

罗布麻叶提取物通过下丘脑室旁核改善慢性应激小鼠的焦虑样行为

杜桐宇^{1,2,3}, 李群涛^{1,2,3}, 殷洁婷^{1,2}, 殷姜文^{1,2,3}, 李燕^{1,2}

(¹石河子大学第一附属医院麻醉科, 石河子 832000; ²中亚高发疾病防治中心重点实验室, 石河子 832000; ³新疆地方病和民族病重点实验室, 石河子 832000)

摘要 目的 探究罗布麻叶提取物 (AVLE) 对慢性束缚应激 (CRS) 导致的小鼠焦虑样行为的调控作用。方法 将雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组, 每组 5 只: 正常对照组 (等量生理盐水 0.2 ml/10 g)、CRS 模型组 (等量生理盐水 0.2 ml/10 g)、AVLE 治疗组 (AVLE 120 mg/kg) 和阳性对照组 (盐酸帕罗西汀 3 mg/kg)。构建慢性束缚应激的焦虑小鼠模型, 行旷场实验、高架十字迷宫实验评估小鼠 AVLE 治疗后焦虑水平。采用免疫荧光染色检测下丘脑室旁核中五羟色胺受体变化, 通过化学遗传学实验结合腺相关病毒检测下丘脑室旁核催产素能神经元对 AVLE 焦虑调节作用的影响。结果 与造模组相比, AVLE 处理后能够增加小鼠旷场运动总距离和活动时间, 提高小鼠进入中心区域时间 ($P < 0.05$), 增加小鼠高架迷宫的活动路程和时间 ($P < 0.05$)。AVLE 处理后下丘脑室旁核中五羟色胺 1A 受体表达增强, 抑制下丘脑室旁核五羟色胺 1A 受体及催产素能神经元, 小鼠活动水平下降 ($P < 0.05$)。结论 AVLE 能够改善 CRS 小鼠模型的焦虑状态, 提高小鼠活动能力, 其作用与下丘脑室旁核五羟色胺受体及催产素能神经元有关。

关键词 罗布麻叶; 焦虑; 下丘脑; 五羟色胺受体; 神经元; 慢性束缚应激

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2072-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.002

根据世界卫生组织数据显示, 目前全球人口中有 4% 的人患有焦虑症^[1]。由于压力应激等各种因素, 焦虑症已经成为最常见的一种精神障碍疾病。焦虑症会导致抑郁症和药物使用风险增加, 危及个体精神与行为健康^[2-3]。目前焦虑障碍发病机制尚不完全明晰, 可能与脑内神经生理结构如海马、杏仁核、下丘脑等有关。五羟色胺 (5-hydroxytryptophan, 5-HT) 是与心境状态有关的神经递质, 通过作用于特异的 5-HT 受体实现多样的生物学作用^[4], 其中 5-HT_{1A} 受体与焦虑症密切相关^[5], 且下丘脑室旁核催产素能神经元参与焦虑调节, 并受到五羟色胺系统广泛支配^[6]。罗布麻叶 (apocynum venetum leaves, AVL) 具有广泛的药理活性, 能够降血压、降脂、抗氧化, 具有清热平肝及改善睡眠的功效^[7-8]。为了研究罗布麻叶提取物 (ALV extraction, ALVE) 对焦虑小鼠的影响, 本研究采用慢性束缚应激

(chronic restraint stress, CRS) 诱导焦虑模型, 通过观察 ALVE 对焦虑模型小鼠行为学及 5-HT 受体的影响, 并基于下丘脑室旁核 5-HT 受体及催产素能神经元来进一步探讨其发挥抗焦虑作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 ALVE (货号: HYS20230105) 购自陕西海益斯生物科技有限公司; 盐酸帕罗西汀片 (货号: H20031106) 购自浙江华海药业股份有限公司; 异氟烷 (货号: R510-22) 购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司; 5-HT_{1A} 受体 (货号: ab85615) 抗体购自美国 Abcam 公司; 山羊抗兔 IgG 二抗 (货号: ab150077)、多聚甲醛通用型组织固定液 (货号: BL539A) 购自 Biosharp 生物技术有限公司; WAY100635 (货号: HY-10349) 购自美国 MCE 公司; 标记催产素能神经元 (oxytocin, OXT) 的腺相关抑制病毒 (adeno-associated virus, AAV) rAAV2/9-mOXT-CRE (货号: PT-6086) 与 rAAV2/9-EF1 α -DIO-hM4Di-mCherry (货号: PT-0043) 购自武汉枢密科技有限公司; 氯氮平 N-氧化物 (clozapine N-oxide, CNO) (货号: A3317) 购自美国 ApexBio 公司; 微量注射泵购自深圳瑞沃德生命科技有限公司 (型号: KDS130);

2024-11-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82360242, 81860209)

作者简介: 杜桐宇, 女, 硕士研究生;

