

熊果酸与槲皮苷镇静催眠作用对 NO, IL-1 和 TNF- α 水平的影响

刘晓岩, 王莹, 李廷利*

(黑龙江中医药大学中药药理教研室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 探讨熊果酸和槲皮苷的镇静催眠作用是否与睡眠的一氧化氮调节和免疫调节机制两个方面有关。方法: 熊果酸、槲皮苷注射正常大鼠和睡眠剥夺大鼠后, 进行指标测量。NO 含量测定采用 Griess 法, 白细胞介素-1 (IL-1) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 采用放免法测定。结果: 正常大鼠腹腔注射熊果酸 2 h 后, 各脑区内 NO 水平升高, IL-1 水平升高, TNF- α 水平也略有升高, 但与空白组比较均没有显著性意义。正常大鼠腹腔注射槲皮苷 2 h 后, 各脑区中 NO 水平下降, IL-1 和 TNF- α 水平均有升高趋势, 其中下丘脑内 TNF- α 含量增加显著, 与空白组比较有显著性意义。睡眠剥夺大鼠腹腔注射熊果酸 4 h 后, 脑内 NO 水平显著升高, 与空白组和模型组比较均有显著性意义; 血清中 IL-1 含量增加, 与空白组和模型组比较均有显著性意义。睡眠剥夺大鼠腹腔注射槲皮苷 4 h 后, 脑内 NO 含量显著升高, 与空白组和模型组比较均有显著性意义; IL-1 含量显著增加, 与空白组比较有显著性意义; 下丘脑中的 TNF- α 含量升高, 与空白组比较具有显著性意义。结论: 熊果酸对正常大鼠和睡眠剥夺大鼠睡眠的影响可能与睡眠调节的一氧化氮和免疫调节机制有关; 槲皮苷对睡眠剥夺大鼠睡眠的影响可能与一氧化氮和免疫调节机制有关, 对正常大鼠, 免疫调节机制也可能参与其中。

[关键词] 熊果酸; 槲皮苷; 睡眠; 一氧化氮; 免疫调节

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0162-04

Mechanism investigation of Sedative and Hypnic Actions for Ursolicacid and Quercitrin Influences on Levels of NO, IL-1 and TNF- α

LIU Xiao-yan, WANG Ying, LI Ting-li*

(Traditional Chinese Medicine Pharmacology Teaching and Research in Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** This experiment aim to observe the relationship between sedative and hypnic actions of the Ursolic acid and quercitrin with nitric oxide (NO) and immune regulation mechanism of sleep. **Method:** The experiment respectively surveyed the indicatrix after intraperitoneal injection of ursolic acid and quercitrin in brain of both normal and sleep-deprived rats. The assaying of NO is through the method of Griess. The assaying of IL-1 and TNF- α is through the method of radioimmunity. **Result:** Two hours after intraperitoneal injection of ursolic acid in normal rat, the level of NO in every encephalic region and IL-1 in blood serum, hippocampus and hypothalamus were enhanced, as well as the amount of TNF- α was slightly increased. But compared with blank group, all results wasn't different significant. Two hours after intraperitoneal injection of quercitrin in normal rat, the amount of NO in every encephalic region was cut down; The levels of IL-1 and TNF- α in blood serum and each encephalic was raised, especially the amount of IL-1 in hypothalamus was increade markedly compared with blank group.

[收稿日期] 20100327(002)

[第一作者] 刘晓岩, 硕士, 研究方向: 中药及复方的药理作用、作用机制及安全性评价, Tel: 13936620731, E-mail: yy525318@163.com

[通讯作者] * 李廷利, 医学博士, 教授, 研究方向中药及复方的药理作用、作用机制及安全性评价, Tel: 13804527211, E-mail: litingli8888@sohu.com

Four hours after intraperitoneal injection of ursolic acid in sleep-deprived rat, the amount of NO in brain were increased compared with either blank or model group, having significant different; the amount of IL-1 in blood serum was significantly elevated compared with either blank or model group. The levels of LI-1 and TNF- in blood serum, hippocampus and hypothalamus were enhanced, but it was insignificant. Four hours after intraperitoneal injection of quercitrin in sleep-deprived rats, the level of NO in every encephalic region were enhanced, compared with blank and model group, it had significant difference. The level of IL-1 in blood serum was enhanced compared with blank and model group, it had significant different. The amount of LI-1 in hippocampus and hypothalamus was increased significantly compared with blank group. The level of TNF- in hypothalamus was enhanced significantly. **Conclusion:** The sedative and hypnic actions of ursolic acid and quercitrin are related with NO and immune regulation mechanism of sleep. Quercitrin of influencing sleep-deprived rat's sleep is probably related to NO and immunoregulation mechanism. For normal rat immunoregulation mechanism may be participate in.

