

睡安片对咖啡因诱导斑马鱼失眠症的改善作用

潘 兰¹, 黄 乐², 叶志文¹, 朱晓宇³

1. 广西玉林制药集团有限责任公司, 广西 玉林 537001

2. 广西医科大学, 广西 南宁 530021

3. 杭州环特生物科技有限公司, 浙江 杭州 311231

摘要: **目的** 观察睡安片对咖啡因诱导失眠症斑马鱼的镇静作用和睡眠改善作用, 评价睡安片对失眠症的疗效。**方法** 采用 200 $\mu\text{mol/L}$ 咖啡因诱导活体斑马鱼建立失眠症模型, 并确定睡安片的最大非致死浓度(MNLC)。睡安片选取 MNLC (1 200 $\mu\text{g/mL}$)、1/3 MNLC (400 $\mu\text{g/mL}$)、1/10 MNLC (120 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度, 同时设置对照组、模型组和氯化锂 (500 $\mu\text{g/mL}$) 组, 每组均处理 30 尾斑马鱼幼鱼, 使用行为分析仪测量斑马鱼的运动距离和处于失眠状态的时间, 计算镇静作用和睡眠改善作用。**结果** 睡安片的 MNLC 为 1 200 $\mu\text{g/mL}$ 。120、400、1 200 $\mu\text{g/mL}$ 睡安片组与模型组比较, 运动距离均显著减少, 差异具有极显著性 ($P < 0.001$), 镇静作用分别增加 0.69、1.66、2.74 倍。除 120 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度外, 400、1 200 $\mu\text{g/mL}$ 组与模型组比较, 失眠时间显著减少, 差异具有极显著性 ($P < 0.001$), 睡眠改善作用分别增加 1.63、2.65 倍。**结论** 睡安片对咖啡因诱导失眠症斑马鱼具有明显的镇静和睡眠改善作用, 呈现明显的浓度相关性。

关键词: 睡安片; 失眠症; 斑马鱼; 镇静作用; 睡眠改善作用

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)09-1627-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.09.005

Improvement of Shui'an Tablets on insomnia of zebra fishes caused by caffeine

PAN Lan¹, HUANG Le², YE Zhi-wen¹, ZHU Xiao-yu³

1. Guangxi Yulin Pharmaceutical Group Co., LTD, Yulin 537001, China

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. Hunter Biotechnology, Inc, Hangzhou 311231, China

Abstract: Objective To observe the sedative effect and sleep improvement of Shui'an Tablets on zebra fishes with insomnia caused by caffeine, and to evaluate the effect of Shui'an Tablets on insomnia. **Methods** The insomnia model was established by 200 $\mu\text{mol/L}$ caffeine in living zebra fishes, and the maximum non-lethal concentration (MNLC) of Shui'an Tablets was determined. All zebra fishes were randomly divided into control group, model group, lithium chloride (500 $\mu\text{g/mL}$) group, and Shui'an Tablets 1/10 MNLC (120 $\mu\text{g/mL}$), 1/3 MNLC (400 $\mu\text{g/mL}$), and MNLC (1 200 $\mu\text{g/mL}$) groups, and each group had 30 zebra fishes. The distance of movement and the time of insomnia were measured with behavioral analyzer, and sedative effect and sleep improvement of Shui'an Tablets on zebra fishes was calculated. **Results** The maximum non-lethal concentration (MNLC) of Shui'an Tablets was 1 200 $\mu\text{g/mL}$. Compared with the model group, the exercise distances of Shui'an Tablets 120, 400, and 1 200 $\mu\text{g/mL}$ groups were significantly decreased ($P < 0.001$) and sedative effects were 0.69, 1.66, and 2.74 times, respectively. Compared with the model group, the times of insomnia of Shui'an Tablets 400 and 1 200 $\mu\text{g/mL}$ groups were significantly decreased ($P < 0.001$), and the improvements of sleep were 0.62, 1.63, and 2.56 times, respectively. **Conclusion** Shui'an Tablets have obvious sedative and sleep improvement effects on zebra fishes with insomnia caused by caffeine, and show significant concentration-dependence.