李燕, 女, 主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: 1249623003@qq.com

微量套管购自深圳瑞沃德生命科技有限公司(型号:ID26G);Labmaze 动物行为学分析系统 V3.0(型号:ZS-LabMaze-III,北京众实迪创科技发展有限公司);高速离心机(型号:S1010E,北京 Scilogex 公司);激光共聚焦显微镜(型号:LSM880,德国 CarlZeiss 公司);动物麻醉机(型号:R500,深圳瑞沃德生命科技有限公司);数显小鼠脑立体定位仪(型号:ZS-FD,北京众实迪创科技发展有限公司)。

1.2 实验动物 实验使用 SPF 级雄性 C57BL/6J(8~12 周龄)野生型小鼠,体质量 20~24 g,共 40 只,购自河南斯克贝斯生物技术有限公司。实验小鼠饲养于石河子大学实验动物中心,维持环境恒温(24±1)℃、恒湿(30%~55%)、昼夜周期(12 h 光暗周期)。所有实验程序都由石河子大学实验动物伦理委员会批准(伦理学批号:No. A2022-179-01),实验均严格按照动物实验伦理委员会的规程进行,最大限度减少实验动物痛苦,严格遵守石河子大学动物实验要求。

1.3 焦虑小鼠造模 采用常见的慢性束缚应激法制备焦虑小鼠模型:将小鼠放入以 50 ml 离心管制成的束缚筒中(管壁带有气孔),每日束缚 2 h(10:00 至 12:00),持续 21 d。正常对照组小鼠每日不束缚,每日抚摸 3 min,除正常对照组外其余各组小鼠均束缚 21 d。

1.4 实验分组和处理 采用随机数字法将 C57BL/6J 小鼠分为 4 组,即正常对照组、CRS 模型组、罗布麻叶处理组和帕罗西汀(阳性对照)组,每组 5 只。从造模第 12 天开始,每天束缚结束后,给药组给予相应剂量药物,空白组和模型组给予等量生理盐水,每天 1 次,连续 10 d。具体如下:① 正常对照组:给予生理盐水灌胃处理。② CRS 模型组:焦虑造模后给予生理盐水灌胃处理。③ 罗布麻叶处理组:焦虑造模后给予 AVLE(120 mg/kg)灌胃处理。④ 阳性对照组:焦虑造模后盐酸帕罗西汀灌胃(3 mg/kg)处理。另将 C57BL/6J 小鼠分为 4 组,每组 5 只,探究 AVLE 的作用机制:⑤ AVLE 对照组:焦虑造模前 5 d 侧脑室埋置套管,给予 AVLE(120 mg/kg)灌胃处理。⑥ WAY100635 处理组:焦虑造模前 5 d 侧脑室埋置套管,AVLE(120 mg/kg)灌胃处理,5-HT_{1A} 受体抑制剂 WAY100635 于末次治疗给药后经侧脑室给予,剂量为 0.1 mg/kg。⑦ OXT + WAY100635 处理组:焦虑造模前 5 d 注射 AAV 及侧脑室埋置套管,给予 AVLE(120 mg/kg)灌胃及侧脑室给予受体抑制剂 WAY100635(0.1 mg/kg)。⑧ OXT 处理组:

焦虑造模前 5 d 注射 AAV 及侧脑室埋置套管,给予 AVLE(120 mg/kg)灌胃处理。

1.5 化学遗传学实验 化学遗传学实验即利用改造后的 G 蛋白偶联受体由氯氮平 N-氧化物(CNO)激活。通过将化学遗传学抑制病毒 rAAV2/9-EF1 α -DIO-hM4Di-mCherry 与 rAAV2/9-mOXT-CRE 混合注入 C57BL/6J 小鼠的目标脑区,待病毒稳定转染表达后,开始测定行为学。CNO 于转染后、行为学测试前 1 h 腹腔注射,剂量为 1 mg/kg。

1.6 脑立体定位注射 侧脑室埋置套管给药:将小鼠以异氟烷麻醉,固定小鼠头部于脑立体定位仪上,依照小鼠侧脑室坐标(前囟向后 1.5 mm,向右旁开 1.1 mm,深度 4.5 mm),将微量套管埋置后固定。以同样的方法将抑制性 AAV 病毒注射至下丘脑室旁核(前后: -0.55 mm,旁开: ±0.2 mm,深度: -4.5 mm),使用带有玻璃微电极的微量注射针缓慢注入 AAV 病毒 150 nl,注射完毕针尖停留 10 min 后缓慢移除。

1.7 旷场实验 小鼠旷场(50 cm×50 cm)分为周围和中央两个区域,中央区为 30 cm×30 cm 的小正方形。测试前,允许小鼠适应房间 1 h。实验开始时,将小鼠置于旷场的中央,记录小鼠活动距离、进入中央区域的次数及停留时间,共 5 min。每次实验后用 75%乙醇溶液清洁旷场箱,避免干扰下一只小鼠的实验。

