

安神补心胶囊对小鼠大脑内神经递质影响

陈汉裕¹ 陈凤丽¹ 林赞檬¹ 杨忠奇²

(1 广州中医药大学, 广州, 510405; 2 广州中医药大学第一附属医院, 广州, 510405)

摘要 目的:观察安神补心胶囊对小鼠大脑神经递质 5-羟色胺(5-HT)及 γ -氨基丁酸(GABA)含量的影响,初步探讨安神补心胶囊改善睡眠作用机制,为临床研究提供实验理论依据。方法:将昆明小鼠随机为空白对照组、地西洋对照组、安神补心胶囊组,分别灌相应药物:0.9%氯化钠注射液、地西洋水溶液(0.1 mg/mL)及安神补心胶囊水溶液(0.1 g 药丸/mL),每天灌胃给药 1 次(0.1 mL/10 g),连续灌胃 8 d,末次给药后,用酶联免疫吸附测定法测定小鼠大脑 5-HT 及 GABA 含量。结果:空白对照组、地西洋对照组、安神补心胶囊组 5-HT 含量分别为(604.56 $\pm$ 31.35) ng/mL、(468.42 $\pm$ 30.33) ng/mL、(518.21 $\pm$ 31.20) ng/mL;GABA 含量分别为(10.77 $\pm$ 1.04) μ mol/L、(14.58 $\pm$ 0.75) μ mol/L、(12.07 $\pm$ 0.88) μ mol/L。与空白对照组相比,安神补心胶囊组能明显降低小鼠大脑 5-HT 含量及提高小鼠大脑 GABA 含量,差异有统计学意义($P < 0.05$),与地西洋对照组比较,差异亦具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:安神补心胶囊具有良好的改善睡眠作用,其作用机制可能与抑制减少大脑 5-HT 的合成及刺激增加大脑 GABA 的分泌有关。

关键词 安神补心胶囊;神经递质;睡眠;机制

Effects of Anshen Buxin Capsule on Neurotransmitter in Cerebral Tissue of Mice

Chen Hanyu¹, Chen Fengli¹, Lin Zhanmeng¹, Yang Zhongqi²

(1 Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2 The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract Objective: To study the effect of Anshen Buxin capsule on serotonin (5-HT) and γ -aminobutyric acid content in cerebral tissue of mice, so as to make a preliminary discussion on its mechanism of improving sleep and then experimental theory for clinical study. **Methods:** Kunming mice were randomly divided into 3 groups, and each group was filled the corresponding drugs intragastrically; normal saline, aqueous solution of diazepam (0.1 mg/mL) and Anshen Buxin capsule (0.1 g/mL). All of those were given once a day (0.1 mL/10 g) and lasted for 8 days. After the last day of drug administration, use ELISA method to detect the content of 5-HT and GABA in mice brain serum. **Results:** The contents of 5-HT and γ -aminobutyric acid in normal, diazepam and Anshen Buxin capsule group were (604.56 $\pm$ 31.35) ng/mL, (10.77 $\pm$ 1.04) μ mol/L, (468.42 $\pm$ 30.33) ng/mL, (14.58 $\pm$ 0.75) μ mol/L; (518.21 $\pm$ 31.20) ng/mL, and (12.07 $\pm$ 0.88) μ mol/L. Compared with normal saline group, the 5-HT content of Anshen Buxin capsule group reduced and GABA content in cerebral tissue of mice increased with significant differences ($P < 0.05$). Besides, compared with diazepam control group, significant difference also exists ($P < 0.05$). **Conclusion:** Anshen Buxin capsule had a sound effect in improving sleep quality, and its mechanism may be related to inhibit the production of 5-HT and stimulate GABA secretion in brain.

Key Words Anshen Buxin capsule; Neurotransmitter; Sleep; Mechanism

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.01.035

安神补心胶囊主要由五味子(蒸)、丹参、石菖蒲和安神膏(合欢皮、菟丝子、墨旱莲、女贞子、地黄、首乌藤、珍珠母)组成,是由《中华人民共和国药典》中收录的“安神补心丸”改制而成。方中珍珠母咸寒,善于重镇潜阳而安神,《饮片新参》^[1]言其能“平肝潜阳,安神魂”,尤长于治疗肝阳上亢之心悸失眠;五味子味酸、甘,性温,主入心肾及肺经,能收敛安

