

酸枣仁-延胡索配伍对肝郁型失眠小鼠的作用及机制研究

王婷婷, 郝蕾, 王芮, 张一昕, 王茜, 刘温雨(河北中医学院药学院, 河北省高校中药组方制剂应用技术研发中心, 河北 石家庄 050091)

摘要: **目的** 探讨酸枣仁-延胡索配伍对肝郁型失眠小鼠的镇静催眠作用及机制。**方法** ①将 96 只昆明小鼠随机分为 4 组: 正常组、酸枣仁组($2.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、延胡索组($1.50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、酸枣仁-延胡索配伍组(简称配伍组, $3.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组 24 只; 每日 1 次, 连续灌胃 10 d, 然后观察戊巴比妥钠阈下剂量(腹腔注射, $35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)诱导小鼠的睡眠发生率, 阈上剂量(腹腔注射, $45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)诱导小鼠的睡眠潜伏期、睡眠时间。②将 60 只昆明小鼠随机分为 5 组: 正常组、模型组、酸枣仁组($2.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、延胡索组($1.50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、配伍组($3.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组 12 只。采用慢性夹尾刺激和对氯苯丙氨酸(PCPA, $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射的复合因子造模法复制肝郁型失眠小鼠模型。每日 1 次, 连续灌胃给药 14 d。采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)的含量, 检测垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)及下丘脑促肾上腺皮质激素释放素(CRH)的含量; 采用免疫组化法检测垂体 ACTH 和海马 5-HT 的蛋白表达; 采用 qRT-PCR 法检测脑组织中 $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ 共转运体 2(KCC2)、 $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{-2Cl}^-$ 共转运体 1(NKCC1) mRNA 表达水平。**结果** ①与正常组比较, 给药组小鼠的睡眠发生率明显提高, 睡眠时间显著延长($P < 0.01$); 酸枣仁组及配伍组的睡眠潜伏期显著缩短($P < 0.01$)。②与正常组比较, 模型组小鼠血清的 NE、DA 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 5-HT 含量明显降低($P < 0.01$); 脑垂体 ACTH 及下丘脑 CRH 含量明显升高($P < 0.01$); 垂体中 ACTH 的表达明显上调($P < 0.01$), 海马中 5-HT 的表达明显下调($P < 0.01$); 脑组织的 KCC2 mRNA 表达明显下调($P < 0.01$), NKCC1 mRNA 表达明显上调($P < 0.01$)。与模型组比较, 配伍组小鼠血清的 NE、DA 含量明显降低($P < 0.01$), 5-HT 含量明显升高($P < 0.01$); 脑垂体 ACTH 及下丘脑 CRH 含量明显降低($P < 0.01$); 脑垂体中 ACTH 的表达明显下调($P < 0.01$), 海马中 5-HT 的表达明显上调($P < 0.01$); 脑组织的 KCC2 mRNA 表达明显上调($P < 0.01$), NKCC1 mRNA 表达明显下调($P < 0.05$)。**结论** 酸枣仁-延胡索配伍对肝郁型失眠小鼠具有镇静催眠作用, 可能与其调控 KCC2、NKCC1 基因表达, 抑制 HPA 轴激活, 从而调节神经递质水平有关。

关键词: 酸枣仁; 延胡索; 肝郁证; 失眠; $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ 共转运体 2(KCC2); $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{-2Cl}^-$ 共转运体 1(NKCC1); 神经递质; 小鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)05-0619-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.004

Effect and Mechanism of Combining Ziziphi spinosae Semen and Corydalis Rhizoma on Insomnia Mice Model with Liver Depression Syndrome

WANG Tingting, HAO Lei, WANG Rui, ZHANG Yixin, WANG Xi, LIU Wenyu (Department of Pharmacy, Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Hebei Higher Education Institute Applied Technology Research Center on TCM Formula Preparation, Shijiazhuang 050091 Hebei, China)

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of combination of Ziziphi spinosae semen and Corydalis rhizoma on insomnia mice model with liver depression syndrome. **Methods** Firstly, ninety-six Kunming mice were randomly divided into 4 groups: normal group, Ziziphi spinosae semen group ($2.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Corydalis rhizoma

收稿日期: 2020-04-17

作者简介: 王婷婷, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药性理论。Email: 857719874@qq.com。通信作者: 王茜, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药药性理论。Email: wxi830205@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81503268); 中央财政中共卫生专项“2019 年全国第四次中药资源普查项目——河北省(Z135080000022)”。

