

紫河车冻干粉改善睡眠作用及机制研究

车云¹, 任季禹^{2*}, 韩聪³, 黄绍菊⁴, 张云³, 臧传宝², 张姗姗³, 付开玲², 刘可春³, 夏青^{3*}

1. 陕西城固县医院 妇产科, 陕西 汉中 723200

2. 银丰低温医学科技有限公司, 山东 济南 250000

3. 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250013

4. 单县妇幼保健计划生育服务中心, 山东 菏泽 274300

摘要: 目的 研究紫河车冻干粉改善睡眠的作用及机制。方法 利用ip氯苯丙氨酸(PCPA)法制备大鼠失眠模型, 设置对照组、模型组和紫河车冻干粉低、中、高剂量(0.09、0.18、0.36 g·kg⁻¹)组, 每天ig给药1次, 连续给药7 d, 对照组和模型组ig等量去离子水。通过检测体质量增长量、一般观察、翻正实验、旷场实验、强迫游泳实验、悬尾实验评价紫河车冻干粉改善睡眠的作用; 利用Western blotting技术检测γ-氨基丁酸转氨酶(GABA-T)、谷氨酸脱羧酶-65(GAD65)、γ-氨基丁酸转运体1(GAT1)蛋白的表达水平。结果 与模型组比较, 紫河车冻干粉低、中、高剂量组大鼠体质量增加量显著升高($P<0.01$); 中、高剂量紫河车冻干粉具有显著缩短睡眠潜伏期($P<0.05$)、显著延长睡眠时间($P<0.01$)的作用; 高剂量紫河车冻干粉使大鼠中央格停留时间显著延长($P<0.01$)、中央格穿格次数显著增多($P<0.05$)、站立次数和修饰次数显著增多($P<0.01$), 说明高剂量紫河车冻干粉能够减轻失眠大鼠焦虑情绪, 增强自发探索活动能力; 高剂量紫河车冻干粉使大鼠漂浮时间缩短($P<0.05$), 挣扎时间延长($P<0.01$), 说明高剂量紫河车冻干粉能够减轻失眠大鼠的抑郁状态。Western blotting结果显示, 与模型组相比, 紫河车冻干粉处理组大鼠下丘脑组织中GABA-T的表达水平显著降低($P<0.05$), GAD65、GAT-1的表达水平显著升高($P<0.05$ 、0.01)。结论 紫河车冻干粉可能通过调控GABA-T、GAD65、GAT-1蛋白的表达水平, 发挥改善睡眠的作用。

关键词: 紫河车冻干粉; 改善睡眠; 蛋白免疫印迹; GABA能系统通路; 作用机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)02-0316-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.02.011

Research on effect and mechanism of Ziheche lyophilized powder to improve sleep

CHE Yun¹, REN Jiyu², HAN Cong³, HUANG Shaoju⁴, ZHANG Yun³, ZANG Chuanbao², ZHANG Shanshan³, FU Kailing², LIU Kechun³, XIA Qing³

1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Country Hospital of Chenggu, Hanzhong 723200, China

2. Yinfeng Low Temperature Medical Technology Co., Ltd., Jinan 250000, China

3. Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250013, China

4. Maternal and Child Health and Family Planning Service Center of Shanxian, Heze 274300, China

Abstract: Objective To study the sleep-improving effect and mechanism by of Ziheche lyophilized powder (ZLP). **Methods** To establish the rat insomnia model by intraperitoneal injection of chlorophenylalanine (PCPA). The rats were divided into control group, model group, and low, medium, and high concentration groups (0.09, 0.18, and 0.36 g·kg⁻¹) of ZLP. Ig once a day for seven consecutive days, with the control group and model group receiving an equal amount of deionized water. The effect of ZLP on improving sleep was evaluated through general observation, righting experiment, open field experiment, forced swimming

收稿日期: 2023-09-06

基金项目: 山东省科技型中小企业技术创新能力提升工程项目(2022TSGC1036, 2022TSGC2003); 山东省中央引导地方科技发展资金项目(YDZX2022164)

