

探讨蛇床子催眠活性组分对PCPA失眠大鼠褪黑素合成限速酶AANAT的调控作用

郭晋良, 仲启明, 吉海杰, 杨铃, 宋美卿, 贾力莉, 仝立国, 牛艳艳, 冯玛莉*
(山西省中医药研究院, 太原 030012)

[摘要] 目的:观察蛇床子催眠活性组分(CHC)对对氯苯丙氨酸(PCPA)失眠大鼠行为学、褪黑素(MT)合成限速酶芳基烷基胺N-乙酰基转移酶(AANAT)的影响,探讨其对松果体的保护机制。方法:60只SPF级雄性SD大鼠随机分为正常、模型、MT阳性药、CHC高、中、低剂量6组,每组10只。除正常组其余各组腹腔注射4.5%PCPA混悬液,10 mL·kg⁻¹,连续2 d,建立大鼠PCPA失眠模型。造模后正常及模型组灌胃等体积2%聚山梨酯-80,MT组(10 mg·kg⁻¹),CHC高、中、低(60,30,15 mg·kg⁻¹)给予10 mL·kg⁻¹给药体积的药物,每日1次,连续7 d。给药4 d后分别进行旷场活动、高架十字迷宫、戊巴比妥钠协同睡眠试验,采用酶联免疫吸附法检测血清MT;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定松果体MT合成关键酶AANAT mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测松果体AANAT蛋白表达变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠旷场活动总距离、站立次数、中心区持续时间明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),高架开臂次数及时间比例下降($P<0.05$),入睡潜伏期显著延长($P<0.01$);与模型组比较,低剂量组无明显差异,其余各组大鼠活动总距离均减少($P<0.05$, $P<0.01$),高架开臂次数百分比升高($P<0.05$),入睡潜伏期缩短、睡眠时间明显延长($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常组比较,模型组MT含量显著下降($P<0.01$);与模型组比较,低剂量组差异无明显统计学意义,其余各组血清MT不同程度的升高($P<0.05$)。与正常组比较,模型组AANAT mRNA表达量,AANAT蛋白表达量下降($P<0.01$);与模型组比较,MT组,CHC高剂量组表达量明显增加($P<0.05$)。结论:CHC改善PCPA失眠行为学指标,增加松果体细胞合成分泌MT,提高血清MT水平,与上调松果体AANAT mRNA及其蛋白的表达有关。

[关键词] 蛇床子催眠活性组分;对氯苯丙氨酸(PCPA)失眠大鼠;褪黑素合成限速酶芳基烷基胺N-乙酰基转移酶(AANAT)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)14-0047-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211309

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210524.1356.001.html>

[网络出版日期] 2021-05-24 18:24

Regulation of Hypnotic Active Components of Cnidii Fructus on Melatonin Synthesis Rate-limiting Enzyme AANAT in Rats with PCPA-induced Insomnia

GUO Jin-liang, ZHONG Qi-ming, JI Hai-jie, YANG Qian, SONG Mei-qing, JIA Li-li, TONG Li-guo,
NIU Yan-yan, FENG Ma-li*

(Shanxi Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Cnidii Fructus hypnotic active components (CHC) on the behaviors of rats with p-chlorophenylalanine (PCPA)-induced insomnia and melatonin (MT) synthesis rate-limiting enzyme arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT), and explore the protective mechanism of CHC on the pineal gland. **Method:** Male SD rats of SPF grade were randomly divided into a blank control group, a model group, a MT group, and high-, medium-, and low-dose CHC groups with 10 rats in each group. Except

[收稿日期] 20210312(014)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173574);山西省自然科学基金面上项目(201901D111427)

