

天麻改善小鼠睡眠作用及其机制研究

胡鹏程, 王 进, 李墨香, 刘 莹, 郭晓汐, 郝 倩, 安 输, 徐天瑞, 杨 洋

昆明理工大学 细胞信号传导实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 探讨天麻对小鼠睡眠的促进作用及其对中枢多巴胺 (DA) 系统的影响, 并进一步研究天麻有效成分天麻素通过影响 DA 通路发挥作用的机制。方法 小鼠随机分为对照组、天麻组、橄榄油组、天麻-橄榄油组及阳性对照艾司唑仑组, 每组 10 只, 分别 ig 给予生理盐水、天麻、橄榄油、天麻-橄榄油和艾司唑仑, 连续给药 20 d。各组小鼠分别在第 7、20 天给药 30~40 min 后 ip 最大阈下剂量戊巴比妥钠 (35 mg/kg), 测定睡眠发生率; 分别在第 8 天及第 21 天 ip 最小阈上剂量戊巴比妥钠 (50 mg/kg), 检测小鼠睡眠潜伏期和睡眠时长; 采用 ELISA 法测定天麻对小鼠脑组织 DA 水平的影响; 采用 qRT-PCR 法检测天麻对 DA 受体各亚型表达的影响; 构建 DA 受体 D1、D2 诱导表达稳定细胞株, Western blotting 法检测 ERK 通路相关蛋白的表达水平。结果 与对照组比较, 天麻给药 20 d 后小鼠睡眠潜伏期显著缩短, 睡眠发生率提高, 睡眠时长延长, 中枢 DA 水平显著提高, DA 受体各亚型的表达水平显著上调。同时, 天麻中有效成分天麻素可激活 DA 受体 D₂ 而不是 D₁ 介导的信号通路。结论 天麻可能通过上调中枢 DA 系统活性进而调控睡眠, 天麻中有效成分天麻素可能通过 D₂ 介导的信号通路发挥作用。

关键词: 天麻; 睡眠; 多巴胺; 多巴胺受体; 中枢神经系统; 天麻素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)13-3140-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.021

Effect of *Gastrodia elata* on improving sleep in mice and its mechanism

HU Peng-cheng, WANG Jin, LI Mo-xiang, LIU Ying, GUO Xiao-xi, HAO Qian, AN Shu, XU Tian-rui, YANG Yang

Kunming University of Science and Technology, Cell Signaling Laboratory, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To investigate the sleep promoting effect of *Gastrodia elata* on mice and its effect on the central dopamine (DA) system, and study the mechanisms of gastrodin, the active constituent of *G. elata*. **Methods** Five groups of mice were treated by gavage with saline, gastrodia, olive oil, gastrodia mixed with olive oil and positive control Estazolam, respectively, for 20 d (10 mice per group). Hypnosis induced by suprathreshold and subthreshold doses of Pentobarbital sodium were used to evaluate the effect of *G. elata* on sleep in mice. Sleep latency, occurrence rate and duration were recorded at the 7th and 20th day. The DA content in the brain tested by ELISA and the expression of DA receptor subtypes detected by qRT-PCR were used to determine the effect of *G. elata* on central DA system. Western blotting was further used to detect the expression levels of ERK pathway related protein. **Results** After 20 d of gavage, the sleep latency of mice was significantly shortened, the sleep occurrence rate was increased, the sleep duration was prolonged, and the content of brain DA was significantly increased. At the same time, the expression levels of all the dopamine receptor subtypes were significantly up-regulated. Furthermore, the gastrodin, the active constituent of *G. elata*, could activate the dopamine receptor D₂ rather than the D₁-mediated signaling pathway. **Conclusion** *G. elata* might regulate sleep by up-regulating the activity of central DA system. Gastrodin, the active constituent of *G. elata*, could play a regulating role through D₂-mediated signaling pathway.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; sleep regulation; dopamine; dopamine receptor; central nervous system; gastrodin

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460417); 国家自然科学基金资助项目 (81473342)

作者简介: 胡鹏程 (1993—), 男, 硕士, 主要从事以多巴胺受体为靶点的药物筛选和机制研究。Tel: 15587051602 E-mail: hupengcheng163@163.com

