

· 药理 ·

安神药对地西洋所致小鼠耐受性的抑制作用

丁莉, 潘怡宏, 游秋云, 王平*

(湖北中医药大学老年医学研究所, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**观察长期应用地西洋小鼠对药物的耐受性及不同安神药对对其的抑制作用,并初步探讨其机制。**方法:**将小鼠分为空白组、模型组、法半夏-秫米组(3.25 g·kg⁻¹·d⁻¹)、磁石-朱砂组(0.33 g·kg⁻¹·d⁻¹)、黄连-阿胶组(2.73 g·kg⁻¹·d⁻¹)、黄连-肉桂组(2.15 g·kg⁻¹·d⁻¹)、栀子-淡豆豉组(1.69 g·kg⁻¹·d⁻¹),每天灌胃(*ig*) 1次,连续 60 d。给药期间,除空白组外,各组隔 2 日于 *ig* 给药 30 min 后每 3 天 1 次 *ip* 地西洋注射液 25 mg·kg⁻¹,造成地西洋耐受。持续监测小鼠睡眠潜伏期,测定自主活动次数和时间,并用荧光定量 PCR 测定小鼠全脑 γ -氨基丁酸受体(GABA_A-R)mRNA、谷氨酸脱羧酶 65(GAD65)mRNA 的表达。**结果:**用药期间,模型组睡眠潜伏期逐渐延长,黄连-肉桂组、黄连-阿胶组睡眠潜伏期变化不大;用药 2 个月后,与模型组比较,黄连-肉桂组、黄连-阿胶组睡眠潜伏期明显缩短($P < 0.01$),黄连-肉桂组、黄连-阿胶组、法半夏-秫米组小鼠自主活动次数、活动时间显著性减少($P < 0.05, P < 0.01$),黄连-肉桂组、黄连-阿胶组、半夏-秫米组、磁石-朱砂组和栀子-淡豆豉组小鼠脑组织 GABA_A-R mRNA、GAD65 mRNA 表达显著性上调($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**黄连-阿胶、黄连-肉桂和法半夏-秫米具有抑制长期单独应用地西洋而致药效下降机体耐受的作用,其机制可能与上调脑内 GABA_A-R 和 GAD65 有关。

[关键词] 地西洋; 安神药对; 耐受性; γ -氨基丁酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0140-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210140

Long-term Application of Diazepam Lead to Body Tolerance in Mice and Inhibition of Sedative Chinese Medicine Pairs on Its Role

DING Li, PAN Yi-hong, YOU Qiu-yun, WANG Ping*

(Senile Medicine Institution of Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the long-term application of diazepam on drug tolerance in mice and different sedative medicine for its inhibitory effect, and discussed its mechanism. **Method:** Mice were divided into blank control group, model control group, Pinelliae Rhizoma-Husked Sorghum group (3.25 g·kg⁻¹·d⁻¹), Magnetitum-Cinnabaris group (0.33 g·kg⁻¹·d⁻¹), Coptidis Rhizoma-Asini Corii Colla group (2.73 g·kg⁻¹·d⁻¹), Coptidis Rhizoma-Cinnamomi Cortex group (2.15 g·kg⁻¹·d⁻¹) and Gardeniae Fructus-Sojiae Semen Praeparatum group (1.69 g·kg⁻¹·d⁻¹), orally once a day for 60 days. During the 60 days, except the blank control group, each group mice were injected with diazepam in 30 minutes after taking drugs (25 mg·kg⁻¹·3 d⁻¹). Continuously monitor the mice sleep latency, determination of autonomic activity frequency and time, using fluorescence quantitative PCR determination of whole brain gamma-aminobutyric acid receptors (GABA_A-R)mRNA in mice, glutamic acid decarboxy lase 65 (GAD65)mRNA expression. **Result:** During the medication, sleep latency period of diazepam group extended gradually, Coptidis Rhizoma-Asini Corii Colla group and Coptidis Rhizoma-Cinnamomi Cortex group changed little; Medication after 2 months, compared with diazepam group,

[收稿日期] 20140520(005)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130064);国家自然科学基金面上项目(81072849)

