

复方薰衣草颗粒镇静催眠及改善认知障碍作用研究

都田芳^{1,2}, 赵军³, 窦勤⁴, 霍仕霞⁵, 王春^{1,4}, 努尔玛娜提·胡安别克^{1,4}, 周子虔^{1,4}, 李治建^{4,5*}, 斯拉甫·艾白^{4*}

1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830000
2. 长春市儿童医院, 吉林 长春 130000
3. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000
4. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000
5. 新疆维吾尔自治区维吾尔医院, 新疆 乌鲁木齐 830000

摘要: 目的 观察复方薰衣草颗粒 (CLG) 镇静催眠及对轻度认知功能障碍 (MCI) 模型小鼠的治疗作用。方法 (1) CLG 镇静催眠和抗抑郁、抗疲劳作用研究: 以旷场训练结果为条件、体质量为次要条件, 随机将 79 只 ICR 小鼠分为对照组、地西洋 (3 mg·kg⁻¹, 化药阳性药) 组、复方枣仁胶囊 (12.3 mg·kg⁻¹, 中药阳性药) 组和 CLG 低、中、高剂量 (2.36、4.72、9.44 g·kg⁻¹) 组。采用戊巴比妥钠阈下剂量催眠、旷场和转棒实验, 观察 CLG 对小鼠的一般状态、睡眠潜伏期、30 min 内入睡比例和总睡眠时间以及行为学的影响。(2) CLG 改善 MCI 作用研究: 将 60 只昆明小鼠以 Y 迷宫实验训练结果为条件、体质量为次要条件随机分为对照组、模型组、多奈哌齐 (3 mg·kg⁻¹, 阳性药) 组和 CLG 低、中、高剂量 (2.36、4.72、9.44 g·kg⁻¹) 组, 每天 1 次, 连续 ig 给药 14 d, 给药第 9 天起, 给药 1 h 后, 除对照组外, ip 3 mg·kg⁻¹ 东莨菪碱制备 MCI 模型。于末次给药 20 min 后进行 Y 迷宫实验; 第 15 天进行跳台实验; 解剖取脑, 称取脑质量并计算脑系数; HE 染色后观察脑组织病理改变; 取海马, ELISA 法测定乙酰胆碱 (ACh)、乙酰胆碱酯酶 (AChE)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 水平。**结果** (1) 与对照组比较, CLG 各剂量对体质量无明显影响; 地西洋组和 CLG 各剂量组入睡率有增高趋势, 但无显著性差异; 地西洋组和 CLG 高剂量组入睡潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$); 各给药组睡眠时间均显著延长 ($P < 0.01$)。(2) 与模型组比较, 多奈哌齐组和 CLG 各剂量组跳台次数均显著减少 ($P < 0.05$); CLG 各剂量组 ACh 有升高趋势, 多奈哌齐组和 CLG 中、高剂量组 AChE 有降低趋势; CLG 各剂量组 SOD 显著增加, MDA 显著降低 ($P < 0.05$); CLG 中、高剂量组小鼠皮层和海马病理改变明显减轻。**结论** CLG 具有镇静催眠作用, 其改善 MCI 的作用可能与调节胆碱能系统和抗氧化应激有关。

关键词: 复方薰衣草颗粒; 镇静催眠; 认知障碍; 行为学; 胆碱能系统; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 11-2215-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.11.007

Study of sedative and hypnotic effects of Compound Lavender Granule and its effect on cognitive impairment

DU Tianfang^{1,2}, ZHAO Jun³, DOU Qin⁴, HUO Shixia⁵, WANG Chun^{1,4}, NURMANATI·Juanbei^{1,4}, ZHOU Ziqian^{1,4}, LI Zhijian^{4,5}, SAPHU·Aibai⁴

1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China
2. Changchun Children's Hospital, Changchun 130000, China
3. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830000, China
4. Uyghur Medical Research Institute of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830000, China
5. Uyghur Medical Hospital of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830000, China

收稿日期: 2022-03-16

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”专项课题 (2018YFC1708003, 2018YFC1708006); 天山创新团队计划项目 (2020D14011); 天山雪松项目 (2020XS19); 乌鲁木齐市“优秀青年科技人才培养”工程

第一作者: 都田芳 (1993—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: 3147967740@qq.com

*共同通信作者: 李治建 (1982—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药理学。E-mail: lizhijian0220@sina.com