1.8 高架十字迷宫实验 高架十字迷宫由 2 个开臂(30 cm×5 cm)和 2 个闭臂(30 cm×5 cm×15 cm)组成,相交部分为中央平台(5 cm×5 cm),距离地面 50 cm。实验开始时,将小鼠置于中央平台,面向开臂,记录小鼠活动距离、进入开臂和闭臂的次数及在各臂停留的时间,共 5 min。每次实验后用 75%乙醇清理高架迷宫,避免干扰下一只小鼠实验。

1.9 免疫荧光染色 将小鼠脑组织灌注取出后制备冰冻切片,用 PBS 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,清洗脑片上的杂质。室温下用 10%牛血清白蛋白封闭 1 h,用 5-HT_{1A} 受体一抗(1:500)于 4℃冰箱孵育 16 h。用 PBS 缓慢洗涤 3 次,加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:500)并放置于 37℃水浴锅中孵育 2 h。PBS 清洗二抗后滴加 DAPI 染核,封片后用荧光显微镜成像观察,使用 ImageJ 软件对荧光强度进行测定。

1.10 统计学处理 所有统计分析均使用 GraphPad Prism 软件进行。数据进行正态检验后,采用 *t* 检验以及单因素方差分析,多重比较采用 Tukey 法。所有数据均用平均值±标准误表示,*P* < 0.05 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 AVLE 对于慢性应激小鼠焦虑水平的影响

2.1.1 AVLE 对于小鼠旷场活动的影响 小鼠旷场实验结果显示,与造模组相比,经 AVLE 处理后的小鼠在旷场中总路程上升 $[(4.33 \pm 0.56) \text{ m vs } (12.37 \pm 1.02) \text{ m}, P < 0.001]$, 活动时间增加 $[(23.98 \pm 2.15) \text{ s vs } (51.67 \pm 7.85) \text{ s}, P < 0.01]$, 中心区域时间增加 $[(10.91 \pm 5.86) \text{ s vs } (50.30 \pm 10.75) \text{ s}, P < 0.01]$, 进入中心区域次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。阳性对照组(帕罗西汀组)的小鼠在旷场中总路程 $[(18.51 \pm 0.77) \text{ m}, P < 0.001]$ 、活动时间 $[(76.45 \pm 1.38) \text{ s}, P < 0.001]$ 、中心区域的时间 $[(55.17 \pm 7.73) \text{ s}, P < 0.01]$ 和进入中心区域的次数 $(5.40 \pm 0.74, P < 0.01)$ 均增加, 总体治疗效果较佳, 见图 1。以上结果表明, AVLE 及药物帕罗西汀均可以改善焦虑水平。

2.1.2 AVLE 对于小鼠高架十字迷宫活动的影响

小鼠高架十字迷宫实验结果显示,与造模组相比,经 AVLE 处理后的小鼠在高架十字迷宫中活动总路程 $[(2.33 \pm 0.84) \text{ m vs } (6.48 \pm 0.40) \text{ m}, P < 0.05]$ 和活动时间 $[(19.90 \pm 5.98) \% \text{ vs } (53.02 \pm 4.41) \% , P < 0.01]$ 增加, 进入开放臂的时间及次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。阳性对照组

(帕罗西汀组)的小鼠在高架十字迷宫中活动总路程 $[(8.23 \pm 1.11) \text{ m}, P < 0.01]$ 和活动时间 $[(54.88 \pm 5.08) \text{ s}, P < 0.001]$ 增加, 进入开放臂的时间及次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。由此可见, AVLE 及药物帕罗西汀均可以改善焦虑水平。

2.2 AVLE 通过小鼠下丘脑室旁核途径改善焦虑水平

2.2.1 AVLE 促进下丘脑室旁核 5-HT1A 受体的表达 为了进一步探究 AVLE 改善焦虑水平的机制, 使用组织免疫荧光检测下丘脑室旁核 5-HT1A 受体表达, 结果如图 3 所示, 与造模组相比, 在 AVLE 处理后, 小鼠下丘脑室旁核 5-HT1A 受体表达增加, 荧光强度增加 $(11.34 \pm 1.69 \text{ vs } 24.01 \pm 3.98, P < 0.05)$, 提示下丘脑室旁核 5-HT1A 受体可能参与 AVLE 改善焦虑过程。

2.2.2 下丘脑室旁核 OXT 化学遗传学病毒表达 鉴于下丘脑室旁核催产素能神经元与焦虑水平相关且受 5-HT1A 受体的调控, 采用化学遗传学腺相关病毒特异性标记与操纵下丘脑室旁核催产素能神经元, 化学遗传学腺相关病毒序列见图 4。在荧光显微镜下观察显示, 下丘脑室旁核可见 AAV 病毒显示的红色荧光, 细胞核呈蓝色, 提示病毒充分转染, 见图 4。

