

酸枣仁总皂苷对失眠老年大鼠 脑氨基酸类神经递质及受体表达的影响

张舜波, 王平, 田代志, 游秋云*
(湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**观察酸枣仁总皂苷对老年阴血亏虚证失眠大鼠脑组织谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)及GABA_A受体表达的影响。**方法:**将Wistar大鼠随机分为空白对照组(等容生理盐水),模型组(老年阴血亏虚证失眠组,等容生理盐水),阳性对照组(安定0.18 mg·kg⁻¹·d⁻¹),酸枣仁总皂苷低、高剂量组(15,30 g·kg⁻¹·d⁻¹)。用D-半乳糖致亚急性衰老、环磷酰胺及氢化可的松致阴血亏虚,及自制改良多平台法剥夺快动眼睡眠(REM)48 h,制作阴血亏虚证候失眠老年大鼠模型。造模后各组灌胃给药3周,采用高效液相法检测脑皮质、海马部位Glu,GABA含量;免疫组化染色及RT-PCR法检测脑皮质、海马部位GABA_AR的表达变化,并考察酸枣仁总皂苷对这些指标的影响。**结果:**与空白对照组比较,模型组大鼠脑皮质及海马Glu,GABA含量显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),且Glu/GABA增高;脑皮质及海马部位的GABA_AR免疫化学累积吸光度明显较高($P < 0.01$);皮质部位GABA_AR mRNA的表达均显著上调($P < 0.01$),经酸枣仁总皂苷干预后各指标明显下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论:**酸枣仁总皂苷治疗阴血亏虚证老年失眠的机制可能与减少脑内氨基酸毒性作用,下调大脑皮质及海马部位GABA_AR的表达有关。

[关键词] 酸枣仁总皂苷; 睡眠剥夺; 氨基酸类神经递质; 阴血亏虚证

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0124-04

[doi] 10.11653/syjf2014040124

Effects of Jujuboside on Amino Acid Neurotransmitters and its Receptor Expression in the Brain of Syndrome Insomnia Old Rats

ZHANG Shun-bo, WANG Ping, TIAN Dai-zhi, YOU Qiu-yun*
(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of jujuboside (JBSD) on glutamic acid (Glu), γ -aminobutyric acid (GABA) and γ -aminobutyric acid A receptor (GABA_AR) expression in the brain of syndrome insomnia old rats. **Method:** Wistar rats were randomly divided into 5 groups: blank control, syndrome model group, positive medicine group, high and low-dose JBSD treatment group. Multiple factors model were established with subacute senescence induced by D-galactose, Yin and blood-deficiency induced by cyclophosphamide and hydrocortisonum, and the rapid eye movement (REM) sleep deprivation (SD) induced by mated-self multiple platform method (MMPM). After three weeks of administration, the levels of amino acid neurotransmitters Glu and GABA in cortex and hippocampus were detected by HPLC, and GABA_AR expression were detected by immunohistochemical staining and retrovirus-polymerase chain reaction (RT-PCR). After intervention of jujuboside, those indicators were studied. **Result:** Compared to environmental control group, in model group the content of Glu and GABA and the ratio of them increased in cortex and hypothalamus ($P < 0.01$, $P < 0.05$),

[收稿日期] 20130608(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072849)

[第一作者] 张舜波, 硕士, 讲师, 从事神经精神类相关中药药理学研究, Tel:027-68890101, E-mail:420599572@qq.com

[通讯作者] * 游秋云, 博士, 副教授, 从事失眠等神经精神类中药药理学研究及益智健脑中药新产品开发, Tel:027-68890101, E-mail: youqiuyn@126.com

GABA_AR immunohistochemistry absorbance was rose significantly ($P < 0.01$) in cortex and hippocampus, and GABA_AR mRNA expression showed higher significantly ($P < 0.01$) in cortex. While the indicators tended to the normal range after the treatment of JBSD ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** JBSD can reduce the toxic effects of amino acids in brain, and downregulating GABA_AR expression in the rat brain may be one of the mechanisms in treatment of the syndrome insomnia.