[第一作者] 郭晋良,硕士,从事内分泌疾病及中药药理学研究,Tel:0351-4174328,E-mail:gloria_gjl@163.com

[通信作者] *冯玛莉,硕士生导师,主任医师,从事内分泌疾病及中药药理学研究,E-mail:Fengmali@163.com

for the blank control group, other groups received 4.5% PCPA suspension at $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, intragastric administration, for two consecutive days. After PCPA model of insomnia was established, normal and model groups were gavaged at the same volume of 2% Tween-80, MT control group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), CHC was high, medium and low ($60, 30, 15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, once a day, for consecutive 7 days. Four days after administration, open field, elevated cross maze, and pentobarbital sodium-induced sleep tests were conducted, respectively. Serum MT was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA expression level of AANAT was determined by real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expression of AANAT protein in the pineal gland was detected by Western blot. **Result:** Compared with the results in the blank control group, the total distance of open field activity and standing times and duration in the central area were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the proportions of open arm entry (OE%) and open arm time (OT%) were decreased ($P < 0.05$), and the sleep latency was prolonged ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, no significant difference was observed in the low-dose CHC group, while other groups exhibited reduced total distance of activity ($P < 0.05$, $P < 0.01$), elevated OE% ($P < 0.05$), shortened sleep latency, and prolonged sleep time ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the serum MT in the blank control group, that in the model group was decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, no significant difference was observed in the low-dose CHC group, while other groups displayed increased serum MT ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression of AANAT was decreased in the model group as compared with that in the blank control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the MT group and the high-dose CHC group showed up-regulated expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** CHC improved the behavioral indexes of PCPA-induced insomnia, increased the synthesis and secretion of MT in pineal cells, and elevated the serum MT level, which was related to the up-regulation of the mRNA and protein expression of AANAT in the pineal gland.

[Keywords] hypnotic active components of Cnidii Fructus; p-chlorophenylalanine (PCPA)-induced insomnia rats; melatonin synthesis rate-limiting enzyme arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT)

松果体(PG)为神经内分泌转换器,主要合成分泌的褪黑素(MT)广泛参与人体的机能代谢,除调节昼夜节律减轻失眠外^[1],有大量研究证实MT具有抗氧化抗炎作用,减轻组织炎症反应^[2]、减少自由基、氧化应激损伤^[3],也有研究显示其对中枢神经退行性疾病、创伤性、缺血性疾病有改善作用^[4-5]。PG损伤后MT分泌也随之减少,出现一系列生理功能紊乱,由于MT生物利用度较低、半衰期短,且长期补充外源性补充可能会反射性引起体内MT合成分泌功能紊乱,造成昼夜节律性消失,甚至疗效降低^[6-7],因此需要寻求保护PG损伤并增加内源性MT合成分泌的活性成分。MT合成由PG细胞主动摄取色氨酸,在色氨酸羟化酶的作用下转化为5-羟色氨酸,通过芳基烷化胺 *N*-乙酰基转移酶(AANAT),羟基吲哚氧位甲基转移酶(HIOMT)转化为MT,其中AANAT被认为是关键合成限速酶。

蛇床子为伞形科植物蛇床的干燥成熟果实,具有温肾壮阳、燥湿祛风、杀虫止痒等功效。前期发现蛇床子催眠活性组分(CHC)改善对氯苯丙氨酸(PCPA)失眠大鼠PG损伤且显著提高血清MT水

平^[8-9],CHC是否通过调节AANAT关键合成限速酶促进内源性MT的生物合成,本文观察PCPA对失眠大鼠自主活动及睡眠等行为学,血清MT水平,PG AANAT mRNA及AANAT蛋白表达的影响,探讨CHC保护PG损伤、促进内源性MT合成、改善睡眠作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,SPF级,雄性,体质量160~180 g,共60只。购自北京华阜康生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008,22~24 °C温度,40%~50%湿度环境中饲养。本实验符合动物伦理委员会要求。

1.2 药物与试剂 蛇床子购于安徽亳州远光中药饮片厂,批号121203,经山西省药品检验所高天爱主任药师鉴定为正品。称取药材600 g粉碎,乙醇加热回流提取,并经D101型大孔吸附树脂柱纯化,收集60%乙醇洗脱液,减压浓缩干燥得20.5 g,每1 g折合蛇床子生药29 g,采用紫外分光光度法测定蛇床子总香豆素含量2.46%。高效液相色谱法(HPLC)测得本品含蛇床子素3.67%,欧前胡素