2.2.3 AVLE 对小鼠旷场活动调节受下丘脑室旁核影响 小鼠旷场实验结果显示, 与 AVLE 处理组

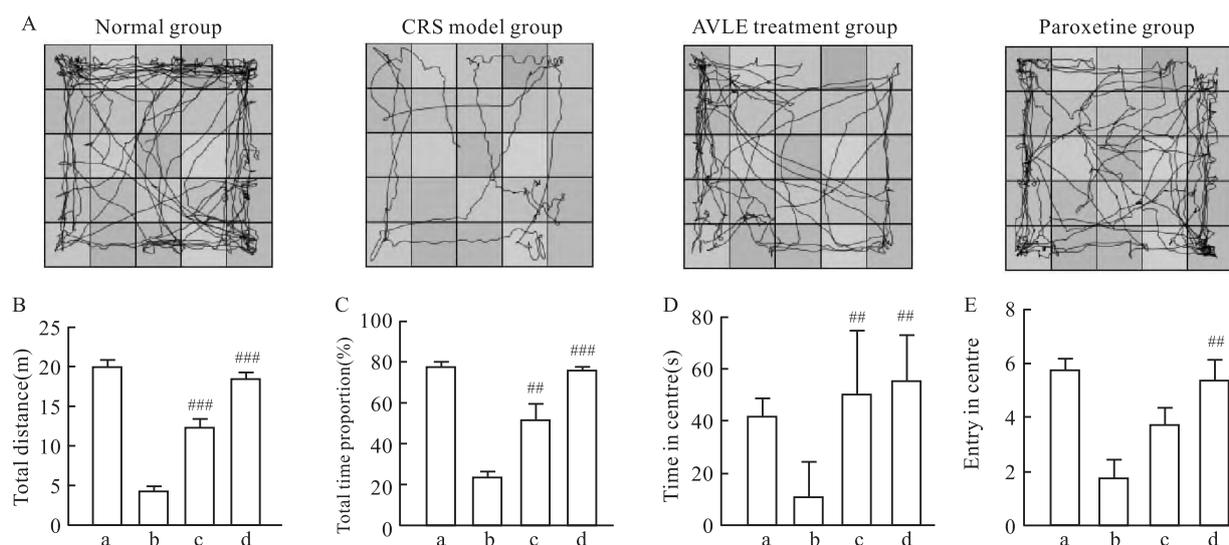


图 1 各组旷场示意图及比较

Fig. 1 Schematic diagram and comparison of open field test

A: Trajectory diagram of open field experiments for each group; B-E: Statistical charts of each group; a: Normal group; b: CRS model group; c: AVLE treatment group; d: Paroxetine (positive control) group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs CRS model group.

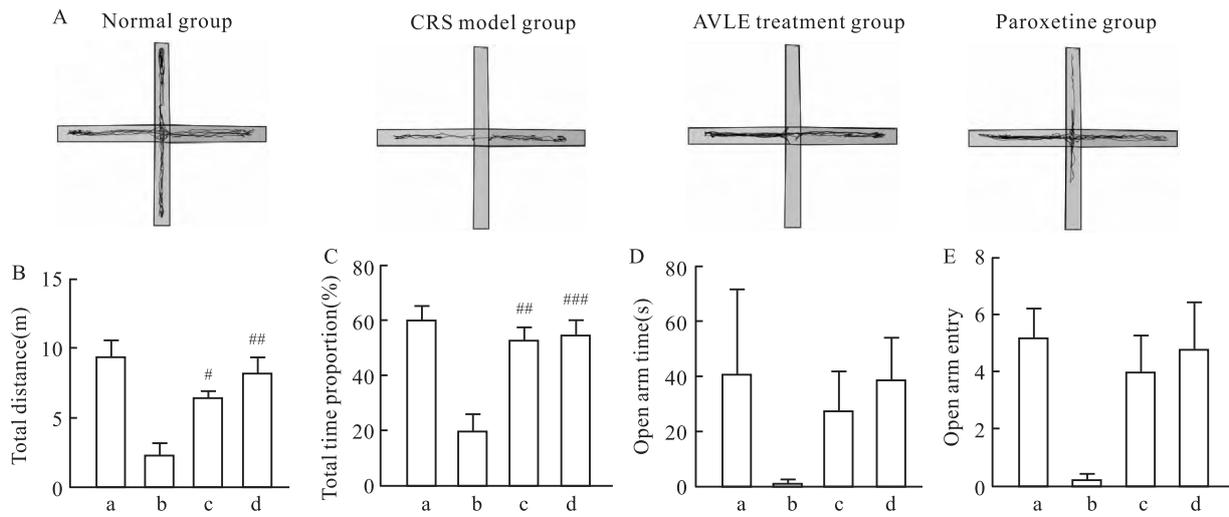


图2 各组高架十字迷宫示意图及比较

Fig. 2 Schematic diagram and comparison of elevated plus maze test

A: Trajectory diagram of elevated cross maze experiment for each group; B - E: Statistical charts of each group; a: Normal group; b: CRS model group; c: AVLE treatment group; d: Paroxetine (positive control) group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs CRS model group.

