

异虎耳草素对原代海马神经元细胞抑制性神经递质及其受体基因表达的影响

郝雨蒙, 王若瑜, 仲启明, 仝立国, 宋美卿, 杨钤, 冯玛莉*
(山西省中医药研究院, 太原 030012)

[摘要] 目的:观察异虎耳草素对原代海马神经元细胞 γ -氨基丁酸(GABA), 5-羟色胺(5-HT)含量及受体基因表达的影响,探讨其催眠作用机制。方法:体外培养SD乳鼠原代海马神经元细胞,在细胞生长状态最佳时,经神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫组化鉴定纯度并给药。分为空白组,地西洋组($25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),异虎耳草素低、中、高剂量组($5, 10, 20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),共5组,给药24 h后流式细胞术检测海马神经元细胞早期凋亡率,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞上清液GABA, 5-HT含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞内 γ -氨基丁酸A型受体(GABAA)基因GABRA₁, GABRA₅, GABRB₂, γ -氨基丁酸B型受体(GABAB)基因GABBR1, 5-羟色胺1A型受体(5-HT_{1A})基因5-HT_{1A(A)}, 5-HT_{1A(B)}, 5-HT_{1A(C)}表达的变化。结果:第7天海马神经元细胞生长状态良好,鉴定纯度>90%;与空白组比较,海马神经元细胞早期凋亡率异虎耳草素中、高剂量组显著降低($P<0.01$),GABA含量异虎耳草素高剂量组显著升高($P<0.01$),GABRA₁, GABRA₅, 5-HT_{1A(A)}, 5-HT_{1A(C)} mRNA表达异虎耳草素中、高剂量组显著升高($P<0.05, P<0.01$),GABBR1, 5-HT_{1A(B)} mRNA表达异虎耳草素各组均显著升高($P<0.05, P<0.01$)。结论:异虎耳草素催眠作用机制可能与抑制海马神经元细胞凋亡,升高抑制性神经递质GABA含量,上调GABA与5-HT相关受体基因表达有关。

[关键词] 异虎耳草素; 海马神经元细胞; 抑制性神经递质; 细胞凋亡; 体外培养

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0093-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191302

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190317.1907.003.html>

[网络出版时间] 2019-03-19 8:53

Effect of Isopimpinellin on Expression of Inhibitory Neurotransmitter and Receptor Genes in Primary Hippocampal Neurons

HAO Yu-meng, WANG Ruo-yu, ZHONG Qi-ming, TONG Li-guo, SONG Mei-qing,
YANG Qian, FENG Ma-li*

(Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of isopimpinellin on primary hippocampal neuron cells γ -aminobutyric acid (GABA), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and receptor genes expressions, in order to explore its hypnotic mechanism. **Method:** The primary hippocampal neurons of neonatal Sprague-Dawley rats were cultured *in vitro*. And subsequent experiments were conducted in the optimal state of cell growth, and the purity was identified by immunohistochemistry of neuron-specific enolase. Hippocampal neurons were randomly divided into five groups, namely blank control group, diazepam group ($25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and low-dose ($5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), moderate-dose ($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and high-dose ($20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) isopimpinellin groups. Early apoptosis of hippocampus neuron cells were detected using flow cytometry technique after 24 h administration, and the changes in the levels of GABA and

[收稿日期] 20181210(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173574);山西省实验动物专项[2013(K05),2014(K02)]

[第一作者] 郝雨蒙,在读硕士,从事中药药理与内分泌疾病研究,Tel:0351-4174328,E-mail:630380521@qq.com

[通信作者] *冯玛莉,硕士生导师,主任医师,从事中药药理和内分泌疾病的研究工作,Tel: 0351-4174328,E-mail: fengmali@163.com

