

黄连阿胶汤对对氯苯丙氨酸致失眠模型小鼠神经递质的影响

贾利利,周宁,李凯*,张振凌
(河南中医学院药学院,郑州 450008)

〔摘要〕 目的:研究黄连阿胶汤对对氯苯丙氨酸(PCPA)致失眠模型小鼠的神经递质 5-羟色胺(5-HT)及 γ -氨基丁酸含量的影响,分析黄连阿胶汤对失眠的作用。方法:空白组、模型组给予生理盐水溶液;阳性组给予天王补心混悬液 $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;给药组给予黄连阿胶汤混悬液 $5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;给药体积均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药 1 周后停止灌胃给药。之后阳性组、给药组、模型组腹腔注射 PCPA $350\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药体积为 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,空白组腹腔注射同体积的生理盐水溶液,连续 2 d。采用酶免法测定 5-HT 及 γ -氨基丁酸含量。结果:黄连阿胶汤组、空白组、模型组、天王补心混悬液组 5-HT 分别为 (89.12 ± 5.81) , (116.08 ± 8.36) , (68.45 ± 17.63) , $(98.08\pm4.11)\text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$, γ -氨基丁酸分别为 (13.72 ± 1.83) , (12.01 ± 0.66) , (16.13 ± 2.26) , $(14.17\pm2.17)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。给药组与空白组、模型组相比,5-HT 和 γ -氨基丁酸含量均具有显著性差异;给药组与阳性组相比,5-HT 有显著性差异,而 γ -氨基丁酸没有显著性差异。结论:黄连阿胶汤可逆转由 PCPA 引起的失眠,改善脑内神经递质 5-HT 的含量,为黄连阿胶汤治疗失眠提供了实验依据。

〔关键词〕 黄连阿胶汤;对氯苯丙氨酸;失眠;5-羟色胺; γ -氨基丁酸

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)22-0240-03

Effect of Huanglian Ejiao Decoction to Neurotransmitter of
p-chlorophenylalanine Induced Insomnia Mice

JIA Li-li, ZHOU Ning, LI Kai*, ZHANG Zhen-ling

〔收稿日期〕 20120419(015)
〔基金项目〕 2010 年中医药行业科研专项项目(201007010);河南中医学院博士基金项目(BSJJ2010-06)
〔通讯作者〕 *李凯,讲师,从事中药学教学与研究工作,E-mail:cpuikai@163.com

[8] 康学东,余臣祖,朱瑾,等. 化浊颗粒治疗大鼠非酒精性脂肪肝的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 200.

[9] 王斌胜,丁乐顺,刘同,等. 仙虎合剂对大鼠实验性脂肪肝治疗作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 179.

[10] 徐英敏,张大伟,蒋士卿,等. 祛痰化痰汤治疗痰瘀内阻型非酒精性脂肪肝 35 例[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(16): 296.

[11] 中国药典. 一部[S]. 2010:29.

[12] 罗先钦,黄崇刚,伍小波,等. 山楂总黄酮对复合因素致大鼠脂肪肝模型脂质代谢与低密度脂蛋白受体表达的影响[J]. 中草药,2011,42(7): 1367.

[13] 宁康健,张子明,司阳洋,等. 当归对四氯化碳肝损伤保护作用的电镜观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009,15(12): 68.

[14] 刘丹,汤海峰,张三奇,等. 虎杖浓缩片对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药,2007, 18(12):3034.

[15] 恭岚. 中药虎杖的药理研究进展[J]. 中国中药杂志, 2000,25(11):651.

[16] 吴永平,王梦,卢定强. 乙酰泽泻醇 B 与洛伐他汀对大鼠降血脂作用的比较[J]. 华西药学杂志,2011, 26(3):243.

[17] 陈晓蕾,李红阳. 泽泻生品及不同炮制品对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中药材,2006, 29(6):592.

[18] 章一凡,朱雄雄,朱惠萍,等. 丹参酮 II_A 磺酸钠对高脂性脂肪肝大鼠肝脏脂质过氧化物的影响[J]. 苏州大学学报:医学版,2009,29(6):1076.

