

增食素脑室注射对麻醉大鼠促觉醒作用 及对下丘脑 NE, 5-HT 的影响

唐汉庆¹, 郑建宇², 李克明¹, 李晓华¹, 朱晓莹¹, 韦祎^{3*}

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2. 右江民族医学院附属医院针灸科, 广西 百色 533000;
3. 海南医学院, 海口 571199)

[摘要] **目的:** 观察增食素(orexin)脑室注射对麻醉大鼠的促觉醒作用及检测下丘脑去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)含量变化, 探讨 orexin 促觉醒作用及机制。**方法:** Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、orexin 低、高剂量组 4 组, 每组 10 只。模型组、低剂量组、高剂量组采用水合氯醛、乌拉坦 1:1 混合液按 5 mL·kg⁻¹ ip 建立麻醉模型, 然后, 低剂量组侧脑室注入 1 mmol·L⁻¹ orexin 10 μL (0.1 mg), 高剂量组侧脑室注入 5 mmol·L⁻¹ orexin 10 μL (0.5 mg), 观察翻正反射消失时间、翻正反射消失持续时间, ELISA 法检测下丘脑 NE、5-HT 含量。**结果:** 与正常组比较, 模型组 NE 含量(82.44 ± 2.16) ng·L⁻¹, 5-HT 含量(149.88 ± 14.21) ng·L⁻¹, 均下降, 但差异无统计学意义。与模型组 NE 含量比较, orexin 高剂量组 NE 含量[(158.83 ± 4.87) ng·L⁻¹]显著升高($P < 0.01$)。与模型组 5-HT 含量比较, 增食素低、高剂量组 5-HT 含量(232.58 ± 16.05), (278.14 ± 17.85) ng·L⁻¹]显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组翻正反射消失持续时间(61.08 ± 11.32) min 比较, 增食素高剂量组(32.01 ± 7.42) min 显著减少($P < 0.01$)。**结论:** orexin 兴奋下丘脑 NE、5-HT 能神经元, 增强大脑皮质对单胺能神经元功能活动的“易化”影响, 从而起到促觉醒及维持觉醒作用。

[关键词] 增食素; 去甲肾上腺素; 5-羟色胺; 觉醒

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0233-04

[doi] 10.11653/syjf2013140233

Effects of Orexin on Wakefulness and Content of NE, 5-HT in Hypothalamus

TANG Han-qing¹, ZHENG Jian-yu², LI Ke-ming¹, LI Xiao-hua¹, ZHU Xiao-ying¹, WEI Yi^{3*}

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;

2. Acupuncture and Moxibustion department of Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China; 3. Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effects of orexin on wakefulness and content of norepinephrine (NE), serotonin (5-HT) in hypothalamus to discuss the mechanisms. **Method:** Rats were divided into the control group, the model group, the low-dose group and the high-dose group at random. Each group included 10 rats. The anesthesia rat model was established with intraperitoneal injection by using chloral hydrate and urethane mixture (1:1) according to 5 mL·kg⁻¹. The low-dose group were intraperitoneally injected orexin 10 μL (1 mmol·L⁻¹, 0.1 mg) from paracele and the high-dose group were intraperitoneal injected orexin 10 μL (5 mmol·L⁻¹, 0.5 mg) from paracele. To observe lost of righting reflex (LORR) time and LORR lasting time. ELISA method was applied to test content of NE, 5-HT in hypothalamus. **Result:** Compared with the control group, in the model group the content of both NE [(82.44 ± 2.16) ng·L⁻¹] and 5-HT [(149.88 ± 14.21) ng·L⁻¹] declined, but there was no significant difference. Compared with the model group by content of NE in the high-dose group the content of NE [(158.83 ± 4.87) ng·L⁻¹] increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the

[收稿日期] 20121226(008)

[第一作者] 唐汉庆, 副教授, 医学博士, 从事中西医结合基础研究, Tel:0776-2849479, E-mail:iloveyouverymuch0000@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 韦祎, 硕士, 讲师, E-mail:sue0900cn@163.com

model group by content of 5-HT [(149.88 ± 14.21) ng · L⁻¹], in the low-dose group the content of 5-HT [(232.58 ± 16.05) ng · L⁻¹] increased ($P < 0.05$) and in the high-dose group the content of 5-HT [(278.14 ± 17.85) ng · L⁻¹] increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group by LORR lasting time [(61.08 ± 11.32) min], in the high-dose group [(32.01 ± 7.42) min] reduced significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** orexin could excite NE, 5-HT neuron, which enhance cerebral cortex effect of 'facilitation' on monamine neuron, finally may cause and keep wakefulness, which is probably one of the mechanisms of orexin causing wakefulness.