斯拉甫·艾白 (1960—), 男, 教授, 研究员, 博士生导师。研究方向为药理学。E-mail: aibai1960@sina.com

Abstract: Objective To observe the sedative and hypnotic effects of Compound Lavender Granule (CLG) and its effect on mild cognitive impairment (MCI) model mice. **Methods** (1) Studies on the sedative and hypnotic effects and anti-depression and anti-fatigue effects of CLG: Taking open field training results as the main condition and body weight as the secondary condition, 79 ICR mice were randomly divided into control group, diazepam (chemical positive drug, $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, FuFang ZaoRen JiaoNang (Chinese traditional positive drug, $12.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and CLG low, medium, and high dose ($2.36, 4.72, \text{ and } 9.44 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group. The effects of CLG on general state, sleep latency, proportion of falling asleep within 30 min, total sleep time and behavior of mice were observed by using pentobarbital sodium subthreshold dose hypnosis test, open field test and rotating bar test. (2) Effect of CLG on MCI: 60 KM mice were divided into six groups: control group, model group, donepezil ($3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, positive drug) group, CLG low, medium, and high dose ($2.36, 4.72, \text{ and } 9.44 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group. Mice were ig given corresponding drugs once a day for 14 consecutive days. On the 9th day of administration, 1 h after administration, except for the control group, $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ scopolamine was ip for modeling. Y maze test was performed 20 min after the last dose. On the 15th day, the platform experiment was carried out, the brain was dissected, the brain weight was weighed, the brain body coefficient was calculated. The pathological changes were observed after HE staining. The contents of acetylcholine (Ach), acetylcholinesterase (AChE), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) in the hippocampus were determined by ELISA method. **Results** (1) Compared with control group, CLG dose groups had no significant effect on body weight, and the sleep rate of the diazepam group and the CLG high-dose groups tended to increase, but there was no significant difference. The sleep latency of the diazepam group and the CLG high-dose groups was significantly shortened ($P < 0.05$), and the sleep time of the CLG high-dose groups was significantly prolonged ($P < 0.01$). (2) Compared with model group, the number of platform jumps in donepezil group and CLG administration groups were significantly reduced ($P < 0.05$), Ach of all CLG administration groups had an increasing trend, AChE of donepezil group, CLG middle and high dose groups had a decreasing trend, but there was no significant difference, and SOD was significantly increased and MDA was significantly decreased in CLG dose groups ($P < 0.05$). Compared with model group, the pathological changes of cortex and hippocampus in CLG medium- and high-dose groups were significantly reduced. **Conclusion** CLG has sedative and hypnotic effects, and its effect on MCI improvement may be related to the regulation of cholinergic system and anti-oxidative stress.

Key words: Compound Lavender Granule; sedative and hypnotic; cognitive impairment; behavioral science; cholinergic system; oxidative stress

中国失眠症诊断和治疗指南(2017版)^[1]将失眠定义为:失眠症是以频繁而持续的入睡困难和(或)睡眠维持困难并导致睡眠感不满意为特征的睡眠障碍。其临床症状大致分为入睡困难、睡眠易醒和睡眠短暂。随着生活压力的加大,失眠的发病率呈明显上升趋势。失眠症可单独发生,也可与躯体疾病和精神障碍,如焦虑、认知障碍、抑郁等共病。失眠严重损害患者的身心健康和睡眠质量,甚至引发交通事故,危及人身安全和公共安全,给个人和社会造成严重负担。2006年,中国睡眠研究会的研究发现,中国大陆高达57%的成年人患有失眠。在成年人中,10%~15%的患者符合失眠的诊断标准,病程缓慢发展,且近一半的严重失眠症患者可以持续10年以上^[2]。

轻度认知功能障碍(MCI)是正常衰老与痴呆的中间状态,病情具有一定可逆性,被视为预防痴呆的关键时段^[3]。研究表明,遗忘型轻度认知功能障碍(aMCI)是MCI的主要亚型,aMCI患者每年约有16%转化为痴呆,6年可高达80%,其中约99%确诊为阿尔茨海默病(AD),而正常老人每年的痴呆转化

率仅为1%~2%,因此MCI具有发展为AD的高度风险,治疗aMCI也是预防AD的关键^[4-5]。有证据表明,失眠可对学习记忆产生一定影响^[6]。记忆障碍与睡眠有关,良好的睡眠可以促进记忆力。失眠可与aMCI互为因果关系,且形成恶性循环^[7]。

薰衣草 *Lavandula angustifolia* Mill. 又名灵香草、香水植物等,属唇形科薰衣草属,原植物为多年生常绿亚灌木,主产于地中海盆地、欧洲南部、非洲、中东,在中国、印度、俄罗斯、澳大利亚、美洲也有分布。薰衣草的药用历史悠久,具有抗惊厥、抗抑郁、抗焦虑、镇静催眠、解痉利尿、解腹胀和抗呼吸道感染的作用,此外,它还用于癫痫、偏头痛和疼痛的治疗^[8]。

中医药在治疗失眠方面有一定的特色,复方薰衣草颗粒(Compound Lavender Granule, CLG)是临床经验方,收载于《中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册》(WS3-BW-0179-98),该复方由薰衣草、甘草、破布木果等共12味药材组成,具有益脑安神的作用,临床用于头痛、失眠、抑郁、神经衰弱等的治疗。前期已完成了该制剂的工艺、质量标

准、中试研究和临床观察。在新疆维吾尔自治区维吾尔医院对213例和60例的2项回顾性调查分析表明,CLG具有良好的临床疗效和安全性^[9-10]。

在临床使用中发现CLG同时对改善认知功能具有一定效果,但其药理作用特点尚不清楚。本实验拟采用戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验和旷场实验,观察CLG镇静催眠作用;ip东莨菪碱制备小鼠MCI模型,初步探讨CLG改善MCI作用及机制。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

