水或乙醇粗萃取物後，再分別腹腔注射 hexobarbital (100 mg/kg)，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) ⁽¹⁶⁾。對照組給 vehicle。

<4>對大鼠運動量之影響：

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)。實驗分一次給藥組及一週給藥組，一次給藥組於定志丸水或乙醇粗萃取物以不同劑量分別經由口服給與大鼠後；一週給藥組每天給藥一次，連續給七天，於第七天口服給予大鼠不同劑量定志丸水或乙醇粗萃取物後，放入此裝置內適應 5 分鐘，再開始記錄大鼠之各種活動行為的變化（包括垂直、水平走動，站立，及移動總距離等）。使用雌性大鼠，每組 6 隻，觀察並連續記錄 1 小時⁽¹⁷⁾。對照組均給予 vehicle。

<5>對大鼠腦內單胺及其代謝物濃度之影響：

定志丸水或乙醇粗萃取物口服給予大鼠後，將大鼠斷頭，取出全腦，將此腦組織置於碎冰中保持冷凍。然後將腦組織置於均質管中，加入 5ml 0.01N HCl 與 500 μ l 0.1M EDTA，以均質機研勻之，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 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^{(21) (22)}。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 510, Solvent Delivery system) (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 M746 型記錄之。

<6>併用影響中樞神經傳遞物質之藥物：探討定志丸水或乙醇粗萃取物抗焦慮作用之機轉

將定志丸水或乙醇粗萃取物給予小鼠，再與影響中樞神經傳遞物質之藥物分別併用，依前法（方法2），進行實驗：併用藥物如下：diazepam (0.1 mg/kg, i.p.) 20 分鐘前給藥⁽¹⁵⁾；serotonin precursor—5-HTP (5、50 mg/kg, i.p.) 30 分鐘前給予⁽¹⁸⁾；serotonin synthesis inhibitor—*p*-Chlorophenylalanine (200 mg/kg, i.p.) 24 小時前給予⁽¹⁸⁾；5-HT_{1A} receptor agonist—Buspirone (0.05 mg/kg, i.p.) 30 分鐘前給予⁽¹⁹⁾；5-HT₂ receptor antagonist—Ritanserin (0.01 mg/kg, i.p.) 30 分鐘前給予⁽²⁰⁾。

<7>統計學分析：

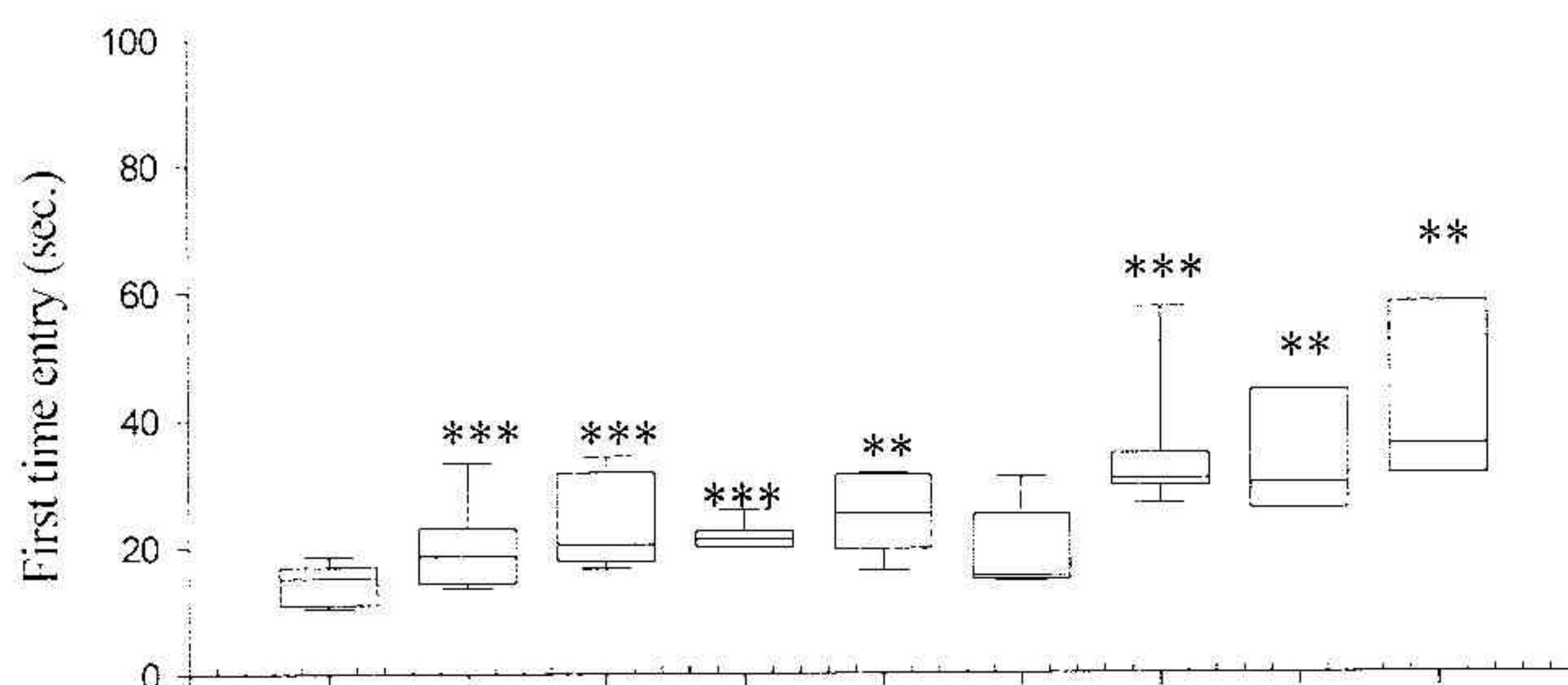
本實驗所得之數據，hexobarbital 誘發睡眠、HPLC 腦內單胺濃度測定及自發運動量實驗數據，均以 one-way ANOVA 分析其變異數，再以 Scheffe's test 檢定，統計並分析其間差異之顯著性，凡 P 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。黑白室實驗及舉高型十字迷宮，則以 non-parameter 統計，先以 Kruskal-Wallis 單因子變異數分析變異數，再以 Mann-Whitney U-test 檢定其間差異之顯著性，凡 P 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。

參、結果

一、對黑白室測定 (Black/White test) 之影響：

由圖一結果顯示，定志丸 95%乙醇提取物(0.1-0.5 g/kg)及水提取物(0.1-1.0 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。