*通信作者 徐天瑞 (1969—), 男, 博士, 教授, 主要从事 G 蛋白偶联受体和下游信号网络在神经系统和肿瘤中的机制研究。

Tel: (0871)65911300 E-mail: xtrgfq@hotmail.com

杨 洋 (1982—), 女, 副教授, 主要从事 G 蛋白偶联受体介导的神经保护和肿瘤发生研究。

Tel: 18213843991 E-mail: 081023042@fudan.edu.cn

失眠已经成为影响现代人健康的重要问题之一,据调查,我国约 47.2% 的老年人存在不同形式的睡眠障碍,并且这一问题呈现出逐年年轻化的趋势^[1]。失眠不仅会诱导情绪的过度兴奋(焦虑、反叛和心境恶劣的人格特质),而且与精神疾病高度共存,是产生抑郁和自杀倾向的重要诱导因素^[2-3]。目前临床治疗失眠的药物主要包括苯二氮草类药物(三唑仑、艾司唑仑、硝基安定等)、褪黑素受体激动剂和具有催眠效果的抗抑郁药物^[4]。

苯二氮草类药物主要与苯二氮受体结合发挥作用,可增强 γ -氨基丁酸(GABA)能神经的功能,促进 Cl^- 离子内流,使神经细胞膜超极化。由于苯二氮草类药物弥散性地抑制中枢神经系统,常带来戒断综合症和白天残留效应等副作用^[4],而褪黑素受体激动剂如褪黑素容易产生耐药性和药物依赖^[5]。近年来,神经解剖学、药理学和分子生物学研究发现多巴胺(DA)能神经元与睡眠觉醒脑区间有着广泛的纤维联系,临床常用的以 DA 受体为靶点的抗精神病药物都具有良好的镇静安神作用,如 DA 受体 D_1 拮抗剂氯氮平以及 FDA 批准的 2 个 DA 受体 D_2 拮抗剂氟奋乃静和三氟拉嗪^[6]。研究发现 D_2 是维持睡眠和觉醒的重要受体^[7]。安神类中药有效成分可以通过调节包括 DA 在内的神经递质及其受体系统而发挥镇静催眠作用^[8]。天麻是兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎,是我国名贵中药,具有镇静安神、息风止痉、平抑肝阳等多种功效,广泛用于小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风、头痛眩晕等病症的治疗^[9]。天麻的主要化学成分有天麻素(0.19%~0.82%)、天麻苷元(0.01%~0.12%)、香草醇、天麻多糖、氨基酸和微量元素等^[10-11],其中水溶性的天麻素和脂水两亲性的天麻苷元因较强的药物活性受到越来越多的关注。现代药理研究表明,天麻对中枢神经系统具有明显的调控功能,可发挥镇静安神作用^[12]。张苗旋等^[13]发现天麻 1.2 g/kg 可明显延长戊巴比妥钠诱导小鼠的睡眠时间,但具体机制并不清楚。

本研究利用经典的小鼠睡眠实验探讨天麻对睡眠的促进作用及其对中枢 DA 系统的影响,并进一步研究天麻有效成分天麻素通过影响 DA 通路发挥作用的机制,为研究天麻对中枢神经系统的影响提供实验依据。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级昆明种小鼠 50 只,雌雄各半,体质量

(20 ± 2) g,购自昆明医科大学 SPF 级实验动物中心,实验动物生产许可证号 SCXK(滇)K2015-0002,饲养于昆明理工大学动物实验中心,饲养室温度为 (25.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,采用全价营养颗粒鼠饲料,动物自由取食、饮水。源自人胚胎肾细胞的 Flp-inTM T-RexTM HEK293 细胞购自 Invitrogen 公司。

1.2 药品与试剂

天麻于 2018 年 4 月 25 日购自云南省昭通市药材市场,为 2017 年 12 月采收,经昆明理工大学生科院郝倩博士鉴定为昭通乌天麻 *Gastrodia elata* Bl. f. *glauca* S. Chow. 的干燥块茎;戊巴比妥钠(山东西亚化学股份有限公司,批号 F074);艾司唑仑片(常州四药制药有限公司,批号 20170812);特级初榨橄榄油(Olitalia 公司);生理盐水(昆明南疆制药有限公司);第一链 cDNA 合成试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司,);qRT-PCR DNA 荧光染料(Roche 公司);小鼠多巴胺 ELISA 试剂盒(Mlbio 公司);胎牛血清、DMEM 培养基(Gibco 公司);双抗、胰蛋白酶(Hyclone 公司);细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、p-ERK1/2 抗体(Cell Signaling Technology 公司);VSV 抗体(Sigma 公司);山羊抗兔二抗(Invitrogen 公司);山羊抗鼠二抗(Sera Care 公司);天麻素(批号 BP0627,质量分数 >95%,成都普瑞法科技开发有限公司);多巴胺盐酸盐(批号 BCBQ4375V,质量分数 98%,Sigma 公司)。