CLG[新疆维吾尔自治区药物研究所,批号201146,含挥发油不得少于0.088%、含白芍以芍药苷($C_{23}H_{28}O_{11}$)计不得少于 $0.74\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$];地西洋(华中药业股份有限公司,批号20200904,规格100 mg:2.5 mg);复方枣仁胶囊(重庆希尔安药业有限公司,批号Z50020601,规格0.4 g:60 mg);戊巴比妥钠(北京雷根生物技术有限公司);东莨菪碱(阿达玛斯试剂有限公司,产品编号01010159);多奈哌齐[卫材(中国)药业有限公司,批号H20050978];0.9%氯化钠注射液、多聚甲醛溶液(北京雷根生物技术有限公司);苏木色精(上海蓝季生物科技发展有限公司);伊红染色液(天津市光复精细化工研究所);中性树胶(中国上海标本模型厂);BCA试剂盒(中国Sinobestbio公司);乙酰胆碱(Ach)、乙酰胆碱酯酶(AchE)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)ELISA试剂盒(中国Sinobestbio公司)。

1.2 主要仪器

AX4201ZHIE电子秤[奥豪斯仪器(常州)有限公司];XR-XY1032旷场视频分析系统(上海欣软有限公司);ZB-100疲劳转棒仪(成都泰盟科技有限公司);SQP电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];病理切片机、显微镜、组织自动脱水机(德国Leica公司);超纯水系统(成都优普净化科技有限公司);高通量组织研磨仪(北京鼎昊源科技有限公司);TS-1000摇床(其林贝尔仪器制造有限公司);涡旋混合器、mini离心机(德国IKA公司);高速离心机(美国Thermo公司);Tecan Infinite F50酶标仪(瑞士帝肯公司);Y迷宫(上海欣软信息科技有限公司);YLS-3TB型跳台记录仪(济南益延科技发展有限公司)。

1.3 动物及饲养条件

SPF级雄性ICR小鼠102只、SPF级雄性昆明小鼠60只,体质量22~28 g,供应单位为新疆医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号

SYXK(新)2018-0001,每笼塑料笼盒中饲养动物不多于5只,自由饮水摄食。小鼠饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供,批号京饲证(2018)06073。室温20~26℃,相对湿度40%~70%,光照黑暗各12 h;实验前环境适应饲养5 d,经过一般行为学观察,选用健康并符合要求的动物进行实验。本实验依托于新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所进行,有完整的实验方案和记录,实验经新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所伦理委员会批准,伦理批号为nGLP-202102。

2 方法

2.1 CLG镇静催眠作用和抗抑郁、抗疲劳作用研究

2.1.1 分组及给药 在检疫期、适应期各组动物均未发生死亡,体质量不在22~28 g及旷场试验总路程不满足4 000~9 000 mm的ICR小鼠(23只)不符合入组条件,剔除。以旷场训练结果为主要条件,体质量为次要条件,随机将79只ICR小鼠分为对照(13只)组、地西洋(化药阳性药, $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,13只)组、复方枣仁胶囊(中药阳性药, $12.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,13只)组和CLG低($2.36\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,13只)、中($4.72\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,14只,临床等效剂量)、高($9.44\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,13只)剂量组。对照组ig给予纯水,其余组分别给予相应药物,每天1次,连续14 d。

每天观察并记录动物的一般状况,包括毛色、活动、步态、神态、大便等。分别在分组前、给药第3、6、9、12、14天称体质量。

2.1.2 旷场实验 于第13天给药60 min后进行旷场实验。将各组小鼠分别置于旷场中央,拍摄并记录5 min之内的运动轨迹,统计各组小鼠活动的总路程、总时间及外围进入次数。

2.1.3 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验 于末次给药当天给药60 min后,各组均ip给予阈下剂量戊巴比妥钠(参考文献报道^[11]和预试验,设定使90%~100%动物不入睡的剂量,约 $35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),观察30 min,以实验小鼠翻正反射消失1 min以上为入睡,记录各组小鼠的入睡率、睡眠潜伏期和睡眠时间。

2.1.4 转棒实验 于第15天进行转棒实验,小鼠掉落后阻断红外,记录小鼠棒上停留时间。

2.2 CLG改善MCI模型小鼠认知和记忆功能作用研究

2.2.1 分组及给药 将60只昆明小鼠以Y迷宫实验训练结果为主要条件、体质量为次要条件随机分为对照(11只)组、模型(11只)组、多奈哌齐($3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,阳性药,10只)组和CLG低($2.36\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,9只)、中($4.72\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,9

只)、高(9.44 g·kg⁻¹, 10只)剂量组。每天1次,连续ig给药14 d,对照组和模型组ig给予等体积动物饮用水。给药第9天起,给药1 h后,除对照组外,ip 3 mg·kg⁻¹东莨菪碱制备MCI模型^[12],对照组ip等体积的生理盐水。于末次给药20 min后进行Y迷宫实验。第15天进行跳台实验。

2.2.2 一般状态观察 每天观察并记录动物的一般状况,包括毛色、活动、步态、神态、大便等。

2.2.3 Y迷宫实验 Y迷宫实验包含2个阶段,第1阶段为训练期,新异臂被隔板挡住,小鼠由起始臂放入,在起始臂和其他臂中自由活动10 min,训练结束后,小鼠被放回饲养笼。4 h后进行第2个阶段实验,第2个阶段为检测期,抽开新异臂隔板,小鼠由起始臂放入,在3个臂中自由活动5 min。录像记录5 min内每只小鼠在各个臂停留的时间和穿梭次数。数据统计:Y迷宫实验中,5 min内小鼠在新异臂的停留时间占总时间的百分比和进入新异臂的次数。