5-HT were detected using enzyme-linked immunosorbent. The changes in mRNA expressions of receptor genes relating to gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAA) genes GABRA₁, GABRA₅, GABBR₁, gamma-aminobutyric acid type B receptor genes (GABAB) GABRB₂, 5-hydroxytryptamine 1A receptor (5-HT_{1A}) 5-HT_{1A(A)}, 5-HT_{1A(B)}, 5-HT_{1A(C)} were detected by real-time quantitative PCR (Real-time PCR). **Result:** On the 7th day, the hippocampal neurons grew in a good condition, and the purity was above 90%. Apoptosis rates of hippocampal neurons in the low-dose and moderate-dose groups were significantly lower than that in the blank control group ($P < 0.01$). The level of GABA secreted by hippocampal neurons in the high-dose isopimpinellin group were significantly higher than that in the blank control group ($P < 0.01$). The mRNA expression levels of GABRA₁, GABRA₅, 5-HT_{1A(A)}, 5-HT_{1A(C)} in the moderate-dose and high-dose isopimpinellin groups were significantly higher than those in the blank control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mRNA expression levels of GABBR₁, 5-HT_{1A(B)} in the low-dose, moderate-dose and high-dose isopimpinellin groups were significantly higher than those in the blank control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The hypnotic mechanism of isopimpinellin may be related to the inhibition of hippocampal neuron apoptosis, the increase of the content of inhibitory neurotransmitter GABA, and the up-regulation of GABA and 5-HT-related receptor genes.

[**Key words**] isopimpinellin; hippocampal neuron; inhibitory neurotransmitter; cell apoptosis; *in vitro* culture

睡眠障碍是抑郁症患者最常见的症状,其发病机制与脑中抑制性神经递质含量不足导致兴奋性与抑制性神经递质的比值失衡及相关受体表达异常有关^[1-2]。异虎耳草素是从蛇床子中发现的镇静催眠活性成分,尚存在于白芷、延胡索等中药材中,研究表明异虎耳草素还有抗抑郁、抗肿瘤、抗菌等多种作用^[3-4],前期在体实验探讨了蛇床子催眠活性组分调节海马氨基酸类神经递质改善睡眠作用机制,经谱效关系分析得出异虎耳草素是其发挥镇静催眠作用的主要活性成分之一^[5-8]。海马来源于哺乳动物大脑皮层的边缘系统,神经元高度集中且独立分布,其活力,抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(GABA),5-羟色胺(5-HT)含量及 γ -氨基丁酸 A 型受体(GABAA), γ -氨基丁酸 B 型受体(GABAB),5-羟色胺 1A 型受体(5-HT_{1A})等受体基因表达与睡眠、学习记忆、情绪密切相关^[9],体外培养的海马神经元细胞与在体海马神经元生理结构和参数非常接近,干扰、影响因素少、作用周期较短,可排除药代动力学的影响^[10];因此本文拟通过体外对海马原代细胞培养观察异虎耳草素对神经元细胞 GABA,5-HT 含量和 GABRA₁, GABRA₅, GABBR₁, GABRB₂, 5-HT_{1A(A)}, 5-HT_{1A(B)}, 5-HT_{1A(C)} mRNA 表达的变化,探讨蛇床子所含催眠活性成分异虎耳草素通过调节海马神经元抑制性神经递质的催眠、抗抑郁等相关作用机制,以期发现含异虎耳草素中药材的安神、调畅情志功效或催眠、抗抑郁等药理作用,为其临床应用和药物研发、资源利用提供依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠,体质量(180 ± 20) g,北京华阜生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2014-0004,雄性与雌性(1:2)循环交配。取出生 3 d 内的乳鼠,雌雄不拘,用于原代海马神经元细胞培养。本实验经过山西省中医药研究院实验动物伦理委员会批准(编号 2017-001),符合实验动物伦理委员会指导原则。

1.2 药物及试剂 异虎耳草素(上海融合医药科技发展有限公司,批号 150809);地西洋注射液(上海旭东海普药业有限公司,批号 AH160302);DMEM 培养基,B-27 无血清添加剂(50 ×),Neurobasal-A 培养基,L-谷氨酰胺(美国 Gibco 公司,批号分别为 1897299,17504044,1910915,1817540);胎牛血清,马血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号分别为 20170704,1861235);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(日本 Dojindo 公司,批号 KS607);兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 GR30514-8);兔 SP 试剂盒,浓缩型 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 17149A10,K172410E);Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份公司,批号 20180416);NA 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(美国 Cusabio 公司,批号 YO7034646);GABA,5-HT ELISA 检测试剂盒(英国 LBC 公司,批号分别为 201807,201807);RNA 提取试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应

