

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

魏文静, 仝立国, 仲启明, 杨 铃, 贾力莉, 胡文卓, 宋美卿, 冯玛莉*

山西省中医药研究院, 山西 太原 030012

摘要: 目的 观察蛇床子催眠活性组分(SCZ)对失眠大鼠海马神经递质及钟基因表达的影响, 探讨其催眠作用机制。方法 采用 ip 对氯苯丙氨酸(PCPA)建立大鼠失眠模型, ig 给予低(25 g/kg)、中(50 g/kg)、高(100 g/kg)剂量 SCZ, 并设阳性对照(地西洋)组, 给药 3 d, 免疫组织化学法检测大鼠海马齿状回 γ -氨基丁酸(GABA)和谷氨酸(Glu)受体蛋白的表达; 高效液相色谱法和免疫组化法检测大鼠海马 GABA 和 Glu 含量的变化; 实时荧光定量 PCR 检测大鼠海马 Clock、Bmal1、Cry1、Cry2、Per1、Per2、Per3 等生物钟基因的表达水平。结果 免疫组化结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马齿状回 GABA 表达水平显著降低, Glu 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, SCZ 中、高剂量组大鼠海马齿状回 GABA 表达水平显著升高, Glu 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。HPLC 结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马 GABA 表达水平显著降低, Glu 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, SCZ 中、高剂量组大鼠海马组织 Glu 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), SCZ 高、低剂量组大鼠 GABA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。生物钟基因表达水平检测结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠 Clock、Bmal1 基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Cry1、Per1、Per2 基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, SCZ 中剂量组大鼠 Clock、Bmal1 基因表达水平显著降低 ($P < 0.01$); SCZ 高剂量组大鼠 Cry1、Per1、Per2 基因表达水平显著增高 ($P < 0.05$ 、 0.01), SCZ 低剂量组大鼠 Per1 基因表达水平显著增高 ($P < 0.01$)。结论 蛇床子催眠活性组分通过降低海马 Clock、Bmal1 表达, 提高 Cry1、Per1、Per2 基因的表达水平, 增加抑制性、减少兴奋性氨基酸类神经递质的表达, 从而调节睡眠-觉醒周期, 达到治疗失眠的效果。

关键词: 蛇床子; 失眠; 生物钟基因; 氨基酸类神经递质; γ -氨基丁酸; 谷氨酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)11-2614-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.019

Effects of hypnotic active components of *Cnidii Fructus* on expression of hippocampal Clock genes and amino acid neurotransmitters in PCPA insomnia rats

WEI Wen-jing, TONG Li-guo, ZHONG Qi-ming, YANG Qian, JIA Li-li, HU Wen-zhuo, SONG Mei-qing, FENG Ma-li

Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China

Abstract: Objective To study the hypnotic mechanism of *Cnidii Fructus* hypnotic active constituent (SCZ) on the expression of clock genes and hippocampal neurotransmitters in insomnia rats. **Methods** The insomnia model was established by intraperitoneal injection of para-chlorophenylalanine (PCPA). SCZ at low (25 g/kg), medium (50 g/kg), and high (100 g/kg) concentrations were ig administrated respectively at the same time with diazepam as positive group, intragastric administration of PCPA was performed in insomnia rats for three days. The expression levels of Clock, Bmal1, Cry1, Cry2, Per1, Per2, and Per3 were detected by real-time PCR. The expression levels of γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamic acid (Glu) in hippocampus dentate gyrus were detected by immunohistochemistry. The changes of contents of GABA and Glu were determined by immunohistochemistry and high performance liquid chromatography. **Results** The results of immunohistochemistry showed that the expression of GABA in the dentate gyrus of the hippocampus of rats in the model group was significantly reduced compared with the control group, and the expression level of Glu was significantly increased

收稿日期: 2017-10-28

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

作者简介: 魏文静 (1990—), 女, 河北省保定人, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药理与内分泌疾病研究。