2.2.4 跳台实验 跳台实验包含2个阶段,第1个阶段为训练期,将小鼠放入装置内,受到电击3 min,训练结束后,小鼠被放回饲养笼。4 h后进行第2个阶段实验,第2个阶段为检测期,受到电击3 min。统计受到电击的次数。

2.2.5 体质量及脑质量 于解剖当天称体质量,取脑,称取脑质量并计算脑系数。

2.2.6 病理改变 将小鼠脱颈处死,迅速取出完整

的脑组织,用冰生理盐水冲洗血液,置于10%福尔马林溶液中固定,固定后的脑组织进行取材,取材位置需包含海马及大脑皮层结构,后用石蜡包埋,切片,HE染色,中性树胶封片,显微镜观察。

2.2.7 海马组织Ach、AchE、SOD、MDA、GSH含量检测 将小鼠脱颈处死,迅速取出完整的脑组织,分离出海马结构,放入液氮中冷冻,再转置于-80℃冰箱中保存,BCA试剂盒进行蛋白定量,ELISA法检测Ach、AchE、SOD、MDA、GSH水平。

2.3 统计学处理

数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 25.0数据分析软件进行统计学处理。组间比较使用单因素方差分析(ANOVA),方差齐时用LSD法,方差不齐时用Dunnett's T3进行两两之间比较。

3 结果

3.1 CLG镇静催眠作用和抗抑郁、抗疲劳作用研究

3.1.1 一般状态观察 给药期各组动物均未发生死亡,小鼠活动、步态等均正常,毛发有光泽,精神状态良好,反应敏捷,口、鼻、眼无异常分泌物,未见呼吸困难等异常改变,未见呕吐和腹泻等胃肠道反应。

3.1.2 CLG对正常小鼠体质量的影响 与对照组比较,第14天酸枣仁组小鼠体质量显著升高($P < 0.05$),其余各给药组无显著性变化。见表1。

表1 CLG对正常小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effects of CLG on normal mice body weight ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	体质量/g					
			分组	第3天	第6天	第9天	第12天	第14天
对照	—	13	25.09±1.78	26.47±1.82	28.99±2.25	29.65±2.42	30.65±2.55	31.05±2.65
地西洋	0.003	13	25.09±1.62	26.23±1.18	27.89±1.09	28.92±1.14	30.80±1.37	30.91±1.04
酸枣仁	0.012 3	13	24.91±1.65	27.04±1.88	28.94±1.65	30.12±2.26	32.34±2.19	32.63±2.23*
CLG	2.36	13	25.16±1.60	26.24±1.85	27.90±1.56	29.14±1.70	30.85±1.92	30.70±1.92
	4.72	14	24.95±1.68	26.16±1.96	27.66±2.04	28.75±2.30	30.44±2.49	30.59±2.48
	9.44	13	24.95±1.38	26.86±1.75	28.10±1.97	29.12±2.04	30.96±1.96	30.81±1.85

与对照组比较:* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.1.3 CLG对戊巴比妥钠阈下剂量催眠小鼠入睡情况的影响 对照组、地西洋组、酸枣仁组和CLG低、中、高剂量组动物入睡率分别为30.77%、53.85%、30.77%、53.85%、64.29%、69.23%,与对照组比较,地西洋组和CLG各给药组入睡率有增高趋势,但无显著性差异。与对照组相比,地西洋组和CLG高剂量组入睡潜伏期显著缩短($P < 0.05$),各给药组睡眠时间均显著延长($P < 0.01$)。见表2。

3.1.4 CLG对正常小鼠旷场实验的影响 与对照

组比较,地西洋组总路程和外围进入次数显著增多($P < 0.05$),其余给药组自主活动指标未见明显变化。见表3。

3.1.5 CLG对正常小鼠转棒实验的影响 如表4所示,与对照组比较,各给药组转棒停留时长无显著性差异。

3.2 CLG改善MCI模型小鼠认知和记忆功能作用研究

3.2.1 CLG对MCI小鼠Y迷宫实验的影响 与对照组比较,其余各组5 min内小鼠在新异臂的停留

表2 CLG对小鼠入睡情况的影响

Table 2 Effects of CLG on sleep condition of mice

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	入睡动物数/只	未入睡动物数/只	睡眠发生率/%	入睡潜伏期/min	睡眠时间/min
对照	—	13	4	9	30.77	8.29±1.02	7.19±0.66
地西洋	0.003	13	7	6	53.85	6.66±1.10*	43.57±6.15**
酸枣仁	0.012 3	13	4	9	30.77	7.32±0.45	28.35±3.52**
CLG	2.36	13	7	6	53.85	7.31±0.82	30.87±6.48**
	4.72	14	9	5	64.29	7.15±0.95	35.48±6.64**
	9.44	13	9	4	69.23	6.55±1.38*	46.56±7.44**