[**Key words**] orexin; NE; 5-HT; wakefulness

增食素(orexin)是一种兴奋性神经肽激素, orexin 神经元主要位于大脑外侧下丘脑和穹隆周核。orexin 系统功能广泛,对于睡眠/觉醒的调节便是其中之一,睡眠由慢波睡眠(slow wave sleep, SWS)和快速眼动(rapid eye movement, REM)睡眠两种状态交替所构成,下丘脑去甲肾上腺素(NE)能神经元、背缝核的 5-羟色胺(5-HT)能神经元在 SWS 时相发放冲动较慢,在 REM 时相冲动发放几乎停止,而在觉醒状态则发放冲动较多^[1],研究指出 orexin 有强大的促觉醒效果,在维持觉醒状态中起着关键作用^[2], orexin 系统通过对 NE 能神经元、5-HT 能神经元的调节、促进其放电是其促觉醒作用的机制之一。本工作通过观察 orexin 对麻醉大鼠的促觉醒作用及检测下丘脑 NE, 5-HT 含量变化为这一机制提供实验学基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠,雌雄不拘,体质量 160 ~ 185 g,常态环境饲养,本院科学实验中心提供,动物许可证号 SCXK(桂)2010-0006。

1.2 试剂和仪器 水合氯醛(批号 20110612,北京化学试剂公司);乌拉坦(批号 20080610,国药集团化学试剂有限公司);NE, 5-HT ELISA 检测试剂盒(R&B 公司, USA); orexin(批号 205640-90-0,北京乐波公司);人工脑脊液(ACSF, EL0006,国家标准物质信息网)。

AE160 型电子天平(瑞士 Mettler 公司);电脑计时器软件(1.90 版,华为技术有限公司);68902 型脑立体定位仪(深圳瑞沃德公司);DY-89 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝公司);PK121R 型高速低温离心机(ALC 公司);MDF-U72V 型超低温冰箱(日本三洋公司);MK3 型酶标仪(Thermo Labssystem 公司)。

2 方法

2.1 动物分组和造模 40 只大鼠常态环境适应性饲养 1 周后,随机分为正常组、模型组、orexin 低剂

量组(简称低剂量组)、orexin 高剂量组(简称高剂量组),每组 10 只。参考文献[3],模型组、orexin 低、高剂量组按 5 mL · kg⁻¹ ip 水合氯醛、乌拉坦 1:1 混合液(50 mL 的 10% 水合氯醛溶液和 50 mL 的 25% 乌拉坦溶液以 1:1 混合而成),正常组则用生理盐水 ip。ip 麻醉混合液后,观察翻正反射消失时间^[4]并记录,以翻正反射消失作为麻醉有效的标志,接着经脑立体定位仪侧脑室置管,2 min 内 orexin 低、高剂量组以 5 μL · min⁻¹ 速率分别注入 1 mmol · L⁻¹ 10 μL(相当于 0.1 mg)和 5 mmol · L⁻¹ orexin(以 ACSF 稀释)10 μL(相当于 0.5 mg)。正常组、模型组则注入同体积的 ACSF。以 orexin 注射完毕后的时间点为起点,记录翻正反射消失持续时间。

2.2 观察翻正反射 翻正反射消失时间:参考文献[4]大鼠连续 3 次仰卧在 10 s 内不能翻正到至少 1 只足掌贴地为翻正反射消失。记录其时间。

翻正反射消失持续时间:连续 3 次仰卧后在 10 s 内翻正到正常姿势称为翻正反射恢复,从 orexin 注射完毕后的时间到恢复时间为翻正反射消失持续时间。记录其时间。

2.3 ELISA 法检测下丘脑 NE, 5-HT 含量 开颅取脑,参照 Paxinos 和 Watson 大鼠脑解剖图谱,切取下丘脑 1.5 mm × 1.5 mm × 1.5 mm 组织,称重后立即标记置于 3 mL 冻存管, -70 °C 冻存。按照 ELISA 试剂盒说明书要求检测其含量。

2.4 统计学处理 数据统计采用 SPSS 13.0 软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 全部大鼠纳入本次实验的结果分析,没有脱失。

3.2 翻正反射消失时间及翻正反射消失持续时间 模型组、orexin 低、高剂量组 3 组间翻正反射消失时间比较,差异无统计学意义。模型组和高剂量组翻正反射消失持续时间比较,高剂量组显著减少