[第一作者] 丁莉,讲师,博士,从事脑病及老年脑病中医药防治规律研究,Tel:13995566700,E-mail:dinglibabara@126.com

[通讯作者] *王平,教授,博士生导师,从事脑病及老年脑病中医药防治规律研究,Tel:027-68890008,E-mail:pwang54@163.com

sleep latency period of Coptidis Rhizoma-Asini Corii Colla group and Coptidis Rhizoma-Cinnamomi Cortex group was obviously shortened ($P < 0.01$), and mice autonomic activity times and activity time of Coptidis Rhizoma-Asini Corii Colla group, Coptidis Rhizoma-Cinnamomi Cortex group and Pinelliae Rhizoma-Husked Sorghum group significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and Coptidis Rhizoma-Asinicornii Colla group, Coptidis Rhizoma-Cinnamomi Cortex group, Pinelliae Rhizoma-Husked Sorghum group, magnetitum-cinnabaris group and gardeniaefructus-sojaesemenpraeparatum group mice brain GABA_A-R mRNA and GAD65 mRNA expression significantly higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Coptidis Rhizoma-Asini Corii Colla, Coptidis Rhizoma-Cinnamomi Cortex and Pinelliae Rhizoma-Husked Sorghum can alleviate body tolerance in mice because of the long-term application of diazepam alone, the mechanism may be related to increase GABA_A-R and GAD65 in the brain.

[**Key words**] diazepam; sedative Chinese medicine pairs; tolerance; gamma-aminobutyric acid

地西泮(苯二氮卓类药物, benzodiazepine drugs, BZD)作为镇静催眠药应用于临床已经有 40 多年的历史,也是目前治疗失眠症最常用的药物。随着失眠症的发病率不断升高,长期使用 BZD 的情况越来越常见。尽管其具有较好的疗效和安全性,但已有大量证据表明长期应用 BZD 会导致机体耐受,药效下降,很多病人表现出需要加大药量才能产生一定疗效,其主要原因可能与 γ -氨基丁酸受体(GABA_A-R)下调有关^[1]。而中药治疗失眠症从这个角度有它的优势,但疗效个体差异又较大。故本研究希望筛选出一些经典小方能起协同镇静催眠作用并减少机体长期用 BZD 后的耐受性,以期在用药过程中既可以减少 BZD 的用量又能保证疗效。故本实验以具有安神作用的中药药对作用于地西洋耐受的小鼠,从行为学、脑组织 GABA_A-R 及谷氨酸脱羧酶 65 (GAD65)的变化入手,研究不同安神药对地西洋所致机体耐受性的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明级小鼠 70 只,雌雄各半,体重(20 ± 2) g,由湖北省实验动物研究中心提供,合格证号 SCXK(鄂) 2008-0005。

1.2 药物制备 中药法半夏、秫米、磁石、朱砂、黄连、阿胶、肉桂、栀子、淡豆豉均购自湖北省中医院中药房。均购自湖北省中医院中药房,药材放入圆底烧瓶,加水浸泡 1 h 后,电热套加热煮沸 1 h,取滤液。药材加水继续煮沸 1 h,取滤液。合并 2 次滤液,浓缩制成相当于生药 1 g·mL⁻¹,冰箱 4 °C 储存备用。地西洋注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号 1302262)。

1.3 试剂与仪器 小鼠自发活动实验视频分析系统(淮北正华生物仪器设备有限公司),Real Time-PCR 仪(CFX96, BIO-RAD 公司),Trizol(Invitrogen 公司,15596-026),逆转录试剂盒(Thermo 公司,

PR6901),SYBR Premix Ex Taq^[TM](TaKaRa 公司,RR420A),引物[英潍捷基(上海)贸易有限公司合成并经质量检测],见表 1。

表 1 β -actin, GABA_A-R 和 GAD65 引物序列

目的基因	引物序列	产物长度 /bp
β -actin	Forward: 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'	129
	Reverse: 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	
GABA _A -R	Forward: 5'-GCCAAATAAGTTGCTTCG-3'	265
	Reverse: 5'-TGTCTCCTTCCGATTGA-3'	
GAD65	Forward: 5'-CGAGAAGGCTATGAAATGG-3'	177
	Reverse: 5'-TACAAATCTTGTCCGAGGC-3'	