[**Key words**] jujuboside; sleep deprivation; amino acid neurotransmitters; Yin and blood-deficiency

酸枣仁是治疗失眠常用的养心安神药,具有安心养神、益肝、敛汗的作用,主治虚烦失眠,惊悸多梦,体虚多汗等症^[1]。前面实验笔者已制作并评价了老年阴血亏虚型失眠证候大鼠模型^[2],证实了经典方剂酸枣仁汤^[3]和酸枣仁总皂苷的脑保护作用,并探索了的酸枣仁汤的部分作用机制^[4]。为了进一步探索酸枣仁汤的物质基础,本课题拟对酸枣仁汤君药主要成分酸枣仁总皂苷,从神经毒性角度以氨基酸类神经递质谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)的含量为指标来探讨其安神的作用机制。因此本实验采用了免疫组化方法和RNA的反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法观察大鼠大脑皮质及海马部位 γ -氨基丁酸A亚型受体(GABA_AR) α_1 和 γ_2 亚单位表达的变化,进一步深入探讨酸枣仁总皂苷的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 大鼠 80 只,体重(200 ± 20)g,雌雄各半,由华中科技大学同济医学院提供,合格证号 SCXK(鄂) 2003-0005。

1.2 药物与试剂 酸枣仁(购自湖北中医药大学门诊部)。酸枣仁总皂苷由湖北中医药大学中药资源重点实验室提取。方法:将酸枣仁碾碎,加6倍体积的石油醚回流脱脂3次,药渣干燥后加6倍体积的70%乙醇回流提取3次,提取液浓缩至无醇味,加正丁醇萃取3次,合并正丁醇层,用5%NaOH溶液洗涤,正丁醇层浓缩干燥,称重,得干膏收率为1.234%,加适量水分别配成9.26,18.52 g·L⁻¹(相当于原药材质量浓度0.75,1.5 g·mL⁻¹)。D-半乳糖(国药集团化学试剂有限公司,批号20071025);环磷酰胺注射液(CPA,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号080226);氢化可的松注射液(山东新华制药股份有限公司,批号080404);戊巴比妥钠(上海化学试剂采购供应站试剂厂,批号070321),多聚甲醛(中国医药上海化学试剂公司,批号20070823);过氧化氢(上海谱振生物科技有限公司,批号20070421),兔抗大鼠GABAAR α_1 和 γ_2 多克隆抗体(美国Chemicon公司进口,批号20070601),ABC试

剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司进口分装,批号20070501);抗体稀释液(武汉博士德公司,批号20071024);Glu,GABA对照品(美国Sigma公司,批号20071004);TRIzolTM试剂(Gibcobi公司,批号20080104);逆转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号20080204]。

1.3 仪器与设备 睡眠剥夺箱(自制),为长72 cm,宽48 cm,高30 cm的鼠箱,内置6个直径8 cm,高8 cm的连体平台,在平台周边注满水,水面距平台面约1.0 cm,大鼠在平台上可自行饮食饮水及自由活动,于箱体上放平行的不锈钢丝笼罩,上面放水和食物。环境对照箱(自制),与睡眠剥夺箱相似,但在距其底部8.0 cm处不放置平台,而是放置一面细密铁丝网,大鼠在网上可自由活动,其他条件均与睡眠剥夺箱相同,以形成与睡眠剥夺组相似的环境。Waters高效液相色谱仪(美国);2487UV检测器及M32色谱数据处理系统(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);DYY-7C电泳槽及C1000TM型PCR扩增仪(联想生物技术有限公司);JS-380A凝胶成像系统(上海培清科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将Wistar大鼠80只随机分成5组,为空白对照组,模型组(老年血亏阴虚睡眠剥夺组),阳性对照组(安定),酸枣仁总皂苷低剂量组,酸枣仁总皂苷高剂量组,每组16只。

2.2 阴血亏虚证候失眠老年大鼠模型的制作^[2]与分组给药 将模型组大鼠颈背部sc D-半乳糖60 mg·kg⁻¹·d⁻¹6周以制备亚急性衰老动物模型;然后将环磷酰胺注射液按100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ip 5 d以制作血虚模型,同时将氢化可的松注射液按50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ip 5 d以制作阴虚模型;最后放入自制睡眠剥夺箱进行快动眼睡眠时相(REM)剥夺2 d。造模历时7周。空白对照组大鼠放入环境对照箱。阳性对照组安定给药剂量为0.18 mg·kg⁻¹,酸枣仁总皂苷组低、高剂量组折合为生药剂量分别15,30 g·kg⁻¹,其余组给予等容生理盐水。灌服3周,给药容积为20 mL·kg⁻¹。