1.3 仪器

高速离心机(Labogene 公司);微量移液枪(Gilson 公司);通用手术器械(上海医疗器械有限公司);BX-50 奥林巴斯显微镜(Olympus 公司);电子天平(Ohaus 公司);酶标仪(BmgLabtec 公司);实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)仪(Roche 公司);DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器有限公司)。

2 方法

2.1 药品配制

称取天麻粉(全天麻烘干超微粉碎制得)0.24 g 混匀于 4 mL 生理盐水中制成 0.6 g/mL 混悬液待用。称取天麻粉 0.24 g,加入 1 mL 橄榄油和 3 mL 生理盐水,制成含 25%橄榄油的天麻粉混悬液,备用。称取 0.4 mg 艾司唑仑粉末,加入 4 mL 生理盐水制成 0.1 mg/mL 的混悬液备用。取 1 mL 橄榄油与 3 mL 生理盐水,使用时混匀吸取。

2.2 分组与给药

将 50 只小鼠随机分为 5 组,分别为对照组、天

麻组、橄榄油组、天麻-橄榄油组及阳性对照艾司唑仑组, 每组 10 只, 雌雄各半。对照组小鼠每只 ig 给予生理盐水 0.4 mL, 天麻组小鼠 ig 给予溶于生理盐水的天麻粉 1.2 g/kg^[13], 橄榄油组小鼠每只 ig 给予 25%橄榄油生理盐水混悬液 0.4 mL, 天麻-橄榄油组小鼠每只 ig 给予含 25%橄榄油的天麻粉混悬液 1.2 g/kg, 艾司唑仑组小鼠 ig 给予 2 mg/kg 的艾司唑仑, 连续给药 20 d。各组小鼠分别在第 7、20 天给药 30~40 min 后 ip 最大阈下剂量戊巴比妥钠 (35 mg/kg), 测定睡眠发生率 (以翻正反射消失为进入睡眠); 分别在第 8 天给药 30~40 min 后及第 21 天 ip 最小阈上剂量戊巴比妥钠 (50 mg/kg), 检测小鼠睡眠潜伏期 (从注射戊巴比妥钠到小鼠翻正反射消失的时间段) 和睡眠时长 (翻正反射消失到翻正反射恢复的时间段)。

2.3 qRT-PCR 检测多巴胺受体各亚型 mRNA 表达

利用相关软件设计 qRT-PCR 引物并利用 NCBI 的 Primer Blast 功能验证引物特异性, 引物序列见表 1。连续给药 20 d, 测定小鼠各项睡眠指标后颈椎脱臼法处死小鼠并取全脑匀浆, 称取全脑匀浆约 0.1 g, 用 1 mL Trizol 裂解, 提取总 RNA 并及时反转录成 cDNA 用于 qRT-PCR。以 cDNA 为模板配制 20 μ L 的反应体系, 使用 Roche Light Cycler96 实时荧光定量 PCR 仪进行测定, 具体反应条件为: 95 $^{\circ}$ C、10 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、10 s, 72 $^{\circ}$ C、15 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算实验组各基因的相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers sequences used for qRT-PCR reactions

基因	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp
D ₁	正向: ATGGCTCCTAACACTTCTACCA	124
	反向: GGGTATTCCCTAAGAGAGTGGAC	
D ₂	正向: ACCTGTCTGGTACGATGATG	105
	反向: GCATGGCATAGTAGTTGTAGTGG	
D ₃	正向: CCTCTGAGCCAGATAAGCAGC	140
	反向: AGACCGTTGCCAAAGATGATG	
D ₄	正向: GCCTGGAGAACCGAGACTATG	142
	反向: CGGCTGTGAAGTTTGGTGTG	
D ₅	正向: CTCGGCAACGTCCTAGTGTG	110
	反向: AATGCCACGAAGAGGTCTGAG	
β -actin	正向: GGCTGTATTCCCCTCCATCG	154
	反向: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	