(Real-time PCR) 检测试剂盒(德国 Qiagen 公司,批号分别为 151047025, 151039406); cDNA 合成试剂盒(瑞士 Roche 公司,批号 31616400)。

1.3 仪器 SW-CJ-2D 型仪器超净工作台(苏州净化设备有限公司); A1 型倒置荧光生物显微镜(德国 Zeiss 公司); 311 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); H1 型多功能读板仪(美国 Bio-Tek 公司); Auegrax-30K 型低温台式离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Navios 10 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); 7500 型 Real-time PCR 仪, 9902 Veriti 型定性 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 海马神经元细胞体外培养与鉴定 参考张学平等^[11]海马神经元细胞培养方法,略作改进,取乳鼠,无菌条件下,断头取脑,剖出新月状海马组织,于冰浴上剔除非海马组织,剪成约 1 mm³ 大小的组织块,加入 0.125% 的胰酶溶液消化,置 37 °C 5% CO₂ 培养箱中消化 15 ~ 20 min,终止消化、吹打均匀,制成单细胞悬液,200 目筛网过滤后加入完全培养基(含有 80% DMEM 培养基,10% 胎牛血清,10% 马血清),16 h 后换为 Neurobasal 无血清培养基(含有 2% B27 无血清添加剂,0.1% 青链霉素,0.25% L-谷氨酰胺),每 3 d 全量换液 1 次,每天观察海马神经元的形态学变化,选择生长状态最佳时的海马神经元细胞经 NSE 免疫组化染色鉴定海马神经元,倒置显微镜下观察,胞质和突起被染成棕褐色,而胞核染成蓝色的神经元为阳性细胞,整个细胞被染成淡蓝色的细胞为阴性细胞。镜下随机选取 20 个视野观察并拍照,计数各时间段 NSE 阳性神经元的百分率。

2.2 细胞分组及给药 采用 CCK-8 法二级筛选:初筛异虎耳草素 1 ~ 100 mg · L⁻¹,地西洋 2.5 ~ 125 mg · L⁻¹按 1 : 10, 1 : 2 剂量距设置,当异虎耳草素质量浓度 5 ~ 40 mg · L⁻¹,地西洋质量浓度为 5 ~ 50 mg · L⁻¹时细胞活性最佳,因此将培养成熟的海马神经元细胞随机分为空白组,地西洋(25 mg · L⁻¹)组,异虎耳草素低、中、高剂量组(5, 10, 20 mg · L⁻¹)共 5 组,给药后置 37 °C 5% CO₂ 培养箱中 24 h,用于后续实验。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 吸弃原培养基, PBS 清洗 2 次,加入 0.25% 胰酶消化约 10 min,以 2 000 r · min⁻¹离心 5 min,收集的细胞用 PBS 洗涤 2 次,加入 Binding 缓冲液 500 μL 重新悬浮细胞,调

整浓度后相继加入 Annexin V-FITC 5 μL, PI 5 μL 混匀,室温、避光反应 15 min,加至 Falcon 管用于上机检测。

2.4 ELISA 检测细胞上清液中 GABA, 5-HT 的含量

采用双抗体夹心法测量细胞上清液 GABA, 5-HT 的含量,给药 24 h 后将每组细胞上清液收集于无菌离心管中,以 3 000 r · min⁻¹离心 20 min,收集上清液,按试剂盒说明书操作。标准曲线用 Curve Expert 软件绘制,其中标准品的浓度为纵坐标,吸光度 A 为横坐标,计算出回归方程式。根据样本的 A 代入回归方程式并算出相应的浓度。