group ($1.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and compatibility group of *Ziziphi spinosae* semen and *Corydalis rhizoma* (compatibility group for short) ($3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). After 10 days of intragastric administration, we observed the sleep incidence of sodium pentobarbital (subthreshold doses) and sleep latency and prolonged asleep time (superthreshold doses). Secondly, sixty Kunming mice were randomly divided into 5 groups: normal group, model group, *Ziziphi spinosae* semen group ($2.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), *Corydalis rhizoma* group ($1.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and compatibility group ($3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 12 mice in each group. The mouse model of insomnia was established by chronic stimulation of tail clipping and intraperitoneal injection of PCPA ($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). After 14 days of intragastric administration, the contents of norepinephrine (NE), dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The contents of pituitary corticotropin (ACTH) and hypothalamic corticotropin releasing hormone (CRH) were detected by the same method. The protein expressions of pituitary ACTH and hippocampal 5-HT were observed by immunohistochemistry, the expression of KCC2 mRNA and NKCC1 mRNA in brain tissue were detected by qRT-PCR technique. **Results** Compared with the normal group, the incidence of sleep in the treated group was higher, the sleep latency was significantly shortened and the sleep time was significantly prolonged ($P < 0.01$). The contents of NE and DA in the serum of the model group were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the contents of 5-HT was significantly decreased ($P < 0.01$), ACTH and CRH in the brain tissue of the model group were significantly higher ($P < 0.01$), the expression of ACTH was significantly increased ($P < 0.01$), the expression of 5-HT was significantly decreased ($P < 0.01$), the expression of KCC2 mRNA was significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the expression of NKCC1 mRNA was significantly up-regulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, the compatibility group could significantly decrease the content of NE and DA in serum ($P < 0.01$), increase the content of 5-HT ($P < 0.01$), decrease the content of ACTH and CRH in brain tissue ($P < 0.01$), decrease the expression of ACTH ($P < 0.01$) and increase the expression of 5-HT ($P < 0.01$). It could up-regulate the expression of KCC2 mRNA ($P < 0.01$) and down-regulate the expression of NKCC1 mRNA ($P < 0.01$). **Conclusion** The combination of *Ziziphi spinosae* semen and *Corydalis rhizoma* has a sleep-promoting effect on insomnia mice model with liver depression syndrome, which may be related to the regulation of KCC2 and NKCC1 genes and inhibiting the activation of HPA axis, thus affecting the content of neurotransmitters.

Keywords: *Ziziphi spinosae* semen; *Corydalis rhizoma*; liver depression syndrome; insomnia; K^+-Cl^- cotransporter 2(KCC2); $\text{Na}^+, \text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter 1(NKCC1); neurotransmitters; mice

失眠症是以频繁且持续的入睡困难或睡眠维持困难, 并导致睡眠满意度不足为特征的睡眠障碍^[1]。随着社会的发展, 生活节奏的加快, 越来越多的人出现了失眠的症状^[2]。WHO 睡眠卫生协会调查^[3]显示, 全球约 29% 的人正在饱受着失眠的困扰, 其中, 约 10% 的人群达到严重失眠的诊断标准, 并且以脑力劳动者居多。我国成人有失眠症状的人数比例高达 57%, 失眠症患者率达 9.7%^[4]。

对氯苯丙氨酸(PCPA)为动物实验中常用的复制失眠模型的药物^[5]。研究发现, 神经递质的变化是 PCPA 诱发失眠的一个重要环节^[6], 阳离子- Cl^- 共转运体中的 K^+-Cl^- 共转运体 2(KCC2)、 $\text{Na}^+, \text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共转运体 1(NKCC1)在神经兴奋/抑制的平衡中起了重要作用^[7]。酸枣仁具有养心补肝、宁心安神的功效。

延胡索的有效成分延胡索乙素、延胡索丑素和延胡索癸素均具有镇静、催眠的作用^[8]。临床上酸枣仁-延胡索是治疗失眠的常用药对^[9-11]。为了进一步探究酸枣仁-延胡索配伍增效的作用途径, 本研究拟采用慢性夹尾刺激和 PCPA 腹腔注射的复合因子造模法复制肝郁型失眠小鼠模型, 通过观察酸枣仁-延胡索配伍对失眠小鼠神经递质及脑组织中 KCC2、NKCC1 基因表达的影响, 以期阐明其治疗失眠的作用机制, 为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 6~8 周龄雄性昆明小鼠, 156 只, 清洁级, 体质量 18~22 g, 河北医科大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(冀)2018-004, 动物

质量合格证号: 1903220。动物饲养于恒温恒湿、明暗各 12 h 的清洁级实验室内, 自由进食饮水。

1.2 药物及试剂 炒酸枣仁(批号: 9070793) 15 g、醋延胡索(批号: 9061383) 10 g, 选用广东一方制药有限公司生产的中药配方颗粒剂, 由河北省中医院中药房提供。酸枣仁-延胡索配伍为 15 g 酸枣仁配方颗粒+10 g 延胡索配方颗粒=25 g; 将药物加入 100 ℃ 蒸馏水中, 加热搅拌使其充分溶解; 将配制好的药液置于 4 ℃ 冰箱中贮存备用, 每周配制 1 次。戊巴比妥钠, 北京化学试剂公司(德国进口分装), 批号: 020402。PCPA, 美国 Sigma 公司, 批号: 1001542324, 将其充分研磨, 用弱碱性生理盐水助溶, 临用时配制成 40 mg·mL⁻¹ 的混悬液。

去甲肾上腺素(NE, 批号: RE59261)、多巴胺(DA, 批号: RE59161)、5-羟色胺(5-HT, 批号: RE59121)检测试剂盒, 德国 IBL International GmbH 公司; 促肾上腺皮质激素(ACTH, 批号: EKE-001-21)、促肾上腺皮质激素释放素(CRH, 批号: EKE-019-06)检测试剂盒及 ACTH 抗体(批号: H-001-21), 美国 PhoenixBiotech 公司; 免疫组化试剂 ABC kit(批号: pk-4001/2)、免疫组化试剂盒(批号: pk-4001/2), 美国 Vector 公司; 5-HT 抗体(批号: s5545)、DEPC(批号: D5758), 美国 Sigma 公司; Eastep Super TRNA ExtractionKit(批号: LS1040)、GoScript Reverse Transcription System(批号: A5001)、GoTaq qPCR Master Mix(批号: A6002), 美国 Promega 公司。

