

Effects of Yangyin Anshen and Zhongzhen Anshen Chinese Medicine on Neurotransmitters in Insomnia Rats

Xiufeng Wang, Xueai Zeng, Yu Zhang, Yifan Zhang, Xing Li, Junshan Huang*

Fujian Academy of Traditional Chinese Medicine, Fujian Key Laboratory of Sleep Medicine of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian
Email: *hjsh0825@163.com

Received: Oct. 30th, 2018; accepted: Nov. 14th, 2018; published: Nov. 21st, 2018

Abstract

Objective: To observe the effects of different types of tranquilizers, such as Tuber fleece flower stem, Acacia, Keel, and Oysters on neurotransmitters in insomnia rats, and to explore the differences in their pharmacological mechanisms for treating insomnia. **Methods:** A rat model of insomnia was established by using p-chlorophenylalanine (PCPA). After successful modeling, it was treated with Tuber fleece flower stem, Acacia, Keel, and Oysters for one week. After treatment, the neurotransmitters γ -aminobutyric acid (GABA), serotonin (5-HT), dopamine (DA) and histamine (HIS) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with the model group, the two kinds of tranquilizers, Tuber fleece flower stem, Acacia, Keel, and Oysters could increase the levels of GABA and 5-HT in the plasma of insomnia rats ($P < 0.01$), and at the same time they could also reduce the levels of DA and HIS in plasma of insomnia rats ($P < 0.01$). **Conclusion:** Evening Tuber fleece flower stem, Acacia, Keel, and Oysters can decrease the levels of excitatory neurotransmitters (DA, HIS) and increase the levels of inhibitory neurotransmitters (GABA, 5-HT) in insomnia rats. But, Tuber fleece flower stem and Acacia increased the inhibitory neurotransmitter effect more significantly, while Keel and Oyster mainly reduced excitatory neurotransmitters.

Keywords

Insomnia, Neurotransmitter, Tranquilizer

养心安神药和重镇安神药对失眠大鼠神经递质的影响

王秀峰, 曾雪爱, 张瑜, 张一帆, 李星, 黄俊山*

*通讯作者。

文章引用: 王秀峰, 曾雪爱, 张瑜, 张一帆, 李星, 黄俊山. 养心安神药和重镇安神药对失眠大鼠神经递质的影响[J]. 中医学, 2018, 7(6): 357-363. DOI: 10.12677/tcm.2018.76060

福建省中医药研究院, 福建省中医睡眠医学重点实验室, 福建 福州
Email: hjsh0825@163.com

收稿日期: 2018年10月30日; 录用日期: 2018年11月14日; 发布日期: 2018年11月21日

摘要

目的: 观察不同类型的安神中药夜交藤、合欢皮、龙骨、牡蛎对失眠大鼠神经递质的影响, 探讨它们治疗失眠的药理机制的差异。**方法:** 利用对氯苯丙氨酸(PCPA)建立失眠大鼠模型, 造模成功后分别给予夜交藤、合欢皮、龙骨、牡蛎治疗一周。治疗结束后通过酶联免疫吸附测定(Elisa)方法检测大鼠血浆中神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)和组胺(HIS)的含量。**结果:** 同模型组相比较, 夜交藤、合欢皮和龙骨、牡蛎这两类安神药均能够增加失眠大鼠血浆中GABA和5-HT含量($P < 0.01$), 同时又能够降低失眠大鼠血浆中DA和HIS的含量($P < 0.01$)。**结论:** 夜交藤、合欢皮和龙骨、牡蛎虽然都能使失眠大鼠兴奋性神经递质(DA、HIS)减少, 抑制性神经递质(GABA、5-HT)增加, 但是夜交藤和合欢皮增加抑制性神经递质作用更显著, 而龙骨和牡蛎以降低兴奋性神经递质为主。

关键词

失眠, 神经递质, 安神药

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

睡眠是维持人类健康不可缺少的部分, 如果睡眠障碍, 人的生活势必会受到影响。近几年, 失眠患者人数呈逐年增长趋势。睡眠障碍正慢慢成为一场公共卫生危机[1]。目前人类对睡眠与觉醒的调控机制研究还不是很明确, 睡眠障碍治疗仍然是以心理与西药疗法为主。西药起效快, 得到大多数患者的认可[2], 但它还是有局限性。