2.5 Real-time PCR 检测生物钟基因及 GABA, 5-HT 相关受体 mRNA 的表达 吸去细胞上清液,在六孔板中每孔加入 RLT 350 μL,反复吹打使细胞充分裂解后按照说明书收集总 RNA 和进行逆转录反应。反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 90 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 35 s, 45 个循环,所得数据采用 2^{-ΔΔC_t} 相对定量分析目的基因表达量, ΔC_t = C_t目的基因 - C_t内参基因, ΔΔC_t = ΔC_t待测样本目的基因 - ΔC_t参照样本内参基因。引物序列由美国 Thermo 公司合成,见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

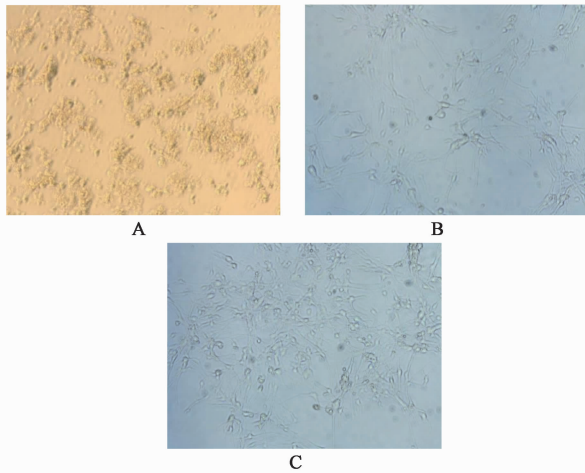
引物	序列(5'-3')	长度/bp
GABRA ₁	上游 TCTGAGCACTCTCTCGGGAA	145
	下游 AGTTACACGCTCTCCCAAGC	
GABRA ₅	上游 TGTCCGACACGGAAATGGAAT	105
	下游 TGTGAGAGGGAGACGTTGC	
GABRB ₂	上游 TGTCAACAAGATGGACCCACA	135
	下游 ATGCTGGAGGCATCATAGGC	
GABBR ₁	上游 CTCTCGGGCTGGATGTTAC	184
	下游 GGCTCTAGGGTCTTCTCTCCA	
β-actin	上游 ATCGTGCGTGACATTAAGAG	418
	下游 CCAGGATAGAGCCACCAAT	
5HT _{1A(A)}	上游 CAGAGGAAGGTGCTCTTTGG	171
	下游 AAGAAGAGCCTGAACGGACA	
5HT _{1A(B)}	上游 CAGAGGAAGGTGCTCTTTGG	201
	下游 AGCTTAGGAACCTCGTCGGCA	
5HT _{1A(C)}	上游 GGCAGCCAGCAGAGGATGAA	335
	下游 CCCCCAAGAAGAGCCTGAA	

2.6 统计学分析 数据经统计软件 SPSS 23.0 分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较方差齐采用 LSD 检验,方差不齐采用 Games-Howell 检验, P < 0.05 为差异有

统计学意义。

3 结果

3.1 海马神经元细胞形态观察与纯度鉴定 海马神经元细胞接种 6 h 后基本贴壁,培养第 1 天胞体出现光晕呈圆形或椭圆形,第 3 天细胞增大,一部分连接成网,7 d 神经元细胞饱满、光晕明显且立体,突起进一步增多增长,细胞间突起网络样连接更加紧密,生长成熟,见图 1。故选择培养第 7 天的海马神经元细胞进行 NSE 免疫组化法染色,神经元的突起被染成棕褐色,细胞核呈蓝紫色,整个细胞被染成淡蓝色或淡紫色的细胞为阴性细胞,阳性细胞数为 90% 以上,表明培养的细胞为高纯度的海马神经元细胞,可用于实验^[10]。见图 2。



A. 培养第 1 天;B. 培养第 3 天;C. 培养第 7 天
图 1 海马神经元细胞不同时间的形态学观察(倒置显微镜, ×100)
Fig.1 Morphological observation of hippocampal neuronal cells at different time (inverted microscope, ×100)