(A) 1day



(B) 7 days

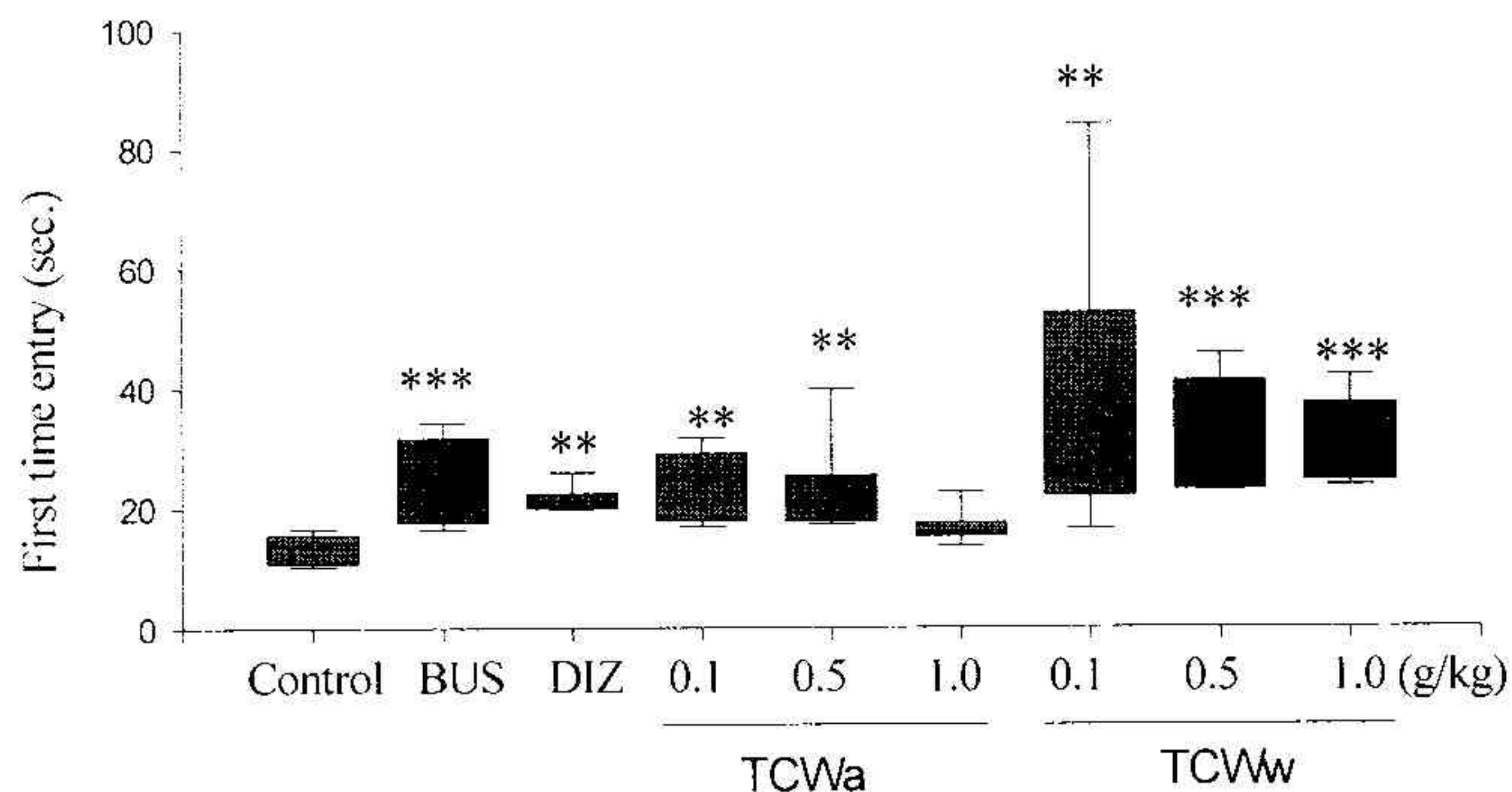


Fig 1. Effects of TCWa and TCWw after (A) 1 day and (B) 7 days administration on the first time entry from the white to the black compartments of the BWT in mice. BUS: buspirone, DIZ: diazepam. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared with the control group (Kruskal-Wallis H followed by Mann-Whitney U test).

由圖二結果顯示，定志丸 95%乙醇抽取物及水抽取物 (0.1- 1.0 g/kg) 對小鼠在黑白室中明室的停留時間均有延長的作用；在暗室的停留時間則均有縮短的作用。

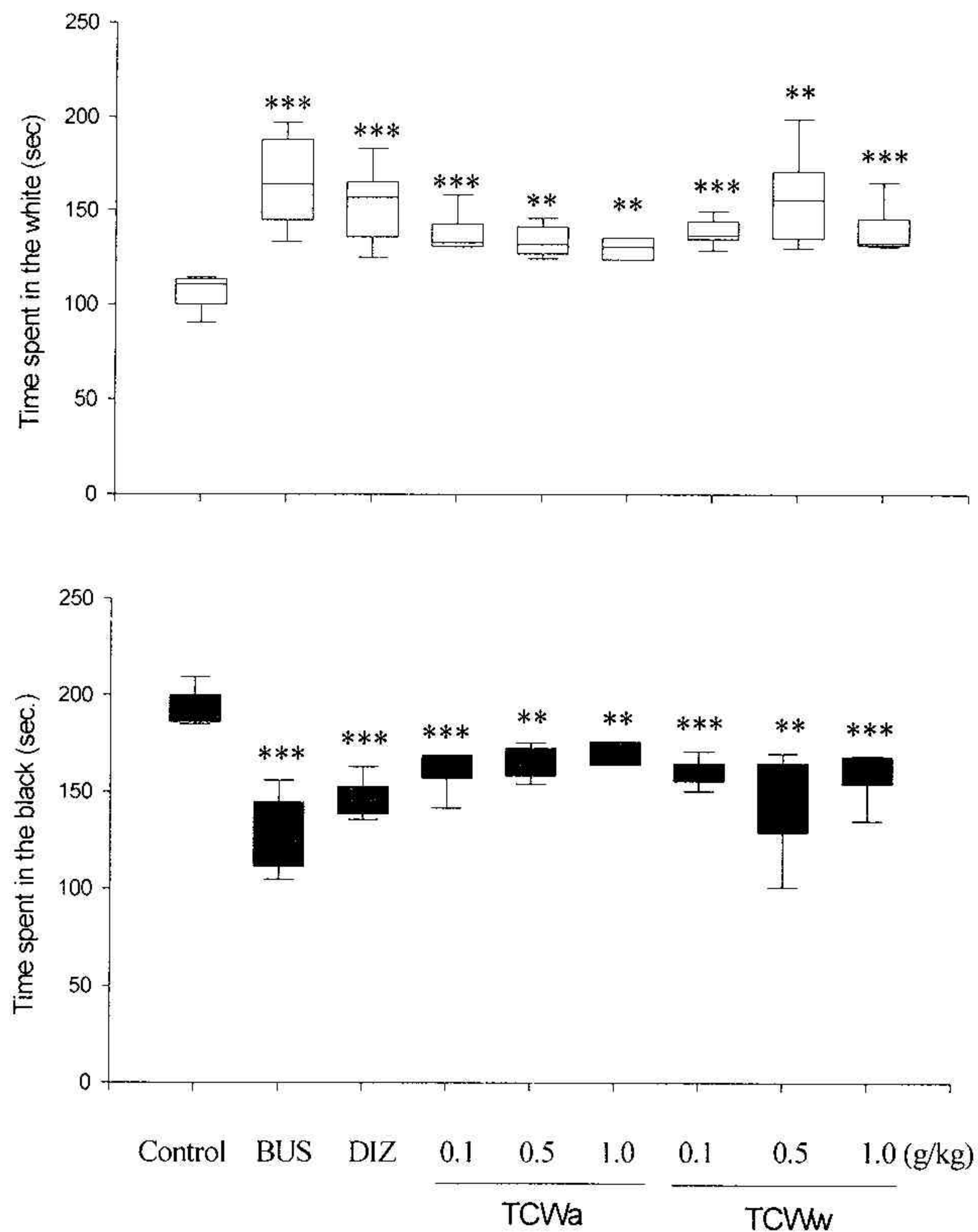


Fig 2. Effects of TCWa and TCWw on the time spent in the white and black compartments of BWT in mice. BUS: buspirone, DIZ: diazepam.
P < 0.01, *P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H followed by Mann-Whitney U test).

由圖三結果顯示，定志丸 95%乙醇抽取物及水抽取物（0.1- 1.0 g/kg）每天口服給藥一次，連續給七天，對小鼠在黑白室中明室的停留時間均有延長的作用；在暗室的停留時間則均有縮短的作用。