[Key words] Ursolic acid; Quercitrin; Sleep; Nitric oxide; Immunoregulation

睡眠障碍是常见的疾病和多种疾病的伴随症状,睡眠时,脑垂体分泌出足够的生长激素,以保证生长发育的需要^[1]。熊果酸、槲皮苷这 2 个单体成分广泛分布在自然界植物之中,并且具有很好的镇静催眠的作用,以往的工作中已确定熊果酸和槲皮苷对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠都具有显著协同作用,并已确定熊果酸和槲皮苷对小鼠镇静催眠作用的给药剂量槲皮苷低于 20 mg·kg⁻¹ 剂量时不呈现延长作用,而大于 20 mg·kg⁻¹ 其延长作用呈现剂量依赖关系,但超过 40 mg·kg⁻¹ 剂量其作用不再显著增加。64 mg·kg⁻¹ 的熊果酸具有明显的协同镇静作用。小于 64 mg·kg⁻¹ 时其延长作用呈现剂量依赖关系,但大于 64 mg·kg⁻¹ 时小鼠的睡眠时间反而呈下降趋势^[2]。与以往报道中一致^[3-4],但对它们的机制研究还未见报道,本实验为弥补这项空白,旨在分析两个单体的药效机制,从睡眠的一氧化氮和免疫调节机制 2 个方面来探讨熊果酸和槲皮苷镇静催眠的作用机制,为其今后的开发利用提供有利的实验支持。

1 材料与方

1.1 药物 熊果酸,宝鸡仁寿药业有限公司,纯度 > 98%,批号 RS-UA20060810,用生理盐水作溶剂,用吐温 80 做混悬剂溶解熊果酸,生理盐水-吐温 80 = 9 : 1 配制成 4.48 g·L⁻¹ 的混悬液。槲皮苷,宝鸡仁寿药业有限公司,纯度 > 98%,批号 RS-QT20051010,用生理盐水作溶剂,用 1% 的羧甲基纤维素钠做混悬剂溶解槲皮苷,配制成 4.2 g·L⁻¹。

1.2 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重 (230 ± 20) g,黑龙江中医药大学试验动物中心提供,许可证号黑动字第 P00101006。

1.3 试剂 一氧化氮试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20070601,20071001); 碘[¹²⁵I] 肿瘤坏死因子- (TNF-) 放射免疫分析药盒(北京福瑞生物科技有限公司,批号 070701); 碘[¹²⁵I] TNF- 放射免疫分析药盒(北京普尔伟业生物科技有限公司,批号 071101) 碘[¹²⁵I] 白细胞介素-1 (IL-1) 放射免疫分析药盒(北京福瑞生物科技有限公司,批号 070701); 碘[¹²⁵I] IL-1 放射免疫分析药盒(北京普尔伟业生物科技有限公司,批号 071101) 吐温 80(广东汕头市西陇化工厂,批号 030508); 戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司生产,批号 WS20060401)。

1.4 仪器 KDC-40 低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司); KQ-500DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 日立 KY2000 半自动生化仪(天津开元医疗设备有限公司); BS224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); HH-S 恒温水浴锅(江苏金坛县医疗仪器厂); 玻璃匀浆器(哈尔滨化玻科学器材有限公司); Eppendorf AG 移液枪; 大鼠失眠刺激器(哈尔滨电工仪表研究所)。

1.5 方法

1.5.1 失眠大鼠模型的复制 将大鼠置于失眠刺激器内,通过笼底部的电栅刺激大鼠足底部 8 h,刺激时间 8:00 ~ 16:00。刺激参数为:电流 0.5 mA,波宽 15 ms,频率 1 Hz,在刺激期间,EEG 记录线路可自行中断,电刺激可被两个可调定时器自动启动,每刺激 30 s 间隔 30 min,以造成大鼠睡眠剥夺^[2]。

1.5.2 分组及给药

1.5.2.1 熊果酸、槲皮苷对正常大鼠各脑区 NO,

IL-1 和 TNF- 及血清中 IL-1 和 TNF- 含量的影响 将试验动物随机分成空白组,熊果酸组和槲皮苷组 3 组,每组 8 只。采用腹腔注射给药方式,于下午 16 00 开始给药,熊果酸给药剂量 $44.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,槲皮苷给药剂量 $42 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,3 组大鼠给药体积均为 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。给药 2 h 后将大鼠断头处死,采集样品,进行指标测量。