第一作者: 车云(1973—), 副主任医师, 主要从事高危产科救治及妇科微创技术。E-mail: 1933498773@qq.com

*共同通信作者: 任季禹, 中级工程师, 研究方向为冻干技术产品和服务的开发及应用。E-mail: renjiyu@yinfeng.com.cn

夏青, 副研究员, 山东省科学院生物研究所, 研究方向为中药药效物质及作用机制。E-mail: sdxq1021@163.com

experiment, and tail suspension experiment, and the Western blotting technique was used to detect the expression levels of GABA-T, GAD65, and GAT-1 proteins, and preliminarily explore the mechanism of ZLP in improving sleep. **Results** Compared with the model group, the body weight increase of rats in the low, medium, and high dose groups of ZLP was significantly increased ($P < 0.01$), medium and high doses of ZLP have the effect of shortening sleep latency ($P < 0.05$) and prolonging sleep time ($P < 0.01$), a high dose of ZLP prolonged the retention time of the central grid ($P < 0.01$), increased the number of times the central grid was pierced ($P < 0.01$), and increased the number of standing and modification times in rats ($P < 0.01$), indicating that high-dose ZLP can reduce anxiety in insomnia rats ($P < 0.05$) and enhance their spontaneous exploration activity ability ($P < 0.01$); high dose ZLP shortened the floating time ($P < 0.05$) and prolonged the struggling time of rats ($P < 0.01$), indicating that high-dose ZLP can alleviate the depressive state of insomnia rats. Western blotting results showed that compared with the model group, the expression level of GABA-T in the hypothalamic tissue of rats treated with ZLP decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of GAD65 and GAT-1 increased ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** ZLP may improve sleep by regulating the expression levels of GABA-T, GAD65, and GAT-1 proteins.

Key words: Ziheche lyophilized powder; improve sleep; Western blotting; GABA acid system access; mechanism of action

失眠是一种最常见的睡眠障碍,临床主要症状表现为长时间、高频次入睡困难,睡眠时间短、易醒,睡眠质量低、深度不足,同时伴随容易疲劳、情绪不佳、躯体不适、注意力不集中、反应迟钝等日间功能障碍^[1]。随着现代人们学习、工作、生活压力的不断增大,失眠人群越来越多。据流行病学调查显示,我国慢性失眠患病率约为15%,短期失眠发生率可达30%~50%^[2]。短期失眠会使人们日常工作和学习效率降低,长期失眠可能会引发一系列代谢综合征、抑郁以及心血管疾病等,严重影响患者的身心健康和正常生活^[3]。西医认为失眠与谷氨酸和 γ -氨基丁酸等多种脑内神经递质有关,临床上常用苯二氮草类受体激动剂、褪黑素受体激动剂和抗抑郁药物等提高患者睡眠质量,但这些药物可能导致成瘾性,并且具有一定的副作用^[4]。中医认为失眠属于“不寐”范畴,病因主要是阴阳失调、气血失和、五脏功能失调等,主要用中药汤剂、针灸、推拿等调整阴阳,治疗失眠^[5]。

紫河车作为一种药物及保健养生品在我国已有悠久的历史。《本草纲目》中记载:“紫河车性温。益气养血,补肾益精;久服耳聪目明,须发黑;延年益寿,有夺造化之功”。现代药理研究表明,紫河车含有多种激素、免疫因子、氨基酸、酶及酶抑制剂、微量元素、维生素以及胶原蛋白等活性物质,具有增强机体抵抗力、提高免疫力、抗病毒、抗癌等作用,临床可用于治疗呼吸系统疾病、神经肌肉系统疾病、消化系统疾病和妇科疾病等^[6]。但是既往关于紫河车改善睡眠的作用少有报道,且缺乏机制研究。

本研究采用ip氯苯丙氨酸(PCPA)法复制大鼠失眠模型,给予紫河车冻干粉治疗,通过一般观察、

翻正实验、旷场实验、强迫游泳实验、悬尾实验评价紫河车冻干粉改善睡眠的作用,并利用Western blotting技术检测 γ -氨基丁酸转氨酶(GABA-T)、谷氨酸脱羧酶-65(GAD65)、 γ -氨基丁酸转运体1(GAT1)蛋白的表达水平,初步探讨紫河车冻干粉改善睡眠的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

50只健康雄性SD大鼠,体质量(200 ± 20)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(鲁)2019-0003。动物饲养于山东省科学院动物房,饲养环境为温度(22 ± 2)°C、湿度(50 ± 10)%和光照控制12 h/12 h明暗循环,光照时间为8:00~22:00,饲养期间自由进食进水。动物实验经山东省科学院生物研究所实验动物福利伦理委员会批准,动物实验伦理号为SWS20220926。

