

# 酸枣仁汤对失眠大鼠中脑中缝背核神经胶质细胞的影响

王慧<sup>1\*</sup>, 罗坤<sup>1</sup>, 武静<sup>2</sup>

(1. 贵阳中医学院基础部, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院 2009 级研究生, 贵阳 550002)

**[摘要]** **目的:**研究酸枣仁汤对失眠大鼠中脑中缝背核星形胶质细胞和小胶质细胞的作用。**方法:**采用连续 2 d ip 对氯苯丙氨酸(PCPA)350 mg·kg<sup>-1</sup>的方法建立失眠大鼠模型。动物随机分为空白对照组,模型组,酸枣仁汤治疗组和西药对照组。酸枣仁汤治疗组按 15, 7.5, 3.75 g·kg<sup>-1</sup>ig 7 d,西药对照组按 2 mg·kg<sup>-1</sup>给予艾司唑仑 2 mg·kg<sup>-1</sup>ig 7 d。取脑组织,用 HE 染色观察中脑中缝背核区神经细胞损伤情况,采用免疫组织化学染色法对中脑胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和小胶质细胞 OX42 进行染色,观察与睡眠和觉醒密切相关的中脑中缝背核 GFAP 和 OX42 表达的变化。**结果:**PCPA 失眠模型组神经损伤评分与空白对照组相比具有显著性差异( $P < 0.01$ ),PCPA 失眠模型组大鼠中脑中缝背核 GFAP 与 OX42 表达增强,阳性细胞数增多,与空白对照组相比,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );酸枣仁汤高剂量组(15 g·kg<sup>-1</sup>)GFAP 与 OX42 表达与模型组相比具有显著性差异( $P < 0.01$ ),酸枣仁汤高剂量组 GFAP 与 OX42 表达与西药对照组相比无显著性差异。**结论:**PCPA 所致失眠能导致大鼠中脑中缝背核组织损伤,PCPA 所致失眠能激活大鼠中脑中缝背核星形胶质细胞和小胶质细胞,酸枣仁汤能减少失眠大鼠中脑中缝背核星形胶质细胞和小胶质细胞的激活,改善神经细胞损伤程度,这可能是酸枣仁汤治疗失眠症的作用环节之一。

**[关键词]** 酸枣仁汤;对氯苯丙氨酸;失眠;中脑;胶质细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0235-05

## Effect of Suanzaoren Decoction on the Glia Cell in the Dorsal Raphe Nuclei of Insomnia Rats

WANG Hui<sup>1\*</sup>, LUO Kuen<sup>1</sup>, WU Jing<sup>2</sup>

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550002, China;

2. Postgraduate Student, Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Suanzaoren decoction (SZRD) on the expression of astrocytes and microglia cells in the dorsal raphe nuclei (DRN) insomnia rats. **Method:** The insomnia rat model was established by intraperitoneal injection of DL-4-Chlorophenylalanine (PCPA) at the dose of 350 mg·kg<sup>-1</sup> for two days. Rats were divided into control group, model group, SZRD groups, and estazolam group. The SZRD groups were treated by intragastric administration of SZRD at 15, 7.5, 3.75 g·kg<sup>-1</sup> each day for seven days. The estazolam group was treated the same way using estazolam at 2 mg·kg<sup>-1</sup> for 7 days. HE staining was use to check the neural damage in the DRN and test animal's midbrain glial fibrillary acidic protein (GFAP); and OX42 expression was examined using immunohistochemical staining. **Result:** The level of neural damage in the DRN was significantly higher in the insomnia model group than in the control group ( $P < 0.01$ ). Insomnia model group rats showed significantly higher levels ( $P < 0.01$ ) of GFAP and OX42 positive cells in the DRN than control animals. Treatment animals receiving a high dose of SZRD (15 g·kg<sup>-1</sup>) showed significantly lower levels ( $P < 0.01$ ) of GFAP and OX42 positive cells in the DRN than insomnia model group animals. This treatment group showed no significant difference when compared to animals treated using estazolam. **Conclusion:** PCPA can damage the DRN

**[收稿日期]** 20120405(014)

**[基金项目]** 贵州省自然科学基金项目(黔科合J字[2010]2192号)

**[通讯作者]** \* 王慧,博士,副教授,从事中西医结合基础研究,Tel:0581-5606147,E-mail:wanghsky@126.com

neurons. Insomnia induced by PCPA can activate midbrain astrocytes and microglia. SZRD reduces midbrain GFAP and OX42 expression, and reduces the damage from PCPA. This may be one of the mechanisms for SZRD in treatment of insomnia.

