

肝胆两益汤镇静催眠作用及其机制研究

张岗强^{1,2}, 何昕³, 董宪喆², 刘屏^{2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国人民解放军总医院临床药理研究室, 北京 100853;
3. 蚌埠医学院, 安徽 蚌埠 233030)

[摘要] **目的:**研究肝胆两益汤对小鼠的镇静催眠作用及其作用机制。**方法:**将KM小鼠随即分为正常组、安定组(1.3 mg·kg⁻¹)、百乐眠组(0.3 g·kg⁻¹组)和肝胆两益汤组(5.2, 2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹),按照10 mL·kg⁻¹ ig给药,连续给药7 d,正常组ig等量蒸馏水。观察肝胆两益汤对小鼠ip戊巴比妥钠阈剂量;采用转棒法观察肝胆两益汤对小鼠运动协调性的影响,观察肝胆两益汤对小鼠自主活动的影响;高效液相色谱法检测肝胆两益汤对小鼠脑组织中氨基酸类神经递质[天门冬氨酸(Asp),谷氨酸(Glu),甘氨酸(Gly)和γ-氨基丁酸(GABA)]含量的影响。**结果:**肝胆两益汤2.6, 1.3 g·kg⁻¹组能显著缩短小鼠入睡潜伏期、显著延长小鼠睡眠持续时间和显著减低小鼠自主活动次数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而对小鼠运动协调性没有明显的影响。肝胆两益汤5.2 g·kg⁻¹组能显著升高小鼠脑组织中GABA, Asp, Glu的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 2.6 g·kg⁻¹组能显著增加小鼠脑组织中GABA, Gly的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而1.3 g·kg⁻¹组能显著升高小鼠脑组织中GABA的含量($P < 0.01$)。**结论:**肝胆两益汤有显著的镇静催眠作用,其作用机制可能与增加脑组织中抑制性氨基酸GABA和Gly的含量有关。

[关键词] 肝胆两益汤; 镇静催眠; 中枢神经递质

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0226-04

[doi] 10.11653/syfj2013140226

Sedative and Hypnotic Activities of Gandan Liangyi Tang via the Elevation Effects on Amino Acids Neurotransmitters in Mice

ZHANG Gang-qiang^{1,2}, HE Xin³, DONG Xian-zhe², LIU Ping^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Department of Clinical Pharmacology, Center of Pharmacy, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 3. Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the sedative and hypnotic effects of Gandan Liangyi Tang (GDLYT) and the potential mechanism in mice. **Method:** The KM mice were divided into seven groups: control group, diazepam group, Bailemian group, GDLYT 5.2, 2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹ dose groups, and mice were administrated once per day. The threshold dose of pentobarbital sodium was observed in mice. The locomotion activity was estimated, and the rotarod test was used to evaluate the effects of GDLYT. The contents of amino acids neurotransmitters including aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), glycine (Gly), γ-aminobutyric acid (GABA) in mice brain were determined by HPLC-FL. **Result:** The results showed that administration of GDLYT at 2.6, 1.3 g·kg⁻¹·d⁻¹ significantly shorted the latency period and lengthened the duration of sleep ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Besides, the locomotion activities were significantly reduced by GDLYT (1.3, 2.6 g·kg⁻¹·d⁻¹) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) while the coordination of motion was no changed in mice after GDLYT treated. The results of

[收稿日期] 20130227(008)

[基金项目] 军队“十二五”中医药推广研发项目(10ZYZ141)

[第一作者] 张岗强, 硕士研究生, Tel:010-66936678

[通讯作者] *刘屏, 博士生导师, 研究员, 从事神经药理研究, Tel:010-66936676, E-mail:liuping301@126.com

HPLC indicated that GDLYT 5.2 g·kg⁻¹ group can significantly increase the GABA, Asp and the Glu content ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the 2.6 g·kg⁻¹ group could increase the GABA and Gly content significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), meanwhile the 1.3 g·kg⁻¹ group could significantly increase the content of GABA ($P < 0.01$) in the mice brain tissues. **Conclusion:** Our results suggested that GDLYT exerts sedative and hypnotic activities, and the mechanisms may be correlated with the effects of increasing the contents of amino acids neurotransmitters GABA and Gly.