*通信作者 冯玛莉 (1963—), 女, 山西大同人, 硕士生导师, 主任医师, 主要从事中药药理和内分泌疾病的研究工作。

Tel: (0351)4174328 E-mail: fengmali1@163.com

($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the expression level of GABA in SCZ medium and high dose group was significantly increased, and Glu expression was reduced significantly ($P < 0.01$). HPLC results showed that the GABA expression level in the hippocampus of the model group was significantly decreased compared with the control group, and the expression level of Glu was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the expression level of Glu in hippocampus of rats in SCZ medium and high dose group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression of GABA in rats with high and low doses of SCZ was significantly increased ($P < 0.01$). The results of Clock gene expression test showed that the expression of Clock and Bmal1 gene in the model group was significantly increased ($P < 0.05$) compared with the control group, and the expression levels of Cry1, Per1, and Per2 genes were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the expression of Clock and Bmal1 gene in the SCZ medium dose group was significantly decreased ($P < 0.01$); The expression levels of Cry1, Per1, and Per2 in the SCZ high dose group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The Per1 gene expression in the SCZ low-dose group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** *Cnidii Fructus* hypnotic active components can increase the expression of Cry1, Per1, and Per2 gene by reducing the hypnosis of hippocampal Clock and Bmal1 expression. The increased expression of the inhibitory neurotransmitter GABA and the decreased expression of excitatory neurotransmitter Glu can inhibit the occurrence and development of insomnia, which can regulate the sleep-wake cycle for clinical treatment of insomnia.

Key words: *Cnidii Fructus*; insomnia; clock genes; amino acids neurotransmitter; γ -aminobutyric acid; glutamic acid

失眠是现代都市人常见病之一, 日益成为威胁人类健康的杀手, 长期睡眠不足使人免疫功能下降、抵抗力下降、记忆力减退、植物神经功能紊乱, 给正常生活和工作带来严重的影响。蛇床子为伞形科(Umbelliferae)植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实, 具有温肾壮阳、燥湿、祛风、杀虫的功效。现代药理学研究显示, 蛇床子有促激素样作用、抗心率失常作用以及杀菌、抗生育、抗氧化作用, 具有扩张支气管、局部麻醉、中枢抑制等活性^[1]。其主要成分为香豆素类和挥发油类, 香豆素类成分主要有蛇床子素、欧前胡素、异虎耳草素、佛手柑内酯、花椒毒酚和蛇床明素等^[1]。课题组前期研究发现, 蛇床子醇提物催眠活性强、宿醉作用小, 谱效分析表明蛇床子催眠活性组分(SCZ)中佛手柑内酯和异虎耳草素 2 种成分镇静催眠活性显著^[2], 并观察了 SCZ 对失眠大鼠血清及脑干神经递质的影响, 初步探索 SCZ 的催眠作用机制, 但其作用靶点、神经递质及有关的分子机制仍不明确, 因此有必要对其进行进一步研究。

研究表明, 生物钟基因与睡眠障碍密切相关, 其中 Clock 基因控制睡眠的稳态, 其突变可以导致睡眠减少和神经高度兴奋, Per3 基因与睡眠时相延迟症有关。失眠与中枢神经系统兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸神经递质的平衡失调密切相关, 氨基酸类神经递质含量的变化成为睡眠障碍分子机制研究的重要指标^[3]。本实验采用 ip 对氯苯丙氨酸(PCPA)的方法制备大鼠失眠模型, 选择与睡眠觉醒相关的大脑生物钟基因 Clock、Bmal1、Cry1、Cry2、Per1、

Per2、Per3 及氨基酸类神经递质谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)为检测指标, 观察 SCZ 对失眠大鼠海马内生物钟基因的表达水平及氨基酸类神经递质含量变化的影响, 从分子水平探讨 SCZ 催眠作用机制, 为蛇床子的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药品

蛇床子药材, 安徽省亳州市远光中药饮片厂, 产地河南, 批号 121203, 经山西省药品检验所高天爱主任药师鉴定为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实; 地西洋片为上海信谊药厂有限公司产品, 批号 14150301, 规格 2.5 mg。

1.2 动物

SD 大鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体质量(190 $\pm$ 10) g, 共 96 只, 由中国食品药品检定研究院实验动物中心提供, 动物合格证号 11400500014207。

1.3 试剂

PCPA, 美国 Sigma 公司, 批号 1001099368; GABA、L-Glu 抗体, 康为世纪生物科技有限公司。RNA 提取、cDNA 合成、定量 PCR 检测试剂盒, Roche 公司; 对照品 L-Glu (批号 LRAA7158, 质量分数 $\geq 98\%$)、GABA (批号 BCBQ3318V, 质量分数 $\geq 98\%$), 美国 Sigma 公司; 甲醇, 色谱纯, 美国 Dikma 公司; 邻苯二甲醛(OPA), 德国 Fluka 公司。