1.65%, 异虎耳草素 1.74%, 佛手柑内酯 4.85%; 用时以 2% 聚山梨酯-80 溶液配置成 0.6%, 0.3%, 0.15% 的混悬液。MT(北京 Solarbio 公司, 批号 917D02 1); PCPA(美国 Sigma 公司, 批号 10026000696); 大鼠 MT 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(生工生物工程股份有限公司, 批号 D731170-0096); RNA 提取试剂盒, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测试剂盒(德国 Qiagen 公司, 批号分别为 74104, 163018617); cDNA 合成试剂盒(瑞士 Roche 公司, 批号 04379012001); AANAT 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 批号 bs3914R); 辣根过氧化物酶(HRP)二抗(上海生物工程股份有限公司, 批号 D110058-0025); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(北京索莱宝科技有限公司, 批号 K101527P), 其余试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 高架旷场 Topscalite Version 2.00 软件分析系统(美国 Clever.Sys 公司); 7500 型实时荧光定量(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司); Veriti9902 型定性 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); H1 型多功能微孔读板机(美国伯腾); Mini-PROTEAN 型电泳仪, 221BR 型转膜仪(美国伯乐公司); FluorChem HD2 型凝胶成像仪(美国 Protein Simple 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 用 2% 聚山梨酯-80 0.1 mol·L⁻¹ 碳酸盐缓冲液(pH 10.1), 配制成 4.5% PCPA 的混悬液, 45 °C 超声处理(功率 250 W, 频率 25 kHz) 10 min, 充分混匀。除正常组腹腔注射含 2% 聚山梨酯的碳酸盐缓冲液, 其余各组大鼠分别腹腔注射 PCPA 混悬液 450 mg·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 2 d。除正常组其余各组大鼠造模后出现反应迟钝、皮毛枯槁战栗且易脱落等外观改变, 随着直立洗脸、频繁走动跳起, 昼夜节律逐渐消失, 兴奋性增高, 出现易惊吓, 易激惹, 易攻击撕咬的状态, 表明模型复制成功。灌胃液浓度及等效剂量均参照贺氏剂量-体表面积公式 $D_2 = D_1 \times R_2 / R_1$ (式中 D_2 是所求剂量, D_1 是已知剂量, R_1 是已知剂量对应的 R 值, R_2 为代求 D_2 的 R 值) 计算, 并以前期实验为依据^[8], 正常组、模型组灌胃等体积 2% 聚山梨酯-80 溶液, MT 组 10 mg·kg⁻¹, CHC 高、中、低剂量分别为 60, 30, 15 mg·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 7 d。

2.2 指标测试

2.2.1 行为学测试 旷场自主活动, 将大鼠置 50 cm×50 cm×50 cm 的敞口箱中心区, 记录大鼠

5 min 的活动轨迹, Topscalite Version 2.00 软件分析大鼠活动总距离、直立次数及中心区活动时长。十字高架迷宫, 将大鼠朝向其中一个开臂放入高架十字迷宫中心区, 释放后让其随意走行并记录 5 min 内活动轨迹, Topscalite Version 2.00 软件分析进入开放臂次数的比例(OE)及进入开放臂时间的比例(OT)。戊巴比妥钠睡眠试验, 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 38 mg·kg⁻¹, 记录入睡潜伏期及睡眠持续时间, 即注射戊巴比妥钠至翻正反射消失时间与翻正反射消失至觉醒的时间。