[ **Key words** ] Suanzaoren decoction; PCPA; insomnia; midbrain; glia cell

酸枣仁汤作为临床经典用方,治疗失眠症疗效确切。神经胶质细胞在神经系统正常功能活动的维持中起着重要的作用。研究表明,神经胶质细胞与睡眠和觉醒周期关系非常密切,胶质细胞对哺乳类动物的睡眠活动发挥重要的调节作用<sup>[1-2]</sup>。酸枣仁汤是否作用于神经胶质细胞,进而发挥治疗失眠症的作用非常值得探讨。本研究以大鼠对氯苯丙氨酸(PCPA)失眠模型为对象,研究酸枣仁汤对失眠大鼠中脑星形胶质细胞 GFAP 和小胶质细胞 OX42 表达的影响,进一步探讨酸枣仁汤作用的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康成年清洁级 SD 雄性大鼠 42 只,体质量 200 ~ 220 g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(渝)2007-0008。置于安静、温度保持恒定(22 ± 2)℃、避免强光的环境中饲养 7 d。

**1.2 试剂、药物与器材** GFAP (Epitomics U S A), OX42 (Abcam HongKong), 二步法免疫组化试剂盒(北京中杉金桥公司产, PV-6001、PV-6002); DAB 显色剂(北京博奥森有限公司)。对氯苯丙氨酸(DL-4-Chlorophenylalanine, Sigma 公司),艾司唑仑片(上海信谊药厂有限公司),酸枣仁、川芎、知母、茯苓、甘草均购自贵阳中医学院第一附属医院中药房。BX-41 显微镜(Olympus, Japan)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 酸枣仁汤(SZRD):由酸枣仁 18 g,知母 10 g,茯苓 10 g,川芎 5 g,甘草 3 g,称取以上 5 味药材 386 g,加 8 倍量水,浸泡 1 h 后煎煮,沸后 30 min 滤过,药渣加 6 倍水煎煮,沸后 20 min 滤过,合并滤液,浓缩成 150% 的水提物,分装灭菌,4℃冰箱储存备用。艾司唑仑经研钵粉碎后以去离子水溶解,充分混匀,配成 0.2 g·L<sup>-1</sup> 浓度,4℃储存备用。

**2.2 动物分组与模型制备** 大鼠随机分为以下 6 组(每组 7 只):空白对照组,模型组, SZRD 高、中、低剂量组,西药治疗组(艾司唑仑)。参照文献[3-4]的方法并结合预实验结果,按 350 mg·kg<sup>-1</sup> 以 10 mL·kg<sup>-1</sup> 体积 ip 对氯苯丙氨酸,于每日上午 8:00 ~ 9:00 进行,每天 1 次,持续 2 d。动物在第 1 次注射后 30 ~ 32 h 后,出现昼夜节律消失,白天也活动不

停,整体观察与正常对照组有明显不同,表明模型复制成功<sup>[3-6]</sup>。空白对照组按照同样方法 ip 等体积的生理盐水。

**2.3 给药方法** 各组于第 3 天开始每天 8:30 ig 给药, SZRD 高、中、低剂量组分别给予 15, 7.5, 3.75 g·kg<sup>-1</sup> 的酸枣仁汤 ig, 给药体积 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 西药治疗组以相同的给药体积按 2 mg·kg<sup>-1</sup> 给予艾司唑仑溶液 ig, 空白对照组及模型组给予同体积的生理盐水 ig, 1 次/d, 连续 ig 7 d。

