

柴胡加龙骨牡蛎汤改善围绝经期雌性小鼠睡眠的有效部位研究

杜纳纳, 于 爽, 黄莉莉(黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 确定柴胡加龙骨牡蛎汤改善围绝经期睡眠的有效部位及最佳给药剂量。**方法** 以去卵巢合并电刺激小鼠为动物模型, 观察柴胡加龙骨牡蛎汤水洗脱部位和不同浓度乙醇洗脱部位对戊巴比妥钠协同睡眠时间, 以及对模型小鼠子宫系数和肾上腺系数的影响。**结果** 与模型组比, 柴胡加龙骨牡蛎汤 70%醇洗脱组 ($48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 可以明显延长模型小鼠的睡眠时间 ($P < 0.01$), 增加模型小鼠的子宫系数 ($P < 0.05$)。**结论** 柴胡加龙骨牡蛎汤改善睡眠作用的有效部位为 70 %醇洗脱部位, 最佳给药剂量每天为 $48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

关键词: 围绝经期; 失眠; 柴胡加龙骨牡蛎汤; 有效部位; 去卵巢合并电刺激; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0556-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.009

Studies on Effective Parts of *Chaihu Jia Longgu Muli* Decoction for Improving Sleep of Perimenopausal Female Mice

DU Nana, YU Shuang, HUANG Lili (Pharmaceutical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040 Heilongjiang, China)

Abstract: **Objective** To screen the effective parts and optimal dose of *Chaihu Jia Longgu Muli* Decoction, a Chinese herbal recipe composed of Longgu Muli Decoction with Radix Bupleuri for improving sleep of perimenopausal female mice. **Methods** Ovariectomy and electrical stimulation were given to the female mice to the model. And then, we observed the effects of water elution part of *Chaihu Jia Longgu Muli* Decoction and the elution parts obtained by elution with different concentrations of ethanol on pentobarbital-induced sleep time of the model mice, and the effects on uterus coefficient and adrenal gland coefficient of the model mice. **Results** Compared to the model group, 70 % ethanol ($48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) elution of *Chaihu Jia Longgu Muli* Decoction had significant effect on prolonging the pentobarbital-induced sleep time ($P < 0.01$) and on increasing the uterus coefficient ($P < 0.05$) of the model mice. **Conclusion** The part of *Chaihu Jia Longgu Muli* Decoction eluted by 70 % ethanol is the effective part for improving sleep of perimenopausal female mice, and the optimal dose is $48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ per day.

Keywords: Perimenopausal period; Insomnia; *Chaihu Jia Longgu Muli* Decoction; Effective parts; Ovariectomy and electrical stimulation; Mice

失眠是围绝经期女性最常见的主诉, 也是影响其生活质量的主要因素, 临床尚无安全、有效的治疗措施, 寻找改善围绝经期失眠安全有效的药物已成为全球医学关注的热点。本课题组以往研究^[1-2]表明, 柴胡加龙骨牡蛎汤具有改善去卵巢及电刺激围绝经期大鼠睡眠作用, 但其改善睡眠的有效部位尚不清楚。本实验以去卵巢合并电刺激小鼠为模型,

采用戊巴比妥钠协同睡眠实验, 筛选柴胡加龙骨牡蛎汤改善围绝经期睡眠的有效部位, 在确定有效部位的基础上, 开展其量效关系及对模型小鼠子宫系数和肾上腺系数的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 ICR 小鼠, 雌性, SPF 级, 体质量(24 ± 1)g,

收稿日期: 2014-04-18

作者简介: 杜纳纳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理研究。Email: 1052943047@qq.com。通讯作者: 黄莉莉, 博士, 副教授, 研究方向: 中药改善睡眠作用及作用机制研究。Email: 908668195@qq.com。

基金项目: 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划(1254G054); 黑龙江中医药大学校科研基金(2012bs01); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”(2012RCD02); 教育部重点实验室-北药基础与应用研究开放课题基金资助项目。