2.2.2 血清 MT 采用竞争酶联免疫吸附检测技术测定样品中大鼠血清 MT 水平, 操作按照试剂盒说明书严格进行。

2.2.3 Real-time PCR 检测 PGMT 合成限速酶 AANAT mRNA 表达 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 基因引物见表 1。AANAT 的引物设计参考文献[10]委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将 PG 从 -80 °C 冰箱取出提总 RNA, 抽提和 cDNA 合成按照试剂盒说明进行, 测 RNA 纯度吸光度 A_{260}/A_{280} 在 1.9~2.1 良好, 表明 RNA 完整较好, 将反应设为 20 μ L 体系, 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 95 °C 退火 10 s, 60 °C 延伸 35 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 mRNA 相对表达情况。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 ATGGGAAGCTGGTCATCAAC	185
	下游 CCACAGTCTTCTGAGTGGCA	
AANAT	上游 TGCTGTGGCGATACCTTCACCA	225
	下游 CAGCTCAGTGAAGGTGAGAGAT	

2.2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)PG AANAT 蛋白表达 取 RIPA 裂解液适量, 加入 PMSF (PMSF-RIPA 裂解液 1:100)混匀, 每 3 只大鼠 PG 加入 150 μ L, 充分研磨, 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 20 cm), 取上清液 BCA 蛋白定量, 其余上清液加蛋白上样缓冲液煮沸变性; 电泳; 转膜; TBST 漂洗后浸入 5% 脱脂牛奶中封闭, 室温封闭 2 h; 加入一抗稀释液中(1:1 000)4 °C 过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的二抗(1:1 万)室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min; 滴加 ECL 超敏发光液, 凝胶成像系统拍照显影, 运用 Image J 软件分析。

2.3 统计学处理 采用SPSS 22.0软件进行分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据经正态检验,均服从正态分布,所以可采用单因素方差分析,若方差齐,组间两两比较采用*t*检验;方差不齐采用Dunnett's *T3*检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对PCPA失眠大鼠旷场活动的影响 与正常组比较,模型组活动总距离、站立次数、中心区持续时间明显增加($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,MT组,CHC高、中剂量组活动总距离减少($P<0.05, P<0.01$),CHC高剂量站立次数、中心持续时间组减少($P<0.05, P<0.01$)。见表2。

表2 CHC对PCPA失眠大鼠旷场活动影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of CHC on open field activity of PCPA rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	总距离/ cm	站立数/ 次	中心持续 时间/s
正常		404.1±60.0	9.1±2.9	13.3±1.8
模型		533.2±89.1 ¹⁾	14.4±6.8 ²⁾	19.1±4.4 ²⁾
MT	10	414.5±67.2 ³⁾	10.0±4.1	16.1±2.9
CHC	60	345.7±75.4 ⁴⁾	8.2±3.8 ⁴⁾	13.5±3.7 ³⁾
	30	427.5±41.6 ³⁾	10.3±5.7	15.0±3.6
	15	511.9±86.5	10.1±3.0	17.9±3.3

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3~7同)。

3.2 对PCPA失眠大鼠高架十字迷宫OE,OT比较的影响 与正常组比较,模型组开臂次数及时间比例明显下降($P<0.05$);与模型组比较,MT组,CHC高、中剂量组OE均升高($P<0.05$),给药后各组大鼠OT差异无统计学意义。见表3。

表3 CHC对PCPA失眠大鼠高架十字迷宫OE,OT比较的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of CHC on comparison of OE and OT in elevated cross maze of PCPA rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) %

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	OE	OT
正常		55.05±5.34	44.45±8.44
模型		44.50±6.73 ¹⁾	28.70±8.05 ¹⁾
MT	10	59.26±5.88 ³⁾	36.99±10.17
CHC	60	56.50±5.61 ³⁾	36.22±12.18
	30	53.25±5.05 ³⁾	38.82±8.49
	15	45.01±6.02	33.86±9.79

3.3 对PCPA失眠大鼠戊巴比妥钠协同睡眠入睡潜伏期、睡眠持续时间的影响 与正常组比较,模型

组大鼠入睡潜伏期显著延长($P<0.01$);与模型组比较,MT组及CHC高、中剂量组能够明显缩短入睡潜伏期,延长睡眠时长($P<0.01$),CHC低剂量睡眠时间高于模型组($P<0.05$)。见表4。