神,补肾宁心;地黄味甘质重,能滋阴养血以潜浮阳;合欢皮甘平,擅解郁安神;女贞子甘凉,补益肝肾,《神农本草经》^[2]称其能“安五脏,养精神,除百病”,与合欢皮同用补肾宁心,以助珍珠母、五味子安神之力,与墨旱莲、菟丝子同用,以增滋补肝肾之效。石菖蒲、丹参皆入心经,开心窍,菖蒲能醒神益智,而丹参养心血而宁心,二药配入方中,不仅增强补心安神

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201410572008)

作者简介:陈汉裕(1990.04—),男,硕士研究生,研究方向:中医药防治心血管疾病,E-mail:659783540@qq.com

通信作者:杨忠奇(1969.09—),男,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:中医药防治心血管疾病,E-mail:yang_zhongqi@163.com

之效,且使诸药补而不滞,滋而不腻。本方既含酸味,又有辛味,辛甘化阳,酸甘养阴,同时寒温并用,使寒而不遏,温而不燥,诸药配伍,共奏补肾宁心安神之效。临床上主要用于治疗心悸失眠等病症,并取得了一定疗效。而在动物实验方面,有相关研究表明本药具有减少小鼠自主活动次数,延长小鼠睡眠时间,与戊巴比妥钠具有协同作用^[3,4]。然而,目前对安神补心胶囊改善睡眠作用机制尚不明确,尤其在神经递质方面的有关报道更为少见^[5]。因此,本实验通过观察安神补心胶囊对小鼠大脑神经递质的影响,初步探讨安神补心胶囊改善睡眠作用的分子机制,为临床研究提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用药 地西洋(山东省平原制药厂,LOT:130301,规格:2.5 mg × 100 片)。根据动物给药剂量体表面积折算公式,得小鼠给药剂量为 1 mg/kg^[6],将地西洋片压碎,过 100 目筛,用纯净水配成浓度为 0.1 mg/mL;安神补心胶囊(聚协昌药业有限公司,国药准字 Z10960053),成人用量为 6 g/d,按上述公式计算出小鼠给药剂量约 1 g/kg,将丸剂溶解于温水中,配成水溶液 0.1 g 药丸/mL。最后将上述水溶液置于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2 实验动物 SPF 级昆明小鼠 24 只,雌雄兼用,小鼠均来自广州中医药大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2013-0034,体质量 20 ~ 25 g。

1.3 实验仪器 AE200 电子分析天平(上海 METTLER 公司);T25 高速分散机(IKA LABORTECHNIK);MDF-U3386S 医用低温箱:SANYO);TLXJ-II 离心机(上海安亭科学仪器厂);Mk3 酶标仪(Thermo Electron Corporation)。

1.4 实验步骤 将 SPF 级昆明小鼠 24 只,放入 SPF 级实验室适应性喂养 3 d 后,应用随机数字表分为地西洋对照组、安神补心胶囊组、生理盐水对照组,每组 8 只,雌雄各半,每组灌相应溶液:地西洋水溶液(0.1 mg/mL)、安神补心胶囊水溶液(0.1 g 药丸/mL)、0.9% 氯化钠注射液,每天灌胃给药 1 次(0.1 mL/10 g),连续灌胃 8 d,末次给药后,禁食 6 h,将 3 组小鼠脱颈椎处死,立即在枕骨大孔边缘处迅速剪断颈部,去除颅骨,暴露出大脑组织,用小勺子将脑组织完整取出,在冰培养皿上去除小脑,分离出大脑后,在冰冷生理盐水中洗去血液、组织,用电子天平称重,将小鼠大脑放入离心管内,并加入与小鼠大脑重量相等的生理盐水 3 倍,充分匀浆,离心(3 000 r/min, 10 min),取上清液,用小鼠 5-HT 及

GABA 的 ELISA 试剂盒按说明书处理后,在酶标仪 450 nm 处进行检测 5-HT 及 GABA 含量。

1.5 5-羟色胺(5-HT)及 γ-氨基丁酸(GABA)标准曲线建立 配置标准品溶液,并用小鼠 5-HT ELISA 试剂盒进行含量测定,以标准品的浓度及对应的 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程: $y = 137.36x - 9.9539$ ($R^2 = 0.99951$, $n = 6$)。见下图标准曲线 1,图中表明样品中 5-HT 含量在不超过 240 ng/mL 时线性关系良好。以同样的方法计算出 GABA 的直线回归方程: $y = 5.5152x - 0.42064$ ($R^2 = 0.99953$, $n = 6$)。见下图标准曲线 2,表明样品中 GABA 含量小于 8 μmol/L 时线性关系良好。