黑龙江中医药大学药物安全性评价中心, 动物许可证号: SCXK(黑)2013-004。

1.2 药材及试剂 柴胡加龙骨牡蛎汤, 组方为人参、肉桂、旱半夏、茯苓、黄芩、柴胡、掌叶大黄、生姜、大枣、煅牡蛎、煅龙骨, 药材购自哈尔滨世一堂药店, 并经黑龙江中医药大学药学教研室鉴定。戊巴比妥钠, 上海新亚药业有限公司, 批号: 20130407。

1.3 仪器 JL-D 药理生理实验多用仪, 上海嘉龙教仪厂; Mettler-Toledo MS 电子天平, 瑞士 Mettler-Toledo 公司; EYELA FDU-1200 型冷冻干燥机, 日本 EYELA 公司; EYELA OSB-2100 旋转蒸发仪, 日本 EYELA 公司。

1.4 受试药物制备

1.4.1 柴胡加龙骨牡蛎汤水煎液的制备 按文献方法^[1]制备柴胡加龙骨牡蛎汤水煎液, 浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.4.2 柴胡加龙骨牡蛎汤洗脱部位的制备 D-101 型大孔树脂 95 % 乙醇浸泡 24 h, 使之充分溶胀后赶尽气泡, 湿法装柱。95 % 乙醇洗脱至与蒸馏水混合不显浑浊, 然后用蒸馏水洗至无醇味。将柴胡加龙骨牡蛎汤上大孔树脂柱, 静态吸附 3 h 后, 用蒸馏水冲洗至无糖, 再用 30 %、50 %、70 % 醇洗脱, 分别收集水洗脱部位, 30 % 醇洗脱部位, 50 % 醇洗脱部位和 70 % 醇洗脱位, 回收水及乙醇, 冷冻干燥备用。

1.4.3 各洗脱部位的配制 精确称取水洗脱部位 2.5 g, 30 % 醇洗脱部位 0.5 g、50 % 醇洗脱部位 0.05 g 及 70 % 醇洗脱部位 0.12 g (以上各洗脱部位重量均相当于生药量 50 g), 1 % 羧甲基纤维素钠定容至 50 mL, 备用。

1.4.4 不同浓度 70 % 醇洗脱部位的配制 精确称取 70 % 醇洗脱部位 0.96 g, 1 % 羧甲基纤维素钠定容至 100 mL。依次按等比稀释法配成相应的浓度(9.6, 4.8, 2.4, 1.2, 0.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 备用。

1.5 小鼠模型的复制

1.5.1 手术 小鼠 0.5 % 戊巴比妥钠麻醉后, 依照文献方法^[2]摘除双侧卵巢, 缝合皮肤, 术后恢复 7 d。假手术组小鼠, 仅切除双侧卵巢旁同样大小的脂肪团。

1.5.2 电刺激方法 术后第 8 天, 将手术后的鼠放入刺激盒中, 接受电刺激应激, 刺激电压为 36 v, 每秒点激 1 次, 连续点激 10 次, 隔 50 s 再点激 10 次, 如此进行 10 次循环。电刺激时间安排在每天上午 8:00~10:00, 每天 1 次, 连续 14 d。

1.6 分组及给药

1.6.1 柴胡加龙骨牡蛎汤不同提取部位对模型小鼠睡眠影响 50 只雌鼠, 随机分为 5 组, 分别为模型组、水洗脱组, 30 %, 50 %, 70 % 醇洗脱组。术后第 15 d, 即电刺激第 8 天, 分别灌胃给予 1 % 羧甲基纤维素钠和柴胡加龙骨汤水洗脱部位以及 30 %、50 %、70 % 醇洗脱部位, 灌胃体积为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 灌胃时间为每天电刺激后, 连续灌胃 7 d。

1.6.2 不同浓度 70 % 醇洗脱部位对模型小鼠睡眠影响 60 只雌鼠, 随机分为 6 组, 分别为模型组, 剂量 1、2、3、4、5 组。术后第 15 天, 即电刺激第 8 天, 各组依次灌胃给予 1 % 羧甲基纤维素钠和柴胡加龙骨汤不同浓度的 70 % 醇洗脱部位(0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 灌胃体积为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 灌胃时间为每天电刺激后给予, 连续灌胃 7 d。