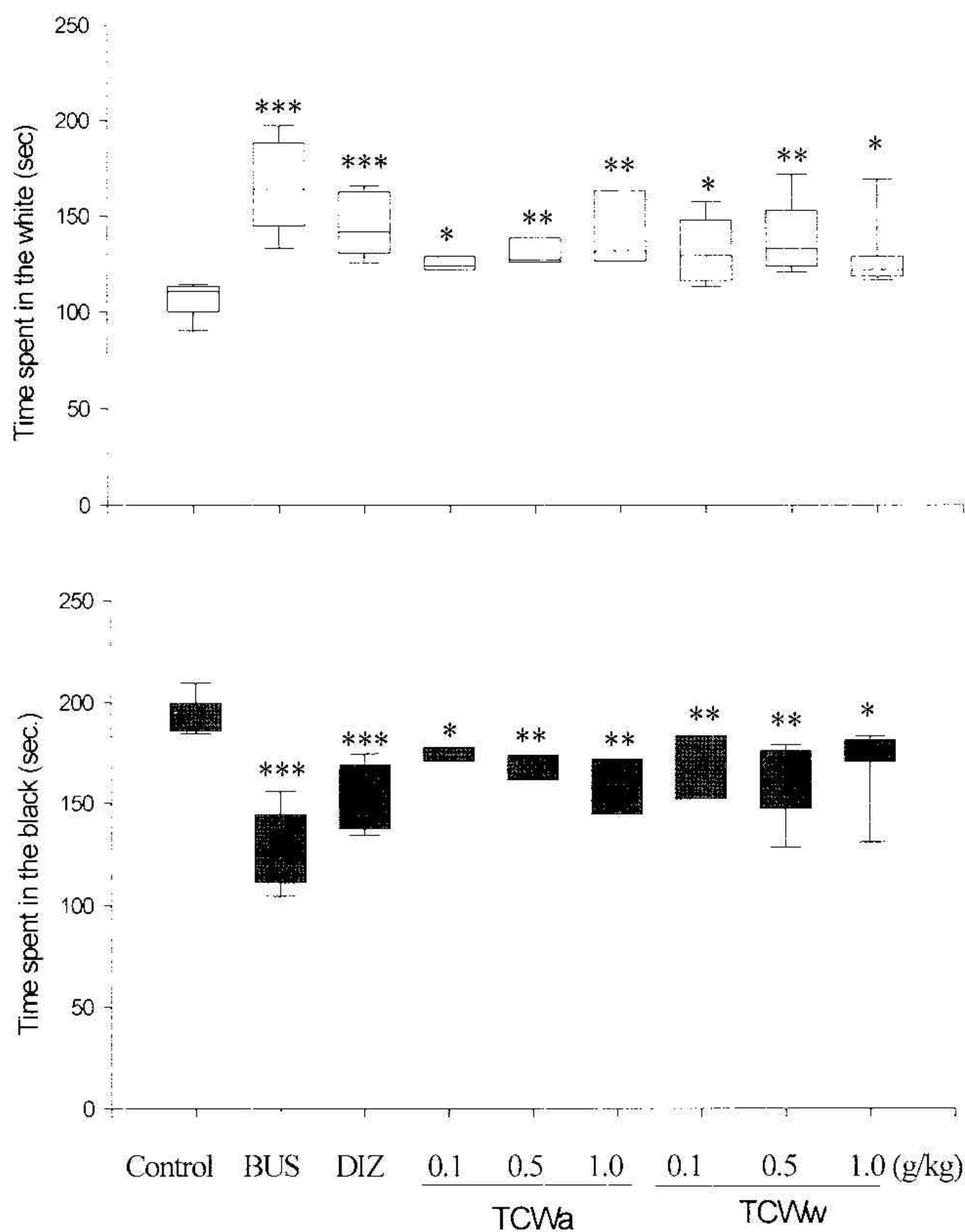


Fig 3. Effects of TCWa and TCWw after 7 days administration on the time spent in the white and black compartments of BWT in mice.
 BUS: buspirone, DIZ: diazepam.
 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group (Kruskal-Wallis H followed by Mann-Whitney U test).

由圖四結果顯示，定志丸水提取物及 95% 乙醇提取物 (0.1-0.5 g/kg) 不論一次給藥或七天給藥對小鼠在黑白室中兩室間的穿梭次數均有延長的作用。

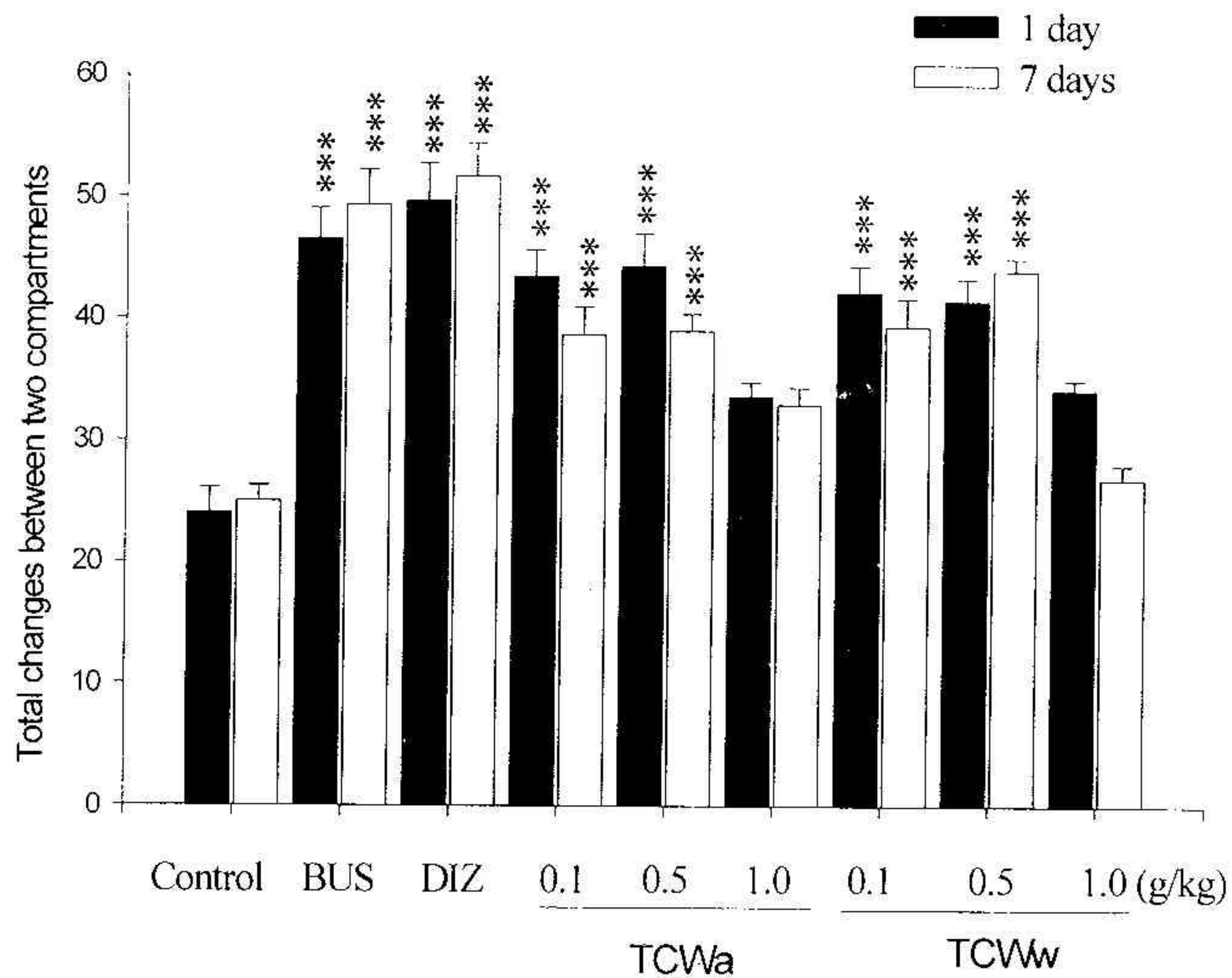


Fig 4. Effects of TCWa and TCWw after 1 day or 7 days administration on the total changes between two compartments of BWT in mice.
BUS: buspirone, DIZ: diazepam. *** $P < 0.001$ as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

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

圖五結果顯示，定志丸 95% 乙醇提取物 (0.1-1.0 g/kg) 及水提取物 (0.1, 0.5 g/kg) 不論一天給藥或七天給藥對小鼠在舉高型十字迷宮中開放臂進入次數均有增加的作用，封閉臂的進入次數則均有減少的作用。