1.6 5-羟色胺(5-HT)及 γ-氨基丁酸(GABA)标准曲线建立 配置标准品溶液,用酶标仪在 450 nm 波长下测定对应吸光度(OD 值),根据 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程: $y = 137.36x - 9.9539$ ($R^2 = 0.99951$, $n = 6$)。见下图标准曲线 1,图中表明样品中 5-HT 含量在不超过 240 ng/mL 时线性关系良好。以同样的方法计算出 GABA 的直线回归方程: $y = 5.5152x - 0.42064$ ($R^2 = 0.99953$, $n = 6$)。见下图标准曲线 2,表明样品中 GABA 含量小于 8 μmol/L 时线性关系良好。

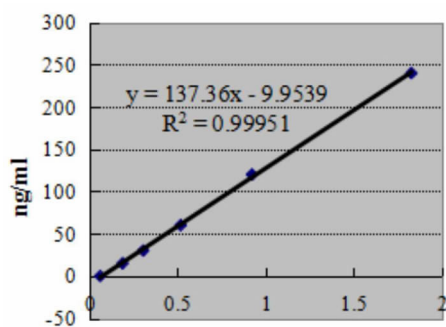


图 1 5-HT 标准曲线 1

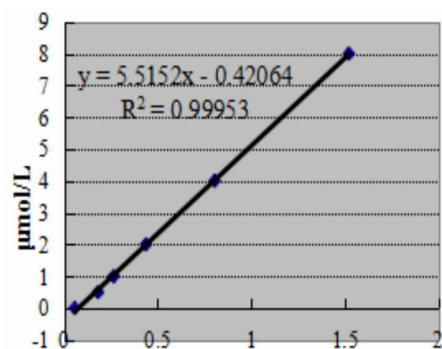


图 2 GABA 标准曲线 2

1.7 统计学方法 所有数据均以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示说明。收集的实验数据采用 Stata 12 for mac V13.1 统计软件处理。计量资料组间比较采用

单因素方差分析,若方差齐,则采用 Least Significant Difference (LSD) 检验,若方差不齐,则采用 Dunnett's T3 检验。

2 结果

各组小鼠大脑组织 5-HT 与 GABA 测定结果见表 1、表 2 及图 1、图 2。对各组小鼠所测得的 5-HT 及 GABA 含量数据进行组间方差齐性分析,得 F 值等于 39.60 和 37.47, P 均小于 0.01,因此可认为方差不齐,宜采用 Dunnett's T3 检验。与空白对照组相比,地西洋对照组与安神补心胶囊组均能明显降低小鼠大脑 5-HT 含量及提高小鼠大脑 GABA 含量,差异有统计学意义($P < 0.05$)。安神补心胶囊组与地西洋对照组比较,地西洋对照组更能显著降低小鼠大脑 5-HT 含量及提高小鼠大脑 GABA 含量($P < 0.05$)。结果表明安神补心胶囊能治疗失眠的作用机制可能与减低大脑 5-HT 及升高大脑 GABA 的含量有关。