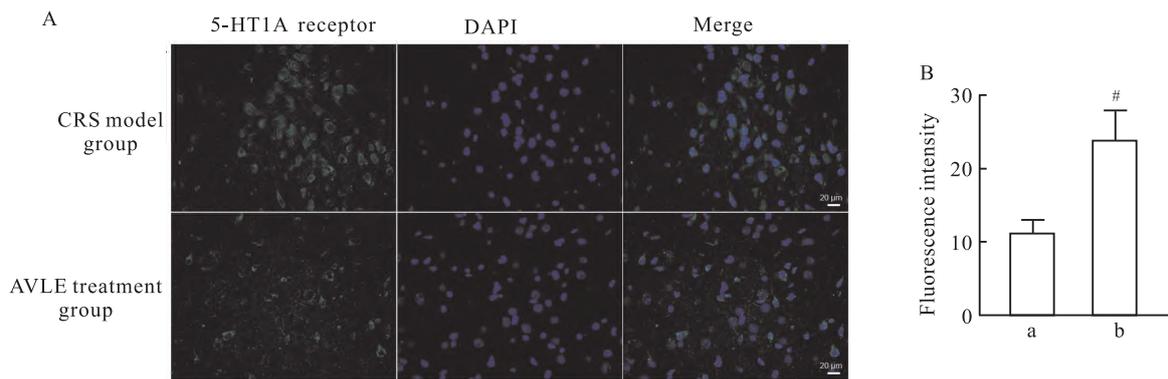


图3 免疫荧光法检测两组 5-HT1A 受体表达

Fig. 3 Immunofluorescence detection of 5-HT1A receptor expression in two groups

A: 5-HT1A receptor immunofluorescence images $\times 400$; B: 5-HT1A receptor fluorescence intensity analysis; a: CRS model group; b: AVLE treatment group; $^{\#}P < 0.05$ vs CRS model group.

相比, WAY100635 处理组旷场总路程下降 $[(17.15 \pm 0.46) \text{ m vs } (13.41 \pm 0.38) \text{ m}, P < 0.01]$, 活动时间减少 $[(72.74 \pm 1.27)\% \text{ vs } (57.53 \pm 5.78)\%, P < 0.05]$, 进入中心区域时间及次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。与 AVLE 处理组相比, OXT + WAY100635 处理组旷场总路程下降 $[(6.32 \pm 0.71) \text{ m}, P < 0.001]$, 活动时间 $[(23.29 \pm 2.90)\%, P < 0.001]$ 、中心区域时间 $[(11.14 \pm 1.91) \text{ s}, P < 0.05]$ 和进入中心区域次数 $(1.40 \pm 0.24, P < 0.01)$ 减少; OXT 处理组旷场总路程下降 $[(6.54 \pm 0.59) \text{ s}, P < 0.001]$, 活动时间减少 $[(27.82 \pm 2.89)\%, P < 0.001]$, 进入中心区域次数减少 $(2.00 \pm 0.31, P < 0.05)$, 见图 5。这表明, 下丘

脑室旁核 5-HT1A 受体及催产素能神经元参与 AVLE 对焦虑水平的调节。

2.2.4 AVLE 对小鼠高架迷宫活动调节受下丘脑室旁核影响 小鼠高架十字迷宫实验结果显示, 与 AVLE 处理组相比, WAY100635 组小鼠在进入开放臂的时间略有下降, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 6。OXT + WAY100635 处理组与 OXT 处理组高架十字迷宫活动总路程均有下降 $[(7.81 \pm 0.94) \text{ m vs } (4.41 \pm 0.36) \text{ m}, (7.81 \pm 0.94) \text{ m vs } (4.83 \pm 0.32) \text{ m}, P < 0.05]$, 但进入开放臂时间及次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 6A。提示下丘脑室旁核 5-HT1A 受体及催产素能神经元参与 AVLE 对焦虑水平的调节。

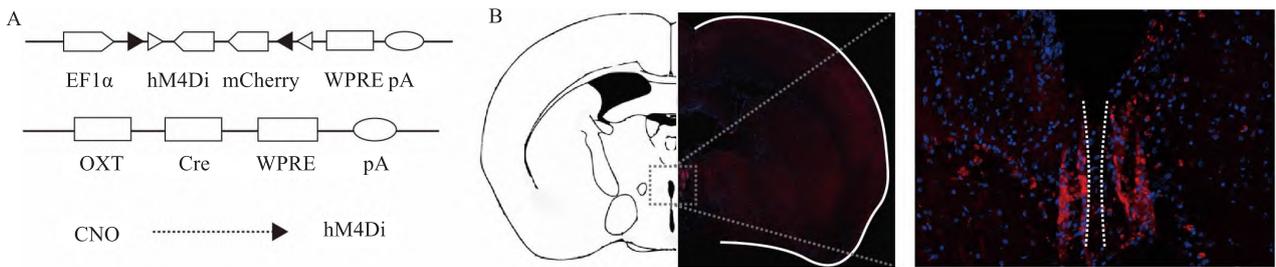


图4 下丘脑室旁核 OXT 化学遗传学病毒表达

Fig. 4 Chemogenetics virus expression of OXT in the paraventricular nucleus of the hypothalamus

A: Chemogenetics of adenovirus sequences; B: Adeno associated virus transfection images $\times 10$ (left), $\times 200$ (right).