Key words: Shui'an Tablets; insomnia; zebra fishes; sedative effect; sleep improvement

失眠症指睡眠的始发和睡眠维持发生障碍, 致使睡眠质量不能满足个体生理需要而明显影响患者

白天活动(如疲劳、注意力下降、反应迟钝等)的一种睡眠障碍综合征^[1]。失眠症是现代生活中的一

收稿日期: 2017-06-14

基金项目: 广西工业创新发展项目(桂工信投资[2012]297号)

作者简介: 潘 兰(1982—), 女, 工程师, 从事民族药物发展及新药研究。Tel: (0775) 3892661 E-mail: 24372519@qq.com

种常见、多发的睡眠疾病,并且失眠症患者有明显的睡眠结构紊乱^[2],并存在有较高的焦虑状态和焦虑特质^[3]。斑马鱼是一种具有多重优点的模式脊椎动物,与人类基因组相似度高达 87%,在神经系统、心血管系统和肾脏系统等方面都与人类具有相似的发育机制与特点^[4]。近年来斑马鱼已被越来越多地应用于生物医学研究,如建立人类疾病模型、进行药理毒理实验、筛选药物^[5]。目前已有大量研究观察抗焦虑药、镇静药、治疗失眠药物作用于神经系统对斑马鱼成鱼的影响^[6-8]和评价斑马鱼睡眠的模型^[9-11]。睡安片由酸枣仁(炒)、五味子、远志、首乌藤、丹参、石菖蒲、知母、茯苓、甘草制成,具有养血安神、清心除烦的功效,用于心烦不寐,怔忡惊悸,梦多易醒或久卧不眠。本实验采用咖啡因诱导斑马鱼造成失眠模型,给予睡安片治疗,从行为学角度考察睡安片对失眠症斑马鱼的镇静和睡眠的改善作用。

1 材料

1.1 药物

睡安片由广西玉林制药集团有限责任公司生产,薄膜衣,规格 0.57 g/片,产品批号 970010;使用前睡安片去掉薄膜衣,粉碎成超微粉,用超纯水配制滤过得储备液,现用现配。

咖啡因、氯化锂(阿拉丁,货号 H1305029)。将咖啡因、氯化锂用超纯水配制成 50 mmol/L 的母液,备用。

1.2 仪器

SMZ645 解剖显微镜(Nikon 公司);24 孔板(Nest Biotech);V3 行为分析仪(Viewpoint Life Sciences 公司)。

1.3 实验动物

实验所用斑马鱼品系为野生型 AB 系斑马鱼,由杭州环特生物科技有限公司斑马鱼实验室提供。斑马鱼的繁殖以自然成对交配的方式进行。每次交配准备 4~5 对成年斑马鱼,平均每对能产 200~300 个胚胎。

2 方法

2.1 斑马鱼失眠模型的制备和分组

选取 5 dpf 野生型 AB 系斑马鱼,在解剖显微镜下挑选发育正常的斑马鱼进行分组和处理。对照组:正常饲养,未处理;模型组:用 200 $\mu\text{mol/L}$ 咖啡因做诱导剂处理 24 h;睡安片组:用咖啡因和睡安片同时水溶给样方式处理斑马鱼 24 h;氯化锂组:用

咖啡因和 500 $\mu\text{mol/L}$ 氯化锂同时水溶给样方式处理斑马鱼 24 h。

2.2 睡安片最大非致死浓度的确定

随机选取 480 尾斑马鱼于 6 孔板中,分为 7 个实验组,每组各 30 尾。即对照组、模型组、睡安片治疗组,按不同的浓度各分为 5 组,睡安片的质量浓度分别为 750、1 000、1 500、1 750、2 000 $\mu\text{g/mL}$;24 h 后,观察斑马鱼反应情况,并统计各组的死亡数量,使用 Originpro 8.0 统计学软件绘制最佳的浓度效应曲线,并计算最大非致死浓度(MNLC)。

2.3 睡安片对失眠斑马鱼的镇静作用

睡安片选取 MNLC、1/3 MNLC、1/10 MNLC 3 个质量浓度,同时设置对照组、模型组和氯化锂组,每组均处理 30 尾野生型 AB 系斑马鱼幼鱼,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育。24 h 后,每组随机选择 10 尾斑马鱼,使用行为分析仪测量斑马鱼的运动距离(D),计算镇静作用。

