

“明暗箱法”用于抗焦虑药物药理作用研究的实验教学初探

胡萍萍¹, 佟晓永², 刘进², 冉冬芝¹, 马丽梅^{1*}

1. 重庆医科大学药学院, 重庆;

2. 重庆大学药学院, 重庆

摘要: 焦虑症是临床常见的情绪障碍, 其发病率和致残率高, 严重影响现代人的生活质量。研究抗焦虑药的药理作用意义重大。由于焦虑症动物模型的建立和行为测试等方面的限制, 目前本科生药理实验教学中基本没有涉及该领域的相关实验。本文利用致焦虑药物(间氯苯哌嗪)处理小鼠来构建简单的焦虑小鼠模型, 并给予苯二氮卓类抗焦虑药地西泮, 通过观察小鼠在明暗箱中的活动情况来考察抗焦虑药物的药理作用。通过本实验的学习, 帮助学生理解抗焦虑药物的药理作用, 培养学生的创新意识, 对学生认识相关领域前沿动态也具有非常重要的意义。

关键词: 明暗箱实验; 焦虑症; 抗焦虑药物; 药理实验; 学生评价

“Light-Dark Box Test” for the Study of the Pharmacological Effects of Anti-anxiety Drugs

Pingping Hu¹, Xiaoyong Tong², Jin Liu², Dongzhi Ran¹, Limei Ma^{1*}

1. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Chongqing University, Chongqing

Abstract: Anxiety disorders with high incidence and disability rates are common emotional disorders, significantly affecting the quality of life of modern individuals. To study the pharmacological effects of anti-anxiety drugs is of great significance. Due to the limitations in establishing anxiety animal models and behavioral testing, undergraduate pharmacology practical teaching currently lacks relevant experiments in this field. This study uses an anxiogenic drug (m-chlorophenylpiperazine) to induce anxiety in mice. Benzodiazepine antianxiety drug-diazepam was then administered, and the pharmacological effects of diazepam were investigated by observing the activity of mice in the light-dark box. This experiment enables students to gain an in-depth understanding of the pharmacological effects of anxiolytic drugs, fosters their innovative thinking, and provides key insights into the latest advances in the field.

Keywords: Light-dark Box Experiment; Anxiety Disorder; Anti-Anxiety Drugs; Pharmacological Experiment; Student Evaluation

焦虑症又称为焦虑性神经症，是临床上一种常见的以病理性焦虑情绪为主要特征的精神障碍。焦虑症患者主要表现为持续性或者发作性的焦虑、紧张、恐慌不安等情绪，并伴有一系列如自主神经紊乱、肌肉紧张以及运动不安等躯体化症状和病理变化[1]。近年来随着经济发展和竞争的日益加剧，焦虑症患者数目明显增加。流行病学调查结果显示，目前全球三分之一的人口在一生之中会受到焦虑症的影响[2,3]。抗焦虑药具有减轻忧虑、稳定情绪和改善睡眠的作用，了解其药理作用意义重大。

动物模型是研究疾病的发生和发展机制并进行新药开发和药效评价的重要载体。通过观察动物在特定环境和条件下的行为反应，并结合多种行为学实验方法，研究者可以全面的了解动物的焦虑程度，有针对性的筛选和开发抗焦虑药物。目前公认的焦虑动物模型的行为学检测方法主要包括架十字迷宫实验、旷场实验以及明暗箱实验[4]。使用这些方法进行动物行为学测试时要求实验过程中保持环境的安静，并对测试仪器进行定期清洁和除味。同时，实验时常需要对动物进行多次学习训练，来保证实验的准确性和可靠性。由于实验周期以及行为学测试条件的限制，目前在传统的本科药理学实验教学中基本没有涉及抗焦虑药物相关的实验内容。

药理学实验教学是药理教学的重要组成部分，不仅可以加深学生对课堂所学理论知识的理解，更是培养学生严谨的科学态度、耐心细致的观察能力以及与时俱进的创新和实践能力的过程。本实验中，我们利用致焦虑药物间氯苯哌嗪（*m*-chlorophenylpiperazine, *m*CPP）处理小鼠，构建简单的焦虑小鼠模型，并观察其在明暗箱中的活动情况。进而通过对比在此基础上使用抗焦虑药物后小鼠在明暗箱活动情况，帮助学生理解抗焦虑药物的药理作用，培养学生的创新意识。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物

雄性C57BL/6J（B6）小鼠（20±2g）购自美国巴尔港杰克逊实验室。所有动物实验相关操作流

程及动物福利保障均符合重庆大学动物伦理委员会及重庆医科大学动物伦理委员会规定（IACUC No.: CQU-IACUC-RE-202112-005）。

1.2 药品

间氯苯哌嗪（*m*-chlorophenylpiperazine, *m*CPP）德国产Sigma公司产品，Lot. 26H3422。地西洋（diazepam），济宁市安康制药有限责任公司（纯度98%），使用时溶于0.2%羧甲基纤维素钠中制成混悬液，储存于棕色瓶中。