[19] 刘锐,李劲平,伍娟娟,等. 丹荷软胶囊对非酒精性脂肪肝模型大鼠胰岛素抵抗及瘦素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(1): 188

〔责任编辑 聂淑琴〕

(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Pharmacy College, Zhengzhou 450008, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the effect of Huanglian Ejiao decoction on serotonin (5-HT) and γ -aminobutyric acid content of *p*-chlorophenylalanine (PCPA) induced insomnia model in mice. **Method:** Normal group and model group were given saline solution; positive group was given Tianwang Buxin suspension $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; medicine group was given Huanglian Ejiao decoction $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; dosing volume was $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ and cycle was one week. Then positive, medicine and model groups were intraperitoneally injected PCPA $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ with dosing volume of $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, and normal group was given same volume of saline solution all for 2 days. The contents of 5-HT and γ -aminobutyric acid were determined by enzyme immunoassay. **Result:** The contents of 5-HT and γ -aminobutyric acid in medicine, normal, model and positive group were $(89.12 \pm 5.81) \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$, $(13.72 \pm 1.83) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $(116.08 \pm 8.36) \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$, $(12.01 \pm 0.66) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $(68.45 \pm 17.63) \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$, $(16.13 \pm 2.26) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $(98.08 \pm 4.11) \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$, $(14.17 \pm 2.17) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Compared with normal group and model group, 5-HT and γ -aminobutyric acid content in treatment groups showed significant differences. Compared with positive group, only 5-HT content of treatment group indicated significant difference. **Conclusion:** Huanglian Ejiao decoction could reverse PCPA induced insomnia, improve the content of neurotransmitters in the brain, and provide experimental basis for the treatment of insomnia by Huanglian Ejiao decoction.

[**Key words**] Huanglian Ejiao decoction; *p*-chlorophenylalanine; insomnia; serotonin; γ -aminobutyric acid

黄连阿胶汤出自《伤寒论》,全方的组成为“黄连四两,黄芩二两,芍药二两,阿胶三两,鸡子黄二枚”,主治“少阴病,得之二三日以上,心中烦,不得卧者”,与阴虚火旺型失眠症临床表现一致。目前,黄连阿胶汤及以其为主的加减方剂研究主要集中在临床方面,其中又以治疗失眠的研究报道最多^[1-5],而有关其治疗失眠的机制研究鲜见报道。本文采用对氯苯丙氨酸(PCPA)致失眠模型小鼠,研究了黄连阿胶汤对神经递质 5-羟色胺(5-HT)及 γ -氨基丁酸含量的影响,并分析黄连阿胶汤治疗失眠的可能机制和途径。

1 材料

1.1 动物 健康雌性昆明种小鼠(SPF级)50只,体重 $(20 \pm 2) \text{ g}$,由郑州大学医学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(豫)2010-0002。

1.2 药品 黄连、黄芩、白芍(南京海源饮片公司提供,批号分别为L110523H,110217H,110508H);阿胶(山东福胶集团东阿镇阿胶有限公司);鸡子黄(郑州市政四街思达超市,批号S20120215);对氯苯丙氨酸(PCPA,美国Sigma公司生产,批号MFCD00002601);5-羟色胺(5-HT,R&D公司,批号20111101A); γ -氨基丁酸(R&D公司,批号20111101A);天王补心丸(河南省宛西制药股份有限公司生产,浓缩丸,批号110908)。

1.3 仪器 BS210S型1/万电子天平(北京SARTORIUS有限公司);DHL-A(3+1)型北京东华原十功能煎药机(北京东华原医疗设备有限公司)。

2 方法

2.1 试药制备 取处方量黄连饮片12g,黄芩饮片6g,白芍饮片6g,加水15倍量(360mL),浸泡30min后,加热自沸腾开始计时用文火煎煮30min,二煎加水13倍量(312mL),煎煮20min,4层纱布分别过滤,合并2次水煎液,浓缩至生药 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,在不低于60℃的温度条件向合煎液中加入阿胶粗粉9g搅拌烊化5min;待温度降至50℃以下,加入鸡子黄2枚,即得,置于4℃冰箱内备用。天王补心混悬液的制备:临用前用蒸馏水制成 $0.15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混悬液,置于4℃冰箱内备用。

2.2 动物分组 小鼠40只,体重 $(20 \pm 2) \text{ g}$,自购买之后进行适应性饲养3d后,随即分为4组:空白对照组、模型组、阳性对照天王补心丸组、黄连阿胶汤组(以下简称空白组、模型组、阳性组、给药组)每组10只。实验室温度20~26℃,相对湿度40%~60%。小鼠自由饮食饮水。

2.3 给药情况 在实验开始前,对除空白组外其余各组进行预防性ig给药,各组动物药物ig剂量如下:空白组、模型组给予生理盐水溶液;阳性组给予天王补心混悬液 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;给药组给予黄连阿胶汤

混悬液 5 g·kg⁻¹;给药体积均为 10 mL·kg⁻¹,给药 1 周后阳性组、给药组、模型组 ip PCPA 350 mg·kg⁻¹,给药体积为20 mL·kg⁻¹,空白组 ip 同体积的生理盐水溶液,连续 2 d。