1.4 仪器

Excelsior 全自动全封闭脱水机, 美国 Thermo 公司; BX51-DP72 万能荧光成像系统, 日本奥林巴斯公司; MS104TS 电子天平, 瑞士梅特勒-托利公

司; UPLC H-Class 超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Veriti9902 定性 PCR 仪、7500 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司。

2 方法

2.1 SCZ 提取

称取蛇床子 600 g 粉碎成最粗粉, 加 95% 的乙醇加热回流提取 3 次, 每次回流 1 h, 滤过, 滤液减压浓缩成干燥的浸膏, 浸膏加水混合溶解后, 经 D101 大孔吸附树脂柱色谱 30%~95% 乙醇梯度洗脱, 收集 60% 乙醇洗脱液, 减压浓缩干燥, 得 SCZ 20.5 g。参考文献方法^[4]采用紫外分光光度法测得 SCZ 中含蛇床子总香豆素 24.6%; HPLC 法测得 SCZ 含蛇床子素 3.67%、欧前胡素 1.65%、异虎耳草素 1.74%、佛手柑内酯 4.85%。用时以 2% 聚山梨酯-80 溶液配制成不同质量浓度的混悬液。

2.2 分组及给药

96 只大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、阳性对照地西洋组 (1.5 mg/kg) 及 SCZ 高 (100 mg/kg)、中 (50 mg/kg)、低 (25 mg/kg) 剂量组共 6 组, 每组 16 只, 分别适应性喂养 1 周后, 按照相应给药剂量每天 ig 给药 1 次, 连续给药 3 d, 对照组、模型组大鼠 ig 等体积 2% 聚山梨酯-80 溶液。

2.3 PCPA 失眠大鼠模型制备

给药第 1 天造模。除对照组外, 其余各组大鼠 ip PCPA 混悬液 0.45 g/kg, 每日 1 次, 连续 3 d, 给药第 3 天, 对照组大鼠反应敏捷、皮毛色泽光亮、睡眠昼夜节律明显、昼伏夜动、性情温顺、叫声柔和。模型组大鼠皮毛欠光泽, 睡眠节律不明显, 精神萎靡且极易受惊, 易激惹、嘶叫、攻击, 表明模型制备成功^[1]。

2.4 免疫组化法检测大鼠海马齿状回 GABA、Glu 表达

2.4.1 切片 末次给药 30 min 后, 每组随机取大鼠 6 只, 雌雄各半, ip 水合氯醛 350 mL/kg 麻醉, 腹主动脉取血, 10 min 后, 心脏灌注生理盐水 300~500 mL 冲洗致肝脏发白, 流出液基本无色后灌注 4% 多聚甲醛致头颈与四肢均僵硬, 静置 10 min 后断头取脑, 置于 4% 多聚甲醛溶液中, 置于 4 °C 固定 24 h, 取海马段, 常规石蜡切片。

2.4.2 免疫组化染色 石蜡切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 抗原修复, 内源性过氧化物酶封闭, 加一抗工作液 (1:50), 生物素标记 (兔抗 GABA, 鼠抗 Glu), 室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次, 加 HRP

标记的霉亲和素室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次, DAB 显色, 苏木素复染 2 min, 盐酸乙醇分化^[5]。免疫组化按照试剂说明书操作。

2.4.3 GABA、Glu 受体蛋白吸光度检测 Image-ProPlus 6.0 图像分析软件检测阳性信号的积分吸光度值, 每张切片选取 5 个视野, 取其平均值。

2.5 HPLC 法检测大鼠海马 Glu 与 GABA 表达

2.5.1 样品溶液制备 其余大鼠于末次给药 30 min 后, 麻醉、固定, 以矢状缝为纵轴, 剖取右侧海马组织, 精密称定, 置 4 °C、0.4 mol/L 的高氯酸冰浴中匀浆 2~3 min, 沉淀 30 min 去除蛋白, 取上清 1.5 mL, 14 000 r/min 低温离心 15 min, 取上清, 0.22 μm 滤膜滤过, 即得。

2.5.2 对照品溶液制备 分别取 Glu、GABA 对照品适量, 精密称定, 加水制成质量浓度为 0.147 1、0.103 1 mg/mL 的对照品溶液, 即得。