[**Key words**] Gandan Liangyi Tang; sedative hypnotic; central neurotransmitter

失眠是指入睡困难或睡眠持续障碍,导致睡眠时间减少或睡眠质量下降,明显影响日间社会功能或生活质量一种疾病^[1],失眠而且往往与精神类疾病有着密切的联系,往往伴随着躁狂、焦虑和抑郁等精神类疾病发生^[2-3],严重影响人们的生活质量,给社会和个人造成了极大的负担。中医药治疗失眠具有多靶点、多途径,毒副作用小的优势,尤其是对病因病机复杂的失眠更好。肝胆两益汤载于古代经方《辨证录》卷四中:“白芍一两,远志五钱,炒枣仁一两”,用于治疗“夜不能寐,恐鬼祟来侵,辗转不安或少睡而即惊醒,或再睡而恍如捉拿”等症。本研究采用经典镇静催眠药效学方法,观察肝胆两益汤的镇静、催眠作用及初步的药理作用机制,为进一步研发镇静催眠药和临床合理用药提供科学依据。

1 材料

1.1 药品 肝胆两益汤(水提醇沉,滤过,取上清液,回收乙醇,真空减压干燥至干粉),每克干粉相当于4.6 g原生药材提取物,中国中医科学院制备(批号20120703),1 g药粉相当于4.6 g生药。安定天津天士力制药股份有限公司,批号1107008);百乐眠胶囊(扬子江药业集团有限公司,批号12031212);戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号20120312);天门冬氨酸(aspartic acid, Asp 140691-200401)和甘氨酸(glycine, Gly 140689-201103,均为中国药品生物制品鉴定所),谷氨酸(glutamic acid, Glu, BCBF3950V)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA, BCBG4279V)和邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA 0070875317),均购自Sigma公司; β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, Amresco公司);甲醇(色谱纯,美国Fisher Scientific公司)。

1.2 仪器与设备 JZZ98型小鼠自主活动仪(中国医学科学院),YLS-4C型小鼠转棒式疲劳仪(济南益延科技发展有限公司),Agilent 1200高效液相色谱仪(Agilent公司),G1321A荧光检测器(Agilent公司);3K15型高速冷冻离心机(Sigma公司);F-30型pH计(北京屹源电子仪器科技公司)。

1.3 动物 健康雄性昆明种小鼠,体重(20±2)g,由解放军总医院动物实验中心提供,合格证号SCXX(京)2011-0004。

2 方法

2.1 动物分组及给药 试验前小鼠先适应性饲养3 d,随机分为7组,分别为正常组、安定组(1.3 mg·kg⁻¹)、百乐眠组(0.3 g·kg⁻¹)、肝胆两益汤5.2, 2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹组。每日ig给药1次,按照10 mL·kg⁻¹ ig给药,正常组ig等量蒸馏水,各组连续ig给药7 d,每日1次。

2.2 阈剂量戊巴比妥钠实验 84只小鼠末次给药50 min后,按照10 mL·kg⁻¹ ip戊巴比妥钠40 mg·kg⁻¹(预实验100%小鼠入眠最小剂量),以翻正反射消失达1 min以上为入睡,以ip完成至完全入睡为睡眠潜伏期,以翻正反射出现1 min以上为苏醒,从完全入睡至苏醒为睡眠持续时间。

2.3 小鼠自主活动实验 84只小鼠末次给药50 min后将小鼠放入自主活动仪中先适应1 min,然后打开电源开关,记录5 min的活动数作为自主活动的指标。

2.4 小鼠脑组织氨基酸类神经递质的测定

2.4.1 衍生试剂的制备^[4] 精密称取13 mg邻苯二甲醛,溶于2.5 mL甲醇中,加入20 μ L β -巯基乙醇,再加入0.05 mol·L⁻¹四硼酸钠缓冲液(pH 9.6) 2.5 mL,制得衍生试剂。