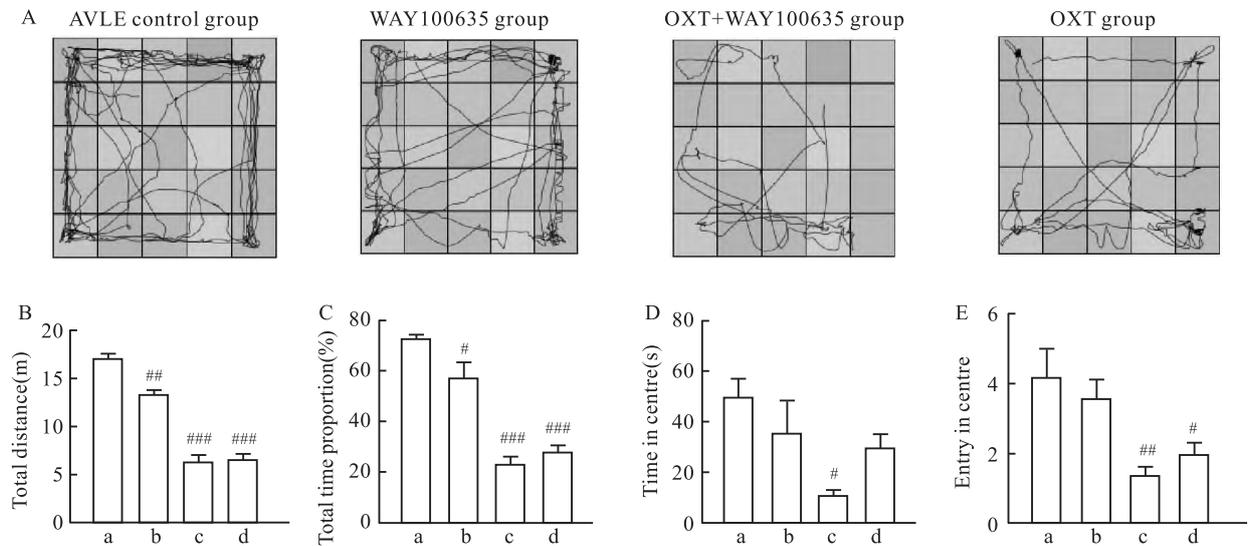


图5 各组旷场示意图及比较

Fig. 5 Schematic diagram and comparison of open field test

A: Trajectory diagram of open field experiments for each group; B - E: Statistical charts of each group; a: AVLE control group; b: WAY100635 group; c: OXT + WAY100635 group; d: OXT group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs AVLE control group.

3 讨论

焦虑症是最常见的一组精神障碍,核心特征包括过度焦虑或感知到持续和有害的威胁。焦虑症涉及对危险做出反应的大脑回路的功能障碍,受遗传、环境等多种因素的影响。严重的焦虑症往往意味着更危急的症状、更大的临床负担和治疗难度^[9]。通过及时、准确且适当的治疗管理,可以最大限度地减少由焦虑症造成的巨大疾病负担。精神活性药物有助于患者的治疗,但常产生耐药性。因此,未来应该寻求更平缓的、更有效的持续性的治疗方法。

近年来,研究^[10]表明天然产物可用于调节焦虑情绪及状态以治疗疾病。天然产物罗布麻具有清热平肝、抗氧化、改善睡眠及抗抑郁的功效。本研究通过旷场和高架十字迷宫实验进一步证明了 AVL 在抗焦虑方面的作用,研究结果表明天然产物 AVLE

能够改善 CRS 小鼠模型的焦虑状态,能在应激状态时减少其焦虑静止,提高小鼠活动能力并增加其探索能力。研究^[11]已经证明了 ALV 在情绪治疗中的有益作用,AVLE 可促进抑郁焦虑状态的改善,然而,ALV 发挥功能的机制需要进一步研究。而 5-HT 作为一种单胺类神经递质,在抑郁、焦虑和躁狂等情绪方面发挥着重要作用,5-HT 的功能障碍可导致应激反应中内环境的不稳定^[12]。其中 5-HT1A 受体在调节情绪和焦虑水平方面起关键作用,据研究^[13],应激暴露后 5-HT1A 受体表达逐渐增加,达到高峰后下降。本研究中,AVLE 治疗后下丘脑室旁核 5-HT1A 受体表达增强,差异有统计学意义,这表明 AVLE 可能通过下丘脑室旁核 5-HT1A 受体发挥缓解焦虑的作用。