各组动物于末次给药后 20 min, 腹腔注射戊巴比妥钠(0.5 %, 55 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 分别记录动物翻正反射消失及恢复时间, 以戊巴比妥钠注射后至翻正反射消失为入睡潜伏期, 翻正反射消失至恢复时间为睡眠时间。

1.7 70 % 醇洗脱部位对模型小鼠子宫和肾上腺系数影响 30 只雌鼠, 随机分为 3 组, 分别为模型组、假手术组、剂量 3 组, 术后第 15 天, 即电刺激第 8 d, 模型组和假手术组均灌胃给予 1 % 羧甲基纤维素钠, 剂量 3 组灌胃给予 70 % 醇洗脱部位(2.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 灌胃体积为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 灌胃时间为每天电刺激后给予, 连续灌胃 7 d。于末次给药后 20 min, 处死动物并分离肾上腺和子宫, 吸干血迹称其湿重, 计算脏器系数, 脏器系数(%)= 器官质量(mg)/小鼠体质量(g) $\times 100\%$ 。

1.8 统计学处理方法 使用 SPSS17.0 统计软件, 实验结果采用均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 多重比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。

2 结果

2.1 柴胡加龙骨牡蛎汤不同洗脱部位对戊巴比妥钠所致去卵巢合并电刺激小鼠睡眠的影响 见表 1, 与模型组比较, 柴胡加龙骨牡蛎汤 70 % 醇洗脱组可以明显延长戊巴比妥钠所致去卵巢合并电刺激小鼠的睡眠时间($P < 0.01$); 水洗脱组以及 30 %、50 % 醇洗脱组对入睡潜伏期和睡眠时间均无明显影响, 故确定 70 % 醇洗脱组为其改善睡眠的有效部位。

表 1 柴胡加龙骨牡蛎汤不同洗脱部位对戊巴比妥钠所致去卵巢合并电刺激小鼠睡眠的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of different ethanol elution of *Chaihu jia longgu muli* decoction groups on pentobarbital induce sleep time in ovariectomized combined electrical stimulation mice.

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	入睡潜伏期 /s	睡眠时间 /min
模型组	—	267.1 ± 51.5	50.2 ± 21.7
水洗脱组	1000	275.9 ± 48.3	56.2 ± 19.1
30 %醇洗脱组	200	275.9 ± 38.6	64.4 ± 33.8
50 %醇洗脱组	20	311.8 ± 68.2	42.9 ± 21.5
70 %醇洗脱组	48	283.7 ± 31.8	109.7 ± 44.0*

注：与模型组比较，* $P < 0.01$ 。

2.2 不同浓度 70 %醇洗脱部位对去卵巢合并电刺激小鼠睡眠影响 见表 2。与模型组比较，70 %醇洗脱部位剂量 3 组(48 mg·kg⁻¹)和剂量 4 组(96 mg·kg⁻¹)可以明显延长戊巴比妥钠所致去卵巢合并电刺激小鼠的睡眠时间($P < 0.05$, $P < 0.01$)，剂量 1 组、2 组、5 组对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间无明显影响($P > 0.05$)。

表 2 不同浓度 70 %醇洗脱部位对去卵巢合并电刺激小鼠睡眠影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of different 70 % ethanol elution parts concentrations of *Chaihu jia longgu muli* decoction on pentobarbital induce sleep time in ovariectomized combined electrical stimulation mice

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	入睡潜伏期 /s	睡眠时间 /min
模型组	—	262.1 ± 60.1	21.0 ± 7.8
剂量 1 组	12	299.5 ± 46.7	25.9 ± 9.3
剂量 2 组	24	261.1 ± 33.7	26.3 ± 10.9
剂量 3 组	48	219.5 ± 43.1	39.2 ± 18.0*
剂量 4 组	96	228.5 ± 30.4	42.1 ± 17.1**
剂量 5 组	192	254.1 ± 49.8	33.6 ± 17.7