目前, 中医药对失眠治疗的有效性、特色和优势也已经得到认同, 并且形成了独特的理法方药体系。但其理论基础尚缺乏客观实验依据, 制约了其发展和推广。本研究正是从临床经验的基础上选取重镇安神(龙骨、牡蛎)和养心安神(夜交藤、合欢皮)中药结合失眠大鼠模型, 对比研究两类安神药的疗效物质基础, 揭示安神药的部分作用机理。为以后安神中药的开发和推广提供科学的实验依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

雄性 SD 大鼠 48 只, 8 周, 体重(250 ± 10)g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2007-0005, 质量合格证号: 2007000525946, 于福建省中医药研究院动物实验中心清洁级饲养室喂养。

2.2. 实验药物

中药饮片夜交藤、合欢皮、龙骨和牡蛎购于鹭燕(福建)药业股份有限公司。夜交藤和合欢皮, 分别加

入 5 倍量蒸馏水, 浸泡 1 h, 煎煮 2 次, 第一次 30 min, 第二次 20 min, 合并煎煮液, 过滤后浓缩至 2 g/mL, -20℃ 保存备用。龙骨和牡蛎: 分别加入 5 倍量蒸馏水, 浸泡 1 h, 煎煮 2 次, 第一次 60 min, 第二次 50 min, 合并煎煮液, 过滤后浓缩至 3.5 g/mL, -20℃ 保存备用[3]。

2.3. 主要试剂

Rat 5-HT ELISA Kit (货号: ml9028308); Rat DA ELISA Kit (货号: ml9003201); Rat HIS ELISA Kit (货号: ml9002986); Rat GABA ELISA Kit (货号: ml9097322) 购于 mlbio 公司。对氯苯丙氨酸购于 Sigma 公司。

2.4. 失眠大鼠模型的建立

采用 PCPA 按 300 mg/kg 溶于弱碱性生理盐水中, 配置成混悬液, 以 10 mL/kg 腹腔注射, 连续腹腔注射 PCPA 2 天, 大鼠昼夜节律消失, 白天夜晚活动不停, 睡眠减少直至消失, 进食及饮水增多, 表示造模成功[4]。实验在福建省中医药研究院动物实验室进行, 室内温度 22℃, 湿度 79%RH, 正常对照组正常笼养, 自然昼夜光照。

2.5. 实验大鼠的分组、给药及取材

造模成功后分成以下几组: 正常组、失眠模型组、龙骨组、牡蛎组、夜交藤组和合欢皮组, 每组 8 只。龙骨组、牡蛎组、夜交藤组和合欢皮组分别按 35 g/kg、35 g/kg、20 g/kg、20 g/kg 计量灌胃给药, 正常组和模型组给予同等体积的生理盐水灌胃, 1 次/天, 共 7 天。将实验大鼠用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (40 mg/kg), 腹主动脉取血 5 mL 装到抗凝管中, 离心取上清, 分装 EP 管中冻存备用。取血后, 断头, 剪开头皮, 用血管钳揭去颅骨和硬脑膜, 剪断双侧视神经后用眼科镊子迅速取出大鼠的整个脑组织。用 0.9% 氯化钠溶液冲洗干净, 置于液氮或 -80℃ 保存备用。

2.6. 神经递质的检测

神经递质的检测方法分别按照 Rat 5-HT ELISA Kit (货号: ml9028308); Rat DA ELISA Kit (货号: ml9003201); Rat HIS ELISA Kit (货号: ml9002986); Rat GABA ELISA Kit 检测试剂盒说明书进行。取不同处理组大鼠血浆样本各 50 μ L, 不同浓度标准品各 50 μ L 分别加入 96 孔酶标板中。标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体 100 μ L, 用封板膜封住反应孔, 37℃ 水浴锅温育 60 min。弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液(350 μ L), 静置 1 min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μ L, 37℃ 避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μ L, 15 min 内, 450 nm 测 OD 值, 计算样本的浓度。

2.7. 统计学方法

实验结果用数据和图表显示, 实验数据以 $X \pm S$ 表示, 用 SPSS16.0 统计分析软件进行数据处理, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异存在统计学意义, $P < 0.01$ 为差异显著。

3. 结果

3.1. 不同药物处理后各组大鼠血浆中 GABA 含量变化情况

运用 Rat GABA ELISA Kit 检测各组大鼠的血浆 GABA 含量, 检测结果如图 1 所示: 正常组大鼠血浆中 GABA 的含量为 2.85 μ mol/L, 模型组为 2.12 μ mol/L。模型组与正常组相比较, 模型组的 GABA 含