2.5.3 衍生液配制及衍生反应 称取 OPA 27 mg, 加入 β-巯基乙醇 40 μL, 溶于 5 mL 甲醇中, 加入 5 mL pH 9.5 的 0.1 mol/L 四硼酸钠缓冲液, 制成 OPA 衍生剂, 密封, 避光保存。取对照品或处理后样品溶液 10 μL, 加 OPA 衍生剂 5 μL, 混匀反应 2 min 后使样品衍生化, 立即进样, 每次进样 10 μL。

2.5.4 色谱条件 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 0.1 mol/L NaAC, 梯度洗脱: 0.01~7.00 min, 65%~40% B; 7.01~12.00 min, 40%~20% B; 12.01~16.00 min, 20% B; 16.01~18.00 min, 20%~95% B。检测波长: 激发光波长 λ_{ex} =340 nm, 发射光波长 λ_{em} =450 nm。体积流量 1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

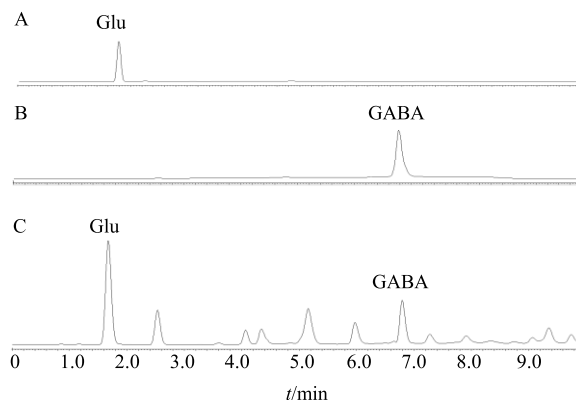


图 1 Glu、GABA 对照品 (A、B) 与大鼠海马样品 (C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Glu, GABA reference substance (A and B), and hippocampus sample of rats (C)

2.5.5 方法学考察

(1) 标准曲线与线性范围: 分别精密吸取 Glu、GABA 对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0 μL , 按照上述色谱条件注入液相色谱仪, 以对照品进样量为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 并计算 Glu、GABA 的回归方程和相关系数分别为 $Y=2\times 10^6 X-6.99\ 994\times 10^5$, $r=0.994\ 9$; $Y=2\times 10^6 X+2.55\ 198\times 10^5$, $r=0.995\ 6$; 分别在 0.001 47~0.147 10、0.001 31~0.103 10 mg 有良好的线性关系。

(2) 精密度试验: 取 Glu 和 GABA 对照品溶液 (质量浓度分别为 0.147 1、0.103 1 mg/mL), 连续进样 6 次, 测得对照品的峰面积 RSD 分别为 1.06%、0.49%, 表明仪器精密度良好。

(3) 重复性试验: 取大鼠海马组织 6 份, 精密称定, 按照样品溶液方法制备, 测得 Glu、GABA 质量分数 RSD 分别为 2.637%、2.255%, 表明重复性良好。

2.6 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠海马生物钟基因表达

剖取上述大鼠左侧海马组织, 提取总 RNA, 逆转录反应体系为 12.5 μL 2 $\times$ QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix、2.5 μL Forward Primer、2.5 μL Reverse Primer、11 μL cDNA 和 6.5 μL RNase-free Water。引物序列见表 1。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 预变性 1 个循环; 扩增 40 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、35 s)。反应结束后产物置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行比较, GAPDH 作为内参进行数据的标准化, 测出基因的相对表达量, 每次实验均设置 3 个复孔^[6-7]。

2.7 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件统计, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for real-time quantitative PCR

基因	引物序列 (5'→3')
GAPDH-F	CCCCCAATGTATCCGTTGTG
GAPDH-R	TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT
CLOCK-F	GCCGCAGAATAGCACCCAGAGT
CLOCK-R	ACTTGGCACCATGACGGCCC
Bmal1-F	GCGACTCATCGATGCGAA
Bmal1-R	AACAGGTGGAGGCGAAGT
CAM-F	CTGTCAAACGGGAGATGAATGGT
CAM-R	TCTGGCGGTAATAGGTGTAAATGG
Cry1-F	AATGGAGCCCCTGGAGAT
Cry1-R	TGGTGTACTGCAACCATCAGAG
Per1-F	AGCGCATCCACTCTGGTT
Per1-R	GTCGGTCCTCAGGATGTA
Per2-F	GACACCCTACCTGGTCAA
Per2-R	CATCCTGGAACAGGCAGT