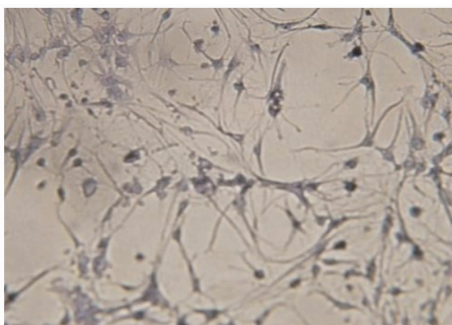


图 2 海马神经元细胞 NSE 形态学观察(免疫组化, ×200)
Fig.2 NSE morphological observation of hippocampal neuronal cells(IHC, ×200)

3.2 对海马神经元细胞早期凋亡的影响 与空白组比较,地西洋组、异虎耳草素高、中剂量组海马神经元细胞早期凋亡率明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),异虎耳草素低剂量组无显著差异。见表 2。

表 2 异虎耳草素对原代海马神经元早期凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Effect of isopimpinellin on early apoptosis rate of primary hippocampal neurons($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	早期凋亡率/%
空白	-	13.02 ± 0.57
地西洋	25	6.71 ± 0.57 ²⁾
异虎耳草素	20	9.28 ± 0.40 ¹⁾
	10	9.93 ± 1.20 ¹⁾
	5	11.92 ± 0.31

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

3.3 对海马神经元细胞上清液中 GABA, 5-HT 含量的影响 与空白组比较,地西洋组、异虎耳草素高剂量组海马神经元细胞分泌 GABA 含量显著升高 ($P < 0.01$),5-HT 含量各组间无显著性差异,但地西洋组、异虎耳草素低、中、高剂量组 5-HT 含量有升高趋势。见表 3。

表 3 异虎耳草素对海马神经元细胞分泌抑制性神经递质的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 3 Effect of isopimpinellin on secretion of inhibitory neurotransmitters in hippocampal neurons($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	GABA/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	5-HT/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	82.0 ± 11.20	60.98 ± 10.30
地西洋	25	111.21 ± 6.50 ²⁾	64.37 ± 11.00
异虎耳草素	20	105.16 ± 4.83 ²⁾	70.98 ± 9.03
	10	95.48 ± 11.21	62.26 ± 9.82
	5	77.39 ± 8.72	59.10 ± 9.27

3.4 对海马神经元细胞 GABA, 5-HT_{1A} 相关受体 mRNA 表达的影响 与空白组比较,地西洋组和异虎耳草素中、高剂量组 GABRA₁, GABRA₅ mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),地西洋组和异虎耳草素低、中、高剂量组可显著升高 GABBR₁ mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$),地西洋组及异虎耳草素各组 GABRB₂ mRNA 表达无显著差异。见表 4。与空白组比较,地西洋组、异虎耳草素中、高剂量组显著升高 5-HT_{1A(A)} 受体 mRNA 表达 ($P < 0.05$),地西洋组和异虎耳草素各组 5-HT_{1A(B)} 受体 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.05$),地西洋组和异虎耳草素中、高剂量组显著升高 5-HT_{1A(C)} 受体 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。见表 5。

4 讨论

海马神经元细胞来源于哺乳动物大脑皮层的边缘部分—海马区,与脑干、丘脑等部位联系紧密,有

表 4 异虎耳草素对海马神经元细胞 GABA 受体 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of isopimpinellin on expression of GABA receptor mRNA in hippocampal neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	GABRA ₁	GABRA ₅	GABRB ₂	GABBR ₁
空白	-	0.55 ± 0.04	0.50 ± 0.02	1.19 ± 0.08	0.66 ± 0.02
地西洋	25	1.35 ± 0.05 ²⁾	0.78 ± 0.04 ¹⁾	1.07 ± 0.03	1.40 ²⁾
异虎耳草素	20	1.00 ± 0.03 ¹⁾	1.00 ± 0.01 ¹⁾	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.05 ¹⁾
	10	3.36 ± 0.05 ²⁾	2.50 ± 0.08 ²⁾	0.81 ± 0.03	2.63 ± 0.05 ²⁾
	5	0.72 ± 0.09	0.79 ± 0.01	1.29 ± 0.04	0.93 ± 0.03 ¹⁾