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

2.3 70 %醇洗脱部位对去卵巢合并电刺激小鼠子宫和肾上腺系数影响 见表 3。与假手术组比较，模型组的子宫系数明显降低。与模型组相比，柴胡加龙骨牡蛎汤 70 %醇洗脱部位(48 mg·kg⁻¹)，即剂量 3 组可以明显增加去卵巢合并电刺激小鼠的子宫系数($P < 0.05$)。

3 讨论

围绝经期是指妇女从生育期向老年期过渡的转换期和卵巢功能逐步衰退至丧失的过渡期，是妇女生理发生变化的重要时期。睡眠障碍是围绝经期妇女出现的主要症状之一，长期低质量的睡眠会引发一系列身体、心理问题。围绝经期综合征在中医称

表 3 70%醇洗脱部位对去卵巢合并电刺激小鼠子宫和肾上腺系数影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Effects of 70 % ethanol elution on uterine and adrenal coefficient of mice with ovariectomy combined stimulation .

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	子宫系数 / $\times 10^{-3}$	肾上腺系数 / $\times 10^{-3}$
模型组	—	1.21 ± 0.70	0.33 ± 0.06
假手术组	—	4.64 ± 2.07**	0.30 ± 0.05
70 %醇洗脱组	48	2.72 ± 1.66*	0.27 ± 0.07

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

之为妇女绝经前后诸症，主要表现为潮热汗出、心悸失眠、烦躁不安、眩晕等症，尤以失眠为重，中医药在治疗围绝经期综合征方面具有整体调节、标本兼治的优势，已成为治疗此病的主要方法之一^[4-5]。Meta 分析^[6]结果表明，中医药治疗围绝经期综合征与西药激素治疗的疗效相当，且副作用少、安全性高。

围绝经期综合征是一个多因素疾病，其发病机制不仅和内分泌系统、神经系统、免疫系统有关，也和自身的社会环境、文化、心理等因素有着密切的联系^[7-8]。本实验采用去卵巢手术的方法造成小鼠雌激素水平下降，同时又合并电刺激对小鼠造成应激。此建模方法既可以避免自然衰老小鼠获得困难的问题，又可以解决单纯去卵巢小鼠无心理因素诱因的困难，更贴近临床。本实验通过戊巴比妥钠所致去卵巢合并电刺激小鼠协同睡眠实验，确定了柴胡加龙骨牡蛎汤改善围绝经期睡眠的有效部位，同时又开展了 70 %醇有效洗脱部位的量效研究。结果提示，70 %洗脱部位具有复杂的量效关系，起效剂量为 48 mg·kg⁻¹，剂量过高(192 mg·kg⁻¹)效应反而下降，在 12~96 mg·kg⁻¹ 剂量范围内成量效关系，此结果将为临床治疗围绝经期综合征选择合理剂量提供数据支持。

围绝经期睡眠障碍发病机制尚不十分清楚。已有研究表明，围绝经期下丘脑 - 垂体 - 卵巢内分泌轴的变化，即雌激素水平的变化，可以影响与睡眠相关的神经递质释放，如乙酰胆碱、5- 羟色胺和 γ - 氨基丁酸等^[9]。另外，围绝经期睡眠障碍与神经内分泌免疫网络也有着密不可分的联系，围绝经期女性体内雌激素水平发生变化，免疫活性细胞、脑内单胺类神经递质如 5- 羟色胺、去甲肾上腺素和多巴胺水平等也会发生变化^[10]。近年来，研究亦发现^[11]雌激素受体除存在于生殖系统和第二性征器官外，还存在于全身其他很多部位，调节睡眠觉醒的相关脑区也有其分布，如基底前脑、下丘脑 / 视前区、腹

侧被盖区和蓝斑等。这些研究均证实雌激素水平的变化与围绝经期睡眠障碍有着密切的联系。本实验研究结果显示, 70 %醇洗脱有效部位($48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)可以增加去卵巢合并电刺激小鼠的子宫系数, 提示柴胡加龙骨牡蛎汤可能是通过调节去卵巢合并电刺激小鼠的雌激素水平而发挥其改善睡眠作用。