1.3 主要仪器 UV-254 型紫外透射仪, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 1-15K 型高速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; 756MC 型紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; DYY 电泳槽及电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪, 英国 Bio-Rad 公司; MK3FC 型酶联免疫检测仪, 美国 Thomer Fisher 公司。

1.4 酸枣仁-延胡索配伍对戊巴比妥钠阈上、阈下剂量诱导小鼠镇静催眠作用的影响

1.4.1 分组及给药 取 96 只小鼠, 适应性喂养 1 周后, 随机分为 4 组, 每组 24 只, 即正常组、酸枣仁组、延胡索组、酸枣仁-延胡索配伍组(简称配伍组)。各组小鼠的给药剂量参照 2015 年版《中华人民共和国药典: 一部》中规定的成人每日最大用量, 根据人和动物体表系数折算为: 酸枣仁组 2.25 g·kg⁻¹、延胡索组 1.50 g·kg⁻¹、配伍组 3.75 g·kg⁻¹。

灌胃给药体积为 10 mL·kg⁻¹, 每日 1 次, 连续给药 10 d; 正常组给予等体积生理盐水。

1.4.2 小鼠入睡数量、睡眠潜伏期、睡眠时间观察 于末次灌胃给药 50 min 后, 每组选择 12 只小鼠腹腔注射 3.5 mg·mL⁻¹ 戊巴比妥钠水溶液 10 mL·kg⁻¹, 观察注射后 30 min 内每组小鼠的入睡数量, 并计算睡眠发生率。选择其余 12 只小鼠腹腔注射 4.5 mg·mL⁻¹ 戊巴比妥钠水溶液 10 mL·kg⁻¹, 观察注射后 30 min 内每组小鼠的睡眠潜伏期及睡眠时间。从开始注射戊巴比妥钠到翻正反射消失的时间为睡眠潜伏期, 从翻正反射消失到翻正反射恢复的时间为睡眠时间。实验中以动物翻正反射消失达 1 min 为入睡指标, 以 30 s 内翻转达 3 次为睡眠结束指标。

1.5 酸枣仁-延胡索配伍对 PCPA 致失眠小鼠的影响

1.5.1 分组、模型复制及给药 取 60 只小鼠, 适应性喂养 1 周后, 随机分为 5 组, 每组 12 只, 即正常组、模型组、酸枣仁组(2.25 g·kg⁻¹)、延胡索组(1.50 g·kg⁻¹)、酸枣仁-延胡索配伍组(3.75 g·kg⁻¹, 简称配伍组)。参考朱洁等^[2]的研究方法, 采用小鼠慢性夹尾刺激和 PCPA 腹腔注射的复合因子造模方法复制肝郁型失眠小鼠模型。将每组小鼠置于同一笼内, 用尖端包扎纱布的止血钳分别夹小鼠尾部, 令其与其他小鼠厮打, 每天刺激 45 min, 控制刺激强度, 以不破皮流血为度, 连续 20 d。于模型复制第 16 天起, 模型组及给药组小鼠按 400 mg·kg⁻¹ 剂量腹腔注射 PCPA, 每日 1 次, 连续 2 d, 正常组给予等体积生理盐水。给药组小鼠于模型复制第 7 天起, 分别给予相应药物灌胃(10 mL·kg⁻¹), 每日 1 次, 连续 14 d; 正常组、模型组给予等体积生理盐水。灌胃时间为每日 8:00~9:00, 腹腔注射时间为灌胃后 2 h。自由进食饮水, 每 7 d 称体质量 1 次, 调整给药剂量。

1.5.2 样本采集、处理 末次给药后, 各组小鼠摘眼球取血, 以离心半径 12 cm、4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 分离血清, 待检测相关神经递质指标。取血后, 立即取大脑, 每组选取 6 只小鼠的脑组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 待切片后, 用免疫组化法观察相应指标; 另取 6 只小鼠的脑组织, 置于冰台上分离下丘脑、垂体、海马, 置于冻存管中, 液氮冻存, -80 ℃ 冰箱保存, 待检测脑组织匀浆中的神经递质含量以及脑组织中 KCC2、NKCC1 的基因表达。

1.5.3 宏观体征评价 动态观察小鼠造模前后的精神、活动、睡眠、饮食、体质量、皮毛状态, 于模

型复制开始前及模型复制过程中每周日上午 7:30 称量小鼠体质量。

1.5.4 酶联免疫吸附法(ELISA)检测有关神经递质含量 严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,检测小鼠血清 NE、DA、5-HT 及垂体 ACTH、下丘脑 CRH 的含量,在 450 nm 波长处测定各孔的光密度(OD)值。

1.5.5 免疫组化法检测脑组织 ACTH、5-HT 蛋白表达 小鼠脑组织经充分脱水、透明、浸蜡、包埋后,切成 5 μm 厚度。脱蜡、入水:将切片依次浸于二甲苯中 0.5~1 h、无水乙醇 5~10 min、95%乙醇 5 min、80%乙醇 5 min,然后以蒸馏水冲洗;3%甲醇双氧水浸泡 15 min,室温自来水冲洗 20~30 min;采用高压组织抗原修复(高压锅内修复液浸过组织,等喷气后电磁炉功率降低一半,修复 1 min 45 s;放气,冷水冲洗高压锅降温,待冷却后将玻片取出)后,放入 PBS 中;切片上滴加一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日取出,待切片恢复至室温后,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;切片上滴加二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光 20 min 后,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加 DAB 染液显色 5~10 min,水洗终止显色;苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片。光学显微镜 $\times 200$ 视野下随机选择背景和阳性组织区域,应用彩色病理图文分析系统计算平均 OD 值。