2.4 检测指标 PCPA 造模成功后,脱颈椎处死小鼠,在枕骨大孔处迅速剪断延髓,去颅骨,完全暴露脑组织,取出脑组织,在冰平皿上分离出大脑后,在冰冷生理盐水中洗去血液,组织称重后,在冰浴条件下充分匀浆,离心(3 000 r·min⁻¹, 10 min),取上清液,用 ELISA 试剂盒按说明书处理后,在酶标仪 450 nm 处进行检测 5-HT 和 γ-氨基丁酸含量^[6-8]。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析处理,各项指标结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果与分析

5-HT 和 γ-氨基丁酸含量测定结果见表 1。与空白对照组比较,模型组小鼠脑内 5-HT 含量减少,γ-氨基丁酸含量增加, ($P < 0.01$);与模型组比较,给药组和阳性对照组小鼠脑内 5-HT 含量降低,且具有极显著差异 ($P < 0.01$),γ-氨基丁酸含量无显著性差异。

表 1 黄连阿胶汤对 PCPA 致失眠小鼠脑内 5-HT 和 γ-氨基丁酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	5-HT /pg·mg ⁻¹	γ-氨基丁酸 /μmol·L ⁻¹
空白	—	116.08 ± 8.36 ^{2,3)}	12.01 ± 0.66
模型	—	68.45 ± 17.63 ³⁾	16.13 ± 2.26
天王补心混悬液	1.5	98.08 ± 4.11 ²⁾	14.17 ± 2.17 ¹⁾
黄连阿胶汤混悬液	5	89.12 ± 5.81 ^{2,4)}	13.72 ± 1.83 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与天王补心混悬液组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

PCPA 失眠小鼠模型是目前公认的,并被广泛用于 5-HT 及其与其他递质之间关系研究的经典动物模型^[9]。故本实验采用腹腔注射 PCPA 制造失眠小鼠模型,观察黄连阿胶汤治疗失眠的作用。造模后,相对空白组小鼠,给予 PCPA 的小鼠出现明显的失眠特征,活动频繁,对外界的声、光等刺激异常敏

感,兴奋性增高,攻击性增强,昼夜节律紊乱,白天也活动不止,表明造模成功。

5-HT 作为神经递质,主要分布于松果体和下丘脑,可能参与痛觉、睡眠和体温等生理功能的调节,PCPA 是 5-HT 合成抑制剂,造成睡眠昼夜节律消失,达到完全失眠。脑内 5-HT 浓度的升高,会使机体产生疲劳感和睡意。γ-氨基丁酸是中枢神经系统特有的物质,对神经元具有普遍的抑制作用,具有抗焦虑、抗惊厥、镇痛、调节内分泌等功能。

本研究结果显示,黄连阿胶汤给药组与模型组比较 5-HT 含量降低,且具有极显著差异 ($P < 0.01$),γ-氨基丁酸含量无显著性差异。初步的结果提示,黄连阿胶汤治疗失眠症的作用与 5-HT 关系明显,而与 γ-氨基丁酸关系不明显,推测其治疗失眠的机制可能与黄连阿胶汤抑制了 5-HT 含量下降有关。

[参考文献]

[1] 沈秀辉. 黄连阿胶鸡子黄汤加减治疗失眠 46 例[J]. 临床医药实践,2010,19(8B):1122.

[2] 宋艳杰,邢佳丽,宋元元. 桂枝加龙骨牡蛎汤合黄连阿胶汤加味治疗围绝经期失眠 36 例[J]. 河北中医,2009,31(2):222.

[3] 周晓波. 黄连阿胶汤加味治疗阴虚火旺型失眠证临床观察[J]. 世界中西医结合杂志,2007,2(9):524.

[4] 莫剑翎,盛夏. 黄连阿胶汤加味治疗更年期失眠症 25 例观察[J]. 全科医学临床与教育,2007,5(3):222.

[5] 陈帅康. 黄连阿胶汤加味治疗顽固性失眠 36 例[J]. 中医杂志,1996,37(9):529.

[6] 肖成荣,马增春,李海静,等. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制[J]. 毒理学杂志,2007,21(4):326.

[7] 胡霞. 舒郁化痰健脑法对老年失眠模型小鼠的影响[D]. 武汉:湖北中医学院,2005:12.

[8] 杨奎,张德波,史焱,等. 含黄芩血清及黄芩苷影响内生致热原产生的研究[J]. 中药药理与临床,1994,10(6):13.

[9] 李海静,高月,刘萍,等. 失眠动物模型研究进展[J]. 中国药理学通报,2007,23(4):437.

[责任编辑 聂淑琴]