2.4 ELISA 法检测小鼠脑组织 DA 水平

颈椎脱臼法处死小鼠并称取约 0.1 g 的小鼠全脑于 0.8 mL 1 $\times$ PBS 中快速混匀, 并充分涡旋使递质溶出, 5 000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清按照试剂盒说明书采用 ELISA 法检测 DA 水平。

2.5 Western blotting 法检测 DA 受体 D₁、D₂ 诱导表达稳定细胞株 ERK 通路相关蛋白的表达

利用 Flp-in T-Rex HEK293 $\text{\textcircled{R}}$ 系统, 将含有 D₁ 和 D₂ 编码序列的诱导表达载体 pCDNA5/FRT/TO-VSV-GluR5-D₁/D₂ 与可以在哺乳动物细胞中过表达整合酶的 pOG44 载体共转染 Flp-in T-Rex HEK293 细胞, 并用潮霉素筛选, 得到由多西环素 (DOX) 诱导表达多巴胺受体 D₁ 和 D₂ 的稳定细胞株。

用 DOX 以终质量浓度 10 ng/mL 诱导上述稳定细胞株 24 h, 血清饥饿 12 h, 分别使用 0.001、0.100、10.000 nmol/L 的天麻素分别处理 D₁ 和 D₂ 细胞 (分别都以空载体细胞为阴性对照) 各 5 min, 以 DA 受体激动剂多巴胺盐酸盐 (100 nmol/L) 作为阳性对照。在上述处理过的细胞中加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 充分裂解细胞, 蛋白定量, 与 SDS 上样缓冲液混匀, 利用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离并转移到 PVDF 膜上, 以 5%脱脂牛奶封闭。用一抗 (VSV、ERK1/2 和 pERK1/2 抗体) 分别孵育 2 h。TBST/T 洗膜 3 次, 相应二抗孵育 1 h。TBST/T 洗膜 3 次。最后配制化学发光底物, 并在化学发光仪上对靶蛋白条带进行曝光显影。

2.6 统计学方法

应用统计学软件 SPSS Statistics 22.0 进行数据分析, 组内比较采用 *t* 检验, 组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。

3 结果

3.1 天麻对小鼠睡眠的影响

为了观察天麻水溶性和脂溶性成分可能的不同效果, 将天麻粉分别与生理盐水或生理盐水加橄榄油混合, 利用药物辅助戊巴比妥钠促进睡眠实验检测天麻镇静安神的功效。与对照组比较, 连续给药 7 d 后天麻组小鼠睡眠发生率提高 (表 2), 但睡眠潜伏期和睡眠时长未发生明显变化 (图 1); 连续给药 20 d 后, 天麻组小鼠睡眠发生率较给药 7 d 无明显增加 (表 2), 但睡眠潜伏期缩短, 睡眠时长增加; 天麻-橄榄油组小鼠的睡眠潜伏期显著缩短 ($P<0.001$, 图 1)。提示天麻中的有效成分发挥稳定的促进睡眠的效果可能需要一定时间, 是一个缓慢的过程。

表 2 天麻对小鼠睡眠的影响 ($n = 10$)
Table 2 Effect of *G. elata* on sleep in mice ($n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	睡眠发生率/%	
		7 d	20 d
对照	0	20	10
天麻	1.2	40	40
橄榄油	0	20	30
天麻-橄榄油	1.2	50	30
艾司唑仑	0.002	80	90

3.2 天麻对小鼠脑内神经递质 DA 水平的影响

结果显示,与对照组比较,天麻组和天麻-橄榄油组小鼠脑内 DA 水平均显著提高,天麻-橄榄油组 DA 水平上调幅度更为明显($P < 0.01$ 、 0.001 ,图 2)。天麻-橄榄油组相对于橄榄油组小鼠脑内 DA 含量提高约 36%,高于天麻组相对于对照组的提高幅度(约 25%)。阳性对照艾司唑仑组小鼠脑内 DA 水平显著高于对照组($P < 0.001$,图 2)。