1.5.6 qRT-PCR 法检测脑组织 KCC2、NKCC1 mRNA 表达 用 Trizol 提取脑组织样本中的总 RNA;取 5 μL RNA 用 1%琼脂糖凝胶进行电泳,以检测 RNA 的完整性。逆转录反应:取总 RNA 2 μg ,先在含 Oligo dT Primer、RandomPrimers 的混合液中 70 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 使模板 RNA 变性后,冰上迅速冷却。再加入反转录反应液,并用 Nuclease-Free Water 补足至 20 μL 反应液体积,缓慢混匀后短暂离心,于 PCR 仪 25 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min(退火),42 $^{\circ}\text{C}$ 、60 min(延伸),70 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min(失活),冰上冷却,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。Real time PCR 反应:应用两步法反应程序,预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min,然后 40 个循环反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s。扩增完毕,得到每个样本各目的基因及内参基因 GAPDH 的 Cq 值,目的基因 Cq 值-GAPDH Cq 值= ΔCq ;按照公式 $Q=2^{-\Delta\text{Cq}}$,得到每个目的基因的 Q 值及其均值,再以每个目的基因的“Q 值/Q 均值”作为各目的基因表达的相对定量值(RQ 值)。引物序列由 Primer 5.0 软件设计,引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequence for qPCR

引物名称	引物序列	产物长度/bp
KCC2	Forward primer:5'-ACCGTGTCTTTGTGGGTGT-3'	131
	Reverse primer:5'-ATCGGAAATGGGTGGGTC-3'	
NKCC1	Forward primer:5'-TGAATGGAAGCTAGGGCCTG-3'	198
	Reverse primer:5'-CCCTGTTAGGTGCATCGAGA-3'	
GAPDH	Forward primer:5'-TGATGGGTGTAACCACGAG-3'	126
	Reverse primer:5'-GCCCTTCCACAATGCCAAAG-3'	

1.6 统计学处理方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较用 LSD 检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 酸枣仁-延胡索配伍对戊巴比妥钠阈上、阈下剂量诱导小鼠镇静催眠作用的影响 结果见表 2。与正常组比较,给药组小鼠的睡眠发生率明显提高,睡眠时间显著延长($P < 0.01$);酸枣仁组及配伍组的睡眠潜伏期显著缩短($P < 0.01$)。结果表明,酸枣仁-延胡索配伍能够提高戊巴比妥钠阈下剂量诱导的小鼠睡眠发生率,缩短阈上剂量诱导的小鼠睡眠潜伏期并延长其睡眠时间。

表 2 酸枣仁-延胡索配伍对戊巴比妥钠阈上、阈下剂量诱导小鼠镇静催眠作用的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 2 Effect of combination of Ziziphi spinosae semen and Corydalis rhizoma with subthreshold or suprathreshold doses on sedation and hypnosis of pentobarbital sodium induced mice ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	剂量/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	入睡鼠 数/只	睡眠发生 率/%	睡眠潜伏 期/min	睡眠时间/ min
正常组	-	0	0	7.36 \pm 0.80	46.27 \pm 4.17
酸枣仁组	2.25	7	58.3	5.92 \pm 0.67**	56.64 \pm 6.07**
延胡索组	1.50	7	58.3	7.27 \pm 0.90	62.36 \pm 9.30**
配伍组	3.75	10	83.3	5.45 \pm 0.82**	58.00 \pm 4.45**

注:与正常组比较,** $P < 0.01$

2.2 宏观体征评价 结果见表 3。正常组小鼠反应敏捷、精神状态良好,活动、睡眠、饮食、体质量正常,毛质光泽柔顺,睡眠节律明显,表现为昼伏夜动。与正常组比较,模型组小鼠在注射 PCPA 1 周后开始出现精神欠佳、活动及饮食减少、毛质欠光泽、叫声尖细,但直立对峙、嘶叫次数逐渐减少;2 周后出现毛发散乱,对外界刺激的反应开始减弱,

活动明显减少, 毛发浸湿, 蛰伏在角落, 表现出“肝郁证”特点; 第 3 周表现为昼夜节律消失, 精神萎靡, 活动和进食明显减少, 大便稀软, 毛发散乱枯燥、胡须下垂、眼角有分泌物, 体质量明显降低 ($P < 0.01$)。上述结果表明肝郁模型复制成功。与模型组比较, 各给药组小鼠对峙、撕咬的情况较少, 清洁行为基本灵活, 叫声比较柔和, 毛发整洁, 饮食正常, 睡眠节律基本存在, 体质量持续升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, 酸枣仁-延胡索配伍能有效调节肝郁失眠小鼠的精神状态和行为表现, 提高其体质量。