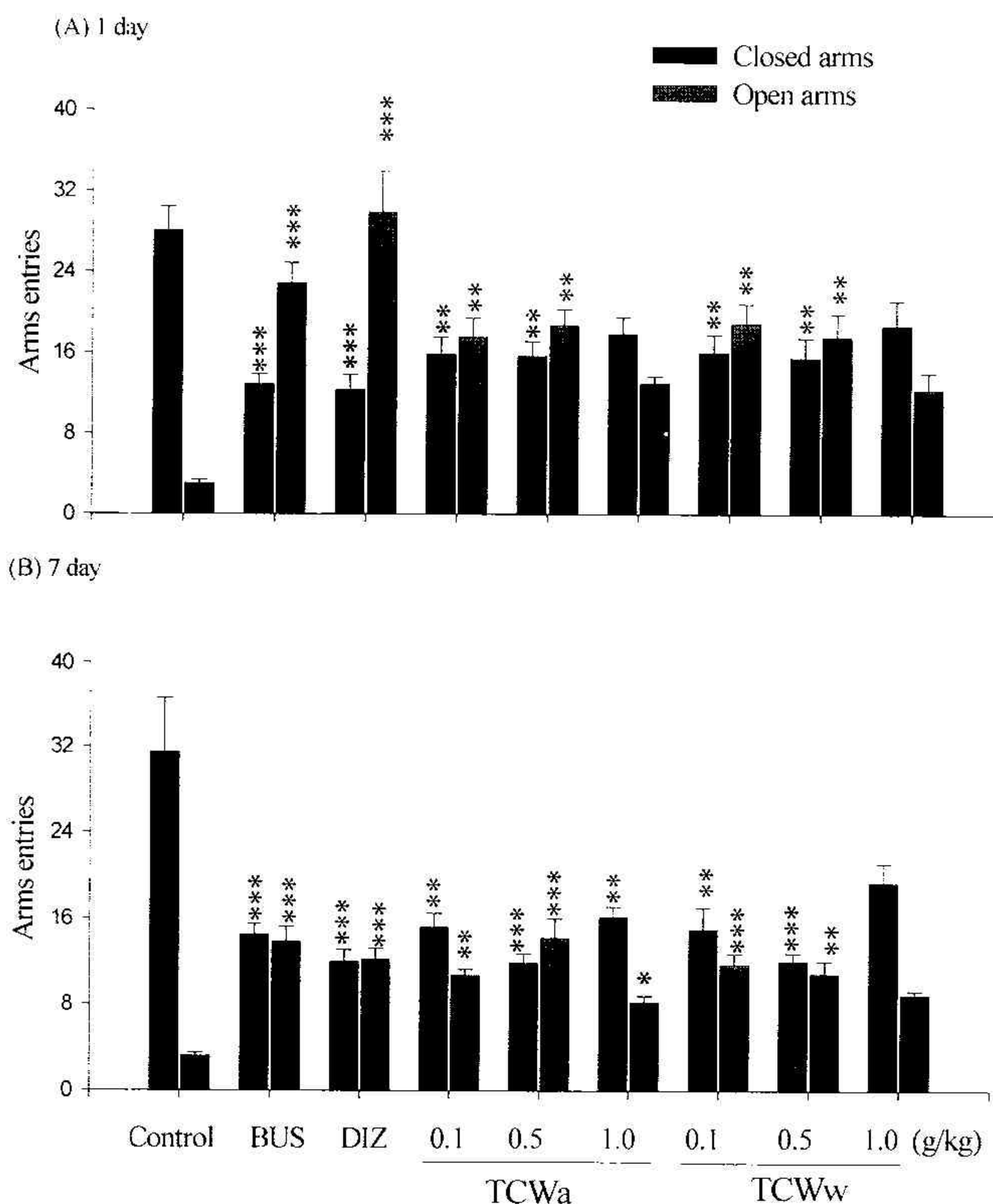


Fig 5. Effects of TCWa and TCWw after (A) 1 day or (B) 7 days administration on the arms entries in the closed arms and the open arms of the EPM during a 5-min test in mice. BUS: buspirone, DIZ: diazepam. *** $P < 0.001$ as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

圖六結果顯示，定志丸 95% 乙醇提取物及水提取物 (0.1- 1.0 g/kg) 不論一天給藥或七天給藥對小鼠在舉高型十字迷宮中開放臂停留時間均有增加的作用，封閉臂的停留時間則均有減少的作用。

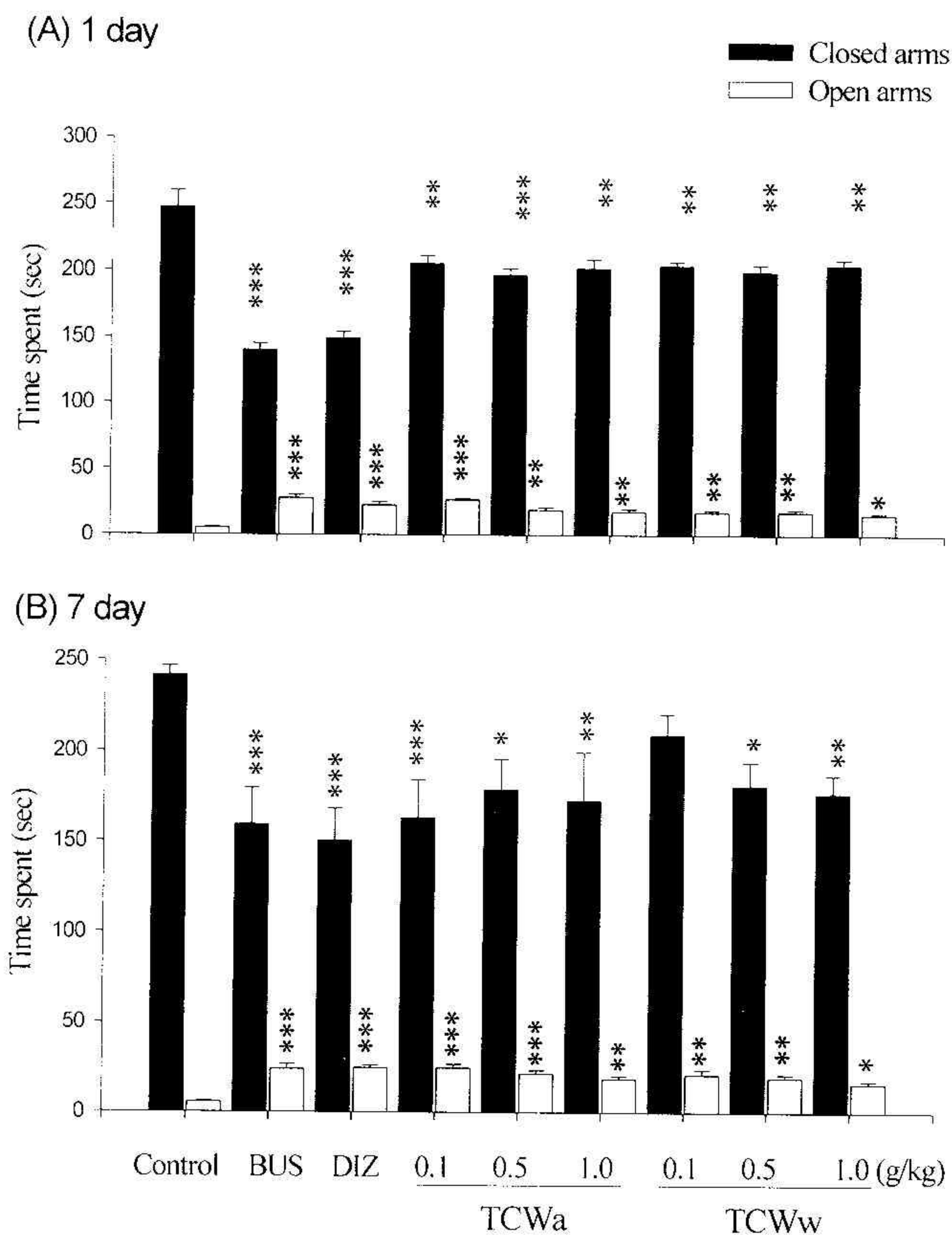


Fig 6. Effects of TCWa and TCWw after (A) 1 day or (B) 7 days administration on the time spent in the closed arms and the open arms of the EPM during a 5-min test in mice. BUS: buspirone, DIZ: diazepam, ***P < 0.001 as compared with the control group (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

三、對 hexobarbital 誘發睡眠時間之影響：

如圖七結果顯示，定志丸 95%乙醇提取物(1.0 g/kg)一天給藥對 hexobarbital 誘發的睡眠時間有延長作用。定志丸水提取物(1.0 g/kg)不論一次或七天給藥對 hexobarbital 誘發的睡眠時間有延長作用。