($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 脑室注射增食素对麻醉大鼠翻正反射消失

时间及消失持续时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg /只	翻正反射	翻正反射消失
		消失时间	持续时间
正常	-	-	-
模型	-	4.02 ± 0.86	61.08 ± 11.32
orexin	0.1	3.88 ± 0.82	51.31 ± 10.07
	0.5	3.72 ± 0.78	32.01 ± 7.42 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 下丘脑 NE,5-HT 含量 与正常组比较,模型组 NE,5-HT 含量均下降,但差异无统计学意义;与模型组比较,orexin 低剂量组 NE 含量升高,但差异无统计学意义,5-HT 含量升高($P < 0.05$);与模型组比较 orexin 高剂量组 NE,5-HT 含量均显著升高($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 脑室注射增食素对麻醉大鼠下丘脑 NE,

5-HT 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

ng·L⁻¹

组别	剂量/mg/只	NE	5-HT
正常	-	94.12 ± 2.86	168.13 ± 15.56
模型	-	82.44 ± 2.16	149.88 ± 14.21
orexin	0.1	106.36 ± 3.14	232.58 ± 16.05 ^{1,3)}
	0.5	158.83 ± 4.87 ^{2,4)}	278.14 ± 17.85 ^{2,4)}

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⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

orexin 是下丘脑 orexin 神经元产生的一种神经肽,近年的研究进一步证实 orexin 系统具有促进并维持觉醒的功能^[5],与单胺能神经元的放电活动有密切联系,orexin 系统能兴奋单胺能神经元,释放 NE,5-HT 等增加单胺能神经元放电频率促进觉醒。

麻醉用药及方法对于动物实验的结果有很大的影响,在麻醉药的选择上,多种药联用,可以克服使用单一麻醉药造成的剂量过大而引起动物麻醉过度死亡的弊端,同时能使动物麻醉的维持时间可以根据实验需要进行设置,提高试验数据的可靠性。

文献[3]报道以水合氯醛、乌拉坦 1:1 混合液 ip 的麻醉方式,效果好、起效快、死亡率极低,适合 2 h 左右大鼠手术或模型制作。本实验工作有鉴于此,采用此麻醉药及给药方式。在实验中,我们观察到模型组、orexin 低、高剂量组 3 组间翻正反射消失时间比较,差异无统计学意义,同时,与正常组比较,模型组 NE,5-HT 含量均下降,但差异无统计学意义,说明联合应用麻醉药可以在很大程度上避免了单一使用麻醉药由于大鼠个体对药物敏感性及耐药性等差异带来的实验误差。

orexin 主要通过激活下丘脑 NE,5-HT 能神经元促进觉醒,从下丘脑 NE,5-HT 含量的变化可以推测 NE,5-HT 能神经元的功能状态,从本实验工作结果分析,与模型组比较,低剂量组 NE 含量升高,但差异无统计学意义,5-HT 含量升高($P < 0.05$)。与模型组比较,高剂量组 NE,5-HT 含量均显著升高($P < 0.01$),说明脑内注射 orexin 后,NE,5-HT 能神经元合成和分泌功能增强,而且这些功能和 orexin 之间存在剂量/浓度依赖性的关系,推测 NE,5-HT 能神经元可能还伴有放电频率的增加。

此外,从翻正反射消失持续时间分析,和模型组比较,高剂量组显著缩短($P < 0.01$),低剂量组尽管也缩短,但差异无统计学意义,结合下丘脑 NE,5-HT 含量的变化,说明翻正反射消失持续时间和下丘脑 NE,5-HT 含量之间可能存在负相关。

研究证实在健康人的脑脊液中可检测到 orexin,而 84.2% 以上的发作性睡病患者脑脊液中 orexin 水平显著低于健康人平均水平,胆碱能神经元放电频率下降^[6],结合该研究结果,从本实验工作看,orexin 的促觉醒及觉醒维持作用是关键的,orexin 参与调控睡眠/觉醒的机制与下丘脑 NE,5-HT 能神经元及胆碱能神经元相互间兴奋/抑制功能失衡有关,机制的基础是 orexin 兴奋下丘脑 NE,5-HT 能神经元,使其合成和分泌 NE,5-HT 功能增强,推测同时放电频率增加,增强大脑皮质对单胺能神经元功能活动的“易化”影响而抑制胆碱能神经元活动^[7-8],从而起到促觉醒及维持觉醒作用,推测这是 orexin 起效机制之一。

正常组和模型组下丘脑 NE,5-HT 含量比较没有统计学意义,说明在麻醉药和 orexin 之间,麻醉药不是引起下丘脑 NE,5-HT 分泌的主要因素,由此反证 orexin 在本实验工作中是引起下丘脑 NE,5-HT 分泌的主要因素的可能性增大。

由于神经元的放电活动涉及到离子流和电位变化,orexin 作用的发挥也与其受体表达水平、c-fos (神经元活性标志物)表达有关^[9-10],本工作只从下丘脑 NE,5-HT 含量变化来揭示 orexin 的作用原理,基础仍显得单薄,可能只涉及其中的部分机制,本实验后续工作将在现有基础上对这些方面进行研究。

[参考文献]

- [1] Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier A D, et al. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(20):7760.