表4 CHC对PCPA失眠大鼠戊巴比妥钠协同睡眠入睡潜伏期、睡眠持续时间的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of CHC on sleep latency and sleep duration of pentobarbital sodium in PCPA rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) min

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	入睡潜伏期	睡眠持续时间
正常		5.71±2.20	71.2±13.6
模型		10.61±2.74 ²⁾	85.3±8.4
MT	10	4.41±0.73 ⁴⁾	177.8±46.2 ⁴⁾
CHC	60	4.42±0.48 ⁴⁾	235.8±34.8 ⁴⁾
	30	5.54±2.08 ⁴⁾	213.9±23.0 ⁴⁾
	15	7.81±1.99	121.8±39.2 ³⁾

3.4 对PCPA失眠大鼠血清MT水平的影响 与正常组比较,模型组血清MT含量显著下降($P<0.01$);与模型组比较,MT,CHC中、高剂量组含量不同程度升高($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

表5 CHC对PCPA失眠大鼠血清MT水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of CHC on serum MT levels of rats in PCPA rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	MT/ng·L ⁻¹
正常		64.9±6.9
模型		46.2±9.7 ²⁾
MT	10	66.4±11.0 ³⁾
CHC	60	80.8±10.9 ⁴⁾
	30	61.9±6.7 ³⁾
	15	47.2±9.9

3.5 对PCPA失眠大鼠MT合成限速酶AANAT mRNA的影响 与正常组比较,模型组AANAT mRNA表达量显著下降($P<0.01$);与模型组比较,MT组,CHC高剂量组表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表6。

3.6 对PCPA失眠大鼠MT合成限速酶AANAT蛋白水平影响 与正常组比较,模型组AANAT表达量显著下降($P<0.01$);与模型组比较,MT组,CHC高剂量组表达量显著升高($P<0.01$)。见图1,表7。

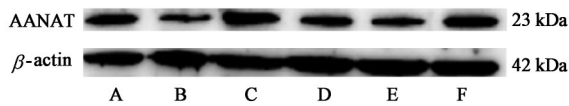
4 讨论

PCPA是一种作用于5-羟色胺(5-HT)生物合成中色氨酸羟化酶的不可逆抑制剂,阻断5-HT合成,为制备失眠大鼠模型的经典方法^[11]。本课题组前期在模型评价时光镜、电镜下观察PG组织出现明

表6 CHC对PCPA失眠大鼠MT合成限速酶AANAT的影响
($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 6 Effect of CHC on melatonin synthesis rate-limiting enzyme AANAT in PCPA rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	AANAT
正常		1.48±0.04
模型		0.97±0.03 ²⁾
MT	10	1.34±0.31 ³⁾
CHC	60	1.90±0.18 ⁴⁾
	30	1.17±0.32
	15	0.87±0.12



A. 正常组; B. 模型组; C. MT组; D. CHC高剂量组; E. CHC中剂量组; F. CHC低剂量组;

图1 AANAT蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of AANAT protein expression

表7 CHC对PCPA失眠大鼠MT合成限速酶AANAT蛋白表达的影响
($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 7 Effect of CHC on expression of melatonin synthesis rate-limiting enzyme AANAT protein in PCPA rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	AANAT/β-actin
正常		0.513±0.033
模型		0.349±0.068 ²⁾
MT	10	0.688±0.049 ⁴⁾
CHC	60	0.742±0.097 ⁴⁾
	30	0.543±0.130
	15	0.596±0.196

显病理改变,证实腹腔注射PCPA损伤大鼠PG结构,本实验以2%聚山梨酯-80增加PCPA溶解,为PCPA制备失眠造模提供更有效的方法。腹腔注射PCPA混悬液诱发大鼠PG损伤及凋亡的机制尚不清楚,未见PCPA化学毒性、神经毒性或损伤组织细胞的相关报道。文献提示长期清醒状态下大脑更易受氧化应激的影响,由于脑组织不饱和脂肪酸及蛋白质含量较高,代谢旺盛更易氧化和产生自由基,细胞、组织更易受损^[12-13],PCPA注射后大鼠持续清醒状态可能是PG受到损伤的一部分原因。PG主要由PG细胞、神经胶质细胞和无髓神经纤维构成,其中PG细胞占90%以上^[14],其功能主要合成分泌MT并迅速释放入血,检测血清中的MT可准确反应PG合成分泌能力^[15]。前期研究结果显示PCPA失眠大鼠PG病理及超微结构受损,明显降低血清MT水平^[7],CHC提高血清MT水平,MT除了具有镇静、调

