

## • 药理与临床 •

## 萆澄茄素治疗失眠症的药效及相关机制研究

王 玮<sup>1</sup>, 杨世林<sup>1,2</sup>, 彭万钱<sup>1</sup>, 张 壮<sup>1</sup>, 欧阳辉<sup>1,3</sup>, 冯育林<sup>1,2</sup>, 罗颖颖<sup>1\*</sup>, 何明珍<sup>1,2\*</sup>

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006
2. 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 江西 南昌 330006
3. 南昌市中药与天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 南昌 330006

**摘要:** **目的** 探讨萆澄茄素对睡眠剥夺小鼠的药效及潜在作用机制。**方法** 首先研究萆澄茄素对正常小鼠的促睡眠作用, 小鼠随机分为对照组、地西洋 (2 mg/kg) 组和萆澄茄素低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 组, 各给药组 ig 相应药物, 记录各组小鼠的入睡率以及睡眠持续时间; 免疫组化法检测小鼠脑组织  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体  $\alpha 1$  ( $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor  $\alpha 1$ , GABAA) 蛋白表达; 氟马西尼拮抗实验验证萆澄茄素的作用是否与苯二氮革类受体有关。然后研究萆澄茄素对睡眠剥夺小鼠的作用, 小鼠分为对照组、模型组、地西洋 (2 mg/kg) 组和萆澄茄素低、中、高剂量 (10、20、40 mg/kg) 组, 给予药物干预后, 采用旷场实验进行行为学测试; LC-MS/MS 检测脑组织中神经递质 GABA、L-谷氨酸 (L-glutamic acid, Glu)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) 的含量; 免疫组化及 qRT-PCR 技术检测小鼠脑组织 GABAA $\alpha 1$  表达。**结果** 萆澄茄素对正常小鼠的促睡眠作用研究结果显示, 萆澄茄素显著增加正常小鼠的入睡率 ( $P < 0.01$ ), 并显著延长了小鼠的睡眠持续时间 ( $P < 0.01$ ), 显著增加皮层 GABAA $\alpha 1$  表达 ( $P < 0.05$ ); 氟马西尼可以拮抗萆澄茄素对小鼠的促睡眠作用。萆澄茄素对睡眠剥夺小鼠的作用研究结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠活动量显著增加 ( $P < 0.05$ ), 脑组织中 GABAA $\alpha 1$  表达以及 GABA、Glu、5-HIAA 含量显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 萆澄茄素组小鼠活动量明显减少 ( $P < 0.05$ 、0.01), 脑组织中 GABAA $\alpha 1$  表达以及 GABA、Glu、5-HIAA 含量显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 萆澄茄素对正常小鼠和睡眠剥夺小鼠均具有促睡眠作用, 可能通过调控 GABAA $\alpha 1$  及脑内神经递质 GABA、Glu、5-HIAA 的含量而发挥作用。

**关键词:** 萆澄茄素; 失眠; 睡眠剥夺; 神经递质;  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体  $\alpha 1$

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6750-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.012

## Efficacy and related mechanism of cubebin in treatment of insomnia

WANG Wei<sup>1</sup>, YANG Shi-lin<sup>1,2</sup>, PENG Wan-qian<sup>1</sup>, ZHANG Zhuang<sup>1</sup>, OUYANG Hui<sup>1,3</sup>, FENG Yu-lin<sup>1,2</sup>, LUO Ying-ying<sup>1</sup>, HE Ming-zhen<sup>1,2</sup>

1. National Engineering Center of Solid Preparation of Chinese Materia Medica Manufacturing Technology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China
2. State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Nanchang 330006, China
3. Nanchang Key Laboratory of Active Ingredients of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, Nanchang 330006, China

**Abstract: Objective** To explore the efficacy and potential mechanism of cubebin in sleep deprived mice. **Methods** Firstly, sleep promoting effect of cubebin on normal mice was investigated: Mice were randomly divided into control group, diazepam (2 mg/kg) group, cubebin low-, medium- and high-dose (25, 50, 100 mg/kg) group, each administration group was ig corresponding drugs, sleep

收稿日期: 2022-07-23

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2019YFC1712302); 中央引导地方科技发展专项项目 (2019ZD02002); 江西省教育厅科技计划 (201222); 中央引导地方科技发展资金项目 (20221ZDD02007); 江西省大学生创新创业训练计划项目 (S202210412081)

作者简介: 王 玮 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学与中药药理学。Tel: 15222817652 E-mail: 15222817652@163.com

\*通信作者: 罗颖颖 (1982—), 女, 硕士生导师, 研究方向为中药药效评价及作用机制。Tel: 13576133107 E-mail: luoying0302@163.com