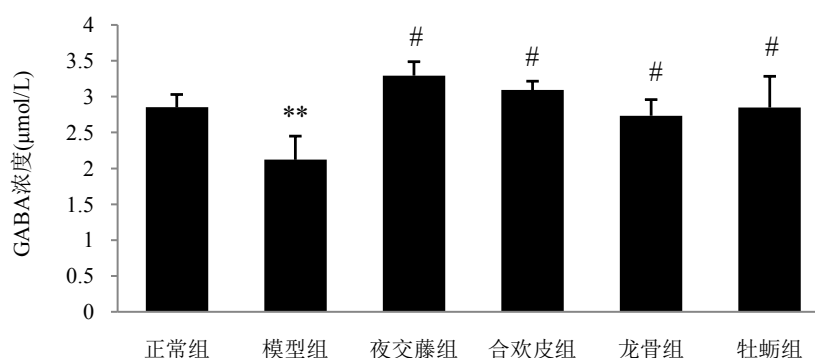


Figure 1. Comparison of plasma GABA content in experimental rats

图 1. 各组实验大鼠血浆中 GABA 含量比较; 注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$ 。

量降低($P < 0.01$)。中药夜交藤组、合欢皮组、龙骨组和牡蛎组大鼠血浆中 GABA 的含量分别为 3.29 $\mu\text{mol/L}$ 、3.09 $\mu\text{mol/L}$ 、2.74 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.85 $\mu\text{mol/L}$ ，四组中药处理组的 GABA 含量与模型组相比较，均上升，都具有显著统计学差异($P < 0.01$)。与正常组比较无显著地统计学差异。

3.2. 不同药物处理后各组大鼠血浆中 5-HT 含量变化情况

Rat 5-HT ELISA Kit 检测各组大鼠的血浆 5-HT 含量，结果如图 2 所示：与正常组大鼠血浆中 5-HT 的含量(3.84 ng/mL)相比较，模型组(3.24 ng/mL)显著降低，具有显著地统计学差异($P < 0.01$)。与模型组相比较，夜交藤组(3.61 ng/mL)和合欢皮组(3.87 ng/mL)的血浆 5-HT 含量均升高，并且均具有显著性统计学差异($P < 0.01$)；龙骨组(3.57 ng/mL)与模型组相比，5-HT 的含量也升高，具有统计学差异($P < 0.05$)；牡蛎组 5-HT 的含量为 3.45 ng/mL，与模型组比较无统计学差异。

3.3. 不同药物处理后各组大鼠血浆中 DA 含量变化情况

运用 Rat DA ELISA Kit 检测各组大鼠的血浆 DA 含量，检测结果如图 3 所示：正常组大鼠血浆中 DA 的含量为 328.77 pg/mL，模型组为 379.52 pg/mL。模型组与正常组相比较，模型组的 DA 含量显著升高($P < 0.01$)。中药夜交藤组、合欢皮组、龙骨组和牡蛎组大鼠血浆中 DA 的含量分别为 332.24 pg/mL、350.80 pg/mL、310.91 pg/mL 和 307.36 pg/mL，四组中药组与模型组相比较，均能降低大鼠血浆中 DA 的含量，都具有显著统计学差异($P < 0.01$)。与正常组比较无显著地统计学差异。

3.4. 不同药物处理后各组大鼠血浆中 HIS 含量变化情况

Rat HIS ELISA Kit 检测各组大鼠血浆中 HIS 含量的结果如图 4 所示：模型组大鼠血浆中 HIS 的含量为 4.03 ng/mL，与正常组大鼠血浆中 HIS 的含量(3.27 ng/mL)相比显著升高($P < 0.01$)。而与模型组相比较，中药夜交藤组(3.22 ng/mL)、合欢皮组(2.94 ng/mL)、龙骨组(2.46 ng/mL)和牡蛎组(2.66 ng/mL)均能够显著降低失眠大鼠血浆中 HIS 的含量($P < 0.01$)。

4. 讨论

失眠是本人对自己睡眠时间和(或)质量不满足并影响到白天功能的一种主观感受[5]。据统计，美国有 1/3 成年人存在睡眠障碍，芬兰有 11%，加拿大 17.8%，日本 21%，法国 19%的成人也存在睡眠障碍[6]。中国成年人失眠发生率约为 38.2%，高于国外发达国家的失眠发生率。长期性的失眠容易使人产生焦虑、抑郁、记忆力下降等影响人的工作和生活[7]。因此，加强对失眠的机制和药物研究具有一定的社会意义。