1.5.2.2 熊果酸、槲皮苷对睡眠剥夺大鼠各脑区 NO, IL-1 和 TNF- 及血清中 IL-1 和 TNF- 含量的影响 将实验动物随机分成空白组、模型组、熊果酸组和槲皮苷组 4 组,每组 12 只。试验当日,模型组、熊果酸组和槲皮苷组 3 组进行失眠模型复制,空白组仍饲养在正常明暗交替环境中。大鼠采用腹腔注射给药方式,于下午 16 00 开始给药,熊果酸给药剂量 $44.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,槲皮苷给药剂量 $42 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,3 组大鼠给药体积均为 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。给药 4 h 后将大鼠断头处死,采集样品,进行指标测量。

1.5.3 样品制备及指标的测定 大鼠断头处死后,取血,离心,取上清放入冰箱中。同时立即剥离脑组织,取大脑前额叶皮质不小于 1.0 mg ,海马在 $0.8 \sim$

1.5 mg ,下丘脑取 0.8 g 左右。分离的脑组织精确称量,保存在 -80 低温冰箱中。指标测定时,将保存的脑组织按质量比 $1:9$ 加冰的生理盐水,玻璃匀浆器手工匀浆后,离心,取上清待测。NO 含量测定采用 Griess 法,IL-1, TNF- 的放免法测定。

2 结果

2.1 熊果酸、槲皮苷对正常大鼠各脑区 NO, IL-1 和 TNF- 及血清中 IL-1 和 TNF- 含量的影响 见表 1~3。

表 1 正常大鼠腹腔注射熊果酸、槲皮苷 2 h 后脑内 NO 含量的变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	大脑皮质 / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	海马 / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	下丘脑 / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
空白	-	1.419 ± 0.800	1.735 ± 0.558	1.961 ± 0.925
熊果酸	44.8	1.628 ± 0.706	2.399 ± 1.516	2.383 ± 1.121
槲皮苷	42	0.668 ± 0.251	1.250 ± 0.516	1.070 ± 0.262

2.2 熊果酸、槲皮苷对睡眠剥夺大鼠各脑区 NO, IL-1 和 TNF- 及血清中 IL-1 和 TNF- 含量的影响 见表 4~6。

表 2 正常大鼠腹腔注射熊果酸、槲皮苷 2 h 后脑内及血清中 IL-1 体积分数的变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	大脑皮质 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	海马 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	下丘脑 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	血清 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白	-	0.133 ± 0.088	0.148 ± 0.075	0.311 ± 0.124	0.351 ± 0.074
熊果酸	44.8	0.114 ± 0.036	0.158 ± 0.058	0.404 ± 0.110	0.426 ± 0.179
槲皮苷	42	0.144 ± 0.081	0.269 ± 0.219	0.405 ± 0.204	0.765 ± 0.457

表 3 正常大鼠腹腔注射熊果酸、槲皮苷 2 h 后脑内及血清中 TNF- 体积分数的变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	大脑皮质 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	海马 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	下丘脑 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	血清 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白	-	3.978 ± 0.944	3.598 ± 1.378	3.670 ± 0.578	2.085 ± 1.389
熊果酸	44.8	4.127 ± 0.878	3.947 ± 1.137	4.658 ± 1.031	3.766 ± 2.749
槲皮苷	42	4.465 ± 0.868	4.555 ± 0.896	$4.784 \pm 1.241^{1)}$	2.798 ± 1.163

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 4 睡眠剥夺大鼠腹腔注射熊果酸、槲皮苷 4 h 后脑内 NO 含量的变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	大脑皮质 / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	海马 / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	下丘脑 / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
空白	-	0.707 ± 0.260	0.740 ± 0.224	1.524 ± 0.311
模型	-	0.733 ± 0.248	1.230 ± 1.042	1.618 ± 0.313
熊果酸	44.8	$3.582 \pm 1.926^{1,2)}$	$3.120 \pm 1.681^{1,2)}$	$3.481 \pm 1.276^{1,2)}$
槲皮苷	42	$3.257 \pm 1.264^{1,2)}$	$1.799 \pm 0.649^{1,2)}$	$3.896 \pm 1.177^{1,2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (下同)。

表 5 睡眠剥夺大鼠腹腔注射熊果酸、槲皮苷 4 h 后脑内及血清中 IL-1 体积分数的变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	大脑皮质 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	海马 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	下丘脑 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	血清 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白	-	0.0281 ± 0.0004	0.0284 ± 0.0007	0.0274 ± 0.0027	0.0309 ± 0.0022
模型	-	0.0283 ± 0.0009	0.0284 ± 0.0008	0.0287 ± 0.0012	0.0317 ± 0.0016
熊果酸	44.8	0.0291 ± 0.0024	0.0299 ± 0.0025	0.0297 ± 0.0015	$0.0345 \pm 0.0078^{1,2)}$
槲皮苷	42	0.0284 ± 0.0015	$0.0299 \pm 0.0008^{1)}$	$0.0289 \pm 0.0011^{1)}$	$0.0328 \pm 0.0021^{1,2)}$