表 5 异虎耳草素对海马神经元细胞 5-HT_{1A} 受体 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of isopimpinellin on expression level of 5-HT_{1A} receptor mRNA in hippocampal neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	5-HT _{1A(A)}	5-HT _{1A(B)}	5-HT _{1A(C)}
空白	-	0.50 ± 0.01	0.46 ± 0.03	0.34
地西洋	25	1.23 ± 0.08 ¹⁾	1.19 ± 0.09 ¹⁾	0.66 ± 0.04 ¹⁾
异虎耳草素	20	1.00 ± 0.01 ¹⁾	1.00 ± 0.06 ¹⁾	1.00 ± 0.01 ¹⁾
	10	2.84 ± 0.11 ¹⁾	1.90 ± 0.07 ¹⁾	1.01 ± 0.08 ¹⁾
	5	0.71 ± 0.02	0.60 ± 0.08 ¹⁾	0.64 ± 0.04 ¹⁾

调节睡眠、情绪、内分泌及植物神经功能等多种作用^[9],海马神经元细胞凋亡增多、抑制性神经递质 5-HT, GABA 含量不足或兴奋性与抑制性比例失衡及其受体功能发生紊乱会使神经元兴奋性增加导致失眠、抑郁、焦虑等一系列不良情绪变化^[8,12],但 5-HT 大量堆积或不能及时代谢则会产生中枢性疲劳及认知能力下降等症状^[13]。

海马神经元细胞凋亡是细胞在基因及生理、病理产物的调控下发生程序性死亡,在凋亡早期可通过 AnnexinV-FITC/PI 双染色法检测海马神经元细胞损坏程度,凋亡减少对神经元细胞具有保护作用^[14-15],本文观察到异虎耳草素较少体外培养的原代海马神经元早期凋亡,对海马神经元细胞有保护作用,从而调节情绪、睡眠。

GABA 是中枢神经系统重要的氨基酸类抑制性神经递质,其在海马中含量最丰富,信息传递依赖于海马神经元细胞膜上的 GABA 受体,并介导突触发挥突触后抑制作用,转换睡眠时相从而起到镇静催眠、抗焦虑作用,GABAA 受体是很多镇静催眠药物的作用靶点,如巴比妥类和苯二氮卓(BDZ)类药物,但其存在成瘾性、认知障碍等副作用^[16],GABAA 受体主要分布于突触后膜,GABAB 受体前后膜均有,GABAB 受体激动剂有松弛肌肉和解痉的作用,其抑制剂和激动剂都可能对神经有保护作用^[17];异虎耳草素升高海马神经元细胞 GABA 含量,上调 GABRA₁, GABRA₅, GABBR₁ 基因表达介导突触后

抑制作用,而发挥催眠作用。5-HT 为单胺类神经递质,在脑部神经元突触间含量很高,同时也是一种抑制性神经递质,主要通过 5-HT_{1A} 受体介导恢复大鼠原代海马神经元相关信号通路调节睡眠和控制疲倦感,升高突触间 5-HT 含量可抑制神经系统兴奋性起到催眠效果^[18]。本文海马神经元细胞 5-HT 含量虽无显著差异,但有升高趋势,并且 5-HT_{1A(A)}, 5-HT_{1A(B)}, 5-HT_{1A(C)} 受体表达均有上调,推测异虎耳草素可能介导 5-HT_{1A} 受体表达调节睡眠和控制疲倦感;抑制性神经递质 5-HT 受体也是多种神经、精神类药物的作用靶点,可以通过抑制其再吸收或通过单胺氧化酶机制来实现中枢抑制作用^[19]。

综上所述,异虎耳草素减少海马神经元细胞早期凋亡,对海马神经元具有保护作用;增加海马神经元抑制性神经递质 GABA 含量,介导 GABAA, GABAB, 5-HT_{1A} 受体相关信号通路降低中枢神经兴奋性从而起到催眠作用。

[致谢] 感谢山西医科大学基础医学院生理教研室张军老师、王昭君老师、赵芳同学在海马神经元细胞培养中给予的热情帮助!