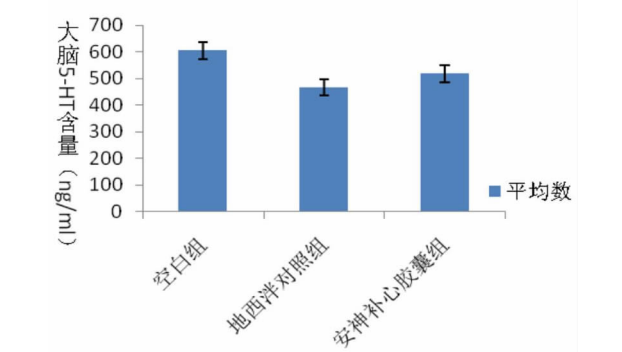


图 3 各组小鼠大脑组织 5-HT 含量测定结果

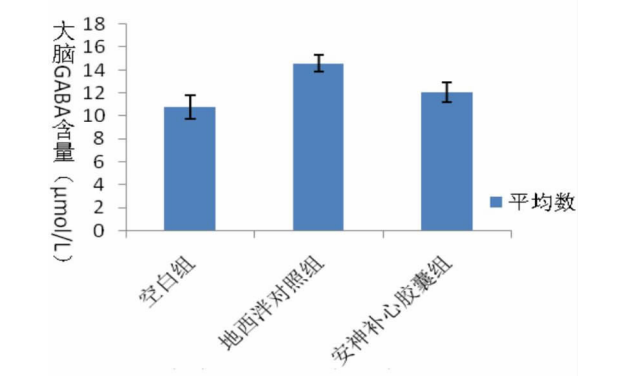


图 4 小鼠大脑组织 GABA 含量结果测定

表 1 对小鼠大脑 5-HT 及 GABA 含量影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	5-HT 浓度 (ng/mL)	GABA 浓度 (μmol/L)
空白对照组	8	604.56 ± 31.35	10.77 ± 1.04
地西洋对照组	8	468.42 ± 30.33	14.58 ± 0.75
安神补心胶囊组	8	518.21 ± 31.20	12.07 ± 0.88

表 2 3 组小鼠大脑 5-HT 及 GABA 含量多重比较结果

组别	$P(5\text{-HT}; \text{Dunnett's T3 检验})$	$P(\text{GABA}; \text{Dunnett's T3 检验})$
①与②	0.000	0.000
①与③	0.000	0.049
②与③	0.017	0.000

注:①、②、③分别代表生理盐水对照组;地西洋对照组;安神补心胶囊组。

3 讨论

失眠属于中医学“不寐”范畴,主要表现为睡眠深度及时间不足,轻者入睡困难,或睡而不酣,或时睡时醒,或者醒后不能再入睡,严重者彻夜不眠^[7]。并且认为本病病位以心和肝多见,同时与脾、胃、肾和胆密切相关,而证候要素以火(热)、气虚多见^[8]。失眠发病率非常高,涉及面广,不仅危害个人身体健康,还影响社会的安定,已成为当今社会关注的焦点^[9]。世界卫生组织曾对美国、英国、日本等 14 个国家 15 个地区基层医疗单位的患者进行调查,结果发现睡眠障碍患者高达 27%,因此关于失眠的发生机制及其药物和非药物的治疗日益受重视^[10]。目前治疗失眠的西药主要有苯二氮草类(如地西洋、氯氮草、三唑仑等)、抗精神病药(如羟哌氯丙嗪)及抗抑郁药(如异丙胍、氯丙咪嗪、阿米替林)等,临床上取得显著疗效,然而长期服用往往造成依赖性、成瘾性、记忆力减退等不良反应。中医在治疗失眠病历史悠久,大量研究表明,中医对其治疗疗效显著,且不良反应相对较少,因此越来越受到患者的青睐及医学界的关注^[11]。安神补心胶囊具有养心安神功效,已被广泛用于治疗失眠患者。临床研究表明,该药具有良好的改善睡眠作用,与此同时,其不良反应相对较少。例如王燕丽等^[3]治疗失眠患者 95 例,治疗组用安神补心胶囊 2.0 g/d,对照组予佳静安定 0.4 ~ 0.8 mg/d,结果显示两药的总有效率相近,差异无统计学意义;在不良反应方面,佳静安定对照组出现不同程度的依赖性,且服药后有晨起头昏、头痛、精神不振等不良反应,而治疗组未发现有药物依赖性现象及不良反应。曹长江^[4]用安神补心胶囊治疗与心血证型有关的心悸失眠患者 100 例,其中痊愈 43 例,总有效率为 94%。结果提示安神补心胶囊具有良好治疗心悸失眠作用,且效果优于安神补心丸($P < 0.05$)。在动物实验方面,王志华等^[12]验证了安神补心胶囊能够显著减少小鼠的自主活动次数,缩短小鼠睡眠潜伏期,延长其睡眠时间,与戊巴比妥钠具有协同作用,与此同时,安神补心胶囊可改善溴氢酸东莨菪碱所致小鼠记忆获得障