ANOVA), 方差齐采用 LSD 法, 方差不齐采用 Games-Howell 法。

3 结果

3.1 SCZ 对失眠模型大鼠海马组织 GABA、Glu 表达水平的影响

光镜下免疫组织化学切片背景呈浅黄色 (图 2), 免疫阳性细胞呈不同程度的棕黄色, 海马齿状回 GABA 免疫阳性神经元呈卵圆形、圆形或多角形, 大小不等, 细胞突起数量不等, 多为 1~3 个^[8]。结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马齿状回 Glu 表达水平显著升高 ($P<0.01$), GABA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, SCZ 各给药组大鼠海马齿状回 Glu 表达水平显著降低 ($P<0.01$), GABA 表达水平显著升高 ($P<0.01$)。结果见表 2。

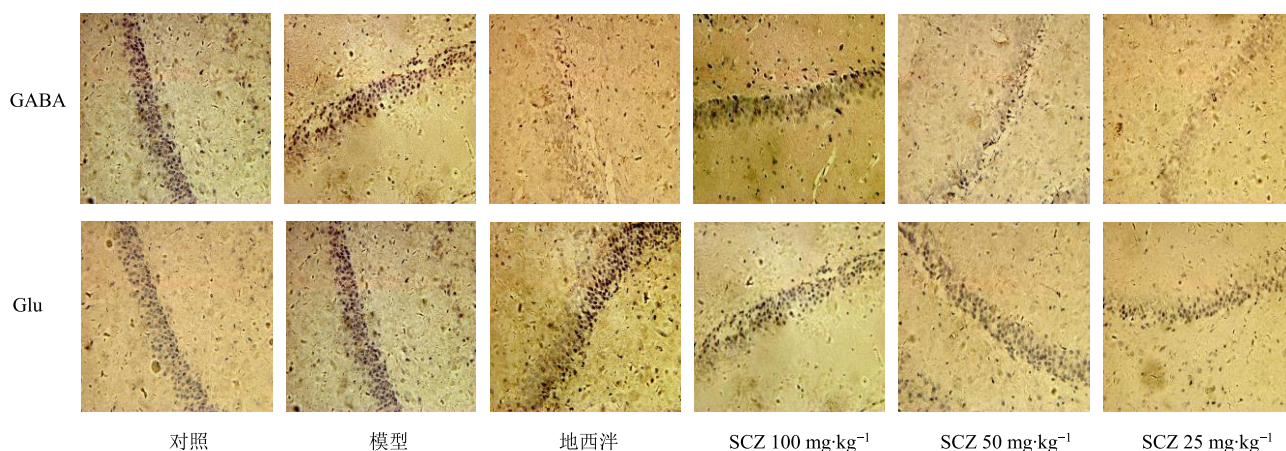


图 2 各组大鼠海马齿状回 Glu、GABA 表达 (免疫组化法, $\times 400$)

Fig. 2 Positive expression of Glu and GABA in hippocampal dentate gyrus of rats in each group ($\times 400$)

表 2 SCZ 对失眠模型大鼠海马齿状回 GABA、Glu 表达水平的影响 (免疫组化法, $\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Effects of SCZ on expression of GABA and Glu in hippocampus dentate gyrus of insomnia rats (immunohistochemistry, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	积分吸光度	
		GABA	Glu
对照	—	0.044 9 ± 0.023 6	0.040 6 ± 0.004 5
模型	—	0.023 9 ± 0.007 8 [▲]	0.050 5 ± 0.015 1 ^{▲▲}
地西洋	1.5	0.054 6 ± 0.012 0	0.036 2 ± 0.008 4
SCZ	100.0	0.053 7 ± 0.017 3 ^{**}	0.034 5 ± 0.004 5 ^{**}
	50.0	0.048 4 ± 0.006 5 ^{**}	0.033 5 ± 0.004 7 ^{**}
	25.0	0.046 7 ± 0.011 2 ^{**}	0.031 9 ± 0.005 1 ^{**}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

HPLC 法检测结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织 Glu 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), GABA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, SCZ 中、高剂量组大鼠海马组织 Glu 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), SCZ 高、低剂量组大鼠 GABA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 结果见表 3。

3.2 SCZ 对失眠模型大鼠海马钟基因表达水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 Clock、Bmal1 基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$, 图 3), Cry1、Per1、