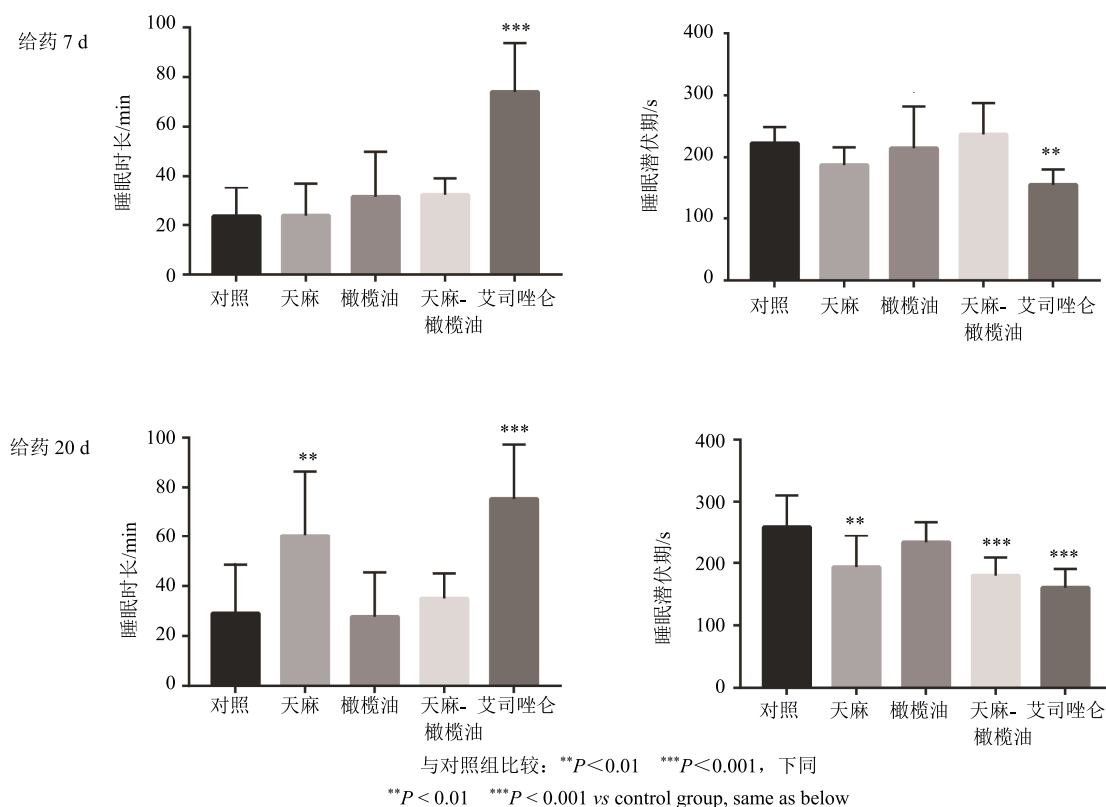


图 1 天麻对小鼠睡眠潜伏期和睡眠时长的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Effect of *G. elata* on sleep latency and sleep duration in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