整生物钟外还有强大的清除氧自由基和抗氧化功能、保护膜脂质、线粒体免受氧化损伤,维持细胞功能等作用^[16]。

旷场活动中,活动距离与大鼠兴奋性有关,活动距离越长兴奋性越高;直立次数与大鼠对新环境的好奇及空间的探究能力有关;中间格行走停留总时长可以反映出大鼠改变生存新环境后的认知能力,大鼠喜欢隐蔽环境,出于本能正常情况下会离开中央格趋向周边格,如果动物的认知能力下降,其在中央区停留的时间要长。本文PCPA失眠大鼠在箱内表现活跃,旷场活动距离、站立次数及中心区持续时长增加,表明大鼠兴奋性增高,这可能与机体自身的应激调节能力有关,PCPA引起大鼠烦躁情绪^[17]。CHC减少旷场活动距离、站立次数及中心区持续时长,表明CHC抑制PCPA失眠大鼠兴奋性,同时能够减少PCPA引起的烦躁焦虑,中心区行走及持续时长表明大鼠对新环境的认知能力,中心区时间越长表示大鼠认知能力越差,实验中发现PCPA失眠大鼠中心持续时间明显长于正常大鼠,提示PCPA降低动物的认知能力,而MT及CHC均明显缩短中心持续时间,提高PCPA失眠大鼠认知能力。旷场活动的变化结果在高架十字迷宫的实验结果也得到印证。PCPA失眠大鼠在高架十字迷宫中的开臂次数比例和时间比例较正常大鼠明显减少,提示PCPA引起大鼠出现一定程度的焦虑情绪。高架十字迷宫抓住大鼠在陌生及高空环境下恐惧的矛盾变化心理,能够反映出大鼠的焦虑心理^[18],MT,CHC高、中剂量都可增加大鼠在高架十字迷宫实验中进入开臂次数比例,提示CHC改善PCPA失眠大鼠烦躁焦虑情绪,前人研究也指出MT有一定抗焦虑作用^[19],CHC与MT作用相似,与旷场所得结论相一致。

戊巴比妥钠协同睡眠实验用于检测受试药物是否具有催眠作用的常用药效学研究方法,其作用机制主要与阻断脑干网状结构上行激活系统有关,选其戊巴比妥钠阈剂量引起大鼠翻正反射消失出现观察催眠协同作用。本实验PCPA失眠大鼠入眠潜伏期延长,而对睡眠时长无明显变化,与文献报道结果一致;CHC不仅明显缩短PCPA失眠大鼠入眠潜伏期、快速诱导睡眠,且显著延长睡眠持续时间。

PG细胞主动摄取色氨酸并在羟化酶的作用下转化为5-羟基色氨酸,通过AANAT转化为N-乙酰血清素,再经HIOMT转化为MT^[20],其中AANAT是

MT合成的关键限速酶。PCPA降低大鼠PGAANAT mRNA及蛋白表达,这可能是早期PG功能下降的“引擎”;CHC增加PCPA失眠大鼠PGAANAT mRNA及蛋白表达,表明CHC通过调控MT合成关键限速酶AANAT表达促进MT合成分泌,进而保护PG结构功能,从而改善PCPA失眠自主活动、十字高架迷宫、戊巴比妥钠协同睡眠等行为学指标,有相关实验也证实作为MT合成中起到主要关键作用的限速酶AANAT,其活性对MT的合成速率及其节奏也都起到了关键作用,对MT血清浓度具有关键性控制效果^[21]。本次的AANAT蛋白表达结果与PCR结果基本一致,认为MT及CHC能显著提高PG中AANAT表达量。此外,MT分泌的调节相当复杂,除AANAT活性及蛋白外,还存在其他多种因素、其他调节系统和机制,在以后的实验中需进一步深入探索。

[参考文献]

[1] STEIN R M, KANG H J, MCCORVY J D, et al. Virtual discovery of melatonin receptor ligands to modulate circadian rhythms [J]. *Nature*, 2020, 579 (78):609-614.