表 3 SCZ 对失眠模型大鼠海马组织 GABA、Glu 水平的影响 (HPLC 法, $\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effects of SCZ on expression of GABA and Glu in hippocampus of insomnia rats (HPLC, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

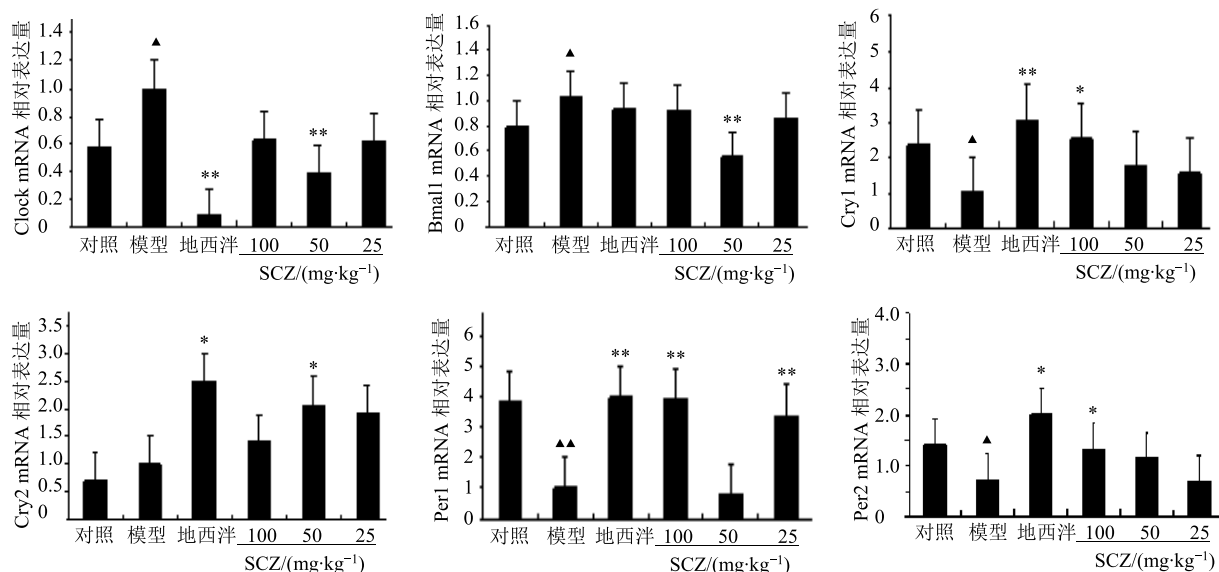
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	GABA/ (mg·g ⁻¹)	Glu/ (mg·g ⁻¹)
对照	—	1.76 ± 1.43	24.6 ± 13.1
模型	—	0.48 ± 0.10 ^{▲▲}	41.9 ± 13.4 ^{▲▲}
地西洋	1.5	1.93 ± 0.95	26.5 ± 11.1
SCZ	100.0	1.00 ± 0.24 ^{**}	24.6 ± 10.2 [*]
	50.0	0.57 ± 0.31	30.9 ± 11.4 [*]
	25.0	1.03 ± 0.27 ^{**}	32.5 ± 13.7

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

Per2 基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组比较, SCZ 中剂量组大鼠 Clock、Bmal1 基因表达水平显著降低 ($P < 0.01$), SCZ 低、高剂量无显著差异; SCZ 高剂量组大鼠 Cry1、Per1、Per2 基因表达水平显著增高 ($P < 0.05$ 、0.01), SCZ 低剂量组大鼠 Per1 基因表达水平显著增高 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 模型组大鼠 Cry2 基因无显著差异, 但 SCZ 各给药组大鼠 Cry2 基因表达量较模型组有增高趋势, SCZ 中剂量组显著增高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

海马与学习记忆功能密切相关, 而充足的睡眠

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group图 3 SCZ 对大鼠海马钟基因表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 3 Effects of SCZ on Clock genes expression in hippocampus of insomnia rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