2.3 检测指标

2.3.1 检测氨基酸类神经递质 Glu 及 GABA 的含量 最后 1 次给药结束 40 min 后,^[5]用甲醇制备各组实验大鼠皮质、海马部位脑组织匀浆,离心,沉淀,所得上清液用来测定 2 种氨基酸的含量^[6]。配制氨基酸对照品储备液,配制衍生化试剂并使样品衍生化。色谱条件:色谱柱 Waters Nova-Pak C₁₈ (3.9 mm × 150 mm, 4 μm);流动相 A 为 0.05 mol·L⁻¹的醋酸钠缓冲液 (pH 6.5), B 为乙腈-水 (1:1), 梯度洗脱程序 B 由初始时的 16% 经 10 min 增至 45%, 25 min 至 85%;流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 360 nm;柱温 30 ℃。取 100 μL 进样分析。采用外标法定量。在该色谱条件下,2 种氨基酸得到有效分离,保留时间为 Glu 5.80 min, GABA 14.00 min。

2.3.2 GABA_ARα₁ 和 γ₂ 亚单位免疫组织化学染色和半定量检测^[7] 将动物麻醉、心脏灌流固定后,取双侧大脑半球制作石蜡切片。用 3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭 1 h,滴加兔抗大鼠 GABA_ARα₁ 和 γ₂ 亚单位的多克隆抗体 (α₁ 亚单位抗体稀释体积比例为 1:400, γ₂ 亚单位抗体稀释体积比例为 1:200), 4 ℃ 孵育过夜,应用 ABC 法免疫组织化学试剂盒进行免疫组织化学染色。每个切片的相关区域以 ×400 倍随机分别留取 2 个视野,应用 Imagine-Pro 5.0 图像处理软件,计算累积吸光度值 (IA),代表相关亚单位蛋白表达水平。

2.3.3 GABA_ARα₁ 和 γ₂ 亚单位 mRNA 半定量检测^[7] 将余下实验大鼠处死,取脑,提取 mRNA 用于 RT-PCR 实验。RNA 提取及 cDNA 合成参照试剂盒说明书进行 [TRIzol™ 试剂购自 GIBCOBRI 公司;逆转录试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司], 合成 cDNA 进行 PCR 扩增。采用 Primer 3 软件设计 RT-PCR 引物, GABA_ARα₁ 亚单位引物 (上游引物 5'-TTGACTGTGAGAGC-CGAATG-3', 下游引物 5'-CAGAGCCGAGAA-CACGA_AG-3', 扩增片段长度 507 bp)、GABA_ARγ₂ 亚单位引物 (上游引物 5'-ACTATGTGGTTATGTC-CGTGTA-3', 下游引物 5'-TGTGTATCCTCCCGTGC-3', 扩增片段长度 534 bp) 和内参照 β-actin 引物 (上游引物 5'-CGAGAAGATGACCCAGATCA-3', 下游引物 3'-AGGGGCCGACTCGTCATAC-5', 扩增片段长度 234 bp) 均由上海英浚公司设计合成。取 5 μL PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析,并用 Bio-RAD 影像系统对条带扫描,测定各个条带的吸光度 (A),将

各组的 GABA_AR 条带 A 与相应 β-actin A 比较,得出 GABA_AR mRNA 的相对含量。

2.4 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件包统计分析,显著性检验均采用组间 *t* 检验。*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠大脑皮质和海马部位氨基酸类神经递质 Glu, GABA 含量的影响 与空白对照组比较,模型组大鼠大脑皮质、海马部位的 Glu, GABA 含量均明显增高 (*P* < 0.01), Glu/GABA 比例增大;与模型组比较,酸枣仁总皂苷高、低剂量组大鼠大脑皮质及海马部位 Glu, GABA 含量显著减少 (*P* < 0.01, *P* < 0.05), Glu/GABA 减小,并呈现一定量效关系。见表 1。