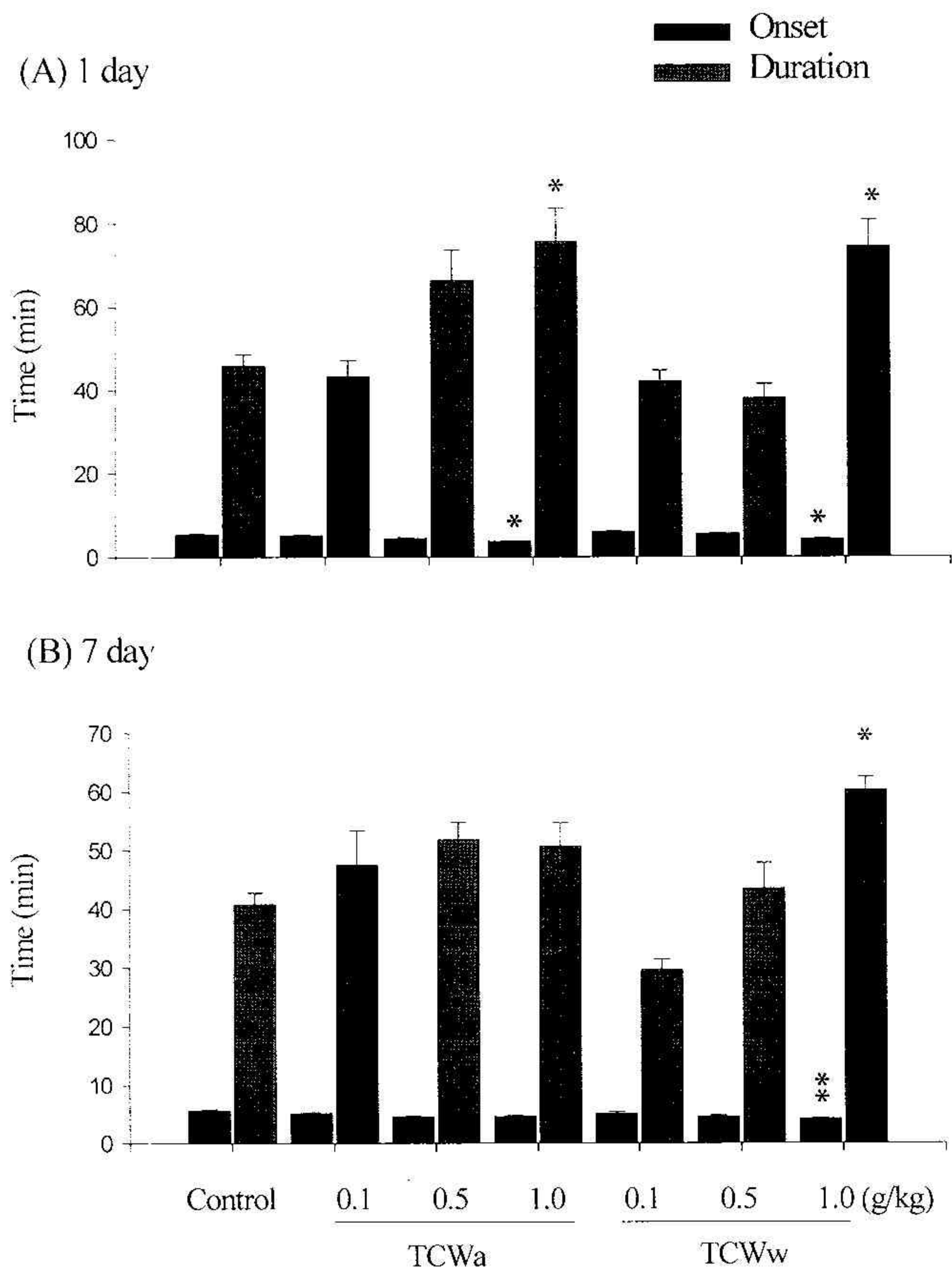


Fig 7. Effects of TCWa and TCWw after (A) 1 day or (B) 7 days administration on the hexobarbital-induced hypnosis in mice. *P < 0.05, as compared with the control group (One-way ANOVA following by Scheffe test).

四、對大鼠運動量之影響：

如圖八結果顯示，定志丸水提取物及 95%乙醇提取物 (1.0 g/kg) 一次給藥對大鼠自發運動量有抑制作用；七天給藥對大鼠自發運動量則無影響。

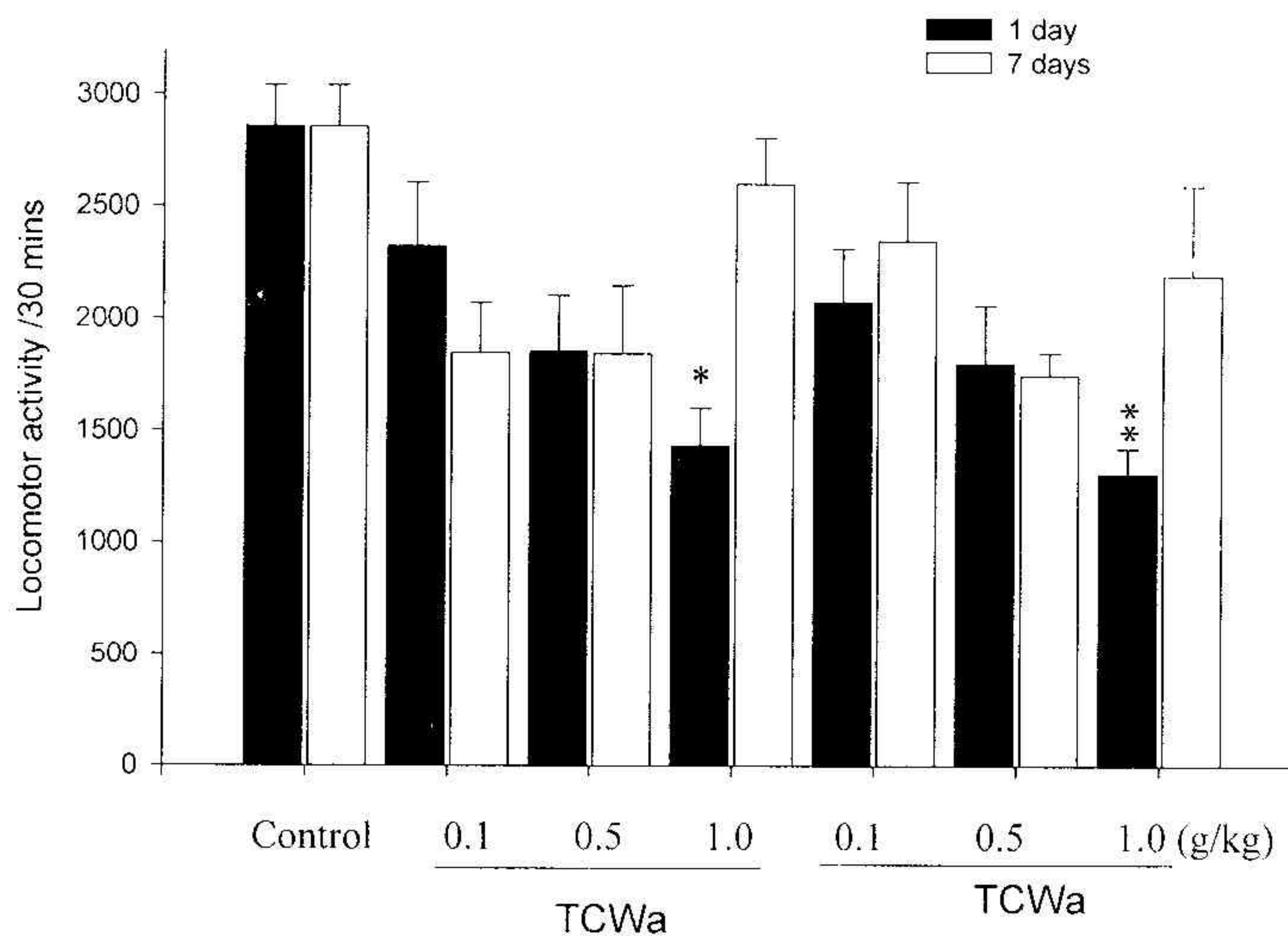


Fig 8. Effects of TCWa and TCWw after 1 day or 7 days administration on the locomotor activity in rats.