1.2 药品与主要试剂

紫河车冻干粉样品是由银丰低温医学科技有限公司提供的人源胎盘冷冻干燥粉末,胎盘由山东省妇幼保健院产妇捐献,捐献及后续处理当事人均知情并同意。人源胎盘使用过程严格遵照《卫生部关于产妇分娩后胎盘处理问题的批复》(卫政法发[2005]123号)的相关规定。紫河车冻干粉由去除胎盘羊膜及周边组织的新鲜胎盘,经搅碎、冷冻干燥后研磨成粉制成的,其主要成分为蛋白质,质量分数为75.4%^[7]。

PCPA(Sigma公司,批号20131101-17);BCA蛋白含量测定试剂盒(批号SW101-02)、RIPA裂解液(批号SW104-02)、SDS-PAGE电泳液(批号P00-14B)均购自碧云天公司;SDS-PAGE凝胶快速配制

试剂盒(批号SW109-01)、转膜缓冲液(干粉)(批号SW118-01)均购自赛文创新(北京)生物科技有限公司;GAPDH(批号A19056)、GABA-T(批号A9146)、GAD65(批号20746-1-AP)、GAT-1(批号28488-1-AP)一抗以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(批号AS014)购自proteintech公司。

1.3 主要仪器

5804R离心机(Eppendorf);BMG LABTECH多功能酶标仪(广州伯齐生物科技有限公司);蛋白电泳电转系统(Bio-RAD);Odyssey Fc化学发光显影仪(Gene Company Limited)。

2 方法

2.1 失眠模型的建立及给药

SD大鼠适应性饲养7 d后,随机分为对照组(10只)和造模组(40只)。造模组采用ip PCPA法复制大鼠失眠模型,用弱碱性0.9%氯化钠溶液将PCPA配制成混悬液,按照 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 于每日8:00~8:30对模型组大鼠进行ip,连续2 d^[8]。用戊巴比妥钠翻正实验评价模型成功与否。将造模成功的大鼠随机分为模型组和紫河车冻干粉低、中、高剂量(0.09 、 0.18 、 $0.36\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组10只。将紫河车冻干粉溶于去离子水中进行ig,对照组和模型组ig等量去离子水,每天1次,连续给药7 d。

2.2 改善睡眠活性评价

2.2.1 一般观察 观察各组大鼠的精神状态、记录体质量变化等。

2.2.2 翻正实验 分别于第2次ip和末次给药8 h后,对大鼠进行ip戊巴比妥钠 $35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[9],以大鼠翻正反射消失达1 min以上作为入睡判断标准,翻正反射消失至恢复为睡眠时间,记录各组大鼠ip时刻、入睡时刻和苏醒时刻,计算其睡眠潜伏期和睡眠持续时间。

2.2.3 旷场实验 根据参考文献方法^[10]自制旷场实验箱,旷场实验箱规格为:100 cm×100 cm×30 cm,箱壁及箱底均为黑色,底部分为25个20 cm×20 cm的方格,视沿墙方格为外周格,其余为中央格。于第6天给药30 min后,将大鼠从同一角度放置于旷场实验箱正中心,用摄像头录制实验全过程。当大鼠四爪均进入另一方格时视为穿格;当大鼠两前肢离地或攀附箱壁时视为站立;当大鼠清洁理毛时视为修饰。记录各组大鼠5 min内中央格停留时间、中央格穿格次数、中心穿格数百分比、站立次数、修饰次数。

2.2.4 强迫游泳实验 于第7天给药30 min后,将

大鼠依次放在强迫游泳设备中,其中水的高度30 cm(水温25℃)。用摄像头录制实验全过程,当大鼠主动绕水面游动时视为游泳;当大鼠逃脱意图强烈,前爪上下剧烈运动,攀爬墙面时视为挣扎行为;当大鼠基本不动,仅头部浮于水面上方时视为漂浮行为。观察6 min并记录各组大鼠后4 min内游泳时间(s)、挣扎时间(s)、漂浮行为(不动)的持续时间^[11]。

2.2.5 悬尾实验 强迫游泳实验结束后,将大鼠尾根部1/3处用胶带固定在悬尾仪器挂钩上,使大鼠头部朝下,用摄像头录制实验全过程,记录各组大鼠6 min内不动时间(s)和挣扎次数(次)^[16]。