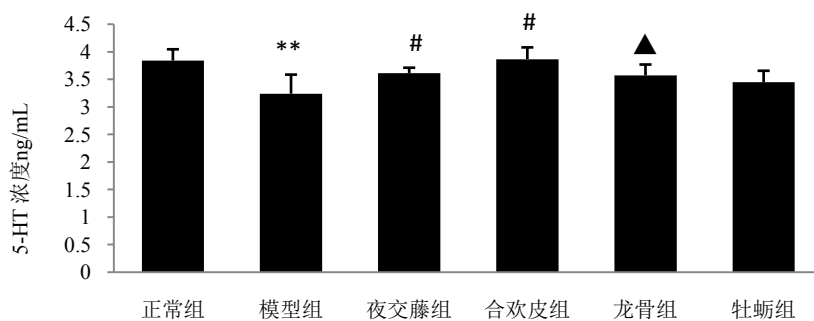


Figure 2. Comparison of plasma 5-HT content in experimental rats

图 2. 各组实验大鼠血浆中 5-HT 含量比较；注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.01$ ，▲ $P < 0.05$ 。

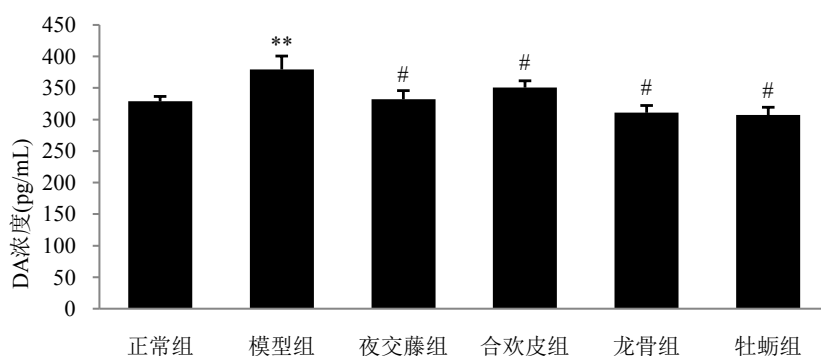


Figure 3. Comparison of plasma DA content in experimental rats

图 3. 各组实验大鼠血浆中 DA 含量比较；注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.01$ 。

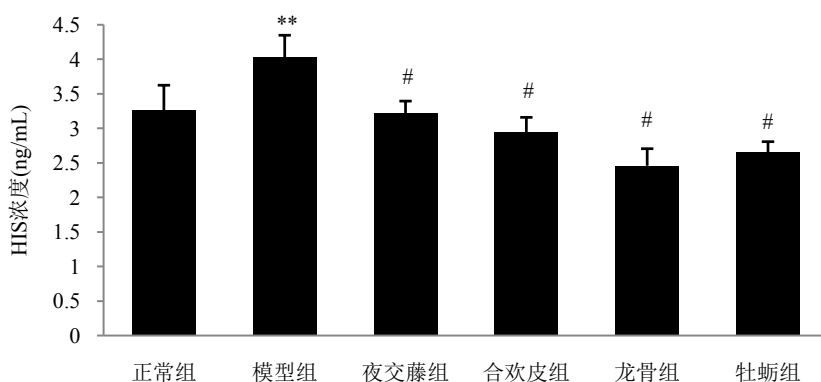


Figure 4. Comparison of plasma HIS content in experimental rats

图 4. 各组实验大鼠血浆中 HIS 含量比较；注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.01$ 。

目前，临床上常用的镇静催眠药物中，作用于 GABA 通路的药物仍然占据主导地位[8]。GABA 是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质，当睡眠活性神经元被激活时，GABA 对所投射的觉醒区的神经元产生抑制作用，从而促进觉醒向睡眠的转化，使深慢波睡眠增加[9]。5-HT 又名血清素，也是一种重要的抑制性神经递质。多项研究证实高水平的 5-HT 在 SWS 的产生和维持中发挥重要作用[10] [11]。给大鼠中缝核微量注射对氯苯丙氨酸，减少 5-HT 合成，能够使动物出现失眠症状，这也是目前睡眠剥夺

研究中常用的失眠模型[12]。本实验研究结果显示：同失眠模型组相比较，夜交藤、合欢皮和龙骨、牡蛎这两类安神药均能够增加失眠大鼠血浆中 GABA 和 5-HT 含量($P < 0.01$)。

DA 是脑内含量最多的单胺类神经递质之一，调控与觉醒相关的运动、认知等多种行为[13]。DA 能神经元与睡眠、觉醒脑区间存在广泛的纤维联系，提示 DA 系统可能参与了睡眠 - 觉醒的调控[14]。HIS 也是觉醒的重要调节物质，研究发现，正常大鼠觉醒期细胞外液中 HIS 释放量是睡眠期的 4 倍，与觉醒水平呈正相关，与睡眠期呈负相关[15]。该研究结果显示：同失眠模型组相比较，夜交藤、合欢皮和龙骨、牡蛎这两类安神药均能够降低失眠大鼠血浆中 DA 和 HIS 的含量($P < 0.01$)。