镇静作用= $[D(\text{模型组})-D(\text{药物组})]/[D(\text{模型组})-D(\text{对照组})]$

2.4 睡安片对失眠症斑马鱼睡眠的改善作用

睡安片选取 MNLC、1/3 MNLC、1/10 MNLC 3 个质量浓度,同时设置对照组、模型组和氯化锂组,每组均处理 30 尾野生型 AB 系斑马鱼幼鱼,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育。24 h 后,每组随机选择 10 尾斑马鱼,使用行为分析仪测量斑马鱼处于失眠状态的时间(T)。药物处理后,失眠状态为斑马鱼处于黑暗环境中的运动状态,失眠时间即处于运动状态的时间,观察时间为 1 h。计算睡安片对失眠斑马鱼睡眠的改善作用。

睡眠改善作用= $[T(\text{模型组})-T(\text{药物组})]/[T(\text{模型组})-T(\text{对照组})]$

2.5 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间资料比较用方差分析和 Dunnett's 方法对数据进行统计分析。

3 结果

3.1 睡安片 MNLC 的确定

睡安片 750、1 000、1 500、1 750、2 000 $\mu\text{g/mL}$ 诱发的斑马鱼死亡率见表 1。采用 OriginPro 8.0 软件拟合浓度-致死曲线,经过曲线拟合,计算得睡安片的 MNLC 为 1 200 $\mu\text{g/mL}$,在这个浓度下斑马鱼全部存活。因此实验设置 1200 $\mu\text{g/mL}$ (MNLC) 为高剂量组,400 $\mu\text{g/mL}$ (1/3 MNLC) 为中剂量组,

120 $\mu\text{g/mL}$ (1/10 MNLC) 为低剂量组。

3.2 睡安片对失眠斑马鱼的镇静作用

咖啡因处理的模型组斑马鱼运动距离大于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明模型建立

表 1 不同浓度睡安片诱发的斑马鱼死亡率 ($n = 30$)

Table 1 Mortality of zebra fishes caused by Shui'an Tablets with different concentration ($n = 30$)

质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	死亡数/尾	死亡率/%
750	0	0
1 000	0	0
1 500	13	43
1 750	20	67
2 000	24	80

成功。氯化锂组斑马鱼运动距离小于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 表明氯化锂对斑马鱼失眠症具有明显的镇静作用。120、400、1 200 $\mu\text{g/mL}$ 睡安片组与模型组比较, 运动距离均显著减少, 差异具有极显著性 ($P < 0.001$), 镇静作用分别增加 0.69、1.66、2.74 倍, 见表 2。

3.3 睡安片对失眠斑马鱼睡眠的改善作用

在观察的 1 h (1 800 s) 内, 模型组斑马鱼失眠时间多于对照组。氯化锂组斑马鱼失眠时间少于模型组, 差异具有有统计学意义 ($P < 0.05$)。睡安片处理后, 除 120 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度外, 400、1 200 $\mu\text{g/mL}$ 组与模型组比较, 失眠时间显著减少, 差异具有极显著性 ($P < 0.001$), 睡眠改善作用分别增加 1.63、2.65 倍, 见表 2。

表 2 睡安片对咖啡因诱导斑马鱼失眠症的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of Shui'an Tablets on insomnia of zebra fishes caused by caffeine ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	运动距离/mm	镇静作用/倍	失眠时间/s	睡眠改善作用/倍
对照	—	7 330 $\pm$ 169	—	460 $\pm$ 45	—
模型	—	8 678 $\pm$ 257*	—	521 $\pm$ 37*	—
氯化锂	500	6 368 $\pm$ 170###	1.71	428 $\pm$ 40###	1.52
睡安片	120	7 760 $\pm$ 254###	0.69	519 $\pm$ 41	0.02
	400	6 433 $\pm$ 165###	1.66	421 $\pm$ 26###	1.63
	1 200	4 986 $\pm$ 142###	2.74	358 $\pm$ 25###	2.65

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ vs control group, ### $P < 0.001$ vs model group

4 讨论

失眠症是多病因、复合病因导致的, 其中包括医疗条件、药物、精神疾病和不良睡眠卫生等, 形成过程相当复杂, 涉及多因素、多环节的异常。随着现代社会的快速发展和竞争压力的增大, 导致失眠症的患者发病率逐年增高。根据世界卫生组织发布的一些调查表明: 我国成年人的失眠率平均高达 57%, 而且这个数字还有逐年上升的趋势。失眠给患者带来了十分巨大的痛苦和心理负担。