2.3 改善睡眠作用机制初步研究

给药结束后第2天,用 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠将各组大鼠麻醉,迅速剥离大鼠下丘脑,并保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出各组大鼠下丘脑组织,加入RIPA裂解液超声匀浆, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min后收集上清,采用BCA试剂盒测定各组大鼠下丘脑组织总蛋白浓度,将各组蛋白样品定量为20 μg。配制10%分离胶和5%浓缩胶,上样4 μL蛋白样品并电泳,再电转到PVDF膜上,用脱脂奶粉封闭1.5 h后,加入一抗GABA-T(1:1 000)、GAD65(1:1 000)、GAT-1(1:1 000)、GAPDH(1:10 000),4℃孵育过夜,用1×TBST洗膜3次,每次10 min,再用二抗室温孵育1.5 h,洗膜3次后用ECL显影液进行显影,用Image J软件统计各目标条带的灰度值。

2.4 数据处理

利用数据处理软件GraphPad Prism 8分析数据,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间差异性采用One-way ANOVA进行检验。

3 结果

3.1 一般观察

对照组大鼠精神状态和日常活动均正常,毛色洁白有光泽;与对照组相比,模型组大鼠毛发略粗糙,对外界刺激敏感;与模型组相比,紫河车冻干粉组大鼠毛发和精神状态有所改善。如表1所示,与对照组相比,模型组大鼠体质量增加量显著降低($P<0.01$);与模型组相比,紫河车冻干粉低、中、高剂量组大鼠体质量增加量显著升高($P<0.01$),且呈剂量相关性。

3.2 翻正实验结果

如图1所示,与对照组相比,模型组大鼠睡眠潜

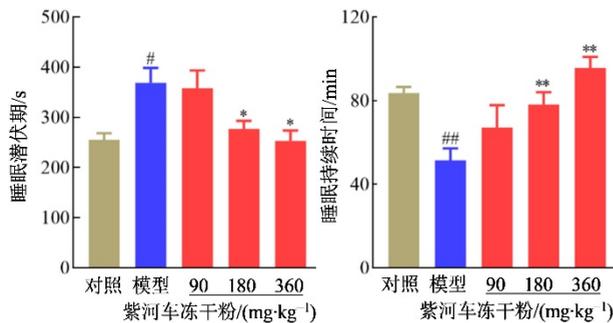
表1 紫河车冻干粉对大鼠体质量的影响

Table 1 Effect of Zihe lyophilized powder on body weight of rats

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g				体质量增加量/g
		第0天	第7天	第9天	第16天	
对照	—	219.2±9.2	239.8±9.6	251.4±5.6	272.3±4.8	53.1
模型	—	221.0±7.3	240.6±8.4	244.5±15.3	248.7±14.2	27.7 ^{##}
紫河车冻干粉	90	218.5±20.0	235.5±15.3	238.8±16.7	252.4±13.9	33.9 ^{**}
	180	216.7±16.2	237.2±12.9	240.3±17.9	255.3±15.6	38.6 ^{**}
	360	217.9±5.4	236.7±6.7	240.7±11.8	260.2±8.9	42.3 ^{**}

与对照组比较：^{##} $P < 0.01$ ；与模型组相比：^{**} $P < 0.01$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group.



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

图1 戊巴比妥钠翻正实验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 1 Results of pentobarbital sodium reversal experiment ($\bar{x} \pm s, n=6$)

伏期显著延长($P < 0.05$)；与模型组相比，紫河车冻干粉组大鼠睡眠潜伏期呈剂量相关性缩短，且中、高剂量组与模型组相比具有显著性差异($P < 0.05$)，说明中、高剂量紫河车冻干粉具有缩短睡眠潜伏期的作用。

与对照组相比，模型组大鼠睡眠持续时间显著缩短($P < 0.01$)；与模型组相比，紫河车冻干粉处理组大鼠睡眠时间呈剂量相关性延长，且中、高剂量组与模型组相比具有显著性差异($P < 0.01$)，说明中、高剂量紫河车冻干粉具有延长睡眠时间的的作用。

3.3 旷场实验结果

如图2所示，与对照组相比，模型组大鼠中央格停留时间显著缩短($P < 0.01$)；与模型组相比，高剂量紫河车冻干粉组大鼠中央格停留时间显著延长($P < 0.01$)。