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs control group

表3 CLG对正常小鼠旷场实验的影响($\bar{x}\pm s$)Table 3 Effect of CLG on open field test of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	自主活动指标		
			总路程/mm	总时间/s	外围进入次数
对照	—	13	5 617.06±948.44	129.56±42.49	24.15±10.59
地西洋	0.003	13	7 265.41±2 565.17*	132.71±49.06	33.77±13.23*
酸枣仁	0.012 3	13	5 579.09±1 080.84	126.59±36.41	26.08±6.93
CLG	2.36	13	5 714.20±2 052.46	115.78±41.65	23.62±11.24
	4.72	14	5 726.33±1 105.37	112.68±33.24	22.79±10.38
	9.44	13	5 631.39±1 979.54	122.05±39.92	20.08±6.65

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

表4 CLG对正常小鼠转棒实验的影响($\bar{x}\pm s$)Table 4 Effect of CLG on rotating bar test of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	停留时间/s
对照	—	13	19.87±7.51
地西洋	0.003	13	16.18±7.38
酸枣仁	0.012 3	13	16.70±6.00
CLG	2.36	13	16.62±6.23
	4.72	14	17.47±7.83
	9.44	13	18.98±7.02

时间占总时间的百分比和进入新异臂的次数无统计学差异。见表5。

3.2.2 CLG对MCI小鼠跳台实验的影响 与对照组比较,模型组电击次数增加;与模型组比较,多奈哌齐组和CLG各剂量组电击次数均显著减少($P<0.05$)。见表6。

3.2.3 CLG对MCI小鼠脑系数的影响 与对照组比较,各组动物脑湿质量均无统计学差异,但CLG高剂量组脑系数显著升高($P<0.01$)。见表7。

3.2.4 各组小鼠大脑皮层和海马病理学比较 对照组皮层和海马均正常;模型组皮层细胞数目减

表5 CLG对MCI小鼠Y迷宫实验影响($\bar{x}\pm s$)Table 5 Effects of CLG on Y maze test in MCI mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	Y迷宫	
			新异臂的停留时间占比/%	新异臂进入次数
对照	—	11	26.37±3.79	10.45±2.98
模型	—	11	28.62±2.69	9.45±2.34
多奈哌齐	0.003	10	28.57±3.75	10.20±2.62
CLG	2.36	9	30.82±5.47	8.78±3.77
	4.72	9	29.52±4.23	9.56±2.24
	9.44	10	27.86±3.87	7.90±1.45

少,海马C3区局灶细胞松散,细胞数目减少;CLG低剂量组皮层细胞数目减少,海马细胞数目减少;多奈哌齐组和CLG中、高剂量组的皮层和海马病理改变显著改善。结果见图1、2。

3.2.5 CLG对MCI小鼠海马Ach、AchE、SOD、MDA和GSH水平的影响 与对照组相比,模型组Ach、GSH水平显著降低,AchE水平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,CLG中、高剂量组Ach有升高趋势;多奈哌齐组和CLG中、高剂量组AchE有降

表 6 CLG 对 MCI 小鼠跳台实验的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effects of CLG on platform experiment in MCI mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	电击次数
对照	—	11	6.5±5.3
模型	—	11	8.5±2.4
多奈哌齐	0.003	10	4.5±2.6 [#]
CLG	2.36	9	5.6±2.3 [#]
	4.72	9	5.3±3.1 [#]
	9.44	10	5.6±1.8 [#]

与模型组比较:[#] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs model group

低趋势;CLG 各剂量组 SOD 显著增高,MDA 显著降低($P < 0.05$)。见表 8。

4 讨论

原发性失眠是不仅是单纯的包括入睡困难和睡眠时间不足的睡眠障碍,还包括伴随不同情志障碍的一类身心疾病。据世界卫生组织统计,全球有失眠困扰的人数占 27%^[13],而中国内地有失眠症状的成人占比高达 57%^[14],发生率大大高于国外发达国家。同时,睡眠不足会导致其他机体疾病的发生,比如可能会使患心血管疾病及内分泌疾病的风险增高^[15]。目前的治疗主要是西医治疗,治疗方式

表 7 CLG 对 MCI 小鼠脑系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effects of CLG on brain coefficient in MCI mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	禁食体质量/g	脑湿质量/g	脑系数/%
对照	—	11	32.90±1.00	0.411±0.035	1.25±0.13
模型	—	11	32.42±1.96	0.408±0.030	1.26±0.11
多奈哌齐	0.003	10	30.92±2.45	0.419±0.020	1.36±0.07
CLG	2.36	9	31.53±3.19	0.402±0.037	1.28±0.11
	4.72	9	31.48±2.73	0.414±0.011	1.32±0.97
	9.44	10	26.92±2.33 ^{**}	0.425±0.024	1.59±1.14 ^{**}