碍及亚硝酸钠所致小鼠记忆巩固障碍,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

然而,目前对安神补心胶囊改善睡眠作用机制的研究主要在动物行为学方面,而对其在中枢神经递质影响方面的报道鲜为少见。通过干预检测中枢神经递质的含量,从而探讨其改善睡眠的作用机制已成为中药研究的重要途径。相关研究表明,与睡眠密切相关的神经递质有 5-HT、GABA、神经肽 S(NPS)、神经肽 Y(NPY)、多巴胺(DA)等^[13-17],其中 5-HT 和 GABA 是大脑中枢主要调节睡眠的神经递质。本研究结果表明,安神补心胶囊组能明显降低小鼠大脑 5-HT 含量及提高小鼠大脑 GABA 含量,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。根据该结果可提示安神补心胶囊能改善睡眠的作用机制可能与抑制减少大脑 5-HT 的合成及刺激增加大脑 GABA 的分泌有关。

参考文献

- [1] 黄兆胜. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:385-386.
- [2] 吴普. 神农本草经[M]. 上海:第二军医大学出版社,2012:88-89.
- [3] 王燕丽,刘茂顺. 安神补心胶囊治疗不寐证疗效观察[J]. 北京中医,1998,17(6):59-60.
- [4] 曹长江. 安神补心胶囊治疗心悸失眠的临床观察[J]. 辽宁中医学院学报,2003,5(3):240-241.
- [5] 李贵海,邵陆. 安神补心胶囊药效学实验观察[J]. 中成药,1997,19(6):31-32.
- [6] 崔淑芳,陈学进. 实验动物学[M]. 4 版. 上海:第二军医大学出版社,2013:201-202.

- [7] 汪卫东,李桂侠,洪兰,等. 失眠症的创新中医心理治疗—TIP 睡眠调控技术简介[J]. 世界中医药,2014,9(2):253-256,260.
- [8] 李优,应豪睿,汪小琳,等. 原发性失眠症证候及证候要素分布特点的文献研究[J]. 世界中医药,2015,10(1):120-122.
- [9] 张景行. 睡眠医学发展呈现强劲势头[J]. 广东医学,2007,28(1):1-3.
- [10] 赵忠新,张照环. 应给予睡眠更多的关注[J]. 中华神经科杂志,2011,44(8):513-515.
- [11] 王洁,许洁睿. 中医药治疗失眠研究进展[J]. 中医学报,2010,25(3):563-564.
- [12] 王志华,吴符火. 安神补心胶囊药效学试验研究[J]. 今日科技,2000(9):31-32.
- [13] Jouvet M. The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle[J]. Ergebnisse Der Physiologie Biologischen Chemie Und Experimentellen Pharmakologie,1972,1804(64):166-307.
- [14] Lee RS, Steffensen SC, Henriksen SJ. Discharge profiles of ventral tegmental area GABA neurons during movement, anesthesia, and the sleep-wake cycle[J]. Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience,2001,21(5):1757-1766.
- [15] 张研,解军波,张彦青. 镇静催眠药物的主要作用机制研究进展[J]. 中国药房,2011,22(41):3906-3908.
- [16] Kohlmeier KA, Burns J, Reiner PB, et al. Substance P in the descending cholinergic projection to REM sleep-induction regions of the rat pontine reticular formation: anatomical and electrophysiological analyses[J]. Eur J Neurosci,2002,15(1):176-196.
- [17] Ueno T, Tomita J, Tanimoto H, et al. Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*[J]. Nat Neurosci,2012,15(11):1516-1523.

(2016-04-03 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 137 页)

- [14] Jiménez-Cervantes C, Martínez-Esparza M, Pérez C, et al. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress; transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor[J]. J Cell Sci,2001,114(Pt12):2335-2344.
- [15] 郑媛,张建军,王淳,等. 消石利尿化痰法对高尿酸血症大鼠血清 UA、NO、ET-1、TXB2 及 6-keto-PGF1a 的影响[J]. 中医学报,2015,43(1):15-18.
- [16] 芮磊,刘甲兴. 老年男性高尿酸血症引起氧化应激和血管内皮损伤的研究[J]. 临床军医杂志,2010,38(4):539-542.

- [17] 王莉,马玲,姚华,等. 单纯酵母饲料和氧嗉酸联合酵母暴露高尿酸血症肾病大鼠模型的建立及其抗氧化活力变化的比较研究[J]. 环境与健康杂志,2012,29(7):612-614.
- [18] Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology[J]. Toxicology,2000,153(1-3):83-104.
- [19] Mates JM, Perez C, Blanca M. Chemical and biological activity of free radical 'scavengers' in allergic diseases[J]. Clin-Chim-Acta,2000,296(1/2):1-15.

(2016-03-21 收稿 责任编辑:张文婷)