与对照组相比，模型组大鼠中央格穿格次数显著减少($P < 0.01$)；与模型组相比，高剂量紫河车冻干粉组大鼠中央格穿格次数显著增多($P < 0.05$)。

与对照组相比，模型组大鼠中心穿格数百分比显著降低($P < 0.01$)；与模型组相比，紫河车冻干粉组大鼠中心穿格数百分比呈升高趋势，但差异无统计学意义。

与对照组相比，模型组大鼠站立次数显著减少($P < 0.01$)；与模型组相比，高剂量紫河车冻干粉组大鼠站立次数显著增多($P < 0.01$)。

与对照组相比，模型组大鼠修饰次数显著减少($P < 0.01$)；与模型组相比，高剂量紫河车冻干粉组大鼠修饰次数显著增多($P < 0.01$)。

3.4 强迫游泳实验

如图3所示，与对照组相比，模型组大鼠漂浮时间显著延长($P < 0.01$)；与模型组相比，高剂量紫河车冻干粉组大鼠漂浮时间显著缩短($P < 0.05$)。与对照组相比，模型组大鼠挣扎时间显著缩短($P < 0.01$)；与模型组相比，高剂量紫河车冻干粉组大鼠挣扎时间显著延长($P < 0.01$)。各组大鼠游泳时间无显著性差异。

3.5 悬尾实验结果

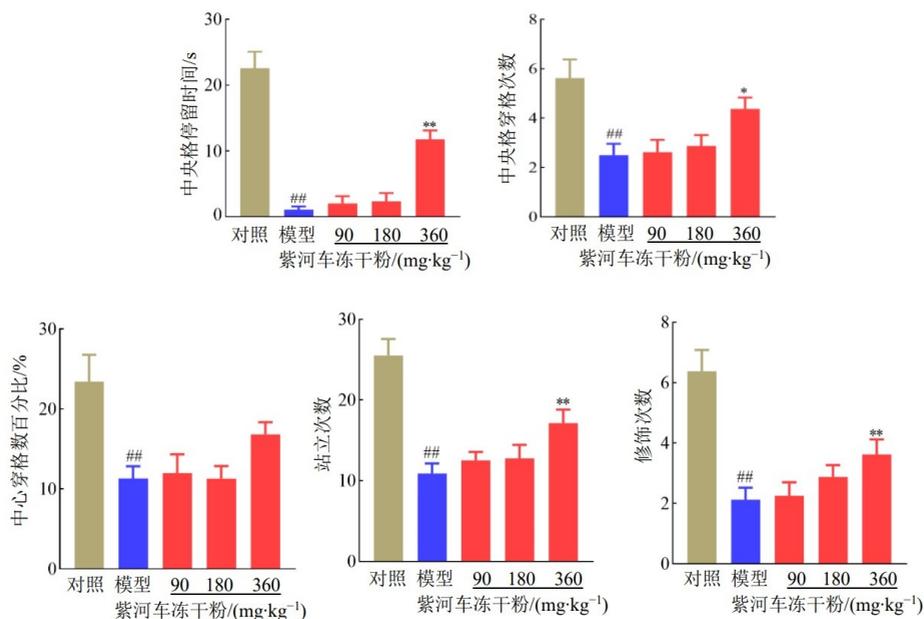
如图4所示，各组大鼠挣扎次数无显著性差异。与对照组相比，模型组大鼠悬尾不动时间显著延长($P < 0.05$)；与模型组相比，紫河车冻干粉处理大鼠不动时间呈缩短趋势。

3.6 改善睡眠作用机制初步研究

如图5所示，与对照组相比，模型组大鼠下丘脑组织中GABA-T的表达水平升高($P < 0.05$)，GAD65、GAT-1的表达水平降低($P < 0.01, 0.001$)；与模型组相比，紫河车冻干粉组大鼠下丘脑组织中GABA-T的表达水平降低($P < 0.05$)，GAD65表达水平显著升高($P < 0.05, 0.01$)、紫河车高剂量组GAT-1的表达水平升高($P < 0.05$)。