与对照组比较:^{**} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group

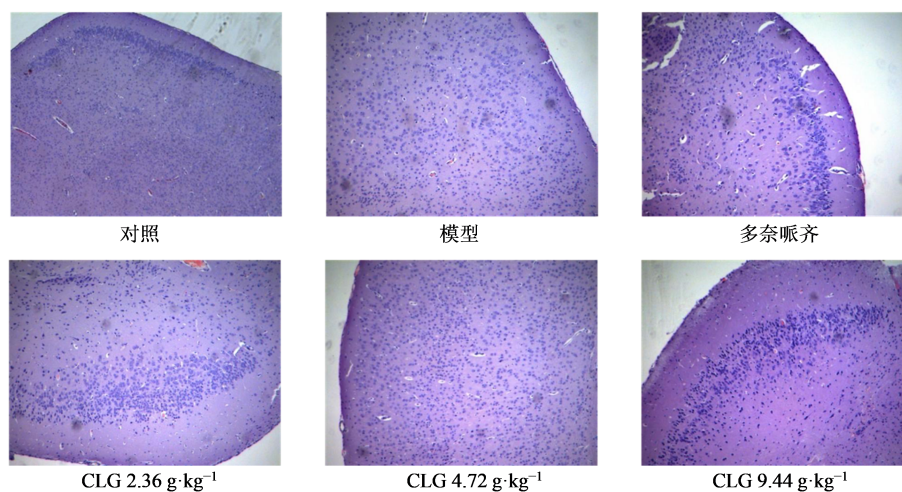


图 1 各组小鼠皮层组织微观病理改变(HE 染色)

Fig. 1 Microscopic pathological changes of cortical tissue in mice in each group (HE staining)

以口服药物为主,但长期使用可引起药物耐受性、成瘾性、戒断症状以及呼吸抑制等严重不良反应。因此,研发新类型的改善失眠的药物具有重要意义,整体有效提高大众的睡眠质量,降低失眠发生率,不仅是对个人健康的保障,也是对现代社会具有重要意义的重大医学防治任务。

CLG 可益脑安神,用于头痛、忧郁、癫痫、失眠,

为临床疗效确切的复方。随着科学技术的发展,传统中医药需要进行现代循证医学的验证才能广泛接受,其药效作用及机制研究需要进行实验验证。

本研究显示,CLG 对正常小鼠的体质量无显著影响;地西洋和 CLG 各给药组戊巴比妥阈下剂量催眠小鼠入睡率有增高趋势,但无显著性差异;地西洋组和 CLG 高剂量组能明显缩短入睡潜伏期;

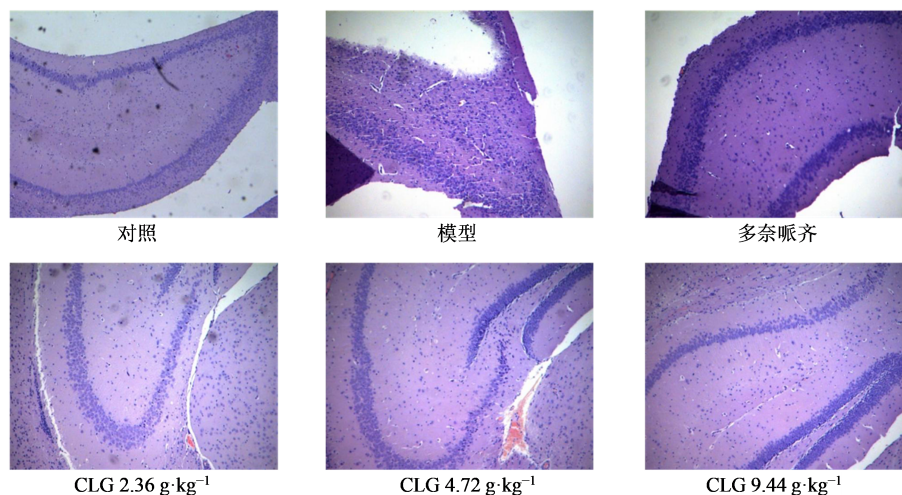


图2 小鼠海马组织微观病理改变(HE染色)

Fig. 2 Microscopic pathological changes of hippocampal tissue in mice (HE staining)

表8 CLG对MCI小鼠海马Ach、AchE、SOD、MDA和GSH水平的影响($\bar{x} \pm s$)Table 8 Effects of CLG on Ach, AchE, SOD, MDA and GSH level in hippocampus of MCI mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	Ach/(ng·mL ⁻¹)	AchE/(nmol·L ⁻¹)	SOD/(ng·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	GSH/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	6	10.77±1.66	69.33±5.09	22.82±1.39	2.39±0.22	2.78±0.22
模型	—	8	8.07±2.32*	98.96±34.10*	22.14±1.35	2.52±0.32	2.15±0.46*
多奈哌齐	0.003	6	9.67±1.60	78.71±13.70	23.37±2.85	2.49±0.19	2.24±0.32
CLG	2.36	6	7.57±2.42*	93.03±9.91	28.12±0.44#	2.11±0.06#	1.90±0.30
	4.72	6	8.43±2.19*	89.02±10.69	28.76±2.37#	1.89±0.16#	2.14±0.50
	9.44	8	8.85±1.13	87.40±9.99	29.43±1.51#	1.80±0.13#	2.52±0.25

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

CLG各剂量组能明显延长睡眠时间。

有研究表明,失眠可能与抑郁、焦虑等精神障碍共病,且互相影响。流行病学研究结果显示,40%~92%的失眠症状是由精神疾病导致的^[16-17],失眠、抑郁、焦虑三者互为共病,且均为常见的临床症状,约70%以上的抑郁患者伴有失眠症状^[18]。