2.4.2 标准曲线的绘制 精密称取Asp, Glu, Gly, GABA对照品各5 mg,用50%甲醇配制成1 000.00, 750.00, 500.00, 250.00, 125.00, 83.33, 62.50, 50.00, 41.67, 33.33, 25.00, 12.50 mg·L⁻¹的混合氨基酸对照品溶液,分别取10 μ L进样测定,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,所绘标准曲线在12.50~1 000 mg·L⁻¹有良好线性关系,结果见表1。

2.4.3 小鼠脑组织匀浆液的准备^[4] 小鼠连续ig给药7 d后,断头处死,于冰上分离出全脑,按照脑组织质量1:9加入预冷的生理盐水,冰浴下用组织破碎机破碎,在3 000 r·min⁻¹, 4 $^{\circ}$ C低温离心15

表 1 Asp, Glu, Gly, GABA 标准曲线及其线性关系

对照品	线性方程	r
Asp	$Y = 0.234X - 13.51$	0.999
Glu	$Y = 0.129X - 14.06$	0.999
Gly	$Y = 0.008X - 0.678$	0.997
GABA	$Y = 0.012X - 1.111$	0.993

min, 取上清 100 μL , 加 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸 100 μL , 混匀, 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心 20 min。柱前衍生化: 取上清液 100 μL , 加 100 μL OPA 衍生试剂, 涡旋混匀, 准确反应 1.5 min, 进样 10 μL , 采用高效液相色谱荧光检测法定量。

2.4.4 色谱条件 色谱柱 Agilent C_{18} 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)。流动相 A 为磷酸氢二钠 (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 用磷酸调节 pH 至 6.86) 与甲醇按照 7:3 比例混合; B 为甲醇。采用梯度洗脱, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为: 激发波长 340 nm, 发射波长 450 nm。

2.5 数据统计处理 数据采用 SPSS 16.0 统计软

表 2 肝胆两益汤对小鼠阈剂量戊巴比妥钠的影响、自主活动的影响及对脑组织氨基酸类神经递质含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	戊巴比妥钠实验		自主活动实验	脑氨基酸类神经递质含量			
		入睡潜伏期 $/\text{s}$	睡眠持续时间 $/\text{s}$	自主活动数 $/\text{次}$	Asp $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Glu $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Gly $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	GABA $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	351.6 \pm 806.0	2 530.6 \pm 868.1	541.7 \pm 102.5	237.5 \pm 95.3	357.3 \pm 181.7	9.9 \pm 3.5	19.3 \pm 8.2
安定	1.3 $\times 10^{-3}$	249.4 \pm 24.1 ²⁾	9 360.7 \pm 1 830.6	405.7 \pm 78.8 ²⁾	328.5 \pm 132.1	481.4 \pm 252.7	11.5 \pm 5.4	32.0 \pm 11.0 ¹⁾
百乐眠	0.3	349.3 \pm 80.7	5 593.8 \pm 1 640.3 ²⁾	436.3 \pm 82.7 ²⁾	222.2 \pm 112.4	394.3 \pm 177.2	11.7 \pm 3.8	28.1 \pm 9.3 ¹⁾
肝胆两益汤	5.2	311.9 \pm 36.8	2 836.0 \pm 970.2	466.2 \pm 110.8	376.4 \pm 32.9 ²⁾	517.3 \pm 43.9 ¹⁾	12.1 \pm 2.4	31.3 \pm 4.4 ²⁾
	2.6	282.3 \pm 35.3 ¹⁾	4 494.2 \pm 1 193.8 ²⁾	391.0 \pm 111.8 ²⁾	289.3 \pm 53.9	425.7 \pm 82.1	13.5 \pm 2.1 ¹⁾	29.5 \pm 4.1 ²⁾
	1.3	262.6 \pm 45.9 ¹⁾	8 184.7 \pm 1 180.9 ²⁾	336.5 \pm 104.1 ²⁾	289.0 \pm 24.9	458.8 \pm 71.1	12.8 \pm 3.3	29.6 \pm 2.9 ²⁾
	0.65	284.1 \pm 32.8 ¹⁾	2 524.1 \pm 1 000.4	533.6 \pm 90.2	200.8 \pm 64.9	370.4 \pm 103.3	11.4 \pm 2.0	25.1 \pm 5.7