[参考文献]

- [1] 张飞燕,李晶晶,周莹,等.安神类中药及其有效成分对神经递质镇静催眠机制的研究进展[J].中国中药杂志,2012,42(23):4320-4327.
- [2] 龙清华,赵宾宾,王平.中药三草安神方对抑郁症失眠大鼠行为学及神经递质含量的影响[J].时珍国医

- 国药,2018,29(1):64-66.
- [3] Ubaldo-Suárez D, Estrada R R, Rosa-Sierra R, et al. Antidepressant-like effect of *Casimiroa pubescens* root extracts[J]. Nat Prod Res,2018,12:1-5.
- [4] WANG X Y, DING X, YUAN Y F, et al. Comprehensive two-dimensional APTES-decorated MCF7-cell membrane chromatographic system for characterizing potential anti-breast-cancer components from Yuanhu-Baizhi herbal medicine pair [J]. J Food Drug Anal,2018,26(2):823-833.
- [5] ZUO G Y, WANG C J, HAN J, et al. Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Phytomedicine, 2016,23(14):1814-1820.
- [6] 魏文静,全立国,仲启明,等. 蛇床子催眠活性组分对对氯苯丙氨酸致失眠大鼠海马钟基因与氨基酸类神经递质表达的影响[J]. 中草药,2018,49(11):2614-2619.
- [7] 全立国,谢君,冯玛莉. 蛇床子中佛手柑内酯和异虎耳草素含量的高效液相色谱-二级管阵列检测法同时测定[J]. 时珍国医国药,2014,25(3):536-538.
- [8] 侯小斌. 蛇床子催眠活性组分对睡眠剥夺大鼠学习记忆与神经递质的影响[D]. 太远:山西中医学院,2014.
- [9] 周绍慈,翁恩琪,封茂滋. 神经生理学概论[M]. 上海:华东师范大学出版社,1994:47.
- [10] 杜成昊,万海同,周惠芬,等. 谷红注射液对新生乳鼠海马神经元缺氧缺糖损伤的保护作用[J]. 中华中医药杂志,2017,32(1):289-293.
- [11] 张学平,王高华,王惠玲,等. 海马神经元原代培养与纯度鉴定方法的优化[J]. 武汉大学学报:医学版,2013,34(5):703-710.
- [12] 杨歆科,赵瑞珍,李小黎,等. 参芪解郁方对产后抑郁大鼠脑前额叶皮层,海马区 5-HT, NE 及其受体的干预机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(24):112-120.
- [13] 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):219-223.
- [14] 杨青丽,陈彦锋. 槲皮素对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠远期学习记忆及 PARP-1/AIF 信号通路的影响[J]. 临床儿科杂志,2016,34(12):936-941.
- [15] 郜然然,周慧,吴也可,等. 中医药通过 mTOR 途径调节细胞凋亡与自噬的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(4):218-224.
- [16] Gravielle M C. Activation-induced regulation of GABA_A receptors: is there a link with the molecular basis of benzodiazepine tolerance? [J]. Pharmacol Res, 2016, 109:92-100.
- [17] 何晓兵,严缘昌. γ -氨基丁酸 B 型受体(GABABR)研究最新进展[J]. 细胞生物学报,2001,24(4):217-273.
- [18] WANG X L, GAO J, WANG X Y, et al. Treatment with Shuyu capsule increases 5-HT1A_R level and activation of cAMP-PKA-CREB pathway in hippocampal neurons treated with serum from a rat model of depression[J]. Mol Med Rep,2018,17(3):3575-3582.
- [19] Richerson G B, Buchanan G F. The serotonin axis: shared mechanisms in seizures, depression, and SUDEP [J]. Epilepsia,2011,52:28-38.

[责任编辑 周冰冰]