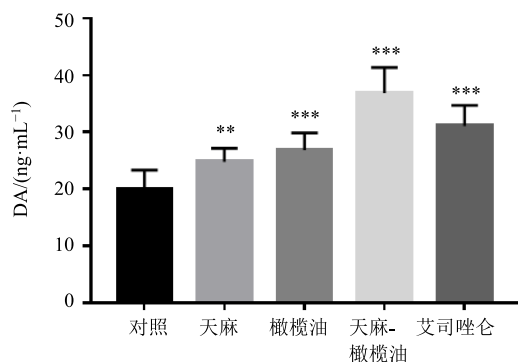


图 2 天麻对小鼠脑内 DA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

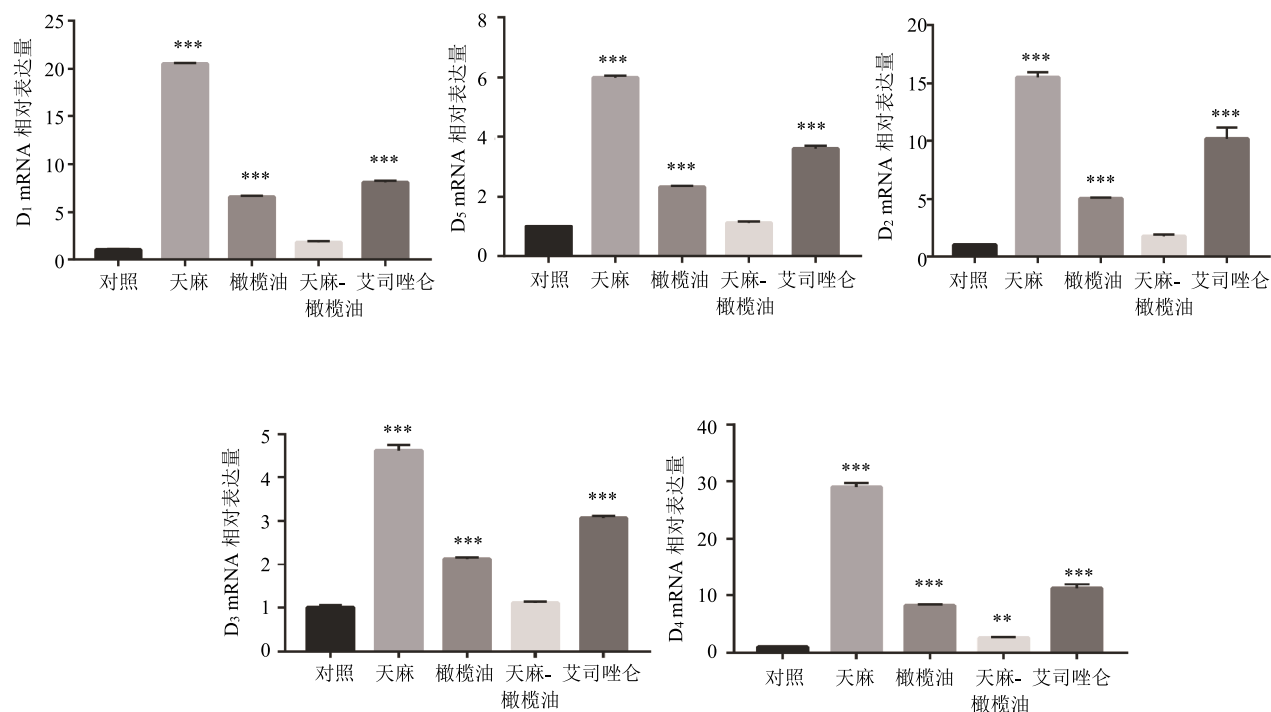
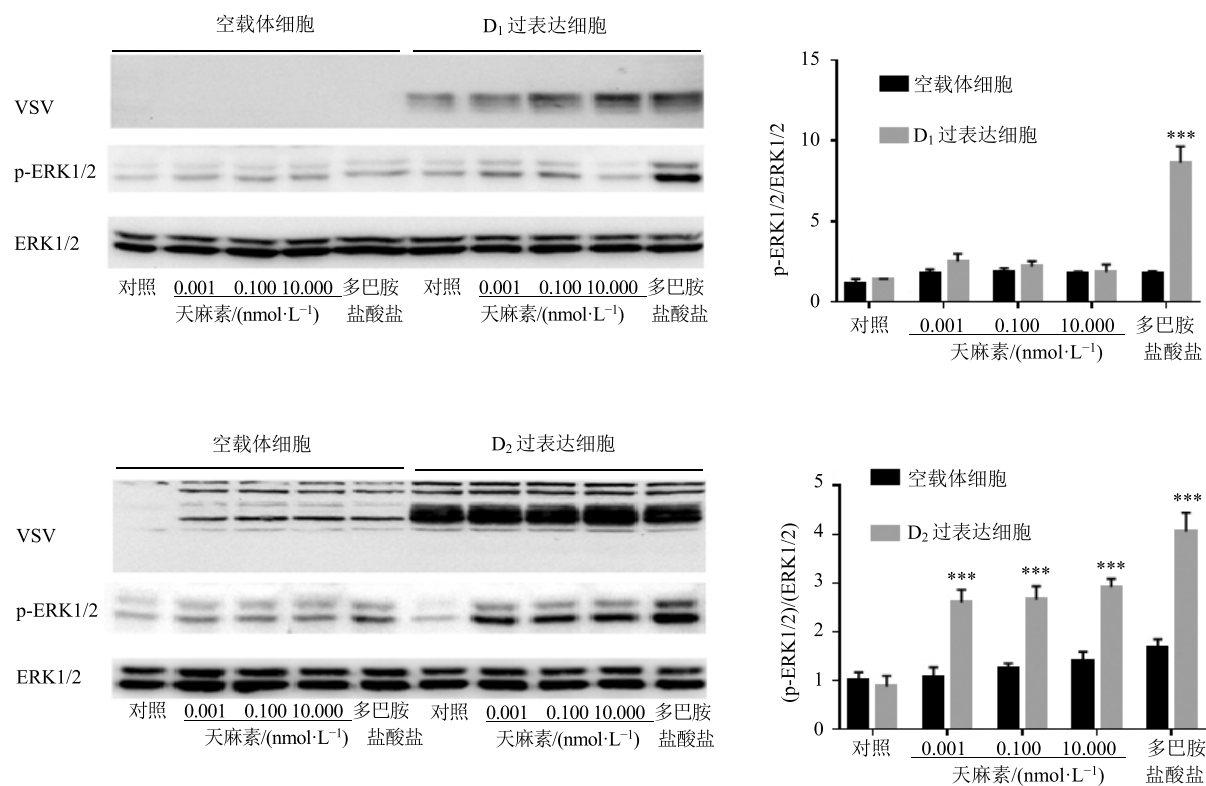
Fig. 2 Effect of *G. elata* on level of DA in brain of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.3 天麻对 DA 受体各亚型表达的影响