* $P < 0.05$ as compared with the control group (One-way ANOVA followed by Scheffe test).

五、對大鼠腦內單胺及其代謝物濃度之影響：

如圖九結果顯示，定志丸 0.1 g/kg 會減少大鼠大腦皮質中 norepinephrine (NE)，dopamine (DA) 及增加 VMA 及 HVA 的濃度；0.5 g/kg 會減少大鼠大腦皮質中 (DA) 及增加 HVA 的濃度。

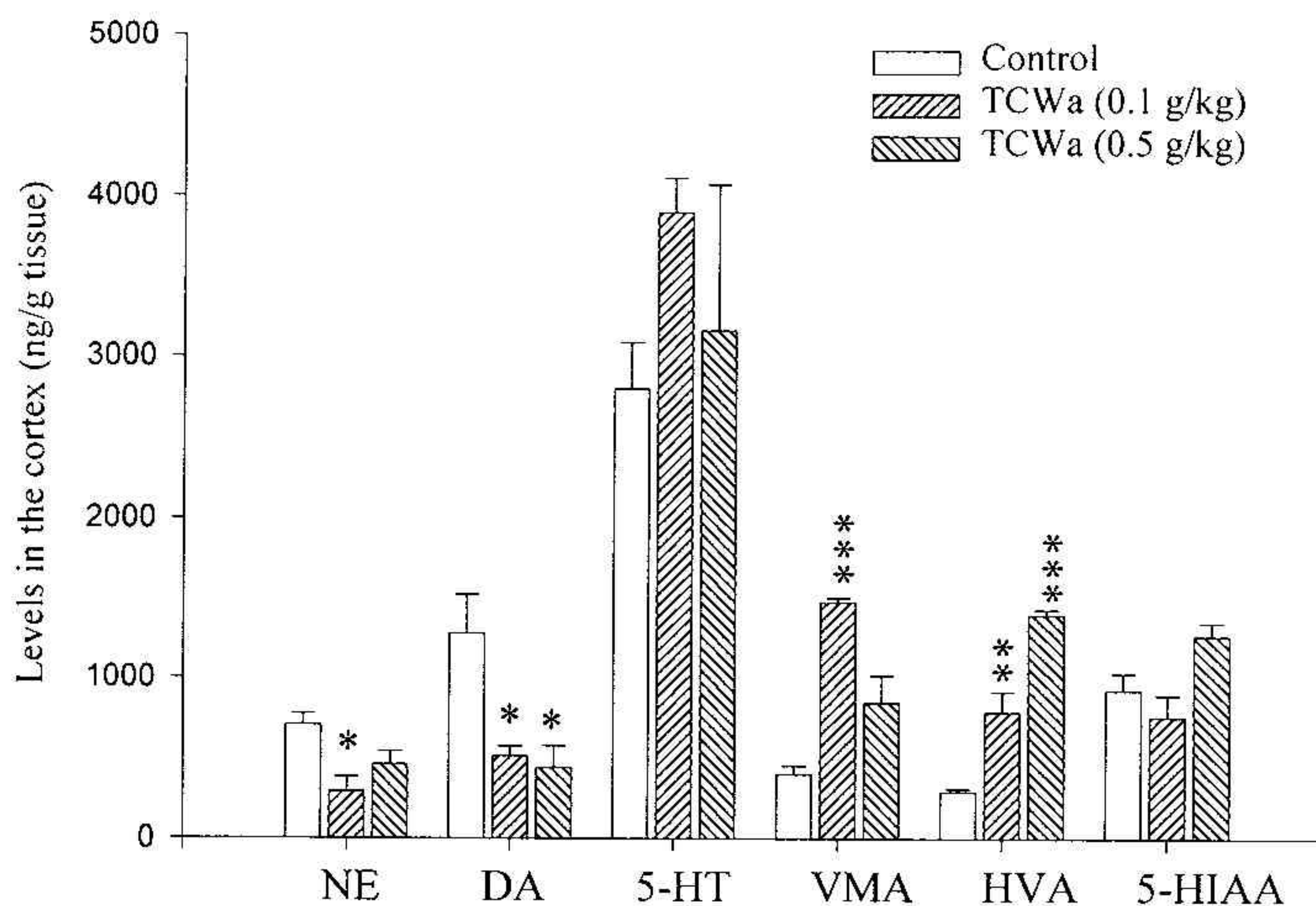


Fig 9. Effects of TCWa on the levels of monoamine and its metabolites in the cortex of rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared with the control group, respectively (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

如圖十結果顯示，定志丸 0.1 g/kg 可減少大鼠腦幹中 dopamine (DA), serotonin (5-HT) 及 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) 濃度及增加 homovallinilmandelic acid (HVA) 的濃度；0.5 g/kg 可減少腦幹中 norepinephrine(NE), DA, 5-HT 及 5-HIAA 濃度及增加 vallinilmandelic acid (VMA) 及 HVA 的濃度。

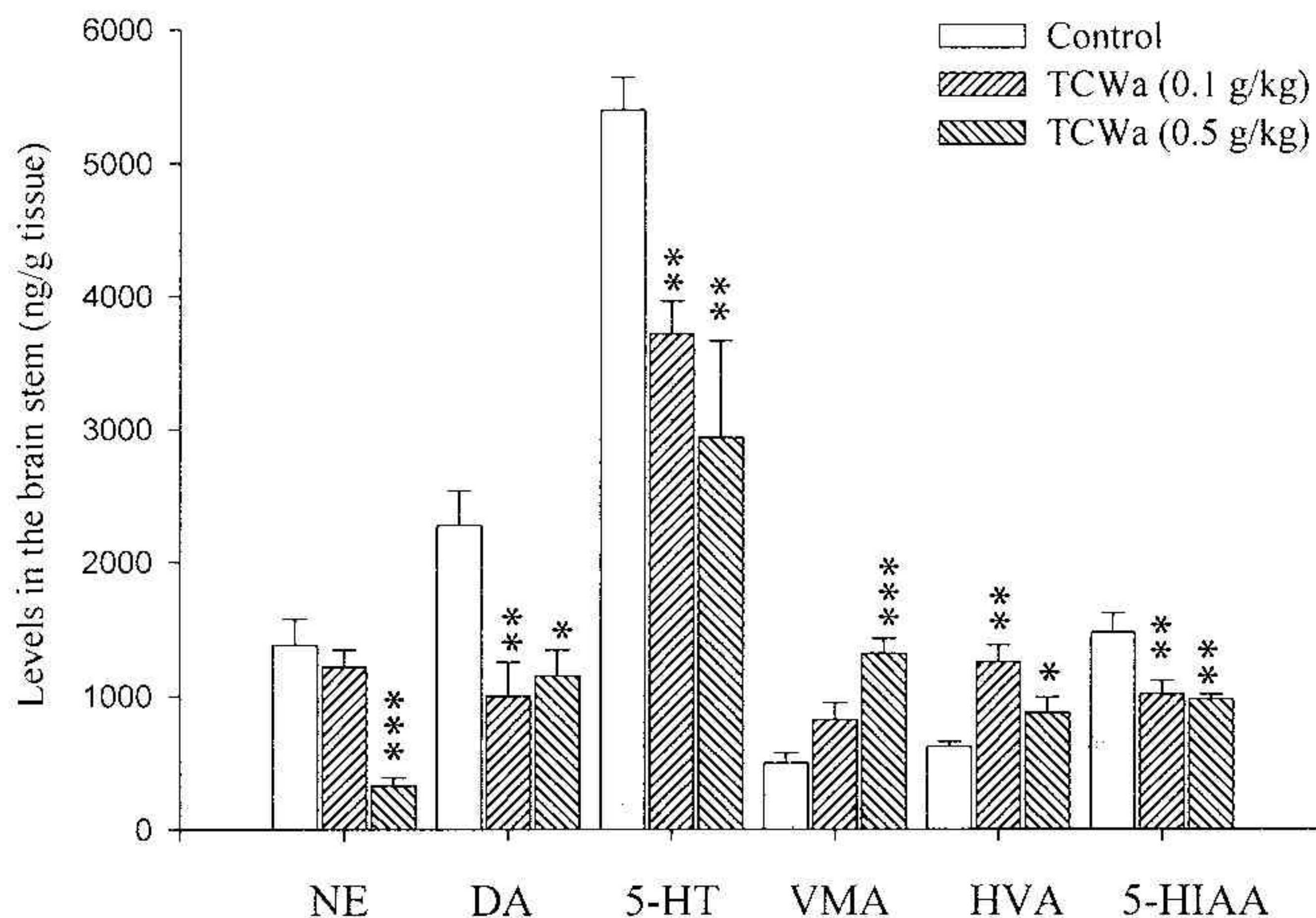


Fig 10. Effects of TCWa on the levels of monoamines and its metabolites in the brain stem of rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared with the control group, respectively (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