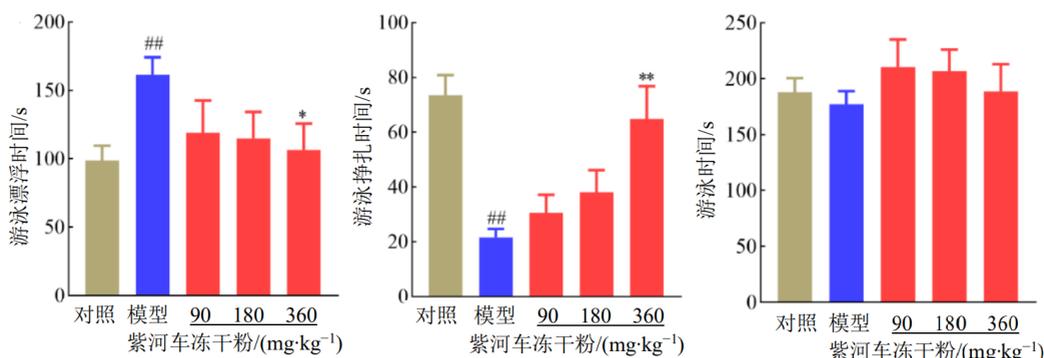
4 讨论

随着现代人们生活节奏的加快和学习、工作压



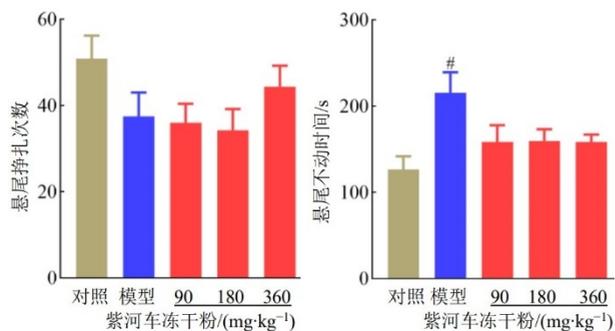
与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 2 旷场实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 2 Result of open field test ($\bar{x} \pm s, n=8$)



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.

图 3 强迫游泳实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 3 Result of forced swimming test ($\bar{x} \pm s, n=8$)

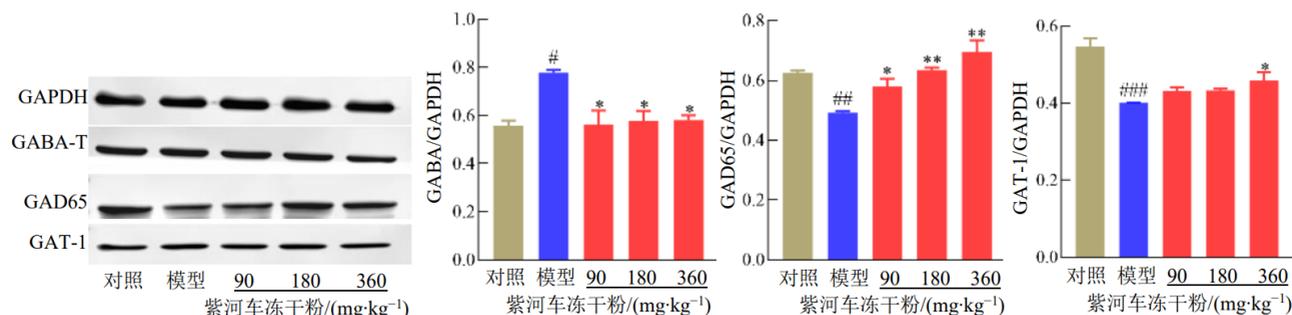


与对照组比较: # $P < 0.05$ 。
$P < 0.05$ vs control group.

图 4 悬尾实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 4 Result of tail suspension test ($\bar{x} \pm s, n=8$)

力的增大,失眠症的发病率逐年增高,因此,对于失眠症的治疗面临巨大的挑战^[12-13]。紫河车冻干粉融合传统中药与现代冻干技术,极大地保留了紫河车原有的价值,具有调节身体内分泌、增加机体免疫功能等多种作用,值得临床上进一步研究和应用。

现代研究发现,口服紫河车可以改善患者睡眠障碍,延缓阿尔茨海默病进展^[14]。此外,紫河车提取物也可改善绝经后女性的睡眠和疼痛^[15]。但是紫河车冻干粉是否具有改善睡眠作用以及其潜在机制尚无报道。本研究结果表明,紫河车冻干粉处理可有效改善PCPA诱导的失眠模型大鼠的失眠情况,可以缩短睡眠潜伏期、延长睡眠时间,可以延长