旷场实验可评价小鼠的抑郁焦虑状态,本研究显示,与对照组比较,地西洋组总路程和外围进入次数显著增多($P < 0.05$),可能与小鼠的自主活动差异较大并不稳定有关,且地西洋具有抗抑郁的作用,可能会导致小鼠活动的路程增加且活动范围增大。CLG各剂量组在旷场实验中活动的总路程、总时间及外围进入次数与对照组均无统计学差异,提示CLG对小鼠焦虑、探索等自主行为没有明显影响,表明CLG无明显的中枢兴奋或抑制作用。转棒实验显示CLG无明显的抗疲劳作用。

薰衣草精油中含有的芳樟醇、乙酸芳樟酯等成分,具有镇静催眠、解痉、抗菌、抗氧化和神经保护

等作用^[19]。有研究表明^[20],薰衣草能提高A β 寡聚物作用24 h后细胞的活力,并能减少细胞核形态的异常,抑制A β 寡聚物诱导的细胞内活性氧生成的增加和促凋亡酶caspase-3的激活,其主要成分芳樟醇可能是治疗A β 诱导的神经毒性的天然药物。

薰衣草精油是治疗AD的传统药物。有研究表明^[21-22],薰衣草精油和芳樟醇对认知障碍有明显的保护作用,显著改善SOD活性的降低,以及AchE活性和MDA含量的增加。

本研究中,CLG高剂量组小鼠禁食后体质量较对照组和MCI模型组显著减少,可能是由于药物较浓稠,使小鼠进食受到影响,从而体质量增长缓慢,脑湿质量无显著变化,但脑系数由于体质量相对较小而显著增高。Y迷宫实验和跳台实验可评价小鼠的学习记忆能力,实验中模型组与对照组比较无显著性差异,由于小鼠个体之间的差异较大,只能尽量通过控制环境变化、预实验挑选小鼠避免,实验数据虽无统计学差异,但有明显趋势,这也许与SD

值较大有关^[23];东莨菪碱造模后小鼠呈现眼神呆滞、动作缓慢等初步痴呆状态,且病理结果显示,模型组小鼠皮层细胞数目减少,海马C3区局灶细胞松散,细胞数目减少;东莨菪碱阻断ACh对M受体的激动作用,与对照组相比,模型组ACh显著降低,AChE显著升高。综合研判,认为MCI模型制备成功。与MCI模型组比较,多奈哌齐组和CLG各给药组跳台次数均显著减少;且海马细胞趋于正常,说明CLG对学习记忆功能有改善作用。

近期、短期的记忆主要储存于海马区,当记忆片段经过反复刺激变成长期记忆时,海马区就会将这些记忆转至大脑皮层中进行储存。AD患者中,海马被认为是最早的受损区域之一,患者在AD早期时,海马就呈现萎缩和细胞损伤,且主要在海马区改变,基本不涉及其他脑结构,所以海马萎缩是诊断AD的重要指标之一,具有重要意义^[24]。本研究病理结果显示,CLG对海马和大脑皮层均具有一定的保护作用。

胆碱能系统在大脑神经元促进突触可塑性、改善学习、记忆和认知方面起重要作用,脑内胆碱能神经系统的退化是造成AD的主要原因之一。东莨菪碱可阻断ACh对M受体的激动作用,从而造成学习和记忆功能障碍。而多奈哌齐通过增强ACh能神经的功能而发挥治疗作用,它可逆性地抑制AChE对ACh的水解,从而提高ACh的浓度。与模型组比较,CLG各给药组ACh有升高趋势,多奈哌齐组和CLG中、高剂量组AChE有降低趋势,说明CLG对胆碱能系统具有一定的改善作用。

SOD能清除和减少自由基而延缓衰老,MDA是脂质的过氧化过程中产物之一,所以MDA含量可有效地反映机体内脂质过氧化的程度。而GSH是一种过氧化物分解酶,可清除机体自由基,其含量可体现机体对氧自由基的清除能力。与模型组比较,CLG各剂量组小鼠脑内海马组织中MDA含量显著降低,SOD活性显著增加,说明CLG可以调节氧化应激,激活抗氧化酶活性,清除细胞内堆积的过氧化产物,发挥神经保护作用。

本研究结果表明,CLG具有镇静催眠作用,其改善MCI的作用可能与调节胆碱能系统和抗氧化应激有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国睡眠研究会. 中国失眠症诊断和治疗指南 [J]. 中

华医学杂志, 2017, 97(24): 1844-1856.

China Sleep Research Association. Guidelines for diagnosis and treatment of insomnia in China [J]. Natl Med J China, 2017, 97(24): 1844-1856.

[2] Riemann D, Spiegelhalder K, Feige B, et al. The hyperarousal model of insomnia: A review of the concept and its evidence [J]. Sleep Med Rev, 2010, 14(1): 19-31.

[3] Bennett D A, Schneider J A, Bienias J L, et al. Mild cognitive impairment is related to Alzheimer disease pathology and cerebral infarctions [J]. Neurology, 2005, 64(5): 834-841.

[4] Tombaugh T N, McIntyre N J. The mini-mental state examination: A comprehensive review [J]. J Am Geriatr Soc, 1992, 40(9): 922-935.

[5] Petersen R C, Thomas R G, Grundman M, et al. Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment [J]. N Engl J Med, 2005, 352(23): 2379-2388.