1.3 焦虑小鼠模型的制备

本研究使用重庆大学药学院本科药理实验平台原有的避暗仪来代替明暗箱，并在明箱底部45cm处用30W的灯泡照明，使明暗箱之间的区域对比更加明显，避免假阳性实验结果。实验前一晚将小鼠置于避暗仪中适应过夜，让其自由活动。正式实验前腹腔注射*m*CPP（10mg/kg）或其等量生理盐水；20min后分别腹腔注射地西洋（10mg/kg）或其等量生理盐水。

1.4 明暗箱反应实验

实验时将小鼠背对洞口置于明箱中央，观察小鼠5min内的探索活动情况并记录其在明箱中停留的时间和穿箱次数。每只动物受试后将明暗箱彻底清洗并擦干以排除残留气味对小鼠行为的影响。

2 结果

如图1A所示，*m*CPP处理后的小鼠穿箱次数有减少的趋势，给予地西洋之后小鼠探索行为有所增加，但与对照组相比，差异无统计学意义。同时，*m*CPP处理明显减少小鼠在暗箱中的停留时间，而给予抗焦虑药地西洋之后小鼠在暗箱中的停留时间显著增加（图1B）。本研究中，与对照组相比，*m*CPP处理后的小鼠在暗箱停留时间明显缩短，提示其处于焦虑状态，证明造模成功。给予地西洋之后在基本不明显影响小鼠探索行为的情况下显著延长了焦虑小鼠在暗箱中停留时间，提示地西洋具有抗焦虑的作用。

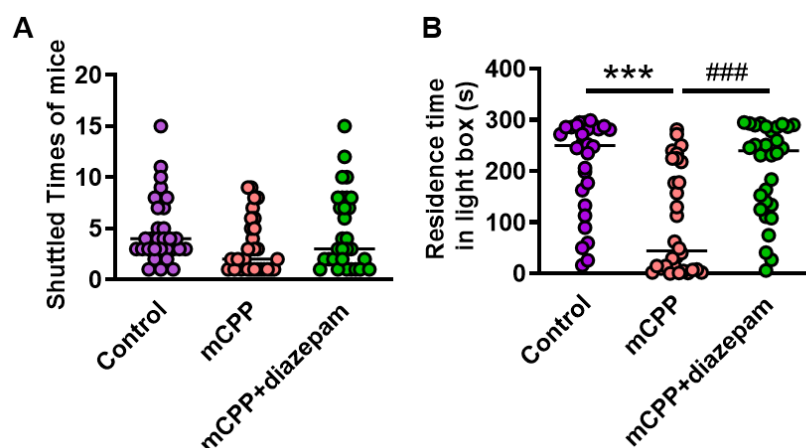


图1. mCPP 与地西洋对小鼠明暗箱行为的影响。A: 小鼠由明箱进入暗箱的穿梭次数。B: 小鼠在暗箱内的停留时间。数据以平均值±标准误 (mean±SEM) 表示, n=30。***P<0.001, 与对照组相比; ###P<0.001, 与mCPP组相比。

3 讨论

以往实验研究中, 动物模型多用动物暂时性、生理性焦虑行为的改变来评价。有的结果难以确定, 且与实际情况有一定的偏差。明暗箱实验是利用鼠类的嗜暗习性以及对新奇环境的自发性探索冲动之间的矛盾设计而成, 为研究患者的焦虑行为提供了有力的工具[5]。在本实验中, 只需实验前将动物置于明暗箱中适应过夜, 无需学习训练即可用于测试抗焦虑药物的药理作用, 大大简化了实验过程。通过记录在一定时间内动物在明暗箱之间的穿梭次数及其在明箱的停留时间等指标来评估动物的焦虑症状以及抗焦虑药物的作用效果。我们发现, 与动物在两箱间的穿梭次数相比, 其在明箱停留时间是这一模型中更一致更有效的用于评价抗焦虑药理作用的指标。

间氯苯哌嗪 (mCPP) 是一种5-HT能神经激动剂, 可以和多种5-HT受体结合, 具有致焦虑作用。1998年, Bilkei-Gorzo等首次用mCPP处理大鼠, 发现其可以引起动物脑内5-HT递质系统发生变化, 诱导焦虑。这是第一个部分模拟临床病理性焦虑的模型, 也是一种非常好的筛选抗焦虑药物的方法[6]。谭等进一步发现在小鼠 (dyy/C57) 中mCPP也可以引起非常显著的焦虑症状[7]。地西洋为苯二氮卓类药物, 是目前临床应用最为广泛的抗焦虑药物, 主要通过抑制GABA_A受体选择性地抑制边缘系