表 6 睡眠剥夺大鼠腹腔注射熊果酸、槲皮苷 4 h 后脑内及血清中 TNF- α 体积分数的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	大脑皮质 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	海马 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	下丘脑 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	血清 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白	-	1.458 \pm 0.272	1.324 \pm 0.130	2.606 \pm 0.244	2.615 \pm 0.248
模型	-	1.476 \pm 0.218	1.382 \pm 0.379	2.808 \pm 0.357	2.752 \pm 0.372
熊果酸	44.8	1.389 \pm 0.224	1.542 \pm 0.342	3.065 \pm 0.617	2.932 \pm 0.398
槲皮苷	42	1.419 \pm 0.224	1.416 \pm 0.474	3.123 \pm 0.456 ¹⁾	2.894 \pm 0.551

3 讨论

大量实验表明,睡眠相关的神经结构存在 NO,与 NO 生成有关的关键酶 NOS,在中枢神经系统内具有广泛的分布,研究还发现与睡眠有关的脑区,如下丘脑、海马,脑干等处 NOS 活性夜间明显高于白天,其中以睡眠调节的主要区域下丘脑最明显^[5]。正常大鼠腹腔注射熊果酸后,在大脑皮质、海马和下丘脑 3 个脑区均可见 NO 水平上升,虽然与空白组比较没有显著性意义,但可看到上升趋势明显。此结果提示 NO 可能参与了熊果酸对睡眠的调节作用。在熊果酸给药组中,3 个脑区内除 NO 水平有增加趋势外还可观察到 IL-1 和 TNF- α 水平也增加,这 3 种物质在脑内水平变化趋势的一致性与现在存在的 NO 介导睡眠因子促进睡眠的观点相一致,此观点认为 NO 能够介导,至少能够部分介导睡眠因子促进睡眠的作用,因此 NO 有可能是睡眠因子发挥睡眠调节作用的共同通路。本次实验结果与这一观点不期而合,可以推测熊果酸可能通过提高 IL-1 和 TNF- α 水平从而提高了 NO 的水平而最终起到了促进睡眠的作用。正常大鼠腹腔注射槲皮苷后,使大鼠 3 个脑区内 NO 水平降低,而使脑内和血清中的 IL-1 和 TNF- α 水平升高,推测槲皮苷促进睡眠作用的机制可能与它增加脑内和血清 IL-1 和 TNF- α 含量有关。睡眠剥夺大鼠腹腔注射熊果酸、槲皮苷 4 h 后脑内 NO 含量显著升高,与空白组和模型组比较都有显著性意义,提示 NO 参与了熊果酸、槲皮苷改善睡眠剥夺大鼠睡眠的作用。另外,尽管我们以前所做的实验表明,足底电刺激对大鼠的脑电信

号影响显著^[6-7],这种差异性可能是因为此种刺激方法较为轻柔,可以达到剥夺动物睡眠的目的,但不会给予动物大的应激性刺激。从结果中还可看到,熊果酸、槲皮苷可使睡眠剥夺大鼠血清中的 IL-1 含量显著增加,槲皮苷还增加了海马、下丘脑中的 IL-1 含量;此外,熊果酸、槲皮苷也增加了海马、下丘脑和血清中的 TNF- α 的含量,槲皮苷对下丘脑中的 TNF- α 水平增加显著;说明 IL-1 和 TNF- α 都参与了两个单体药物对睡眠剥夺大鼠的睡眠调节作用。

[参考文献]

- [1] 秦梅.充足的睡眠[J].有益健康生活百科,2008:3.
- [2] 刘珊珊.槲皮苷和熊果酸对睡眠内源性物质影响的研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2008:25.
- [3] T H Kang, S J Jeong, N Y Kim, et al. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of Albizzia julibrissin Durazz[J]. J Ethno Pharmacol, 2000, 71: 32.
- [4] Debprasad Chattopadhyay, G. Arunachalam, Sub Hash C Mandal, et al. CNS activity of the methanol extract of Mallotus peltatus (Geist) Muell Argleafan ethno medicine of Onge[J]. J Ethno Pharmacol, 2003, 85: 99.
- [5] Ayers NA, Kapas L, Krueger JM. Circadian variation of nitric oxide synthase activity and cytosolic protein levels in rat brain[J]. Brain Res, 1996, 707: 127.
- [6] 李尔逊,孙春宇,李廷利,等.磁朱丸对失眠大鼠睡眠时相的影响[J].中国医药导报,2008,5(2):20.
- [7] 齐凤琴.具有改善睡眠作用药物的药效评价方法的建立[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2005:5.

[责任编辑 邹晓翠]