和高度觉醒的状态是完成学习记忆过程的必备要素,这提示海马与睡眠调节相关。海马是与睡眠-觉醒周期调节密切相关的脑区之一, Glu 是海马神经元主要的兴奋性神经递质,能激活海马 CA1 区和齿状回的 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA) 受体,与之相结合,致使钙通道开放,突触膜内钙浓度升高,继而促发一系列生化反应而发挥作用^[9]。海马结构中至少含有 10 余种神经递质,其中氨基酸类递质(主要是 Glu 和 GABA)分布最为广泛, GABA 是 Glu 经过谷氨酸脱羧酶脱羧而成,是一种重要的抑制性神经递质, GABA、Glu 对于维持神经细胞抑制与兴奋功能平衡的稳定具有极为重要的作用。本研究中, ip PCPA 后大鼠昼夜节律消失,总睡眠量减少,引起睡眠相关的神经元过度兴奋,导致失眠,海马内 Glu 表达水平升高。失眠大鼠给予 SCZ 后,海马 GABA 表达水平显著升高,提示 SCZ 能够明显促进神经递质对神经元的抑制作用,降低神经的兴奋性,从而抑制失眠的发生,达到治疗失眠的效果^[10]。

有研究表明调控昼夜节律的生物钟基因与睡眠的关系密切^[11],已确认的生物钟基因包括 Clock、Bmal1、Cry1、Cry2、Per1、Per2、Per3 等,其中 Clock 基因控制睡眠的稳态,其突变可以导致睡眠减少和神经高度兴奋, Per3 基因与睡眠时相延迟症有关^[12]。本实验结果显示,给药后模型大鼠 Clock、Bmal1 基因表达水平显著降低, Cry1、Per1、Per2 基因表达水平显著升高, SCZ 通过对 PCPA 致失眠大鼠海马组织生物钟基因的调控,达到治疗失眠的作用。

报道神经递质可以影响生物钟基因的表达, Glu 通过细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 信号通路,诱导 Per1 使 Bmal1 基因表达水平增加, Cry1 基因表达水平降低^[13], GABA 可以引起星形胶质细胞 Bmal1 时生物钟信号的缺失^[14]。本研究结果显示, SCZ 通过调节失眠大鼠海马组织内生物钟基因表达,增加抑制性、减少兴奋性氨基酸类神经递质的表达水平,从而调节睡眠-觉醒周期,达到治疗失眠的效果,该结果为蛇床子镇静安神临床应用提供了实验依据。

参考文献

[1] 侯小斌,宋美卿,贾力莉,等.蛇床子催眠活性组分对

睡眠剥夺大鼠学习记忆的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 837-840.

- [2] 仝立国,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.
- [3] Nolte C, Staiger D. RNA around the clock-regulation at the RNA level in biological timing [J]. *Front Plant Sci*, 2015, doi: 10.3389/fpls.2015.00311.
- [4] 何芳辉,尹蓉莉,刘杨,等.大孔树脂纯化白芷总香豆素工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 710-712.
- [5] 刘乃慧,张莉,邵颖,等.在体心脏灌注术在大鼠脑组织切片观察中的应用 [J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(2): 52-53.
- [6] Udoh U S, Valcin J A, Gamble K L, et al. The molecular circadian clock and alcohol-induced liver injury [J]. *Biomolecules*, 2015, 5(4): 2504-2537.
- [7] Chicastañeda D, Ortega A. Clock genes in glia cells: A rhythmic history [J]. *Asn Neuro*, 2016, 8(5): 1-13.
- [8] 聂玉芝.沙苑子对运动训练大鼠脑组织中氨基酸类神经递质及相关基因表达影响的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2005.
- [9] 刘振华,王世军.针刺四神聪、百会对失眠大鼠脑组织钟基因及氨基酸类神经递质表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015(35): 6067-6069.
- [10] 富祯祯.乌龙丹对慢性脑缺血大鼠钟基因及氨基酸类神经递质表达的影响 [D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [11] 张舜波,王平,田代志,等.酸枣仁总皂苷对失眠老年大鼠脑氨基酸类神经递质及受体表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 124-127.
- [12] 阮继源.电针对失眠大鼠脑内谷氨酸、 γ -氨基丁酸含量及 γ -氨基丁酸 A 型受体表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013(12): 3657-3660.
- [13] Morioka N, Sugimoto T, Sato K, et al. The induction of Per1 expression by the combined treatment with glutamate, 5-hydroxytryptamine and dopamine initiates a ripple effect on Bmal1 and Cry1 mRNA expression via the ERK signaling pathway in cultured rat spinal astrocytes [J]. *Neurochem Inter*, 2015, doi: 10.1016/j.neuint.2015.06.013.
- [14] Dudek M, Gossan N, Nan Y, et al. The chondrocyte clock gene Bmal1 controls cartilage homeostasis and integrity [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(1): 365-376.