表 3 酸枣仁-延胡索配伍对氯苯丙氨酸致失眠小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 3 Effect of compatibility of Ziziphi spinosae semen and Corydalis rhizoma on body mass of pchlorophenylalanine induced insomnia mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g			
		造模前	第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常组	-	21.88 ± 1.38	32.77 ± 1.45	38.45 ± 2.05	42.54 ± 0.77
模型组	-	21.47 ± 1.00	29.11 ± 1.45 [#]	32.73 ± 3.28 [#]	36.73 ± 2.00 [#]
酸枣仁组	2.25	21.62 ± 1.61	31.15 ± 1.84 [*]	36.19 ± 2.19 [*]	38.47 ± 0.70
延胡索组	1.50	21.81 ± 1.71	31.19 ± 1.93 [*]	35.84 ± 0.84 [*]	38.90 ± 0.86 [*]
配伍组	3.75	21.29 ± 1.90	32.08 ± 1.38 ^{**}	37.60 ± 1.50 ^{**}	40.61 ± 1.14 ^{**}

注: 与正常组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2.3 酸枣仁-延胡索配伍对 PCPA 致失眠小鼠血清 NE、DA、5-HT 含量的影响 结果见表 4。与正常组比较, 模型组小鼠血清的 NE、DA 含量明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 5-HT 含量明显降低 ($P < 0.01$), 提示失眠模型复制成功。与模型组比较, 各给药组小鼠血清的 NE、DA 含量明显降低 ($P < 0.05$, $P <$

表 4 酸枣仁-延胡索配伍对氯苯丙氨酸致失眠小鼠血清 NE、DA、5-HT 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 4 Effect of compatibility of Ziziphi spinosae semen and Corydalis rhizoma on the contents of NE, DA and 5-HT in serum of pchlorophenylalanine induced insomnia mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	NE/(pg·mL ⁻¹)	DA/(pg·mL ⁻¹)	5-HT/(ng·mL ⁻¹)
模型组	-	250.20 ± 13.97 [#]	161.30 ± 17.03 [#]	166.10 ± 29.88 [#]
酸枣仁组	2.25	221.78 ± 22.26 [*]	89.24 ± 6.27 ^{**}	133.81 ± 18.79
延胡索组	1.50	209.24 ± 8.36 ^{**}	112.96 ± 14.25 ^{**}	229.18 ± 23.33 ^{**}
配伍组	3.75	207.52 ± 15.11 ^{**}	87.20 ± 6.82 ^{**}	329.91 ± 42.40 ^{**}

注: 与正常组比较, [#] $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

0.01); 延胡索组及配伍组的小鼠血清 5-HT 含量明显升高 ($P < 0.01$)。结果表明, 酸枣仁-延胡索配伍能有效改善 PCPA 致失眠小鼠血清中的 NE、DA、5-HT 等神经递质含量。

2.4 酸枣仁-延胡索配伍对 PCPA 致失眠小鼠脑组织中 ACTH、CRH 含量的影响 结果见表 5。与正常组比较, 模型组小鼠的脑垂体 ACTH 及下丘脑 CRH 含量明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组小鼠的脑垂体 ACTH 及下丘脑 CRH 含量明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, 酸枣仁-延胡索配伍能有效改善 PCPA 致失眠小鼠脑组织中神经递质的含量。

表 5 酸枣仁-延胡索配伍对氯苯丙氨酸致失眠小鼠脑组织中 ACTH、CRH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Effect of compatibility of Ziziphi spinosae semen and Corydalis rhizoma on the contents of ACTH and CRH in brain tissue of pchlorophenylalanine induced insomnia mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ACTH/(pg·mg ⁻¹)	CRH/(pg·mg ⁻¹)
模型组	-	683.72 ± 102.10 [#]	2 495.25 ± 96.01 [#]
酸枣仁组	2.25	421.37 ± 28.18 ^{**}	1 376.46 ± 116.00 ^{**}
延胡索组	1.50	537.77 ± 26.57 [*]	1 663.28 ± 104.14 ^{**}
配伍组	3.75	256.75 ± 30.60 ^{**}	1 299.97 ± 104.77 ^{**}

注: 与正常组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2.5 酸枣仁-延胡索配伍对 PCPA 致失眠小鼠脑组织中 ACTH、5-HT 表达的影响 结果见图 1、图 2、表 6。观察免疫组化法染色后的小鼠脑组织切片, 5-HT 及 ACTH 阳性表达的脑组织细胞被着色, 呈现出棕黄色。与正常组比较, 模型组小鼠脑垂体中 ACTH 的表达明显上调 ($P < 0.01$), 海马中 5-HT 的表达明显下调 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组小鼠脑垂体中 ACTH 的表达明显下调 ($P < 0.01$), 海马中 5-HT 的表达明显上调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, 酸枣仁-延胡索配伍可以有效调节 PCPA 致失眠小鼠脑组织中神经递质的表达。

2.6 酸枣仁-延胡索配伍对 PCPA 致失眠小鼠脑组织中 KCC2、NKCC1 mRNA 表达的影响 结果见表 7。与正常组比较, 模型组小鼠脑组织的 KCC2 mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$), NKCC1 mRNA 表达明显上调 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组小鼠脑组织的 KCC2 mRNA 表达均明显上调 ($P < 0.01$), NKCC1 mRNA 表达均明显下调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果表明, 酸枣仁-延胡索配伍可以有效调节 PCPA 致失眠小鼠脑组织的 KCC2、NKCC1 mRNA 表达。