3 种大黄素金属配合物的抗氧化活性研究

向晖, 潘晓丽, 谢运飞, 章从恩, 董小萍*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137)

[摘要] 目的: 对比配体大黄素和其 3 种金属配合物的体外抗氧化活性。方法: 以天然大黄素和相应的金属盐为原料, 在无水乙醇中合成了大黄素-锌、大黄素-锰、大黄素-铁(Ⅲ)等 3 种配合物, 并对其结构进行表征。采用紫外可见分光光度法, 分别考察了配体和配合物对二苯代苦味肼基自由基(DPPH)、超氧自由基(O₂⁻·)、羟基自由基(·OH)等 3 种自由基的清除率。结果: 配体及配合物对 3 种自由基均有一定清除作用。其中大黄素-铁(Ⅲ)清除羟基自由基活性最强, 其半数有效浓度(EC₅₀)值达 19.96 mg·L⁻¹ 小于大黄素(EC₅₀ 147.87 mg·L⁻¹)、大黄素-锌(EC₅₀ 30.76 mg·L⁻¹)、大黄素-锰(EC₅₀ 100.04 mg·L⁻¹); 大黄素-铁(Ⅲ)清除超氧自由基活性也为最强, 其 EC₅₀ 达 60.832 mg·L⁻¹, 小于大黄素(EC₅₀ 853.152 mg·L⁻¹)、大黄素-锌(EC₅₀ 436.296 mg·L⁻¹)、大黄素锰(EC₅₀ 161.949 mg·L⁻¹); 实验范围内(1 × 10⁻⁴ mmol·L⁻¹ ≤ C ≤ 4 × 10⁻³ mmol·L⁻¹) 配合物和配体对 DPPH 自由基清除活性总体不强, 均小于 25%, 但配合物活性稍高于配体。结论: 大黄素与 Fe³⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ 离子形成配合物后抗氧化活性增强, 其中以大黄素-铁(Ⅲ)配合物抗氧化活性最高。

[关键词] 大黄素; 金属配合物; 抗氧化活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0236-04

[doi] 10.11653/syfyj2013140236

Concentration for 50% of Maximum Effect Study of Antioxidant Activity of 3 Emodin Metal Complex

XIANG Hui, PAN Xiao-li, XIE Yun-fei, ZHANG Cong-en, DONG Xiao-ping*

[收稿日期] 20121210(039)

[基金项目] 成都中医药大学校基金项目(ZRMS201236)

[第一作者] 向晖, 在读研究生, E-mail: xianghui12688@126.com

[通讯作者] * 董小萍, 教授, 博士生导师, 从事中药及其复方物质基础与质量标准研究, E-mail: dongxiaoping11@126.com

[2] Gerashchenko D, Kohls M D, Greco M, et al. Hypocretin-2 saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat[J]. J Neurosci, 2001, 21(18): 7273.

[3] 张全鹏, 王慧, 陈旦, 等. 水合氯醛、乌拉坦及其 1:1 混合液在 SD 大鼠麻醉中的效果比较及应用[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1208.

[4] 王金韬, 罗爱林, 万丽. 周-特氏联合指数法研究丙泊酚和咪唑安定致小鼠翻正反射消失的相互作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2005, 21(7): 484.

[5] Berridge C W, Espana R A, Vittoz N M. Hypocretin/Orexin in arousal and stress[J]. Brain Res, 2010, 1314: 91.

[6] Nishino S, Ripley B, Overeem S, et al. Low cerebrospinal fluid hypocretin (orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy [J]. Ann Neurol, 2001, 50(3): 381.

[7] 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.

[8] 孔梅, 邢长永, 舒晓春. 逍遥散干预抑郁症睡眠障碍模型大鼠海马 5-HT_{1A} 受体、5-HT_{2A} 受体的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 157.

[9] Samson W K, Taylor M M, Follwell M, et al. Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates[J]. Regul Pept, 2002, 104(1/3): 97.

[10] Mieda M, Sakurai T. Orexin (hypocretin) receptor agonists and antagonists for treatment of sleep disorders: rationale for development and current status[J]. CNS Drugs, 2013, 27(2): 83.

[责任编辑 聂淑琴]