六、定志丸乙醇粗萃取物抗焦慮作用機轉

表一結果顯示，定志丸 95% 乙醇抽取物 (0.1 g/kg) 對 PCPA, BUS 及 RIT 誘發小鼠在舉高型十字迷宮中開放臂進入次數及停留時間均有增加的作用，封閉臂的進入次數及停留時間則均有減少的作用；對 5-HTP 誘發小鼠在舉高型十字迷宮中開放臂進入次數減少及停留時間縮短均有增加的作用，封閉臂的進入次數增加及停留時間延長則均有減少的作用；但對 DIZ 誘發之開放臂及封閉臂的進入次數及停留時間則無影響。

Table 1. Effects of TCWa (0.1 g/kg, p. o.) on the 5-HTP-, PCPA-, BUS- and RIT- induces entries and time spent (sec) in the closed arms and open arms of EPM during a 5-min test in mice.

	Closed arms		Open arms	
	Arm entries	Time spent (sec)	Arm entries	Time spent (sec)
Control	31.50± 5.13	247.83± 12.20	3.00± 0.37	5.50± 0.76
TCWa 0.1 g/kg	11.83± 0.60	163.00± 5.70	14.67± 2.68	24.83± 2.06
DIZ	25.17± 1.78	213.00± 6.10	12.17± 0.83	15.83± 2.88
DIZ + TCWa	26.83± 1.90	224.00± 6.15	15.83± 3.16	14.50± 3.28
5-HTP	45.83± 4.11	275.86± 14.20	5.67± 1.38	20.57± 1.25
5-HTP + TCWa	25.57± 2.17**	173.50± 9.40**	13.43± 2.33**	35.00± 4.76*
PCPA	29.00± 2.56	215.86± 14.20	9.50± 0.89	20.57± 1.25
PCPA + TCWa	14.71± 1.32*	153.50± 9.40**	27.43± 3.51***	35.00± 4.76*
BUS	32.33± 3.25	213.50± 5.53	13.83± 2.63	13.00± 1.93
BUS +TCWa	16.83± 1.74*	166.00± 9.28**	24.00± 1.81*	33.67± 2.87***
RIT	26.33± 2.17	218.38± 5.23	11.50± 1.75	16.88± 1.29
RIT + TCWa	14.00± 0.82*	156.63± 11.35***	22.00± 1.84**	36.13± 4.40***

Data represented as mean± SE (n=12). TCWa: ethanolic extract of Ting-Chih-Wan; DIZ: 0.5 mg/kg diazepam; 5-HTP: 50 mg/kg, 5-hydroxytryptophan; PCPA: 200 mg/kg, para-chlorophenylalanine; BUS: 0.05 mg/kg, buspirone; RIT: 0.01 mg/kg, ritanserin. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the 5-HTP, PCPA, BUS and RIT, respectively (Oneway ANOVA followed by Scheffe's test).

肆、討論

定志丸為張子和所創之定志丸，由人參二兩、遠志二兩、茯神二兩、柏子仁二兩及酸棗仁二兩所組成，具有益氣補心、安神定驚之功效，主治心氣不足所致驚悸恍惚、夜臥不安，健忘等症(5)。方中人參用於補脾益肺，生津止渴，安神益智；茯神用於寧心安神；遠志用於寧心安神，祛痰開竅；酸棗仁及柏子仁用於養心安神(6)。

現代藥理學研究證實人參有抑制神經系統之雙相性調節效果，故能安神定志(7)；茯神有鎮靜作用(8)；遠志有催眠及抗驚厥作用(9)；酸棗仁具有鎮靜、催眠作用，鎮痛、抗驚厥、降溫作用(10)。儘管如此，有關定志丸主治心氣不足所致驚悸恍惚、夜臥不安等焦慮症狀之現代藥理學研究尚且闕如。

因此本研究擬使用依據鋸齒類動物厭惡高及開放空間的天性而設計的Elevated plus-maze 及鋸齒類動物害怕紅光及白光的天性而設計之 Light-Dark task 來誘發焦慮，老鼠在此環境下會產生與焦慮有關之 conflict behaviors，是目前最廣泛被使用於研究焦慮的動物模式⁽²³⁾，探討定志丸對這兩實驗模式所誘發之 conflict behaviors 的影響，又現今臨床所用之抗焦慮藥，一般在治療劑量或比治療劑量稍高之劑量下，會有鎮靜安眠之作用，如 diazepam；因此本研究除探討定志丸之抗焦慮作用外，亦擬探討定志丸鎮靜安眠劑量與抗焦慮劑量之關係。並以現今臨床常用的抗焦慮藥物 diazepam 為正對照組，以評估其治療效價。並以現今臨床常用的抗焦慮藥物 diazepam 為正對照組，以評估其治療效價。

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⁽²⁴⁾。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⁽²⁵⁾。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 Onaivi & Martin、Young & Johnson 等之研究中被證實⁽²⁶⁻²⁸⁾。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^(27, 29-31)。本研究之正對照組 diazepam 及 buspirone 之實驗結果均與先前 Crawley 及 Costall 等之研究結果一致。而定志丸水及 95%乙醇提取物於 0.1，0.5 及 1.0 g/kg 劑量下，發現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 diazepam 及 buspirone 一致，顯示定志丸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⁽³²⁾。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⁽³³⁾。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之百分率，當作焦慮作用的指標⁽³³⁻³⁵⁾。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百分率⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾。而 buspirone 在 Dunn、Soderpalm、Lee & Rodgers、Kostowski 及 Luscombe 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百分率，顯示 buspirone 在舉臂式十字形迷宮焦慮模式有抗焦慮作用⁽³⁸⁻⁴⁰⁾。本研究所用之正對照組 diazepam 及 buspirone，均可增加小鼠在開放臂之滯留時間及進入次數百分率，作用結果與上述多位學者之研究結果一致。而定志丸水及 95% 乙醇提取物於 0.1, 0.5 及 1.0 g/kg 劑量下，可增加小鼠在開放臂之滯留時間及進入次數百分率，顯示定志丸應具有抗焦慮之作用。

因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，故進行動物之運動活性測定及 hexobarbital 誘發睡眠實驗，結果發現定志丸水提取物 (1.0 g/kg) 一次及一週給藥及 95% 乙醇提取物 (1.0 g/kg) 一次給藥均具降低大鼠自發運動量及延長 hexobarbital 誘發之睡眠時間，而 95% 乙醇提取物 (1.0 g/kg) 一週給藥對大鼠自發運動量及 hexobarbital 誘發之睡眠時間則無明顯影響，顯示定志丸水提取物 (1.0 g/kg) 無論一次給藥或一週給藥均具有鎮靜作用。顯示定志丸水提取物具鎮靜作用。

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⁽⁴¹⁾。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⁽⁴²⁻⁴⁴⁾；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⁽⁴⁵⁾。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⁽⁴⁶⁾；由於 locus coeruleus 中 NE 的神經元會受到 raphe 神經核的控制⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾，而 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⁾⁽⁵⁰⁾；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⁽⁴²⁻⁴⁵⁾⁽⁵¹⁾。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)探討定志丸乙醇抽取物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，實驗結果顯示定志丸口服給予 0.1 g/kg 劑量下可減少皮質及腦幹內 NE、DA 之濃度及腦幹中 5-HT，並增加皮質及腦幹 HVA 和 VMA 的濃度及腦幹 5-HIAA 之濃度。故可推知定志丸於 0.1 g/kg 劑量下之抗焦慮作用，可能是經由減少腦幹 5-HT 之活性，使 5-HT 對 NE 及 DA 神經元產生去抑制，因而使腦幹之 NE 及 DA turnover rate 增加有關。