采用 qRT-PCR 法检测小鼠脑内 D₁~D₅ 的表达。结果显示,与对照组比较,天麻显著提高了小鼠大脑中枢各个亚型 DA 受体的表达(图 3),且其效果优于艾司唑仑。同时,各组小鼠各个亚型 DA 受体的上调趋势一致。提示天麻在促进小鼠睡眠过程中,D₁ 样受体和 D₂ 样受体可能均参与了调控,而天麻水溶性成分(如天麻素)可能扮演了更重要的角色。

3.4 天麻素对 ERK 通路相关蛋白表达的影响

为观察天麻素对 DA 受体介导的通路的作用,采用 Western blotting 法检测 ERK 通路的效应蛋白 ERK1/2 及 p-ERK1/2 表达水平。结果(图 4)显示,

图 3 天麻对 DA 受体各亚型表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 3 Effect of *G. elata* on expression of various subtypes of DA receptor ($\bar{x} \pm s, n = 10$)图 4 天麻素对 ERK 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 4 Effect of gastrodin on expression of protein related to ERK pathway ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

与对照组比较,天麻素可以通过 DA 受体 D₂ 激活 ERK1/2,显著提高 p-ERK1/2 水平,效果与多巴胺盐酸盐相当,但剂量依赖不明显。而天麻素对 D₁ 受体介导的 ERK1/2 通路激活作用并不明显。提示天麻素可能主要通过 D₂ 受体激活 ERK1/2 通路发挥睡眠调控作用。

4 讨论

中枢的 DA 系统是调控睡眠和觉醒的重要组成部分^[14]。D₁ 和 D₂ 都可以被 DA 激活,从而激活下游信号通路,其中 ERK1/2 是 D₁ 和 D₂ 通路的重要分子标记^[15-16]。激动剂可通过 D₁ 或 D₂ 激活效应蛋白 ERK1/2,提高 ERK1/2 磷酸化水平^[15-16]。ERK1/2 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,能在生理和病理条件下参与中枢神经系统的功能调节。本研究发现,天麻能够提高小鼠中枢神经递质 DA 水平,并上调各个亚型 DA 受体的表达,发挥促进睡眠的作用,这些作用可能部分由天麻中水溶性成分天麻素通过 D₂ 激活 ERK1/2 通路来实现。

天麻作为我国的名贵中药,近代药理学研究表明其具有良好的镇静催眠作用^[17]。本实验中,与对照组比较,天麻可明显提高小鼠的睡眠发生率,显著缩短睡眠潜伏期并增加了睡眠时长。其中,天麻-橄榄油组小鼠的睡眠潜伏期显著缩短,天麻组小鼠睡眠时长显著增加,提示天麻中脂溶性成分可能具有加速入眠的功能,而水溶性成分可能具有延长睡眠时间的作用。

失眠作为一种原发性或继发性睡眠障碍,其发病机制与神经递质紊乱、睡眠相关受体表达失常、生活压力过大等一系列因素相关。DA 作为哺乳动物脑含量最多的神经递质之一,参与了机体睡眠-觉醒、运动、认知行为和正性强化等多项功能的调控。郝晋东等^[18]发现天麻素可提高大鼠纹状体多巴胺含量,庞宇涵等^[19]发现人参益智胶囊可提高小鼠脑内去甲肾上腺素 (NE)、DA、5-羟色胺 (5-HT) 含量,改善小鼠的睡眠。本研究结果表明,天麻可显著提高小鼠脑部 DA 水平,同时发现 DA 受体各亚型的表达量也有显著提高,因为中脑边缘 DA 系统具有调控兴奋和镇静的双重作用^[20],且哺乳动物的睡眠还受到 γ -氨基丁酸 A 型受体 (GABA_A)、Melatonin、5-HT、Orexin 等多种受体的调控。本研究初步证明天麻可提高中枢 DA 系统的活力,但其不同于褪黑素系统发挥的快速促睡眠功效^[21],天麻中的有效成分能够以一个较为缓慢的过程发挥促睡