统的海马、杏仁核, 产生抗焦虑作用[8]。研究发现mCPP诱导的小鼠的焦虑模型可以用于苯二氮卓类抗焦虑药物的筛选[7]。

本实验在C57小鼠中利用mCPP诱导焦虑, 并给予地西洋, 观察其抗焦虑作用。通过对本科药理平台现有的仪器进行简单的改造可以实现对小鼠焦虑行为的测试, 且不需要对小鼠进行长期训练, 简化实验流程, 增加实验的成功率, 对学生理解现今社会常出现的焦虑症及抗焦虑药物的药理作用具有重要意义。同时, 由于小鼠经济易得, 比较适于药学的本科学生进行实验操作。本实验自2021年开始纳入重庆大学药学院药学专业本科生的药理实验以来, 4年的教学实践表明, 该实验的学习可以帮助学生了解抗焦虑药物的药理作用、实验设计和数据分析等科研技能, 促进学生对相关药物治疗的理解和认识。同时, 通过这种实验方法的初探, 也可以为进一步的药物研究和临床治疗提供一定的参考和启发。

4 教学评价

4.1 学生反馈

在实验教学过程中, 我们通过问卷调查和课堂讨论的方式收集了学生的反馈。问卷调查显示, 超过80%的学生认为通过本实验能够更好地理解抗焦虑药物, 尤其是地西洋的药理作用和作用机制。学生们普遍表示, 通过实际操作和观察小鼠的行为变

化,比单纯理论学习更加直观和印象深刻。此外,学生们还提到,实验中对小鼠的观察和数据记录培养了他们的耐心、细致的观察能力以及团队协作的能力。

4.2 教师评价

任课老师在教学过程中也对学生的实验表现进行了评价。教师们一致认为,本实验能够有效提高学生的动手能力和实验设计能力。学生们在实验过程中能够独立完成小鼠的给药以及行为观察等操作,并能够准确记录实验数据。此外,通过分析近几年学生的实验报告,教师还发现,学生们能够通过小组讨论和数据分析更好地理解实验结果的意义,并能够提出一些创新性的想法和建议。

4.3 实验效果评估

为了评估实验教学的效果,我们对学生的实验报告进行了分析。实验报告的评分标准包括实验设计的合理性、实验操作的准确性、数据记录的完整性以及实验结果的分析能力。结果显示,学生们的实验报告平均得分达到了80分以上,表明学生们能够较好地掌握实验技能和理解实验内容。此外,我们还发现,通过本实验学习后,学生们在后续的课程中对药物作用机制的理解和应用能力有了显著提高。

5 结论

本实验通过“明暗箱法”研究抗焦虑药物的药理作用,不仅帮助学生更好地理解抗焦虑药物的药理作用和作用机制,还培养了学生的实验技能和创新意识。通过教学评价,我们发现本实验在教学中取得了良好的效果。在未来的教学工作中,实验条件允许的情况下,我们建议在实验教学中增加一些创新性的实验设计或者单独开设一些开放性实验供学生选择学习,鼓励学生自主设计实验方案,培养他们的创新思维和独立解决问题的能力。同时,我们也将进一步优化实验教学内容和方法,提高教学

质量和效果,为培养高素质的药学人才做出贡献。

致谢

本文由重庆医科大学教育教学研究项目(xyjg220215, 20220326, YXJY2206和JY20230317)和重庆大学药学专业实验项目(2020S43)的资助。

参考文献

- [1] Michelle G Craske, Murray B Stein, Thalia C Eley, Mohammed R Milad, Andrew Holmes, Ronald M Rapee, Hans-Ulrich Wittchen Anxiety disorders, *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17024.
- [2] What is an anxiety disorder? *Depress Anxiety*, 2009, 26(12):1066-1085.
- [3] Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci*, 2015, 17(3): 327-335.
- [4] 刘坤, 刑影, 郑智勇, 许佳玲, 张浩, 胡明会, 何小华, 陈凯, 李自发, 耿希文, 魏盛. 啮齿类动物非条件性焦虑测试的困惑与对策[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2023, 4: 361-366.
- [5] Vincent Roy, Pierre Chapillon, Mustapha Jeljeli, Jean Caston, Catherine Belzung, Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest, *Psychopharmacology (Berl)*, 2009, 203(1): 131-141.
- [6] A Bilkei-Gorzó, I Gyertyán, G Lévy, mCPP-induced anxiety in the light-dark box in rats—a new method for screening anxiolytic activity, *Psychopharmacology*, 1998, 136(3): 291-298.
- [7] Trey Thompson, Laura Grabowski-Boase, Lisa M Tarantino, Prototypical anxiolytics do not reduce anxiety-like behavior in the open field in C57BL/6J mice, *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 133: 7-17.
- [8] Devendra Kumar, Sukesh K Gupta, Ankit Ganeshpurkar, Ravi Singh, Dileep Kumar, Nitul Das, Sairam Krishnamurthy, Sushil Kumar Singh, Biological profiling of piperazinediones for the management of anxiety, *Pharmacol Biochem Behav*, 2019, 176: 63-71.