5. 结论

综上所述，夜交藤、合欢皮和龙骨、牡蛎虽然都能使失眠大鼠兴奋性神经递质(DA、HIS)减少，抑制性神经递质(GABA、5-HT)增加，但是养心安神类中药夜交藤和合欢皮增加抑制性神经递质作用更显著，而重镇安神类中药龙骨和牡蛎以降低兴奋性神经递质为主。这可能是此两类中药安神作用的区别之一，其调节机制有待进一步研究。

基金项目

国家自然科学基金项目(81703843)；福建省科技厅公益类科研院所基本科研专项(2015R1035-5, 2017R1035-3)；福建省卫计委医药卫生科技创新项目(2015-CX-35)。

参考文献

- [1] Barnes, C.M. and Drake, C.L. (2015) Prioritizing Sleep Health: Public Health Policy Recommendations. *Perspectives on Psychological Science*, **10**, 733-737. <https://doi.org/10.1177/1745691615598509>
- [2] 赵忠新, 张红菊, 黄流清. 失眠的治疗药物及其使用方法研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(11): 851-856.
- [3] 刘颖. 酸枣仁、夜交藤、龙骨、磁石对自由活动大鼠睡眠时相的影响[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学药学院, 2005.
- [4] 全世建, 林杏娥, 刘妮. PCPA 大鼠失眠模型的证候属性研究[J]. 中医药学刊, 2006, 24(3): 450-451.
- [5] 中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组. 中国成人失眠诊断与治疗指南[J]. 中华神经科杂志, 2012, 45(7): 534-540.
- [6] Mendelson, W.B., Roth, T., Cassella, J., Roehrs, T., Walsh, J.K., Woods, J.H., Buysse, D.J. and Meyer, R.E. (2004) The Treatment of Chronic Insomnia: Drug Indications, Chronic Use and Abuse Liability. Summary of a 2001 New Clinical Drug Evaluation Unit Meeting Symposium. *Sleep Medicine Review*, **8**, 7-17. [https://doi.org/10.1016/S1087-0792\(03\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S1087-0792(03)00042-X)
- [7] 赵忠新. 临床睡眠障碍学[M]. 第二军医大学出版社, 2003: 26-27.
- [8] Wafford, K.A. and Ebert, B. (2008) Emerging Anti-Insomnia Drugs: Tackling Sleeplessness and the Quality of Wake Time. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**, 530-540. <https://doi.org/10.1038/nrd2464>
- [9] Sherin, J.E., Elmpuist, J.K., Torrealba, F. and Saper, C.B. (1998) Innervation of Histaminergic Tubero-mammillary Neurons by GABAergic and Galaninergic Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus of the Rat. *Journal of Neuroscience*, **18**, 4705-4721. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-12-04705.1998>
- [10] Hobson, J.A. (2010) The Cellular Basis of Sleep Cycle. In: Weitzman, E., Ed., *Advances in Sleep Research*, Spectrum, New York, 128.
- [11] Alfaro-Rodríguez, A., Bueno-Nava, A., González-Piña, R., Arch-Tirado, E., Vargas-Sánchez, J. and Avila-Luna, A. (2011) Chronic Exposure to Toluene Changes the Sleep-Wake Pattern and Brain Monoamine Content in Rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars)*, **71**, 183-192.
- [12] 钟静瑜, 黄俊山. 5-羟色胺与睡眠的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(10): 1471-1473.
- [13] 黄志力. 睡眠与睡眠障碍[M]//孙凤艳. 医学神经生理学. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 317-331.
- [14] Miller, J.D., Farber, J., Gatz, P., Roffwarg, H. and German, D.C. (1983) Activity of Mesencephalic Dopamine and

Non-Dopamine Neurons across Stages of Sleep and Walking in the Rat. *Brain Research*, **273**, 133-141.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91101-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91101-0)

- [15] Chu, M., Huang, Z.L., Qu, W.M., Equchi, N., Yao, M.H. and Urade, Y. (2004) Extracellular Histamine Level in the Frontal Cortex Is Positively Correlated with the Amount of Wakefulness in Rats. *Neuroscience Research*, **49**, 417-420.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2004.05.001>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2166-6067, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: tcm@hanspub.org