眠作用。更为确切的调控机制还需深入研究。实验中发现橄榄油也可提高小鼠脑内 DA 水平和 DA 受体表达量,推测这可能是橄榄油在抗衰老与益智健脑方面作用的机制之一^[22]。

参考文献

- [1] 刘芸,董永海,李晓云,等. 中国 60 岁以上老年人睡眠障碍患病率的 Meta 分析 [J]. 现代预防医学, 2014, 41(8): 1442-1445.
- [2] Zhou E S, Partridge A H, Syrjala K L, *et al.* Evaluation and treatment of insomnia in adult cancer survivorship programs [J]. *J Cancer Surviv*, 2017, 11(1): 74-79.
- [3] Le Blanc M, Beaulieu-Bonneau S, Merette C, *et al.* Psychological and health-related quality of life factors associated with insomnia in a population-based sample [J]. *J Psychosom Res*, 2007, 63(2): 157-166.
- [4] 失眠定义、诊断及药物治疗共识专家组. 失眠定义、诊断及药物治疗专家共识 (草案) [J]. 中华神经科杂志, 2006, 39(2): 141-143.
- [5] 张石革. 褪黑素受体激动剂的研究进展与临床疗效评价 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2013, 13(2): 112-115.
- [6] Liu S, Fan Y, Chen A, *et al.* Osteocyte-driven downregulation of snail restrains effects of Drd2 inhibitors on mammary tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(14): 3865-3876.
- [7] 许奇,曲卫敏,黄志力. 多巴胺 D₂ 受体调控睡眠-觉醒研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(4): 361-366.
- [8] 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, 2016, 41(23): 4320-4327.
- [9] 杨世林,兰进,徐锦堂. 天麻的研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(1): 68-71.
- [10] 岑信钊. 天麻的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2005, 28(10): 99-103.
- [11] 沈肖晶,金传山,许凤清,等. 高效液相色谱法测定不同加工工艺天麻中天麻素和天麻苷元含量 [J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33(6): 70-73.
- [12] 邹宁,吕剑涛,薛仁余,等. 天麻素对小鼠的镇静催眠作用 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 807-809.
- [13] 张苗旋,胡卫. 天麻改善小鼠睡眠作用研究 [J]. 生物技术世界, 2014, 8(10): 149-151.
- [14] Oishi Y, Lazarus M. The control of sleep and wakefulness by mesolimbic dopamine systems [J]. *Neurosci Res*, 2017, 118: 66-73.
- [15] Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, *et al.* Opposing patterns of signaling activation in dopamine D₁ and D₂ receptor-expressing striatal neurons in response to

- cocaine and haloperidol [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(22): 5671-5685.
- [16] Chen J, Rusnak M, Luedtke R R, *et al*. D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(38): 39317-39330.
- [17] 周 雪, 陈婷婷, 蒋朝晖, 等. 基于镇静催眠作用的天麻超微粉生物活性限值测定方法研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(5): 132-136.
- [18] 郝晋东, 王梅康, 夏红杰, 等. 天麻素对 PD 模型大鼠纹状体 DA、DOPAC、HVA 含量的影响 [J]. *北京中医药*, 2009, 28(6): 463-465.
- [19] 庞宇涵, 蔡广知, 贡济宇. 人参益智胶囊改善小鼠睡眠作用及其机制的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(4): 97-100.
- [20] de Jong J W, Afjei S A, Pollak D I, *et al*. A neural circuit mechanism for encoding aversive stimuli in the mesolimbic dopamine system [J]. *Neuron*, 2019, 101(1): 133-151.
- [21] 徐 峰, 李经才. 褪黑素对睡眠的调节作用 [J]. *国外医学精神病学分册*, 1997, 24(2): 6-11.
- [22] Angeloni C, Malaguti M, Barbalace M C, *et al*. Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2230-2256.