注: 与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

肝胆两益汤方中酸枣仁、远志、白芍各味中药均为常用中药, 其中酸枣仁^[5-7]和远志^[8-9]已有很多文献报道其在治疗失眠方面的药理活性, 但肝胆两益汤作为整方的镇静催眠药未见有报道。本研究采用 ip 阈剂量戊巴比妥钠催眠作用实验、小鼠转棒实验和自主活动实验, 系统评价了肝胆两益汤的镇静催眠作用。

由阈剂量戊巴比妥钠和自主活动实验研究可知, 肝胆两益汤表现出了较好的镇静催眠作用, 转棒实验能反映药物对动物协调能力的影响, 有较强中枢抑制作用的药物, 能缩短动物从棒上坠落的时间^[10], 本研究表明肝胆两益汤在连续给药 7 d 后对小鼠协调能力没有明显的抑制作用。

件进行单因素方差分析, 计量数据采用 Dunnett t 检验, 计数数据采用 χ^2 检验, 量反应资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

肝胆两益汤对阈剂量戊巴比妥钠、小鼠自主活动及对小鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响结果见表 2。由表 2 结果可知, 安定组和肝胆两益汤 2.6 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 1.3 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 均能显著缩短小鼠入睡潜伏期、延长睡眠持续时间和抑制小鼠自主活动次数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 0.65 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 也能显著缩短入睡潜伏期, 百乐眠组能显著延长睡眠持续时间和抑制小鼠自主活动次数 ($P < 0.01$); 高效液相检测结果显示, 安定组、百乐眠组和肝胆两益汤 (5.2, 2.6, 1.3 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组均能显著升高 GABA 的含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肝胆两益汤 5.2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 还能升高 Asp 和 Glu 含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 2.6 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组还能显著升高 Gly 含量 ($P < 0.05$)。

Gly 和 GABA 是脑内重要的抑制性神经递质, Asp 和 Glu 是脑内重要的兴奋性神经递质, 其各自含量的平衡对于维持大脑的兴奋和抑制作用起到很大作用。从本研究中可发现, 小鼠给予药物干预后, 与正常组相比安定组和百乐眠组均能显著升高 GABA 的含量 ($P < 0.05$); 肝胆两益汤 5.2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组能显著升高 GABA, Asp, Glu 的含量 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) 从而使该剂量在小鼠上并没有表现出明显的镇静催眠作用, 而 2.6 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组能显著提高小鼠脑内 GABA 和 Gly 的含量 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 1.3 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组能显著提高小鼠脑组织 GABA 的含量 ($P < 0.01$), 从而在小鼠上表现出显著的镇静催眠效果; 而肝胆两益汤 0.65 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组虽然能显著缩短阈剂量戊巴比妥钠入睡潜伏期, 但却并没有观察到

芪蚣抗纤方拆方对肝纤维化大鼠 Smad2/3 及 Smad7 蛋白的影响

高 媛, 陈桂敏*, 梁振钰, 谢毅强, 杨世忠
(海南医学院, 海口 571199)