[2] CHAUDHARY S, SAHU U, PARVEZ S. Melatonin attenuates branch chain fatty acid induced apoptosis mediated neurodegeneration [J]. *Environ Toxicol*, 2020, 22(10):1-15.

[3] GALANO A, REITER R J. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: from individual actions to collective protection [J]. *J Pineal Res*, 2018, 65(1): 1-33.

[4] LUO C L, YANG Q, LIU Y C. The multiple protective roles and molecular mechanisms of melatonin and its precursor *N*-acetylserotonin, in targeting brain injury and liver damage and in maintaining bone health [J]. *Free Radicals Biol Med*, 2018, 130(1):215-233.

[5] SHI Y, CAI E L, YANG C, et al. Protection of melatonin against acidosis - induced neuronal injuries [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(12):6928-6942.

[6] 梁竹,魏玮,陶利.褪黑素在治疗睡眠障碍中的研究进展[J].*解放军药学报*,2014,30(1):82-85.

[7] 刘哲学,孙铮.褪黑素代谢模式的研究进展[J].*生命科学*,2017,29(2):209-214.

[8] 王丹妮,郭晋良,仝立国,等.蛇床子催眠活性组分对PCPA损伤大鼠松果体细胞的保护作用及钟基因表达调控机制[J].*中药材*,2021,44(1):182-185.

[9] 王丹妮,杨铃,仲启明,等.异虎耳草素对PCPA致松果体损伤模型大鼠的改善作用及生物钟基因表达的影响[J].*中国药房*,2020,31(17):2081-2086.

[10] UZ T, QU T, SUGAYA K, et al. Neuronal expression of arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AANAT) mRNA in the rat brain [J]. *Neurosci Res*, 2002, 42(4): 309-316.

[11] 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.

[12] VOLLERT C, ZAGAAR M, HOVATTA I. Exercise prevents sleep deprivation associated anxiety like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 224 (2) : 233-240.

[13] ATROOZ F, SALIM S. Sleep deprivation, oxidative stress and inflammation [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2020, 119:309-336.

[14] 樊宇兵,王保芝,侯广棋,等.大鼠松果体组织结构的增龄变化[J].*解剖学杂志*,2002,25(5):471-475.

[15] KLEIN DAVID C. Arylalkylamine *N*-acetyltransferase: "the Timezyme" [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(7):4233-4237.

[16] STEHLE JORG H, SAADE A, RAWASHDEH O, et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases [J]. *J Pineal Res*, 2011, 51 (1):17-43.

[17] ASGHARI M H, MOLOUDIZARGARI M, BAHADAR H, et al. A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2017, 13(5):545-554.

[18] WATSON N, DIAMANDIS T, GONZALES-PORTILLO C. Melatonin as an antioxidant for stroke neuroprotection [J]. *Cell Transplant*, 2016, 25 (5) : 883-891.

[19] 周凯丽.昼夜节律失调性睡眠-觉醒障碍伴抑郁焦虑患者经颅磁刺激治疗的神经心理及睡眠微结构变化的研究[D].天津:天津医科大学,2019.

[20] SINGH M, JADHAV H R. Melatonin: functions and ligands [J]. *Drug Discov Today*, 2014, 19 (9) : 1410-1418.

[21] 陈玉萍,马淑然,王乐鹏,等.中医“肝应春”调控机制与下丘脑褪黑素合成限速酶芳香烷基胺-*N*-乙酰基转移酶 mRNA 表达相关性的研究[J].*中华中医药杂志*,2013,28(5):1556-1559.

[责任编辑 周冰冰]