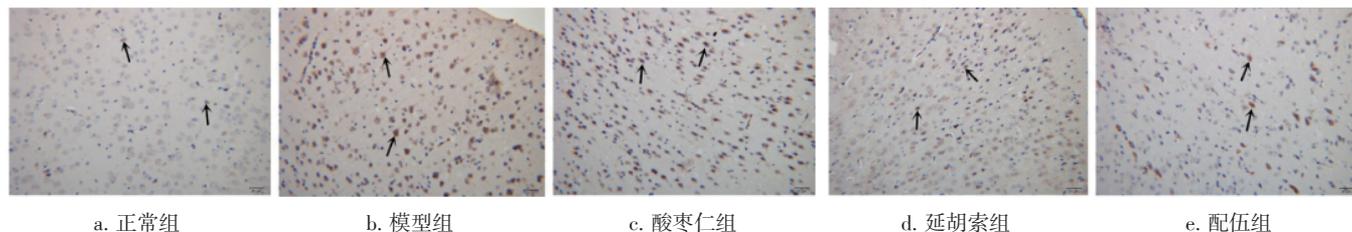


图1 酸枣仁-延胡索配伍对氯苯丙氨酸致失眠小鼠垂体 ACTH 表达的影响(免疫组化, ×200)

Figure 1 Effect of compatibility of Ziziphi spinosae semen and Corydalis rhizoma on ACTH expression in pituitary of pchlorophenylalanine induced insomnia mice(IHC, ×200)

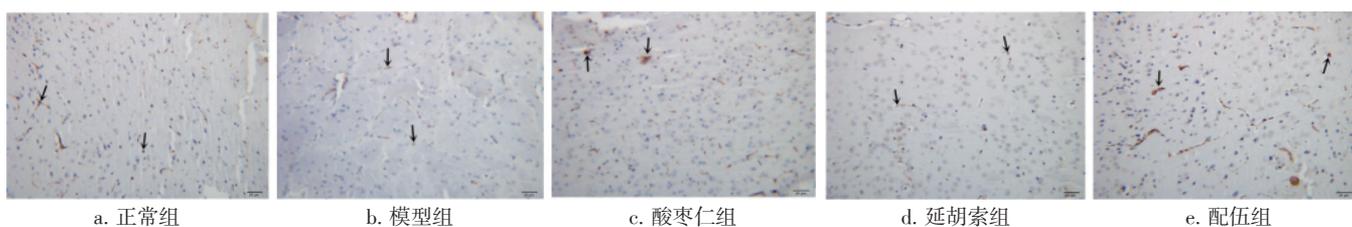


图2 酸枣仁-延胡索配伍对氯苯丙氨酸致失眠小鼠海马 5-HT 表达的影响(免疫组化, ×200)

Figure 2 Effect of compatibility of Ziziphi spinosae semen and Corydalis rhizoma on 5-HT expression in hippocampal of pchlorophenylalanine induced insomnia mice(IHC, ×200)

表6 酸枣仁-延胡索配伍对氯苯丙氨酸致失眠小鼠脑组织中 ACTH、5-HT 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of compatibility of Ziziphi spinosae semen and Corydalis rhizoma on the expression of ACTH and 5-HT in brain tissue of pchlorophenylalanine induced insomnia mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	平均 OD 值	
		ACTH	5-HT
正常组	-	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02
模型组	-	0.33 ± 0.04 ^{##}	0.14 ± 0.01 ^{##}
酸枣仁组	2.25	0.28 ± 0.01 ^{**}	0.19 ± 0.02 ^{**}
延胡索组	1.50	0.26 ± 0.01 ^{**}	0.20 ± 0.03 [*]
配伍组	3.75	0.25 ± 0.01 ^{**}	0.24 ± 0.01 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{##}*P* < 0.01; 与模型组比较, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01

3 讨论

压力过大可导致精神紧张焦虑,在一定程度上干扰正常睡眠,导致失眠经久不愈或愈发严重^[13]。研究^[14-15]显示,肝郁型失眠是临床上常见的失眠证型,其主要病位在心、肝。情志不畅,肝郁气结,日久郁而化火,扰动心神,心神不安而致不寐。患者常见难以入睡,间断多醒,醒后不能再睡,早醒、多梦甚至彻夜难眠^[16]。长期失眠会耗损人体的阴血,因此在治疗时,应当滋心肝之阴,补养心血,并配合少量活血行气之品防止气血壅滞。酸枣仁养心补

表7 酸枣仁-延胡索配伍对氯苯丙氨酸致失眠小鼠脑组织中 KCC2、NKCC1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effect of compatibility of Ziziphi spinosae semen and Corydalis rhizoma on the expression of KCC2 and NKCC1 mRNA in brain tissue of pchlorophenylalanine induced insomnia mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量	
		KCC2	NKCC1
正常组	-	1.18 ± 0.22	0.69 ± 0.14
模型组	-	0.60 ± 0.10 ^{##}	1.36 ± 0.31 ^{##}
酸枣仁组	2.25	1.16 ± 0.18 ^{**}	0.90 ± 0.18 ^{**}
延胡索组	1.50	1.02 ± 0.25 ^{**}	1.01 ± 0.13 [*]
配伍组	3.75	1.60 ± 0.35 ^{**}	0.84 ± 0.17 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{##}*P* < 0.01; 与模型组比较, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01

肝,延胡索归肝、脾二经,有活血、行气之功,故二者配伍为治疗肝郁型失眠的对症之选。

现代药理学研究^[17]表明,酸枣仁皂苷类成分在镇静安神、抗焦虑、抗抑郁等方面表现出明显的活性。酸枣仁皂苷可以显著缩短小鼠的睡眠潜伏期,延长戊巴比妥钠诱导小鼠的睡眠时间,且呈一定的量效关系,其中酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 均能显著减少小鼠的自发活动,还可协同戊巴比妥钠的中枢神经抑制作用^[18]。延胡索的有效成分具有镇静催眠作用,其中以延胡索乙素的作用最强^[19]。本研究结