表 1 各组大鼠大脑皮质层和海马部位中 Glu 和 GABA 含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$) μg·g⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Glu		GABA	
		皮质	海马	皮质	海马
空白对照	-	526 ± 14	516 ± 15	224 ± 11	231 ± 14
模型	-	961 ± 17 ²⁾	874 ± 12 ²⁾	311 ± 16 ¹⁾	332 ± 16 ¹⁾
安定	0.18 × 10 ⁻³	586 ± 16 ⁴⁾	562 ± 18 ⁴⁾	234 ± 11 ⁴⁾	258 ± 17 ⁴⁾
酸枣仁总皂苷	15	760 ± 19 ⁴⁾	724 ± 26 ³⁾	267 ± 21 ³⁾	285 ± 13 ³⁾
	30	631 ± 11 ⁴⁾	613 ± 37 ⁴⁾	247 ± 21 ⁴⁾	271 ± 4 ³⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与模型组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01 (表 2~3 同)。

3.2 对大鼠脑内 GABA_ARα₁, γ₂ 亚单位的影响 空白对照组 GABA_ARα₁, γ₂ 亚单位表达主要分布在大脑皮质及海马部位。与空白对照组比较,模型组 α₁ 亚单位免疫化学累积吸光度 (IA) 在大脑皮质额叶明显增高 (*P* < 0.01), γ₂ 亚单位的免疫化学 IA 在海马 CA₄ 区明显增高 (*P* < 0.01);与模型组比较,酸枣仁总皂苷高、低剂量组在大脑皮质额叶区、海马 CA₄ 区 IA 明显降低 (*P* < 0.01, *P* < 0.05)。见表 2。

表 2 酸枣仁总皂苷对大鼠脑内 GABA_ARα₁、γ₂ 亚单位免疫化学积分吸光度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$) IA

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	额叶		海马 CA ₄	
		GABA _A Rα ₁	GABA _A Rγ ₂	GABA _A Rα ₁	GABA _A Rγ ₂
空白对照	-	30.35 ± 9.32	98.31 ± 16.41		
模型	-	50.65 ± 10.02 ²⁾	125.29 ± 19.21 ²⁾		
安定	0.18 × 10 ⁻³	32.78 ± 6.98 ⁴⁾	99.35 ± 15.38 ⁴⁾		
酸枣仁总皂苷	15	40.88 ± 6.88 ³⁾	104.29 ± 17.41 ³⁾		
	30	34.43 ± 6.77 ⁴⁾	101.21 ± 14.38 ⁴⁾		

3.3 对大鼠脑内 GABA_ARα₁ 和 γ₂ mRNA 表达的影

响 与空白对照组比较,模型组大鼠大脑皮质部位 GABA_A R α_1 和 γ_2 亚单位 mRNA 的表达明显增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,酸枣仁总皂苷高、低剂量组大鼠大脑皮质部位 GABA_A R α_1 和 γ_2 亚单位 mRNA 的表达明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 3。

表 3 酸枣仁总皂苷对大鼠大脑皮质 GABA_A R α_1 和 γ_2 亚单位 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GABA _A R α_1	GABA _A R γ_2
		/ β -actin	/ β -actin
空白对照	-	1.01 \pm 0.17	0.93 \pm 0.18
模型	-	1.62 \pm 0.32 ²⁾	1.57 \pm 0.28 ²⁾
阳性对照	0.18 \times 10 ⁻³	1.21 \pm 0.13 ⁴⁾	1.18 \pm 0.20 ⁴⁾
酸枣仁总皂苷	15	1.08 \pm 0.29 ³⁾	1.09 \pm 0.18 ⁴⁾
	30	1.14 \pm 0.17 ⁴⁾	1.07 \pm 0.14 ⁴⁾

4 讨论

本实验根据中医辨证论治的指导思想,用 D-半乳糖致亚急性衰老、环磷酸胺及氢化可的松致阴血亏虚,及国内外公认的小平台水环境剥夺剥夺快动眼睡眠 48h,制作了阴血亏虚失眠老年大鼠模型。前期已成功确认了该证候模型^[2]。