失眠在中医学中被称为不寐, 不寐症多因阳盛阴衰, 阳盛不入阴, 或阴亏不敛阳, 致使心神不安, 阴阳失交而引起。中药经过长期的应用实践证实对失眠症的防治有一定优势。中药复方含多味中药, 单味药又含多种成分, 具有适应多样性, 在治疗失眠症中药作用更缓和、毒副作用更小。睡安片为中药复方制剂, 主要由酸枣仁 (炒)、夜交藤、茯苓、知母、五味子、石菖蒲、远志、丹参等组成, 通过

调治脏腑, 使气血调和, 阴阳平衡, 恢复脏腑的正常功能, 有效地治疗不寐症, 其中酸枣仁 (炒) 为方中君药, 起养肝血、安心神, 多用于虚烦不眠, 其主要成分主要包括酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B^[12-13], 而酸枣仁皂苷被认为是具有镇静安神作用的活性成分。

本实验采用咖啡因诱导斑马鱼造成失眠模型, 咖啡因是中枢神经系统兴奋剂, 可诱导斑马鱼失眠症, 表现为运动距离和失眠时间增加, 以氯化锂 (临床作为心境稳定剂使用^[14]) 为阳性对照药, 给予睡安片治疗, 从行为学角度, 睡安片能通过减少运动距离和失眠时间来改善斑马鱼的镇静和睡眠质量。实验中镇静和改善作用呈现明显的浓度相关性, 即随着质量浓度的升高, 睡安片的镇静作用和睡眠改善作用增强。120、400、1 200 $\mu\text{g/mL}$ 睡安片组与模型组比较, 镇静作用分别增加 0.69、1.66、2.74 倍; 除睡安片 120 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度外, 400、1 200 $\mu\text{g/mL}$

组与模型组相比,失眠时间显著减少,睡眠改善作用分别增加 1.63、2.56 倍。

参考文献

- [1] American Sleep Disorders Association. The international classification of disorders [C]. Rochester: American Sleep Disorders Association, 1997: 28
- [2] 余海鹰, 王 宏, 崔 庶, 等. 失眠症患者的多导睡眠检测及其与心理卫生状况的相关研究 [J]. 中国行为医学科学杂志, 2003, 12(2): 165-166.
- [3] 潘集阳, 赵耕源, 张晋暗, 等. 原发性失眠症患者的焦虑抑郁状态研究 [J]. 中国行为医学与科学杂志, 2000, 9(3): 178-179.
- [4] 刘晓金, 陈华利, 高 燕, 等. 斑马鱼模式研究现状及应用情况进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(4): 125-127.
- [5] 孙 超, 张 森, 高立栓, 等. 斑马鱼疾病模型的研究简述 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(20): 2340-2343.
- [6] Wang Y, Li S, Liu W, *et al.* Vesicular monoamine transporter 2 (Vmat2) knockdown elicits anxiety-like behavior in zebra fish [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(4): 792-797.
- [7] Liu X, Guo N, Lin J, *et al.* Strain-dependent differential behavioral responses of zebrafish larvae to acute MK-801 treatment [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 127: 82-89.
- [8] Pérez M R, Pellegrini E, Cano-Nicolau J, *et al.* Relationships between radial glial progenitors and 5-HT neurons in the paraventricular organ of adult zebrafish- potential effects of serotonin on adult neurogenesis [J]. *Eur J Neurosci*, 2013, 38(9): 3292-3301.
- [9] 谢 晨, 杨文佳, 于心同, 等. 睡眠研究中相关动物选择的进展 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 87-92.
- [10] Zhdanova I V. Sleep and its regulation in zebrafish [J]. *Rev Neurosci*, 2011, 22(1): 27-36.
- [11] Appelbaum L, Wang G X, Maro G S, *et al.* Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(51): 21942-21947.
- [12] Wang X, Yang B, Zhang A, *et al.* Potential drug targets on insomnia and intervention effects of jujuboside A through metabolic pathway analysis as revealed by UPLC/ESI-SYNAPT-HDMS coupled with pattern recognition approach [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(4): 1411-1427.
- [13] Wang X, Yang B, Sun H, *et al.* Pattern recognition approaches and computational systems tools for ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry-based comprehensive metabolomic profiling and pathways analysis of biological data sets [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(1): 428-439.
- [14] Rui Z, Yi L, Yong H, *et al.* Mice heterozygous for cathepsin D deficiency exhibit mania-related behavior and stress-induced depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2015, 63: 110-118.