下丘脑室旁核与压力情绪密切相关,遗传学激活来自下丘脑室旁核催产素能神经元末梢能够逆转

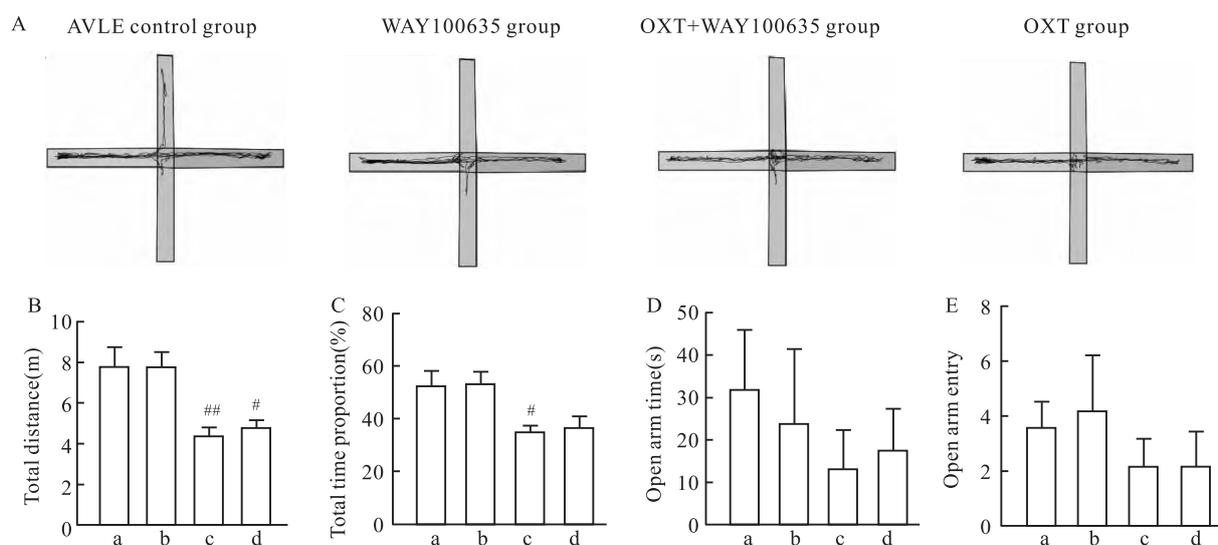


图6 各组高架十字迷宫示意图及比较

Fig. 6 Schematic diagram and comparison of elevated plus maze test

A: Trajectory diagram of elevated cross maze experiment for each group; B - E: Statistical charts of each group; a: AVLE control group; b: WAY100635 group; c: OXT + WAY100635 group; d: OXT group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs AVLE control group.

焦虑情绪^[14],且其受 5-HT_{1A} 受体的广泛调节。因此 AVLE 可能通过 5-HT_{1A} 受体介导调控下丘脑室旁核催产素能神经元,进而改善缓解慢性应激状态引起的焦虑情绪。本研究通过侧脑室注射 5-HT_{1A} 受体抑制剂发现,在受体抑制后 AVLE 的治疗效果在活动距离及时间上出现差异。当同时抑制 5-HT_{1A} 受体与下丘脑室旁核催产素能神经元后,AVLE 的治疗效果在中心区域的探索上出现了改变,且相对于下丘脑室旁核催产素能神经元抑制,其活动与探索能力的下降较大,这表明 AVLE 可能通过 5-HT_{1A} 受体介导调控多种神经元,其中下丘脑室旁核催产素能神经元在 AVLE 改善焦虑状态上发挥重要作用。此外,在 5-HT_{1A} 受体抑制后,其探索能力仅略有改变,这可能是由于下丘脑室旁核包含多种神经元种类,其中促肾上腺皮质激素释放激素神经元是自主神经和行为反应的关键神经群,来协调与应激相关的行为^[15]。因此,对于该核团中不同种类神经元仍需进一步探究。

总而言之,这些发现揭示了天然中药 AVLE 能够有效改善焦虑状态,在 AVLE 治疗后下丘脑室旁核 5-HT_{1A} 受体表达增强。AVLE 作用于 5-HT 系统,并且可能通过介导 5-HT_{1A} 受体调控下丘脑室旁核神经元,进而通过下丘脑室旁核催产素能神经元整合压力和焦虑信号来改善焦虑水平。因此使用 AVLE 治疗干预后可通过 5-HT 系统改善缓解慢性

应激状态引起的焦虑情绪,提供治疗压力及焦虑相关疾病的新方法。

参考文献

- [1] Javaid S F, Hashim I J, Hashim M J, et al. Epidemiology of anxiety disorders: global burden and sociodemographic associations [J]. Middle East Curr Psychiatry, 2023, 30(1): 44. doi:10.1186/s43045-023-00315-3.
- [2] Konnopka A, König H. Economic burden of anxiety disorders: a systematic review and meta-analysis [J]. Pharmacoeconomics, 2020, 38(1): 25-37. doi:10.1007/s40273-019-00849-7.
- [3] Kandola A, Stubbs B. Exercise and anxiety [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1228:345-52. doi:10.1007/978-981-15-1792-1_23.
- [4] Barnes N M, Ahern G P, Becamel C, et al. International union of basic and clinical pharmacology. CX. classification of receptors for 5-hydroxytryptamine; pharmacology and function [J]. Pharmacol Rev, 2021, 73(1): 310-520. doi:10.1124/pr.118.015552.
- [5] Hernandez P M, Batistela M F, Vilela-Costa H H, et al. Role of 5-HT_{1A} receptors in the ventral hippocampus in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors in rats [J]. Behav Brain Res, 2021, 408: 113296. doi:10.1016/j.bbr.2021.113296.
- [6] Liu Y, Shan L, Liu T, et al. Molecular and cellular mechanisms of the first social relationship: a conserved role of 5-HT from mice to monkeys, upstream of oxytocin [J]. Neuron, 2023, 111(9): 1468-85. e7. doi:10.1016/j.neuron.2023.02.010.
- [7] Zhao Z, Jiang S, Fan Q, et al. Apocynum venetum leaf extract alleviated doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating organic