2 方法

2.1 动物分组及给药 小鼠 70 只,按照随机数字表随机分为空白组、模型组、法半夏-秫米组、磁石-朱砂组、黄连-阿胶组、黄连-肉桂组、栀子-淡豆豉组,共 7 组,每组 10 只。空白组和模型组小鼠每天灌胃生理盐水,磁石-朱砂组以磁石水煎液冷却后加入朱砂,其余各组给予相应的生药水煎液,各组小鼠均灌胃 20 mL·kg⁻¹。各组 ig 剂量按照人临床给药剂量折算成小鼠给药剂量倍数,法半夏-秫米组 3.25 g·kg⁻¹·d⁻¹,磁石-朱砂组 0.33 g·kg⁻¹·d⁻¹,黄连-阿胶组 2.73 g·kg⁻¹·d⁻¹,黄连-肉桂组 2.15 g·kg⁻¹·d⁻¹,栀子-淡豆豉组 1.69 g·kg⁻¹·d⁻¹,每天 ig 1 次,连续 ig 60 d。ig 期间,除空白组外,考虑到地西洋的半衰期,其余各组隔 2 日于 ig 30 min 后 ip 地西洋注射液 25 mg·kg⁻¹·3 d⁻¹,造成地西洋耐受。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 入睡时间监测 每次给地西洋后,记录小鼠翻正反射消失的时间,观察时间为 15 min,15 min 内翻正反射还未消失者,则翻正反射消失时间记为

15 min。

2.2.2 自主活动检测 60 d 后,用小鼠自发活动实验视频分析系统记录 3 min 内小鼠的自主活动次数,运动时间^[2]。

2.2.3 脑组织 GABA_A-R 及 GAD65 检测 Morris 水迷宫测试结束后迅速断头,冰上取脑,立即放入液氮急冻并于 -80 °C 保存。Trizol 法提取小鼠脑组织总 RNA,测定 RNA 浓度及纯度后,取相应 RNA 在逆转录酶催化下合成 cDNA,每个标本均进行 GABA_A-R mRNA, GAD65 mRNA 和 β -actin mRNA 实时荧光定量 PCR 检测。实时荧光定量 PCR 反应选用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq^[TM] 定量扩增反应体系,反应总体积为 20 μ L,其中含有 SYBR Premix Ex Taq^[TM] (2 \times) 10 μ L,逆转录反应产物 2 μ L,前引物及后引物各 0.4 μ L,最后用 dd H₂O 补足体系至 20 μ L。实时荧光定量 PCR 反应条件:94 °C 5 min,94 °C 20 s,55 °C 20 s,72 °C 20 s,72 °C 10 min 共进行 40 个循环,59 ~ 96 °C 绘制熔解曲线。

2.3 统计学处理 数据用 SPSS 11.5 软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 翻正反射消失时间 每次给地西洋后,监测各组小鼠翻正反射消失时间的变化情况如下:2 个月内,模型组小鼠翻正反射消失时间逐渐延长;磁石-朱砂组、栀子-淡豆豉组小鼠翻正反射消失时间逐渐延长;法半夏-秫米组小鼠翻正反射消失时间逐渐延长,但程度不及模型组、磁石-朱砂组和栀子-淡豆豉组;黄连-阿胶组、黄连-肉桂组小鼠翻正反射消失时间变化不大。如图 1 所示。

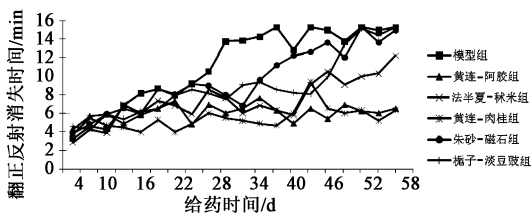


图 1 给药两个月内各组小鼠翻正反射消失时间的变化

最后 1 次给地西洋后,翻正反射消失时间组间比较结果如下:与模型组比较,黄连-阿胶组和黄连-肉桂组小鼠的翻正反射消失时间明显缩短 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.2 自主活动 与空白组比较,模型组小鼠的自主活动次数和活动时间明显减少 ($P < 0.05$);与模型组比较,法半夏-秫米组、黄连-阿胶组和黄连-肉桂组