本实验选取中医临床疗效确切的中药复方柴胡加龙骨牡蛎汤, 筛选并确定了柴胡加龙骨牡蛎汤改善围绝经期睡眠的最佳有效部位和最佳给药剂量, 并通过本方对去卵巢合并电刺激小鼠生殖器系数影响的比较, 从一方面确定了其改善围绝经期综合征睡眠的可能机制, 这为深层次研究柴胡加龙骨牡蛎汤改善围绝经期综合征失眠的作用及生物机制, 奠定了基础, 也为临床应用柴胡加龙骨牡蛎汤治疗围绝经期综合征提供科学依据。

参考文献:

- [1] 黄莉莉, 于爽, 李廷利. 柴胡加龙骨牡蛎汤对围绝经期大鼠睡眠时相的影响[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(2): 76-78.
- [2] 黄莉莉, 于爽, 李秋红, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对去卵巢大鼠睡眠时相的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(1): 38-39.
- [3] 马堃, 李连达. 中医药治疗更年期综合征药效学试验的基本要求[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 214-216.
- [4] Liu KJ, Wang WJ, Li DJ, et al. Effect of Gengnianchun Recipe on bone mineral density, bone biomechanical parameters and serum lipid level in ovariectomized rats[J]. Chin J Integr Med, 2010, 12(2): 132-136.
- [5] 李晔, 周明芳, 王君伟. 坤宝丸治疗围绝经期综合征的临床研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 1957-1958.
- [6] 堵吉, 谈勇. 中医药治疗围绝经期综合征的 meta 分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(5): 564-565.
- [7] 王利芬. 围绝经期综合征中西医临床研究进展[J]. 环球中医药, 2013, 6(2): 151-155.
- [8] 韩翠芹. 围绝经期综合征诊治进展[J]. 医学理论与实践, 2014, 27(1): 33-36.
- [9] McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system[J]. Endocr Rev, 1999, 20(3): 297-307.
- [10] 王宪. 补肾至仙汤治疗围绝经期综合征及对神经-内分泌-免疫网络影响的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- [11] Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha[J]. Endocrinology, 2003, 144(5): 2055-2067.

(编辑: 修春)

基于 I 型胶原代谢水平探讨淫羊藿和女贞子对骨质疏松模型的影响

康 学¹, 刘仁慧¹, 年宏蕾¹, 张伟华², 李 蔚¹, 王秀娟¹(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437)

摘要: **目的** 基于 I 型胶原合成降解率探讨淫羊藿和女贞子配伍对大鼠骨质疏松模型的影响及可能机制。 **方法** 取 Wistar 雄性大鼠 60 只, 随机分为 6 组, 即正常对照组、模型对照组、淫羊藿组 ($9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、女贞子组 ($9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、淫羊藿女贞子配伍组(淫羊藿:女贞子=4:3, $9.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、雷洛昔芬阳性对照组($6.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只, 自由饮水、摄食。除正常对照组外, 其余各组大鼠均用 0.5 % 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成的维甲酸混悬液按 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃, 正常对照组大鼠以 0.5 % CMC-Na 灌胃, 连续造模 2 周。在模型复制的同时, 各组动物灌胃给予相应的药物, 正常对照组和模型对照组给予等量的生理盐水灌胃, 每日 1 次, 共 3 周。检测骨密度、生物力学、血清骨钙素(BGP)及 I 型前胶原氨基端前肽(PINP)、I 型前胶原羧基端前肽(PICP)、I 型胶原交联羧基末端肽(ICTP)水平, 并对实验数据进行相关性分析。 **结果** 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠骨密度和生物力学性能显著下降 ($P < 0.01$), BGP 含量及 PINP、PICP、ICTP 水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型对照组比较, 淫羊藿女贞子配伍可显著升高骨密度 ($P < 0.01$), 增强骨生物力学性能 ($P < 0.01$),

收稿日期: 2014-03-24

作者简介: 康学, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药及复方的药效学研究。Email: kangxue0907@126.com。通讯作者: 刘仁慧, 博士, 副教授, 研究方向: 中药及复方的药效学研究。Email: liurenhui995@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373814); 北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201310025012); 北京中医药薪火传承“3+3”工程二室一站建设项目(2012-SZ-C-42)。