**2.4 取材** 各组末次给药后 2 h, 断头处死大鼠, 冰上快速取出大鼠脑组织, 浸泡于 10% 中性福尔马林溶液中固定 24 h, 常规脱水, 包埋处理。

**2.5 制作组织切片** 制作中脑组织切片, 片厚 4 μm, 依照 Paxinos 和 Watson 大鼠脑立体定位图谱, 选取大鼠中脑中缝背核区, 常规 HE 染色, 观察大鼠中脑中缝背核区的神经组织变化情况。

**2.6 免疫组织化学染色** 将大鼠中脑中缝背核区做连续冠状切片, 片厚 4 μm, 分别进行 GFAP 和 OX42 标记; 免疫组化染色采用非生物素二步法操作。设立已知 GFAP 和 OX42 阳性的细胞组织为阳性对照, 用 PBS 替代一抗为阴性对照。免疫组化染色步骤如下: 切片脱蜡、水化组织切片(石蜡切片用浓度为 0.01 mol·L<sup>-1</sup>, pH 8 的乙二胺四乙酸二钠溶液中煮沸, 从高压锅喷气开始计时 2 min); 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶, PBS 冲洗 2 min × 3 次。分别滴加一抗[GFAP 为兔抗鼠单克隆抗体(稀释度为 1:80), OX42 为兔抗鼠多克隆抗体(稀释度为 1:200), 37℃孵育 1~2 h, PBS 冲洗 2 min × 3 次]; 再分别滴加二抗(PV-6001 为山羊抗兔 IgG 抗体-HR 多聚体和 PV-6002 为山羊抗小鼠 IgG 抗体-HR 多聚体, 37℃孵育 30 min, PBS 冲洗 2 min × 3 次); 最后用 DAB 显色, 苏木素复染。GFAP 和 OX42 阳性产物为棕黄色颗粒, 主要定位在细胞胞质中, 少量定位在细胞核中。染色后的切片常规脱水、透明、封片, 在光镜下观察并采集图像。

**2.7 结果观察和图像采集** 每只大鼠随机选取 3 张切片, 保证各组所选切片的断面水平均相似, 在光镜下观察图像, 并应用软件 MIAS 2000(四川大学)采集分析图像。每张切片随机选取 5 个 400 倍视野

观察中脑中缝背核细胞,计数 500 个细胞,其中阳性细胞除以 5 即为该例的平均阳性细胞数。

**2.8 神经损伤评分** 采用常规 HE 染色观察中脑中缝背核的神经细胞变性、间质水肿、胶质细胞增生、噬神经现象、脑软化灶、血管反应、炎症细胞浸润、脑组织出血、纤维组织增生情况。上述病变占组织块的 30% 以下评分为 1 分,占 30% ~ 50% 评分为 2 分,占 50% 以上评分为 3 分,将所有评分累加即神经系统损伤的总评分。

**2.9 统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,采用单因素方差分析进行处理,以  $P < 0.05$  判定差异有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对 PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核细胞神经细胞的影响** 空白对照组大鼠中脑中缝背核组织中未见明显病变。PCPA 所致失眠模型大鼠中脑中缝背核组织神经损伤明显,神经细胞空泡变性伴有明显间质水肿,间质血管充血。模型组神经损伤评分与空白对照组相比具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),酸枣仁汤高剂量组神经损伤评分与模型组相比,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ );酸枣仁汤高剂量组和艾司唑仑组神经损伤评分无显著性差异。见表 1。

**3.2 对 PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核 GFAP 表达的影响** 空白对照组可见少量棕褐色的 GFAP 染色阳性神经元, PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背

核 GFAP 表达增强,与空白对照组相比具有显著性差异 ( $P < 0.01$ );酸枣仁汤高剂量组 GFAP 表达与模型组相比明显下降 ( $P < 0.01$ ),酸枣仁汤高、低剂量组 GFAP 表达相比具有显著性差异 ( $P < 0.01$ );酸枣仁汤高剂量组和艾司唑仑组之间 GFAP 表达无显著性差异。见图 1,表 2。