[摘要] 目的: 观察芪蚣抗纤方(Qigong Kangxian Prescription, QF)活血组和软坚组对肝纤维化大鼠细胞内信号转导分子 2,3,7(Smad 2/3 及 Smad7)的影响。方法: 成年健康雄性 SD 大鼠 60 只, 随机分为 6 组, 除正常对照组 10 只外, 其余 50 只均用猪血清腹腔注射法复制免疫损伤性肝纤维化大鼠模型, 0.5 mL/只, 每周 2 次, 连续 8 周。活血组和软坚组分别给予活血方和软坚方。低、高剂量组按生药量以 5, 10 g·kg⁻¹ig 给药。实验结束处死大鼠, 断头取血, 分离血清, 用 ELISA 法测定转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β_1 的含量。部分肝组织固定于 10% 甲醛液, 石蜡包埋, 制光镜切片, 免疫组织化学法检测肝组织 TGF- β_1 、Smad2、Smad3 及 Smad7 蛋白的表达。结果: ①血清及肝组织 TGF- β_1 含量及表达 活血高剂量组分别为(0.65 ± 0.09) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 4.33 ± 2.06, 软坚低剂量组分别为(0.62 ± 0.08) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 4.11 ± 1.14, 与模型组(1.22 ± 0.16) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 10.33 ± 3.34 相比有显著差异($P < 0.01$); ②Smad2 和 Smad3 蛋白表达显色指数活血高剂量组分别为(3.88 ± 2.00), (3.22 ± 1.89)分, 软坚低剂量组分别为(4.22 ± 1.49), (4.77 ± 1.75)分, 与模型组(10.20 ± 3.06), (10.22 ± 3.06)分相比有显著差异($P < 0.01$); ③Smad7 蛋白表达显色指数活血高剂量组为(6.89 ± 1.50)分, 软坚低剂量组为(4.33 ± 1.78)分, 与模型组(1.56 ± 0.73)分相比有显著差异($P < 0.01$)。结论: 芪蚣抗纤方活血组及软坚组可通过减少 Smad 2/3 的激活, 增加 Smad7 的表达, 抑制肝纤维结缔组织增生, 减轻肝损伤及肝纤维化程度。具有抑制肝纤维化作用。

[关键词] 芪蚣抗纤方拆方; 活血组; 软坚组; 肝纤维化; Smad 2/3; Smad 7

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0229-04

[doi] 10.11653/syfy2013140229

[收稿日期] 20121210(003)

[基金项目] 2008 年海南省自然科学基金项目(808165)

[第一作者] 高媛, 硕士, 副教授, 从事中医肝病研究, Tel:0898-66890539, E-mail: gaoyuan58505@163.com

[通讯作者] * 陈桂敏, 教授, 硕士生导师, 从事肝纤维化研究, Tel:0898-66960792, E-mail: hehuanchgm@163.com

氨基酸类神经递质含量的显著改变, 其具体原因还需进一步研究。

在上述镇静催眠小鼠模型上, 肝胆两益汤表现出了较好的镇静催眠作用, 其中以 2.6 g, 1.3 g·kg⁻¹药效学最显著, 其作用机制可能与增加脑组织中抑制性神经递质 GABA 及 Gly 的含量有关。

[参考文献]

[1] Neubauer D N. Pharmacologic approaches for the treatment of chronic insomnia[J]. Clinical Cornerstone, 2003, 5(3):16.
[2] Allison G. Harvey sleep and circadian functioning: critical mechanisms in the mood disorders [J]. Clin Psychol, 2011, 7:297.
[3] Richard R Bootzin, Dana R Epstein. Understanding of treating insomnia[J]. Clin Psychol, 2011, 7:435.

[4] 张丽, 叶翠飞, 沈芊, 等. 高效液相荧光测定大鼠脑内氨基酸类神经递质方法的改良[J]. 中国实验动物学学报, 2011, 19(5):377.
[5] 陈百泉, 杜钢军, 需启蒙. 酸枣仁皂苷的镇静催眠作用[J]. 中药材, 2002, 25(6):429.
[6] 李廷利, 刘立, 孙加源, 等. 生、炒酸枣仁催眠作用的实验研究[J]. 中医药学报, 2001, 29(5):351.
[7] 马进杰, 刘萍, 马百平. 酸枣仁化学成分及其镇静催眠作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(3):206.
[8] 张耀春, 王立为. 远志药理研究进展[J]. 国外医药, 2004, 19(2):59.
[9] 王建, 瞿燕, 吴晖晖, 等. 远志及其不同蜜炙品的镇静安神作用对比研究[J]. 江苏中医, 2007, 39(6):60.
[10] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994:643.

[责任编辑 聂淑琴]