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⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾。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⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾，其中以 5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{2A/2C} 及 5-HT₃ 幾類受體與焦慮關係較為密切⁽⁵⁶⁾；因此，本研究併用 5-HTP (5-HT 前驅物質)；PCPA (5-HT 生合成抑制劑)；BUS (5-HT_{1A} 部份致效劑)；RIT (5-HT₂ 拮抗劑) 等 5-HT 受體之致效劑或拮抗劑，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 受體在定志丸抗焦慮作用所扮演之角色，進一步闡明定志丸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)⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾。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⁽⁵⁹⁾。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⁽⁶⁰⁾。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⁽⁶¹⁾；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.) 來和定志丸 95%乙醇抽取物 (0.1 g/kg; p.o.) 併用；實驗結果發現，定志丸 95%乙醇抽取物可增加 PCPA 及 BUS 在開放臂的進入次數及滯留時間，但可縮短封閉臂的進入次數及滯留時間；但可縮短 5-HTP 增加之封閉臂的進入次數及滯留時間，延長所減少之開放臂的進入次數及滯留時間。顯示定志

丸 95%乙醇提取物之抗焦慮作用可能與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⁽⁶²⁾。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.) 與定志丸 95%乙醇提取物 (0.1 g/kg; p. o.) 併用；實驗結果顯示，可增加 RIT 在開放臂的進入次數及滯留時間，並可縮短封閉臂的進入次數及滯留時間。故可推知，定志丸 95%乙醇提取物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，定志丸 95%乙醇提取物及水提取物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，其作用機轉可能與活化突觸前 5-HT_{1A} 受體 及 5-HT₂ 受體之活性，進而減少腦幹中 5-HT 之活性所引起。

伍、結論與建議

本研究以黑白室及舉高型十字迷宮誘發焦慮模式來探討定志丸水及 95%乙醇提取物一次給藥及一週給藥之抗焦慮作用，並以 hexobarbital 誘發睡眠及測定大鼠自發運動量來探討定志丸水及 95%乙醇一次給藥及一週給藥之鎮靜作用，最後並以高效液相層析儀測定大鼠大腦皮質及腦幹中單胺濃度之變化及併用影響 serotonergic system 的藥物及 diazepam 來探討定志丸 95%乙醇提取物抗焦慮作用之機轉。獲得以下結論：

1. 定志丸水及 95%乙醇提取物一次給藥及一週給藥均具有抗焦慮作用。
2. 定志丸水提取物 (1.0 g/kg) 一次給藥及一週給藥均具有鎮靜作用；定志丸 95%乙醇提取物一次給藥於較高劑量 (1.0 g/kg) 下才具有鎮靜作用。
3. 定志丸於 0.1, 0.5 g/kg 下具有抗焦慮作用，而其作用機轉可能與降低腦幹 5-HT 濃度有關。

建議：由本研究結果顯示，定志丸水及 95%乙醇提取物均具有抗焦慮及鎮靜作用，然以水提取物之鎮靜作用較強，以 95%乙醇提取物之抗焦慮作用較好。

陸、參考文獻

1. Robert B. Graham. Physiological psychology. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, A Division of Wadsworth, Inc. 1990, 517-524.
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, 37:231-237.
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, 96:829-836.
 4. Rang HP, Dale MM. Anxiolytic and hypnotic drugs. In: *Pharmacology*, Churchill Livingstone Inc., New York, 1991, 628-641.
 5. 清、汪昂：醫方集解，p. 364，1988；昭人出版社，台中。
 6. 張恩勤主編：中藥學，p369-371, p207-208, p321-323，1988；上海中醫學院出版社，上海。
 7. 王本祥：人參藥理學研究的新進展，*藥學學報* 1980 ;15(5):312-320。
 8. 江蘇新醫學院編：中藥大辭典（下冊），p1599-1560，1993，上海科學技術出版社，上海。
 9. 劉接寶：彩色科學中藥大典，立得出版社 p44-45；1982。
 10. 江蘇新醫學院編：中藥大辭典（下冊），p2534-2536，1993，上海科學技術出版社，上海。
 11. 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.
 12. Young R and Johnson DN. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 1991, 40: 739-743
 13. Montgomery KC. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol* 1955, 48: 254-260.
 14. 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, 24:525-529.
 15. Cole JC, Rodgers RJ. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/ chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem and Behav* 1995, 52: 473-478.
 16. Fujomori H. Porentiation of barbitol hypnosis as an evaluation method for central nervous system depressant. *Psychopharmacology* 1965, 7:374-377.
 17. Itoh T, Murai S, Yoshida Y, Asito H and Ching HC. Effects of

- methamphetamine and morphine on the vertical and horizontal motor activities in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1987, 27: 139-197.
18. 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.
 19. Moser PC. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology* 1989, 99: 48-53.
 20. 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.
 21. Shibuya T, Sato K, Saiafsky B. Simultaneous measurement of biogenic amines and related compounds by high performance liquid chromatography (HPLC). *Int J Clin Pharmacol* 1982, 20:297-301.
 22. Viveros MP, Martin S, Ormazabal MJ, Alfaro MJ, Martin MI. Effects of nimodipine and nifedipine upon behavior and regional brain monoamines in the rat. *Psychopharmacology.* 1996, 127:123-132.
 23. 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.
 24. Young R, Johnson DN. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem & Behav* 1991, 40: 739-743.
 25. 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.
 26. 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.
 27. Lopez-Rubalcava C, Saldivar A, Fernandez-Guasti A. Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics. *Pharmacol Biochem & Behav* 1992, 43: 433-440.
 28. 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 Neuro-Psychopharmacology &*

- Biological Psychiatry 1989, 13:963-976.
29. 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: 829-836.
 30. 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, 1:267-270.
 31. Montgomery KC. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol.* 1955, 48:254-260.
 32. 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: 149-167.
 33. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987, 92: 180-5.
 34. 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: 621-634.
 35. 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: 573-580.
 36. 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.
 37. 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, 169:1-10.
 38. Kostowski W, Dyr W, Krzascik P, Jarbe T, Archer T. 5-Hydroxytryptamine_{1A} receptor agonists in animal models of depression and anxiety. *Pharmacol & Toxicol* 1992, 71: 24-30.
 39. 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: 259-265.
 40. 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, 369-382.
41. 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: 2287-2294.
 42. 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: 355-359.
 43. 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: 545-551.
 44. Stahl SM. Essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications. New York, Cambridge university press, 1996, 167-215.
 45. Golembiowska K. Ipsapirone, a new anxiolytic drug, stimulates catecholamine turnover in various regions of the rat brain. *Pol J Pharmacol Pharm* 1990, 42:143-150.
 46. Segal M. Serotonergic innervation of the locus coeruleus from the dorsal raphe and its action on responses to noxious stimuli. *J Physiol* 1979, 286: 401-415.
 47. 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: 463-464.
 48. Beninger RJ. The role of dopamine in locomotor and learning. *Brain Res Rev* 1983, 6: 173-196.
 49. 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: 463-464.
 50. Beninger RJ. The role of dopamine in locomotor and learning. *Brain Res Rev* 1983, 6: 173-96.
 51. 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.
 52. Gardner CR. Recent developments in 5HT-related pharmacology of animal models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1986, 24: 1479-1485.
 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. 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.
55. Berendsen HHG, Broekkamp CLE. Behavioural evidence for functional interactions between 5-HT-receptor subtypes in rats and mice. *Br J Pharmacol* 1990, 101: 667-673.
56. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994, 46: 157-203.
57. Baldwin D, Rudge S. The role of serotonin in depression and anxiety. *Int Clin Psychopharmacol*. 1995, 9 (Suppl 4) : 41-45.
58. Griebel G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther* 1995, 65: 319-395.
59. Sharp T, Bramwell SR, Grahame-Smith DG. 5-HT_{1A} agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. *Br J Pharmacol* 1989, 96: 283-290.
60. 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, 369-382.
61. 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: 777-785.
62. 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.