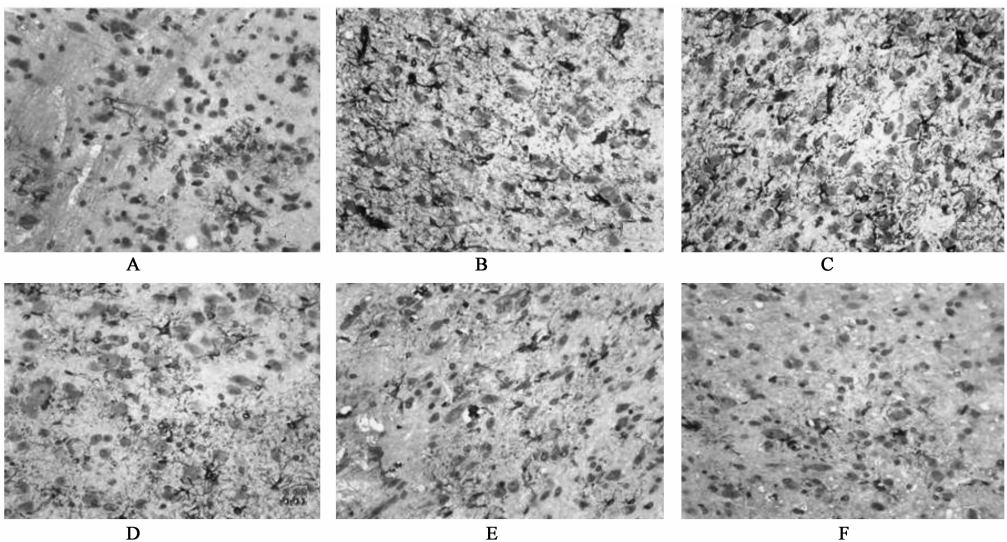
表 1 各组大鼠神经损伤评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	神经损伤总评分
空白对照	-	1.16 ± 0.98
模型	-	12.00 ± 1.10 <sup>1)</sup>
酸枣仁汤	3.75	11.33 ± 1.51
	7.50	10.17 ± 0.98
	15.00	5.00 ± 0.63 <sup>2)</sup>
艾司唑仑	$2 \times 10^{-3}$	3.83 ± 0.72 <sup>2)</sup>

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠中脑中缝背核 GFAP 及 OX42 阳性神经元数目的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	GFAP 阳性神经元数/个	OX42 阳性神经元数/个
空白对照	-	10.20 ± 2.48	11.07 ± 0.93
模型	-	32.53 ± 0.77 <sup>1)</sup>	33.63 ± 1.40 <sup>1)</sup>
酸枣仁汤	3.75	31.67 ± 1.09	32.53 ± 2.00
	7.50	29.97 ± 1.24	28.50 ± 1.73
	15.00	20.50 ± 1.28 <sup>2)</sup>	18.27 ± 0.74 <sup>2)</sup>
艾司唑仑	$2 \times 10^{-3}$	19.67 ± 0.53 <sup>2)</sup>	16.60 ± 1.40 <sup>2)</sup>



A. 空白对照组;B. 模型组;C. 酸枣仁汤 3.75  $g \cdot kg^{-1}$ 组;D. 酸枣仁汤 7.5  $g \cdot kg^{-1}$ 组;E. 酸枣仁汤 15  $g \cdot kg^{-1}$ 组;F. 艾司唑仑 2  $mg \cdot kg^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 各组大鼠中脑中缝背核 GFAP 检测(免疫组化,  $\times 400$ )

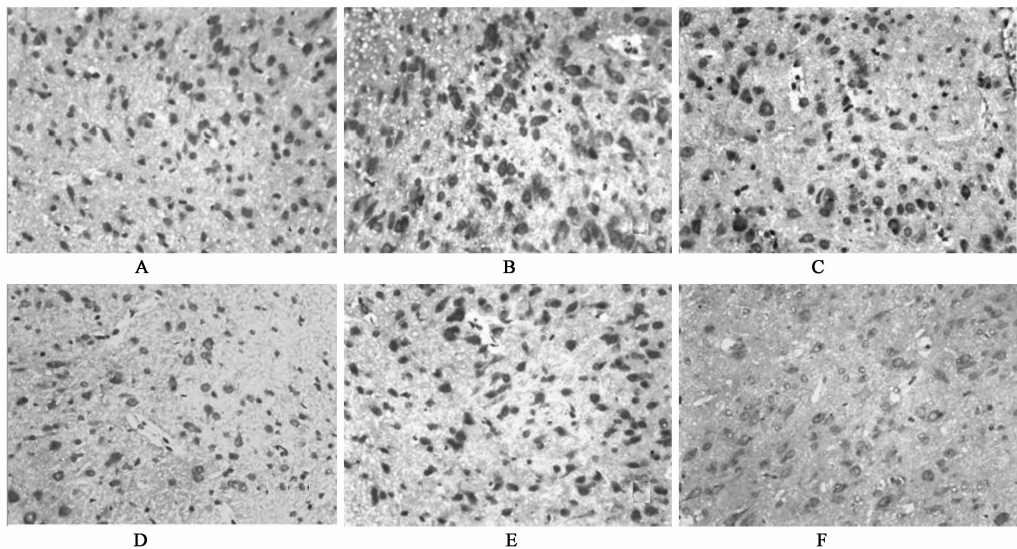


图 2 各组大鼠中脑中缝背核 OX42 检测(免疫组化, ×400)