与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组相比: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图5 改善睡眠作用机制研究结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Research results on mechanism of improving sleep ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

大鼠中央格停留时间、增加中央格穿格次数、站立次数和修饰次数,可以缩短大鼠漂浮时间、延长挣扎时间,可以降低大鼠下丘脑组织中GABA-T的表达水平,升高大鼠下丘脑组织中GAD65、GAT-1的表达水平。

现代医学研究结果显示,失眠疾病机制主要涉及大脑皮层、海马、下丘脑等脑内结构,与脑内抑制性GABA/兴奋性谷氨酸(Glu)神经递质平衡失调密切相关^[16]。GABA的合成和代谢、传导和转运环节发生变化都会间接地影响GABA的含量,进而影响睡眠^[17]。在脑内GABA代谢过程中,GABA-T是一种关键酶,其代谢异常会直接影响GABA与Glu含量的变化,在中枢神经系统“兴奋-抑制”平衡过程中具有重要的调节作用^[18]。有研究表明,GABA-T活力降低会使小鼠脑组织中GABA的含量明显升高^[19]。GABA是由GAD脱羧后形成的。GAD包含2种同工酶:GAD65和GAD67,GAD65主要分布在神经元的突触,与惊厥、焦虑等神经性疾病相关,GAD67的主要作用是合成GABA^[20]。GAD不仅可以调控GABA的合成,而且还可以影响大脑中GABA的水平。在GABA转运过程中,会受到GABA转运体(GAT)的影响。GAT是一种Na⁺/Cl⁻依赖性GABA转运体,主要存在突触前膜、囊泡膜、或者神经胶质细胞膜上^[21]。GAT-1是其最主要的亚型,主要位于神经元及胶质膜突触间隙中,承担GABA突触间转运和再摄取任务^[22]。

本研究采用ip PCPA法复制大鼠失眠模型,给予紫河车冻干粉处理,通过一般观察、翻正实验、旷场实验、强迫游泳实验以及悬尾实验证实了紫河车冻干粉具有改善睡眠的作用。此外,检测了GABA-T、GAD65、GAT-1蛋白的表达水平,首次初步阐明紫河车冻干粉可能通过调控GABA-T、GAD65、

GAT-1蛋白的表达水平,发挥改善睡眠的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组. 中国成人失眠诊断与治疗指南(2017版) [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(5): 324-335. Chinese Medical Association Neurology Branch, Sleep Disorders Group of Chinese Medical Association Neurology Branch. China adult insomnia diagnosis and treatment guidelines (2017 edition) [J]. Chin J Neurol, 2018, 51(5): 324-335.
- [2] 张峰,朱翠玲,孙彦琴,等. 中医药调节基因表达治疗失眠的研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(10): 209-214. Zhang F, Zhu C L, Sun Y Q, et al. Research progress of Chinese medicine regulating gene expression to treatment insomnia [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2023, 25(10): 209-214.
- [3] 韦洁,蓝晓东,李冬梅,等. 基于整合网络药理学和实验验证探究九味补血口服液调控Glu/GABA动态平衡改善失眠大鼠睡眠机制的研究 [J]. 药学学报, 2023, 9(6): 1484-1495. Wei J, Lan X D, Li D M, et al. Sleep-improving mechanisms of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid on regulating Glu/GABA balance in insomnia rats based on network pharmacology and experimental verification [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 9(6): 1484-1495.
- [4] 张丽,季庆玲,崔月萍,等. 微电流电刺激治疗抑郁症、失眠症、焦虑症效果观察 [J]. 河北中医, 2016, 38(10): 1539-1543. Zhang L, Ji Q L, Cui Y P, et al. Observation of micro-current electrical stimulation apparatus on the treatment of depression, insomnia and anxiety [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2016, 38(10): 1539-1543.