[6] 刘旭珂, 侯家保, 夏中元. 睡眠剥夺在认知功能障碍发病中的作用机制研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2020, 19(9): 958-962.

Liu X K, Hou J B, Xia Z Y. Research progress on the mechanism of sleep deprivation in the pathogenesis of cognitive dysfunction [J]. Chin J Diff Compl Cases, 2020, 19(9): 958-962.

[7] 于逢春, 周正宏. 睡眠障碍与认知功能障碍研究进展 [J]. 中国卒中杂志, 2016, 11(11): 966-972.

Yu F C, Zhou Z H. Research progress of sleep disorder and cognitive function [J]. Chin J Stroke, 2016, 11(11): 966-972.

[8] 徐攀, 王克柱, 卢聪, 等. 薰衣草对神经系统药理作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(10): 1298-1302.

Xu P, Wang K Z, Lu C, et al. Research progress on neurological activities of *Lavandula angustifolia* [J]. Drugs Clin, 2015, 30(10): 1298-1302.

[9] 买买提依力·努尔买买提, 海如拉·木萨, 吐尔洪·阿西木, 等. 维吾尔医药治疗失眠症住院病历回顾性调查分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(9): 16-18.

Nurmuhammat M, Musa A, Axim T, et al. Retrospective investigation on hospitalized records of uygur medical treatment for insomnia [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2013, 20(9): 16-18.

[10] 买买提艾力·努尔买买提, 吐尔洪·阿西木, 海如拉·穆萨. 维吾尔药治疗失眠症60例疗效观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17(9): 29-30.

Maimaitiali N, Turhun A, Helula M. Clinical observation of 60 patients with insomnia treated with Uyghur medicine [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2011, 17(9): 29-30.

[11] 何伟, 王莉, 黄景凤, 等. 罗布麻叶水提物镇静催眠作

- 用研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(2): 274-280.
- He W, Wang L, Huang J F, et al. Sedative and hypnotic effects of water extract of *Apocynum venetum* leaves [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(2): 274-280.
- [12] 谭雪, 高莉, 任佳, 等. 类叶升麻苷对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(23): 2812-2818.
- Tan X, Gao L, Ren J, et al. To improve the effect of acteoside on learning and memory impairment in mice induced by scopolamine [J]. Chin J New Drugs, 2018, 27(23): 2812-2818.
- [13] Taylor D J, Lichstein K L, Durrence H H. Insomnia as a health risk factor [J]. Behav Sleep Med, 2003, 1(4): 227-247.
- [14] 陆峥. 失眠症的诊断和药物治疗现状 [J]. 世界临床药物, 2011, 32(4): 193-199.
- Lu Z. Current situation of insomnia in the diagnosis and drug therapy [J]. World Clin Drugs, 2011, 32(4): 193-199.
- [15] Glos M, Fietze I, Blau A, et al. Cardiac autonomic modulation and sleepiness: Physiological consequences of sleep deprivation due to 40 h of prolonged wakefulness [J]. Physiol Behav, 2014, 125: 45-53.
- [16] Johnson E O, Roth T, Breslau N. The association of insomnia with anxiety disorders and depression: Exploration of the direction of risk [J]. J Psychiatr Res, 2006, 40(8): 700-708.
- [17] Oh C M, Kim H Y, Na H K, et al. The effect of anxiety and depression on sleep quality of individuals with high risk for insomnia: A population-based study [J]. Front Neurol, 2019, 10: 849.
- [18] Geoffroy P A, Hoertel N, Etain B, et al. Insomnia and hypersomnia in major depressive episode: Prevalence, sociodemographic characteristics and psychiatric comorbidity in a population-based study [J]. J Affect Disord, 2018, 226: 132-141.
- [19] 王玉芹, 孙亚军, 施献儿. 薰衣草精油的化学成分与药理活性 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2004, 19(1): 5-8.
- Wang Y Q, Sun Y J, Shi S E. Chemical constituents and pharmacological activities of lavender oil [J]. Drugs Clin, 2004, 19(1): 5-8.
- [20] Caputo L, Piccialli I, Ciccone R, et al. Lavender and coriander essential oils and their main component linalool exert a protective effect against amyloid- β neurotoxicity [J]. Phytother Res, 2021, 35(1): 486-493.
- [21] Xu P, Wang K Z, Lu C, et al. The protective effect of lavender essential oil and its main component linalool against the cognitive deficits induced by D-galactose and aluminum trichloride in mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 7426538.
- [22] 陈和平, 曾洪燕, 许波, 等. 薰衣草精油对血管性痴呆大鼠认知功能的影响 [J]. 四川医学, 2014, 35(5): 525-527.
- Chen H P, Zeng H Y, Xu B, et al. Effects of lavender oil on the cognitive function in vascular dementia rats [J]. Sichuan Med J, 2014, 35(5): 525-527.
- [23] 张婧. 孕酮对东莨菪碱致大鼠认知功能障碍的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- Zhang J. Effects of progesterone on scopolamine induced cognitive dysfunction in rats [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.
- [24] Tae W S, Kim S S, Lee K U, et al. Validation of hippocampal volumes measured using a manual method and two automated methods (FreeSurfer and IBASPM) in chronic major depressive disorder [J]. Neuroradiology, 2008, 50(7): 569-581.

[责任编辑 兰新新]