表 2 安神药对地西洋所致小鼠翻正反射消失时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	翻正反射消失时间/min	
		给药前	最后 1 次
模型	-	3.2 \pm 1.2	14.2 \pm 2.9
法半夏-秫米	3.25	2.8 \pm 0.9	12.0 \pm 3.1
磁石-朱砂	0.33	3.8 \pm 1.1	13.9 \pm 3.4
黄连-阿胶	2.73	4.2 \pm 1.4	6.4 \pm 2.6 ¹⁾
黄连-肉桂	2.15	3.7 \pm 1.3	6.2 \pm 2.8 ¹⁾
栀子-淡豆豉	1.69	4.5 \pm 1.8	14.1 \pm 2.8

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

小鼠的自主活动次数和自主活动时间明显缩短 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 安神药对合用地西洋对小鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	自主活动	
		次数/次	时间/s
空白	-	13.6 \pm 3.8 ¹⁾	156.3 \pm 21.5 ¹⁾
模型	-	8.7 \pm 2.8	104.5 \pm 23.7
法半夏-秫米	3.25	6.0 \pm 1.9 ¹⁾	78.3 \pm 17.5 ¹⁾
磁石-朱砂	0.33	8.0 \pm 2.3	97.8 \pm 25.4
黄连-阿胶	2.73	3.8 \pm 1.5 ²⁾	57.1 \pm 18.9 ²⁾
黄连-肉桂	2.15	3.9 \pm 1.9 ²⁾	60.7 \pm 20.5 ²⁾
栀子-淡豆豉	1.69	7.8 \pm 2.3	98.6 \pm 16.9

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.3 小鼠脑组织 GABA_A-R mRNA, GAD65 mRNA 检测 与空白组比较,模型组小鼠脑组织 GABA_A-R mRNA, GAD65 mRNA 表达均明显下调 ($P < 0.01$);与模型组比较,其余各组小鼠脑组织 GABA_A-R mRNA, GAD65 mRNA 表达均明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

表 4 安神药对合用地西洋对小鼠脑组织 GABA_A-R mRNA, GAD65 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	GABA _A -R mRNA	GAD65 mRNA
		/ β -actin	/ β -actin
空白	-	8.71 \pm 0.73 ²⁾	11.41 \pm 1.71 ²⁾
模型	-	3.32 \pm 0.69	5.96 \pm 1.16
法半夏-秫米	3.25	7.31 \pm 0.72 ²⁾	9.62 \pm 0.93 ²⁾
磁石-朱砂	0.33	4.66 \pm 0.76 ¹⁾	7.91 \pm 0.82 ¹⁾
黄连-阿胶	2.73	7.05 \pm 0.66 ²⁾	11.03 \pm 1.09 ²⁾
黄连-肉桂	2.15	8.95 \pm 1.37 ²⁾	11.52 \pm 0.96 ²⁾
栀子-淡豆豉	1.69	5.20 \pm 1.37 ¹⁾	7.57 \pm 1.53 ¹⁾