- [5] 郭雅雯, 芮琛, 王丽, 等. 中医治疗失眠研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(5): 98-102.
Guo Y W, Rui C, Wang L, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of insomnia [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2023, 25(5): 98-102.
- [6] 王亚琼, 祝庆华, 唐明文, 等. 紫河车临床应用研究概况 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(7): 189-192.
Wang Y Q, Zhu Q H, Tang M W, et al. Research on the clinical application of placenta hominis [J]. Asia Pac Tradit Med, 2020, 16(7): 189-192.
- [7] 任季禹, 杨凯, 靳梦, 等. 不同干燥与提取方式处理的人源胎盘防治贫血活性差异研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(8): 1592-1596.
Ren J Y, Yang K, Jin M, et al. Anti-anemia activity of human placenta from different drying and extraction methods [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(8): 1592-1596.
- [8] Si Y P, Wei W J, Chen X H, et al. A comprehensive study on the relieving effect of *Lilium brownii* on the intestinal flora and metabolic disorder in *p*-chlorophenylalanine induced insomnia rats [J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 131-143.
- [9] Ozbakis-Dengiz G, Bakirci A. Anticonvulsant and hypnotic effects of amiodarone [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2009, 10(4): 317-322.
- [10] Bai M, Zhu X Z, Zhang Y, et al. Abnormal hippocampal BDNF and miR-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46921.
- [11] 张金, 董健健, 朱清俊, 等. 甘麦大枣汤对PTSD模型大鼠行为学的影响及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(3): 762-769.
Zhang J, Dong J J, Zhu Q J, et al. Effect of Ganmai Dazao Decoction on ethology of rats with PTSD and its mechanism [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(3): 762-769.
- [12] 袁育红. 从不同观察指标综述中药治疗失眠症的基础研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2022, 34(11): 2181-2185.
Yuan Y H. Review the basic research progress of Chinese medicine in treating insomnia from different observation indexes [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2022, 34(11): 2181-2185.
- [13] 孙宁, 孙佳慧, 仲怀宇, 等. 中药镇静催眠作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1299-1310.
Sun N, Sun J H, Zhong H Y, et al. Research progress on mechanism of sedative and hypnotic effects of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(4): 1299-1310.
- [14] Kim Y, Lee J H, Jung I C, et al. Efficacy and safety of Hominis placenta pharmacopuncture on mild cognitive impairment [J]. Medicine, 2020, 99(46): e22956.
- [15] Kim J, Lee S Y. Effect of Human Placental Extract on Quality of Life in Postmenopausal Woman [J]. Health Med, 2017, 11(4): 192.
- [16] Del Cid-Pellitero E, Plavski A, Mainville L, et al. Homeostatic changes in GABA and glutamate receptors on excitatory cortical neurons during sleep deprivation and recovery [J]. Front Syst Neurosci, 2017, 11: 17.
- [17] 谭丽博, 于佳慧, 郑晓洋, 等. "神宁藏香"对失眠大鼠的行为学及GABA能系统通路的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(11): 4060-4068.
Tan L B, Yu J H, Zheng X Y, et al. Effects of "tibetan incense" on behavior and gamma-aminobutyric acid system of insomniac rats [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2020, 22(11): 4060-4068.
- [18] 林炳岐, 李峰, 马捷, 等. 基于GABA能系统通路探讨失眠的机制 [J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(3): 565-568.
Lin B Q, Li F, Ma J, et al. Based on GABA acid system access to explore the mechanism of insomnia [J]. Prog Mod Biomed, 2018, 18(3): 565-568.
- [19] 邵岩, 曹德庆, 赵越, 等. 乙体氯氰菊酯对小鼠脑组织中Glu、GABA水平及GABA-T活力的影响 [J]. 工业卫生与职业病, 2014, 40(1): 15-17, 20.
Shao Y, Cao D Q, Zhao Y, et al. Effects of β -cypermethrin on the levels of Glu and GABA in brain tissues and GABA-T activity in mice [J]. Ind Health Occup Dis, 2014, 40(1): 15-17, 20.
- [20] 张媛媛. 舒郁胶囊对PMS肝气郁证大鼠关键脑区Glu-GABA代谢通路中GAD、GABA-T、GAT-1变化的影响 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2017.
Zhang Y Y. Effect of Shu yu capsule on the changes of GAD, GABA-t and GAT-1 in the metabolic pathway of glu-GABA in key brain regions of PMS liver qi stagnation model rats [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2017.
- [21] Meldrum B S, Rogawski M A. Molecular targets for antiepileptic drug development [J]. Neurotherapeutics, 2007, 4(1): 18-61.
- [22] Rassner M P, van Velthoven-Wurster V, Ramantani G, et al. Altered transporter-mediated neocortical GABA release in Rasmussen encephalitis [J]. Epilepsia, 2013, 54(3): e41-e44.