- acid metabolism in gut microbiota[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1286210. doi:10.3389/fphar.2023.1286210.
- [8] Feng Y, Jiang C, Yang F, et al. Apocynum venetum leaf extract protects against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing autophagy in PC12 cells[J]. *Biomed Rep*, 2020, 13(2): 6. doi:10.3892/br.2020.1313.
- [9] Penninx B W, Pine D S, Holmes E A, et al. Anxiety disorders [J]. *Lancet*, 2021, 397(10277): 914–27. doi:10.1016/S0140-6736(21)00359-7.
- [10] Du S Y, Huang H F, Li X Q, et al. Anti-inflammatory properties of uvaol on DSS-induced colitis and LPS-stimulated macrophages [J]. *Chin Med*, 2020, 15: 43. doi:10.1186/s13020-020-00322-0.
- [11] Xiang T, Wu L, Isah M B, et al. Apocynum venetum, a medicinal, economical and ecological plant: a review update[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e14966. doi:10.7717/peerj.14966.
- [12] 孟凡涛, 刘晶, 王文涛, 等. 慢性不可预知应激所致抑郁小鼠中缝背核脑区 BDNF 表达的变化[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(12): 1918–22. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.016.
- [12] Meng F T, Liu J, Wang W T, et al. Changes of BDNF expression in the dorsal raphe nucleus of depressed mice induced by chronic unpredictable stress[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2019, 54(12): 1918–22. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.016.
- [13] Lewis M W, Jones R T, Davis M T. Exploring the impact of trauma type and extent of exposure on posttraumatic alterations in 5-HT1A expression[J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 237. doi:10.1038/s41398-020-00915-1.
- [14] He Z, Young L, Ma X M, et al. Increased anxiety and decreased sociability induced by paternal deprivation involve the PVN-PrL Otergic pathway[J]. *eLife*, 2019, 8: e44026. doi:10.7554/eLife.44026.
- [15] Yuan Y, Wu W, Chen M, et al. Reward inhibits paraventricular CRH neurons to relieve stress [J]. *Curr Biol*, 2019, 29(7): 1243–51. e4. doi:10.1016/j.cub.2019.02.048.

Improvement of apocynum venetum leaves on anxiety behavior through hypothalamus paraventricular nucleus in chronic stress mice

Du Tongyu^{1,2,3}, Li Quntao^{1,2,3}, Yin Jieting^{1,2}, Yin Jiangwen^{1,2,3}, Li Yan^{1,2}

(¹Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000;

²Key Laboratory of Prevention and Treatment of Central Asia High Incidence Diseases, Shihezi 832000;

³Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi 832000)

Abstract Objective To observe the effects of apocynum venetum leaves extract (AVLE) on anxiety-like behavior caused by chronic restraint stress (CRS). **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups, 5 per group: control group (equivalent physiological saline 0.2 ml/10 g), CRS model group (equivalent physiological saline 0.2 ml/10 g), AVLE treatment group (AVLE 120 mg/kg) and positive control group (paroxetine hydrochloride 3 mg/kg). The anxiety mouse model of chronic restraint stress was established, and the anxiety level of mice treated with apocynum venetum leaf extract was evaluated by open field test and elevated cross maze test. Immunofluorescence staining was used to detect the changes of serotonin receptor in hypothalamic paraventricular nucleus. Chemogenetics combined with adeno-associated virus was used to detect the effect of hypothalamic oxytocin neurons on the anxiety regulation of AVLE. **Results** Compared with the model group, apocynum venetum leaves extract could increase the total distance of open field exercise, the activity time, the time of mice entering the central area ($P < 0.05$), and the activity distance and time of mouse elevated maze ($P < 0.05$). The expression of serotonin 1A receptor in the paraventricular nucleus of hypothalamus was enhanced after treatment with AVLE, and inhibition of serotonin 1A receptor and oxytocin neurons in hypothalamic paraventricular nucleus could decrease activity level in mice ($P < 0.05$). **Conclusion** AVLE can improve the anxiety state and activity ability of CRS mice, and its effect is related to serotonin receptor and oxytocin neurons in hypothalamic paraventricular nucleus.

Key words apocynum venetum leaf; anxiety; hypothalamus; serotonin receptors; neuron; chronic restraint stress

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 82360242, 81860209)

Corresponding author Li Yan, E-mail: 1249623003@qq.com