失眠与中枢神经系统兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸神经递质的平衡失调密切相关。Glu 是主要的兴奋性递质,GABA 是中枢神经系统中最重要的抑制性递质,发挥突触后抑制作用,同时参与了迟发性神经元损害过程^[8]。GABA 和 Glu 对于维持神经细胞抑制与兴奋功能平衡的稳定具有极为重要的作用。GABA_A 受体是很多临床常用的镇静、抗焦虑及抗惊厥药的靶受体。目前已发现 GABA_A R α_1 与 γ_2 亚单位的组合在脑内广泛表达,是数量最多的 GABA_A R 亚型之一,也是 GABA_A R 的重要功能基因。GABA 作用于 GABA_A 受体上 GABA 位点,使神经细胞膜的 Cl⁻ 通透性增加,Cl⁻ 顺浓度差进入细胞内,细胞膜内的负电位进一步增加,由极化变为超极化,更难以去极化,兴奋性也相应下降^[9],从而表现为镇静、抗焦虑等作用。

已有研究表明,酸枣仁总皂苷可改善脑出血模型大鼠的焦虑状态,保护大脑皮质内 Glu、GABA 能神经元,使脑组织内 Glu 含量明显降低,并升高 GABA 含量^[10]。但少见酸枣仁总皂苷对中医证候动物模型的作用研究,本实验结果表明,酸枣仁总皂苷能够通过下调血亏阴虚失眠老年大鼠模型 Glu、GABA 两种氨基酸类神经递质的含量及比值,来减轻脑内兴奋性神经毒性,其机制可能与下调脑内

GABA_A R 介导的基因转录通路中的 GABA_A R α_1 和 γ_2 亚单位的表达有关,具有与酸枣仁汤相一致的实验结果^[4]。该实验初步揭示了养心安神药酸枣仁的主要有效成分酸枣仁总皂苷对老年失眠模型大鼠的作用机制,且为经典方剂酸枣仁汤的有效物质基础,从而为酸枣仁汤及酸枣仁的临床合理用药提供药理学依据。另有实验证实,睡眠剥夺与单胺类神经递质去甲肾上腺素、5-羟色胺等紊乱有关^[11],下一步我们将继续探索酸枣仁总皂苷对单胺类神经递质的调节作用及机制。

[参考文献]

- [1] 沈鸿,肖红,陈建芳,等. 酸枣仁总皂苷对血虚、阴虚小鼠的镇静催眠作用[J]. 中药药理与临床,2006,22(3):23.
- [2] 游秋云,王平,吴丽丽,等. 两种老年失眠证候大鼠模型的建立及评价[J]. 中华中医药杂志,2011,26(1):21.
- [3] 游秋云,吴丽丽,田代志,等. 酸枣仁汤对老年失眠证候模型大鼠学习记忆及脑内自由基、NOS 的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2010,19(10):885.
- [4] 游秋云,王平,孔明望,等. 酸枣仁汤对老年失眠证候模型大鼠脑组织谷氨酸、 γ -氨基丁酸及 γ -氨基丁酸 A 受体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):119.
- [5] 周卿,代广会,左巨波,等. RP-HPLC 法测定大鼠脑组织及脑脊液中四种氨基酸类神经递质的含量[J]. 遵义医学院学报,2006,29(4):395.
- [6] 王晓菲,罗晓星,周四元,等. RP-HPLC 法检测海马脑片灌流液中氨基酸类神经递质[J]. 第四军医大学学报,2002,23(5):430.
- [7] 薄涛,陈勇. 新生大鼠反复惊厥对脑内 γ -氨基丁酸 A 受体 α_1 和 γ_2 亚单位表达的长期影响[J]. 北京大学学报:医学版,2006,38(6):628.
- [8] 余东来,高妍,申刚义,等. 氨基酸类神经递质对中枢神经系统疾病作用的探讨[J]. 中央民族大学学报,2010,19(2):78.
- [9] 千智斌,齐莹,吴中海. GABA_A 受体在尼可刹米引起的新生大鼠呼吸兴奋中的作用[J]. 南方医科大学学报,2008,28(3):301.
- [10] 卢芳. 酸枣仁总皂苷对实验性脑出血大鼠氨基酸能神经元的调节作用[D]. 长沙:湖南中医药大学,2009.
- [11] 朱蕾,张茹,李廷利. 刺五加对睡眠剥夺大鼠学习记忆及海马单胺类神经递质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):219.

[责任编辑 聂淑琴]