**3.3 对 PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核 OX42 表达的影响** 空白对照组中脑中缝背核可见少量棕色的 OX42 染色阳性神经元。PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核 OX42 表达明显增强,与空白对照组相比具有显著性差异( $P < 0.01$ ),酸枣仁汤高剂量组 OX42 表达与模型组相比明显下降( $P < 0.01$ );酸枣仁汤高、低剂量组 OX42 表达相比具有显著性差异( $P < 0.01$ ),酸枣仁汤高剂量组和艾司唑仑组 OX42 表达相比无显著性差异,提示酸枣仁汤能下调 PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核 OX42 表达,该效应与酸枣仁汤剂量相关。见表 2,图 2。

#### 4 讨论

酸枣仁汤出自《金匱要略·血痹虚劳脉证并治第六》,原书用治“虚劳虚烦不得眠”,临床疗效确切。以往对酸枣仁汤的研究主要集中在神经元和神经递质、细胞因子以及可能存在的神经通路等变化的研究上,对胶质细胞作用的研究较少。目前已经证明神经胶质细胞在睡眠活动的调节中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。且睡眠剥夺后中脑和视交叉上核等部位的神经胶质细胞被激活,与神经元 Fos 蛋白的反应趋势相一致,说明神经胶质细胞和神经元共同参与了失眠的发生过程<sup>[7-8]</sup>。中脑中缝背核(DRN)是中枢神经系统中富含 5-HT 能神经元的一个重要核团,其纤维投射到丘脑,下丘脑,海马,基底神经节和大脑皮层,DRN 的神经元投射到上位中枢主要形成慢波睡眠(SWS)和触发快波睡眠(FWS)<sup>[9]</sup>。本研究观察了不同剂量酸枣仁汤对 PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核区神经胶质细胞的作用,结果显示,

PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核区神经损伤明显,酸枣仁汤  $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量能改善 PCPA 所致的这种损伤。PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核星形胶质细胞 GFAP 和小胶质细胞 OX42 表达明显增强,酸枣仁汤  $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量能显著减弱 PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核 GFAP 和 OX42 表达,提示酸枣仁汤可作用于失眠大鼠中脑星形胶质细胞和小胶质细胞,从而影响神经系统的功能。

在生理条件下,星形胶质细胞参与维持中枢神经系统形态机能的稳定,参与免疫调节及信号转导,在病理条件下,星形胶质细胞从静息状态快速向活化状态转变,其形态数量及功能都发生改变。胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)是星形胶质细胞的特异性标志蛋白,当中枢神经系统受到损伤时,GFAP 含量会有快速而显著的增高。胶质细胞可与神经元形成突触联系,合成并释放神经活性物质,存在多种受体以接受多种物质的调控,能调节神经递质的释放,进而影响神经系统的调节功能。小胶质细胞是中枢神经系统内的巨噬细胞,能表达补体受体 CR3 (complement type 3 receptor),目前普遍使用 CR3 补体受体 OX42 来标记小胶质细胞。在正常状态下,小胶质细胞处于静息状态,胞体很小,突起很细,OX42 染色呈阴性或弱阳性,当机体受到病理性刺激后小胶质细胞被激活,OX42 染色较深成为反应状态,随着刺激的持续存在,小胶质细胞的胞体进一步肥大,突起回缩变短,而成为巨噬细胞样的小胶质细胞。激活的小胶质细胞具有吞噬作用,可释放大量的细胞因子,对损伤产生炎症反应,并有组织修

复、神经营养支持等作用。

PCPA 大鼠失眠模型可重复性强,是国内外较为公认的失眠模型<sup>[3-6,10-11]</sup>,研究表明,PCPA 失眠大鼠脑内的  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)含量下降,GABA<sub>A</sub>受体表达减少<sup>[6,11]</sup>。GABA 是神经系统重要的抑制性递质,苯二氮卓类镇静催眠药对中枢的抑制作用与 GABA 受体的亚型 GABA<sub>A</sub> 密切相关,当苯二氮卓类药物与 GABA<sub>A</sub> 受体结合,可导致 Cl<sup>-</sup> 通道开放频率增加,Cl<sup>-</sup> 流入细胞内而使细胞出现超极化,导致神经元兴奋性下降。本研究发现,PCPA 能激活大鼠中脑中缝背核星形胶质细胞和小胶质细胞,导致 GFAP 和 OX42 的表达上升,艾司唑仑(苯二氮卓类药物)与酸枣仁汤 15 g·kg<sup>-1</sup> 均能下调 PCPA 所致失眠大鼠中脑中缝背核 GFAP 和 OX42 的表达,两者作用相比无显著性差异,表明酸枣仁汤高剂量和艾司唑仑对中脑神经胶质细胞的作用相似,提示 PCPA 失眠大鼠神经胶质细胞的功能活动变化可能与 GABA 及其受体功能活动有关。