4 讨论

BZD 是临床常用的具有镇静、催眠、抗焦虑和抗惊厥等效应的药物。但长时间的使用可产生药物耐受性使疗效减弱。药物耐受性是指一种既定药物在重复使用过程中,其效价强度和效能明显下降以致消失^[3]。本研究应用一些经典安神药对与苯二氮卓类药物合用。半夏-秫米药对出自《灵枢·邪客》的半夏汤,用于湿痰内盛、胃不和则卧不安之失眠症,有祛痰和胃,化浊宁神之功效;磁石-朱砂药对出自《备急千金要方》的磁朱丸,具有益肾镇心,平肝明目之功效;黄连-阿胶出自《伤寒论》的黄连阿胶汤,具有滋阴降火安神之功效;黄连-肉桂药对出自《韩氏医通》之交泰丸,黄连清心泻火以制偏亢之心阳,肉桂温补下元以扶不足之肾阳,心火不炽则心阳自能下降,肾阳得扶则肾水自能上承,水火既济,心肾相交,则不寐自除;栀子-淡豆豉药对出自《伤寒论》的栀子豉汤,方中栀子苦寒清降,泄热除烦,降中有宣;淡豆豉辛散轻浮,清热苦泄,宣中有降,二药相合,共奏清热除烦之功。本实验结果表明,地西洋单独长期使用因机体耐受而使药效明显下降;部分安神中药药对与地西洋联合应用能减轻延缓机体对地西洋的耐受性,提高地西洋镇静催眠的疗效,尤其是黄连-肉桂药对和黄连-阿胶药对表现出较明显的效果,半夏-秫米药对其次。而疗效最显著的两组均含黄连,黄连清心泻火,苦寒燥湿,从中医角度出发,考虑地西洋长期应用所致的药效下降与心火亢盛,中焦湿热有一定相关性,后期将深入研究黄连或黄连素对失眠症的治疗作用。

GABA 是中枢系统内重要的抑制性递质,广泛分布于中枢神经,估计约 20% ~ 30% 的中枢突触是以 GABA 作为其中枢传导递质。介导 GABA 中枢效应的受体至少包括 GABA_A 和 GABA_B,前者属于受体通道超家族,而后者属于 G 蛋白耦联受体超家族。另有 GABA_C 目前发现主要在视觉通路表达^[4]。根据大量实验研究^[5],已经确定 GABA_A 受体是很多临床常用的镇静、催眠、抗惊厥药的靶受体。BZD 可与 GABA_A 受体上 BZD 位点结合,通过复杂的受体构象的改变而增强 GABA 对 GABA_A 受体的作用。中枢 GABA_A 受体是一五聚体复杂大分

子,也是 BZD 发挥药理作用的靶受体, BZD 的药效学耐受性与 GABA_A 受体下调有关,大量文献表明^[6-7] BZ 的慢性使用可引起 GABA_A 受体的数量、结合位点的变构性交互作用、受体功能、亚单位 mRNA 表达以及翻译后的改变。GAD65 是中枢抑制性神经递质 GABA 合成过程中必不可少的酶,与 GABA 的含量密切相关^[8]。本实验结果表明,地西洋单独长期使用药效下降的机制与中枢 GABA_A 受体下调、GABA 合成减少有关;部分安神中药药对与地西洋联合应用能减轻延缓机体对地西洋的耐受性则与增加中枢的 GABA_A 受体、促进 GABA 合成密不可分。本研究的目的旨在寻找较好的安神中药提高单独应用 BZ 的疗效,为开发更好的复方镇静催眠药奠定前期基础。

[参考文献]

- [1] 郭文,王丽. 苯二氮卓类受体的结构功能与苯二氮卓类耐受性和依赖性机制的研究进展[J]. 中国药理学通报, 1999, 15 (2): 111.
- [2] 买文丽,王琼,刘新民,等. 小鼠自主活动实验中的评价指标[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16 (3): 172.
- [3] 边凤芝,王丽,王云秀,等. 对抗大鼠氟西洋抗癫痫耐受性药物及其机制的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12 (1): 56.
- [4] Sieghart W. Structure and pharmacology of γ_2 aminobutyric acid_A receptor subtypes[J]. Pharmacol Rev, 1995, 47 (2): 182.
- [5] 余运龙,全世建. 交泰丸对 PCPA 失眠大鼠大脑 γ -氨基丁酸及受体的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (6): 1417.
- [6] Fritschy J M, Benke D, Johnson D K, et al. GABA_A-receptor α -subunit is an essential prerequisite for receptor formation *in vivo*[J]. Neurosci, 1997, 81 (4): 1043.
- [7] Mohler H. GABA_A receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2006, 26 (5/6): 731.
- [8] Esclapea M, Hoser C R. UP-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA I leulronB in a model of temporal lobe epilepsy [J]. J Comp Neurol, 1999, 412 (3): 488.

[责任编辑 聂淑琴]