果显示,酸枣仁-延胡索配伍能够提高戊巴比妥钠阈下剂量诱导的小鼠睡眠发生率,缩短戊巴比妥钠阈上剂量诱导的小鼠睡眠潜伏期并延长其睡眠时间,尤其在缩短睡眠潜伏期方面作用明显。因此,推测酸枣仁-延胡索配伍对于难以入睡型失眠患者有较好的促进睡眠作用。

研究^[20]显示,睡眠是一种中枢神经系统调节的过程,其发生与中枢神经递质如 5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)等密切相关。5-HT 是一种参与摄食、体温、睡眠-觉醒、情绪活动的重要单胺类神经递质,也是中枢神经系统的抑制性神经递质,其分泌不足能引起大脑皮层兴奋和抑制功能发生紊乱,从而导致睡眠障碍^[21]。研究^[22]发现,脑内 5-HT 的变化与动物觉醒呈正相关,即 5-HT 水平升高有利于维持睡眠状态。NE、DA 是中枢神经系统的兴奋性神经递质,当体内 DA、NE 含量增高时,可以直接兴奋中枢,造成睡眠减少、觉醒增加。本研究结果也表明,对氯苯丙氨酸(PCPA)致失眠模型小鼠的血清 NE、DA 含量明显升高,血清 5-HT 含量及脑组织 5-HT 蛋白表达明显降低,而给药组能降低 NE、DA 含量,升高 5-HT 含量及蛋白表达,其中酸枣仁-延胡索配伍组效果最明显。提示酸枣仁-延胡索配伍可能通过调节 NE、DA、5-HT 等神经递质水平来发挥镇静催眠作用,且作用比单味药使用更强。故下一步拟探讨酸枣仁-延胡索不同配伍比例对不同指标的干预作用。

研究表明,失眠的发生与下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴有关^[23-25],下丘脑室旁核是 HPA 轴活动的直接控制部位,促肾上腺皮质激素释放素(CRH)由下丘脑室旁核神经元分泌,促肾上腺皮质激素(ACTH)由 CRH 刺激神经垂体分泌^[26]。CRH 一方面作为神经递质调控蓝斑核 NE 系统与中缝核 5-HT 系统活性,另一方面在神经内分泌免疫网络上作用于 CRH 受体,有效调节 HPA 轴的功能^[27]。失眠患者的 HPA 轴功能亢进,ACTH 能明显提高大脑皮质应激性,在睡眠-觉醒调控中起关键作用。ACTH 的水平与机体状态呈正相关,当机体处于应激状态时,ACTH 水平升高,当机体处于睡眠状态时,ACTH 水平下降^[28]。本研究结果显示,模型组小鼠脑组织中的 ACTH、CRH 含量明显升高,ACTH 表达显著增强;给药组能降低 ACTH、CRH 含量,下调 ACTH 表达。提示酸枣仁-延胡索配伍可能在促进睡眠的同时

参与了 HPA 轴活动。同时,HPA 轴与神经递质之间也存在密切关系。HPA 轴功能亢进可以驱动中缝核 5-HT_{1A} 受体表达上调,基于自身的负反馈抑制作用,中缝核 5-HT_{1A} 受体表达上调则会抑制 5-HT 能纤维释放 5-HT 至海马^[29],本研究结果也证实了这点。

阳离子-Cl⁻共转运体是广泛分布在不同发育时期中枢神经系统内的一类介导 Na⁺、K⁺和 Cl⁻共转运的转运体家族^[30],其中,K⁺-Cl⁻共转运体 2(KCC2)有神经保护作用,Na⁺、K⁺-2Cl⁻共转运体 1(NKCC1)抑制剂可产生抗焦虑作用^[31]。有研究^[32]表明,NKCC1 和 KCC2 表达的改变可以通过影响 CRH,提高皮质酮水平,从而促进 HPA 轴激活,进而导致失眠。本研究结果显示,模型组小鼠 KCC2 mRNA 表达明显下调,NKCC1 mRNA 表达明显上调,酸枣仁-延胡索配伍可以有效调节 PCPA 致失眠小鼠脑组织的 KCC2、NKCC1 mRNA 表达。

综上所述,酸枣仁-延胡索配伍对 PCPA 诱导的肝郁型失眠小鼠具有促眠作用,其作用机制可能与调控 KCC2、NKCC1 基因表达,抑制 HPA 轴激活,从而调节神经递质水平有关。但其不同配伍比例对镇静催眠的作用以及对不同神经递质的调节程度有待继续深入研究,以期为临床提供最优的配伍比例选择。

参考文献:

- [1] 林炳岐,马捷,刘燕,等.四逆酸枣仁汤合方对失眠大鼠海马 GABAAR α 1、 γ 2及NKCC1的影响[J].中医药学报,2018,46(3):49-53.
- [2] 马丹丹,王琳琳.中医药治疗失眠的研究进展[J].中国民间疗法,2020,28(4):98-100.
- [3] 王庆军.督灸联合柴胡舒肝丸治疗气郁质失眠临床观察[J].河南中医,2021,41(1):120-123.
- [4] 朱正萍,范刚启.浮针联合柴胡加龙骨牡蛎汤加减治疗肝郁化火型原发性失眠疗效观察[J].上海针灸杂志,2020,39(3):274-279.
- [5] 郭海波,王慧.对氯苯丙氨酸在动物失眠模型中的应用概述[J].中国比较医学杂志,2019,29(6):135-140.
- [6] 谢晨,赵娜,杨文佳,等.针刺对失眠大鼠单胺类神经递质的影响研究进展[J].针灸临床杂志,2019,35(8):94-97.
- [7] 蔺芳菊,杨晓苏,杨德,等.阳离子-氯离子共转运体KCC2、NKCC1在对氯苯丙氨酸致急性失眠大鼠模型脑干中的表达[J].中华医学杂志,2013(19):1507-1511.
- [8] 李然,隋得志,王斌胜.析因设计评价元七胶囊配伍对小鼠睡眠的影响[J].滨州医学院学报,2019,42(2):142-143.
- [9] 王桂彩,应森林.重用延胡索(元首汤、二胡汤)从肝论治顽固性失眠[J].实用中医内科杂志,2015,29(8):57-58.

- [10] 刘安平, 刘吉善, 沈绍武, 等. 基于名老中医刘吉善门诊病案的数据挖掘分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(1): 75-79.
- [11] 孟彪, 高立珍, 赵和平. 辨治失眠经验[J]. 河南中医, 2016, 36(12): 2071-2073.
- [12] 朱洁, 中国明, 汪远金, 等. 肝郁证失眠大鼠模型的建立与评价[J]. 中医杂志, 2011, 52(8): 689-692.
- [13] 李俊. 加味丹栀逍遥散治疗肝郁化火型失眠伴焦虑症的临床观察[D]. 恩施: 湖北民族大学, 2019.
- [14] 刘晓雯, 汪卫东. 加味逍遥汤联合中医心理TIP疗法治疗失眠的疗效观察[J]. 世界睡眠医学杂志, 2019, 6(3): 280-283.
- [15] 叶小娜, 马玉侠, 高树中, 等. 脐疗法治疗肝郁型失眠的临床研究[J]. 中医外治杂志, 2018, 27(6): 6-7.
- [16] 陈婷. 电针联合重复经颅磁刺激对肝郁气滞型亚健康失眠者睡眠指标的影响研究[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(2): 129-131.
- [17] 杜晨晖, 崔小芳, 裴香萍, 等. 酸枣仁皂苷类成分及其对神经系统作用研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(5): 1258-1268.
- [18] 王浩博, 梁华, 李廷利, 等. 酸枣仁汤神经精神药理作用及临床应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(12): 198-201.
- [19] 杨波, 纪宏宇, 郑东友, 等. 中药延胡索的炮制工艺和药理作用的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2017, 35(2): 112-115, 153.
- [20] 刘海云, 宋渺渺, 肖爱娇. 菟丝子提取物对失眠大鼠学习记忆能力及神经递质的影响[J]. 江西中医药, 2018, 49(9): 60-62.
- [21] 魏新智, 樊晖, 王清华, 等. 安神方镇静催眠作用及其机制初探[J]. 中医药信息, 2016, 33(5): 48-51.
- [22] 杜晨晖, 裴香萍, 张敏, 等. 基于¹H-NMR代谢组学的酸枣仁改善失眠大鼠睡眠作用机制研究[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2405-2412.
- [23] 独家能, 聂春霞, 许雯雯, 等. 柴欢宁神颗粒对肝郁失眠证候大鼠模型行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(5): 13-17.
- [24] 吕鑫, 合浩, 李晓霞, 等. HPA轴与失眠障碍的相关性研究进展[J]. 世界睡眠医学杂志, 2019, 6(7): 1009-1012.
- [25] 顾思臻, 窦丹波. 中医中药对PCPA失眠大鼠模型HPA轴相关单胺类神经递质及激素影响的研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(1): 83-86.
- [26] 吴雪芬, 郑雪娜, 郭鑫, 等. 针灸干预HPA轴相关激素改善睡眠的研究进展[J]. 针灸临床杂志, 2017, 33(8): 69-71.
- [27] 胡霖霖. 加味酸枣仁汤对焦虑性失眠患者CRH、ACTH、CORT及 α -MSH水平的影响[C]. 2016年浙江省行为医学分会第三届学术年会论文汇编. 杭州: 浙江省医学会行为医学分会, 浙江省科学技术协会, 2016: 148-153.
- [28] 苏丽芳. 探讨浅针治疗肝郁化火型失眠的临床疗效及对HPA轴的调节机制[D]. 福州: 福建中医药大学, 2019.
- [29] 韦理萍, 秦明芳, 何乾超, 等. 柴胡疏肝汤对氟西汀抵抗的癫痫相关性抑郁大鼠HPA轴及中缝-海马通路5-HT转运的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(7): 771-778.
- [30] 蔺芳菊. 阳离子-氯离子共转运体KCC2和NKCC1在PCPA致失眠模型大鼠脑干中的表达变化[D]. 长沙: 中南大学, 2009.
- [31] 季忆婷, 章玲丽, 李斐. 基于 γ -氨基丁酸抑制性神经通路靶向调控策略在神经发育障碍疾病中的应用[J]. 教育生物学杂志, 2017, 5(2): 85-88.
- [32] O'TOOLE K K, HOOPER A, WAKEFIELD S, et al. Seizure-induced disinhibition of the HPA axis increases seizure susceptibility[J]. Epilepsy Research, 2014, 108(1): 29-43.

(编辑: 邹元平)