不仅 PCPA 失眠大鼠脑内的 GABA 及 GABA<sub>A</sub> 受体表达减少,研究表明老年血亏阴虚失眠证候大鼠模型脑内的 GABA 含量及 GABA<sub>A</sub> 受体表达也发生了明显改变<sup>[12]</sup>,最新研究表明,神经胶质细胞可释放 GABA<sup>[13]</sup>,富含 GABA 的胶质细胞分布在包括中脑的广泛脑区,且胶质细胞的 GABA 和脑内神经活动的抑制成正相关<sup>[14]</sup>。失眠大鼠脑内的 GABA 和胶质细胞之间的关系如何?酸枣仁汤如何通过胶质细胞发挥对失眠的干预作用,有待进一步的研究。

本研究表明,酸枣仁汤可抑制 PCPA 失眠大鼠中脑中缝背核星形胶质细胞和小胶质细胞的表达,酸枣仁汤对胶质细胞的作用可能是其发挥治疗失眠的环节之一,本实验为酸枣仁汤治疗睡眠障碍的机制研究提供了可靠的依据。

#### [参考文献]

- [1] Frank M G. Beyond the neuron: astroglial regulation of mammalian sleep [J]. *Curr Top Med Chem*, 2011, 11 (19):2452.
- [2] Halassa M M, Dal Maschio M, Beltramini R, et al.

Integrated brain circuits: neuron-astrocyte interaction in sleep-related rhythmogenesis [J]. *Scientific World Journal*, 2010, 17; 10:1634.

- [3] 马伯艳,张福利,周景华,等.温胆汤的睡眠改善作用与失眠大鼠脑中胆囊收缩素 8 表达的关系[J].*中国临床康复*, 2006, 10(35): 45.
- [4] 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.
- [5] Imeri L, Bianchi S, Mancini M. Muramyl dipeptide and IL-1 effects on sleep and brain temperature after inhibition of serotonin synthesis [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273 (5): R1663.
- [6] 刘祖丽,唐成林,余敏.不同强度电针对 PCPA 失眠大鼠中脑  $\gamma$ -氨基丁酸及受体的影响[J].*生命科学研究*, 2011, 15(3): 236.
- [7] 王晓东,宿长军,李柱一,等.睡眠剥夺及睡眠恢复后大鼠中缝核群星形胶质细胞的反应及其与神经元的关系[J].*神经科学通报*, 2005, 21(1): 19.
- [8] 惠雪枫,宿长军,李柱,等.睡眠剥夺及睡眠恢复后大鼠视交叉上核星形胶质细胞反应及其与神经元的关系[J].*医学研究生学报*, 2006, 19(7): 592.
- [9] 李国彰.神经生理学[M].北京:人民卫生出版社, 2007: 329.
- [10] 全世建,林杏娥.PCPA 大鼠失眠模型的证候属性研究[J].*中医药学刊*, 2006, 3 (24): 450.
- [11] 余运龙,全世建.交泰丸对 PCPA 失眠大鼠中脑  $\gamma$ -氨基丁酸及受体的影响[J].*时珍国医国药*, 2010, 21 (6): 1417.
- [12] 游秋云,王平,孔明望,等.酸枣仁汤对老年血亏阴虚失眠证候模型大鼠脑组织谷氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸及  $\gamma$ -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.
- [13] Lee S, Yoon B E, Berglund K. et al. Channel-mediated tonic GABA release from glia [J]. *Science*, 2010, 330 (6005): 790.
- [14] Yoon B E, Jo S, Woo J. et al. The amount of astrocytic GABA positively correlates with the degree of tonic inhibition in hippocampal CA1 and cerebellum [J]. *Mol Brain*, 2011, 22(4): 42.

[责任编辑 聂淑琴]