何明珍 (1977—), 女, 硕士生导师, 研究方向为中药活性成分及其体内代谢。Tel: 13755757218 E-mail: hmz07@163.com

rate and sleep duration of rats in each group were recorded; Immunohistochemical staining was used to detect  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor  $\alpha 1$  (GABAA $\alpha 1$ ) protein expression in brain tissue of mice; Flumazenil antagonism experiment was used to verify whether the effects of cubebin are related to benzodiazepine receptors. Secondly, effect of cubebin on sleep deprived mice was observed: Mice were divided into control group, model group, diazepam (2 mg/kg) group, cubebin low-, medium-and high-dose (10, 20, 40 mg/kg) group, drugs were given for intervention, open field test was used for behavioral testing; LC-MS/MS was used to detect the content of neurotransmitters [GABA, L-glutamic acid (Glu), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)] in brain tissue; Immunohistochemical staining and qRT-PCR were used to detect GABAA $\alpha 1$  expression in brain tissue. **Results** The results of study on sleep promoting effect of cubebin on normal mice showed that, cubebin significantly increased the sleep rate of normal mice ( $P < 0.01$ ), significantly prolonged the sleep duration of mice ( $P < 0.01$ ), and significantly increased GABAA $\alpha 1$  expression in cerebral cortex ( $P < 0.05$ ); Flumazenil could antagonize the sleep-promoting effect of cubebin. The results of study on effect of cubebin on sleep deprived mice showed that, compared with control group, activity of mice in model group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), GABAA $\alpha 1$  expression and GABA, Glu, 5-HIAA contents in brain tissue were significantly reduced ( $P < 0.05, 0.01$ ); Compared with model group, activity of mice in cubebin group was significantly reduced ( $P < 0.05, 0.01$ ), GABAA $\alpha 1$  expression and GABA, Glu, 5-HIAA contents in brain tissue were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Cubebin has a sleep-promoting effect on both normal and sleep deprived mice, and may exert its effect by regulating the content of GABAA $\alpha 1$  and neurotransmitters GABA, Glu and 5-HIAA in brain.

**Key words:** cubebin; insomnia; sleep deprivation; neurotransmitter;  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor  $\alpha 1$

睡眠是正常的生理活动, 睡眠剥夺会引起许多不良反应, 影响人的正常工作和生活。研究表明, 国内失眠症的发生率已达到 10% 以上<sup>[1]</sup>, 且逐年上升。此外, 失眠会引起各种代谢紊乱等综合性疾病<sup>[2]</sup>, 甚至导致抑郁<sup>[3]</sup>, 在中老年人群中诱发各种并发症的概率更大<sup>[4]</sup>。失眠引发的各种疾病困扰着患者, 而失眠症的预防及治疗也成为了当今医学和社会领域的巨大难题<sup>[5]</sup>。失眠治疗主要分为非药物治疗和药物治疗。已有研究表明, 心理治疗是治疗失眠症的首选方式, 但其在国内应用率不高。因此药物治疗仍是我国治疗失眠症的主要方法。苯二氮䓬类是目前临床上用于治疗失眠症的主要药物, 但使用时会伴随耐受性及成瘾性等多种不良反应<sup>[6]</sup>。近年研究发现中药能多途径改善失眠的发生和恶化, 在临床应用方面, 中药用于治疗失眠的案例也越来越多<sup>[7]</sup>。

萆澄茄素是从木犀科丁香属植物紫丁香 *Syringa oblata* Lindl. 分离得到的二苄基丁内酯木脂素成分, 其茎在藏族地区又称藏沉香, 民间常用作镇静安神药。研究表明, 萆澄茄素具有灭锥虫、抗炎、镇痛、抗癌等活性<sup>[8-11]</sup>, 且对东莨菪碱诱导的小鼠遗忘症具有神经保护作用<sup>[12]</sup>, 但关于其治疗失眠症的研究鲜有报道。因此, 本研究拟初步探讨萆澄茄素治疗失眠症的药效及潜在作用机制, 为开发治疗失眠症的创新药物提供理论基础。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠, 体质量 16~18 g, 4 周

龄, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。动物于 12 h 光暗周期、室温 22~24 °C、湿度恒定的饲养室, 适应性喂养 3 d, 自由进食饮水。动物实验经江西中医药大学伦理委员会批准 (批准号 JZLLSC20210067)。

### 1.2 药品与试剂

萆澄茄素 (质量分数为 99.7%) 由江西中医药大学实验室提供; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 批号 20210401) 购自展云化工有限公司; 戊巴比妥钠 (批号 2015011301) 购自美国 Merck 公司; 地西洋片 (批号 20191004) 购自信谊制药有限公司; 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 J20GR142557) 购自源叶生物科技有限公司; 氟马西尼 (批号 Ro15-1788) 购自 MCE 公司; 浓缩型正常山羊血清 (批号 12L08A09) 购自博士德生物工程有限公司; 牛血清白蛋白 (批号 0703010160) 购自 Gen-view 科技有限公司; 柠檬酸钠缓冲液 (批号 1114A0144)、苏木素 (批号 20200629)、中性树胶 (批号 6071021) 购自北京索莱宝科技有限公司; DAB 试剂盒 (批号 CW2069S)、TRIZOL 试剂 (批号 05421) 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 组织固定液 (批号 20210826) 购自美伦生物技术有限公司; OCT 包埋剂 (批号 1906-00) 购自日本 Sakura 公司; 对照品 5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA, 批号 BCCD4271, 质量分数  $\geq 98\%$ )、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT, 批号 BCCF8292, 质量分数  $\geq 98\%$ ) 购自美国 Sigma 公司; 对照品  $\gamma$ -氨基丁酸

( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA, 批号 B21979, 质量分数 $\geq 98\%$ )、L-谷氨酸(L-glutamic acid, Glu, 批号 B21916, 质量分数 $\geq 98\%$ )购自源叶生物科技有限公司; 第一链 cDNA 合成试剂盒(批号 H2126010)、Hieff UNICON<sup>®</sup> Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix(批号 H6004030)购自上海翌圣生物科技有限公司; 3,4-二羟基苄胺(3,4-dihydroxybenzylamine, DHBA, 批号 C11856507, 质量分数 99%)购自上海麦克林生化科技有限公司;  $\gamma$ -氨基丁酸受体 A $\alpha$ 1( $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor  $\alpha$ 1, GABAA $\alpha$ 1)抗体(批号 DF8548)购自 Affinity 公司。

### 1.3 仪器

RM2235 型切片机、DM2500 型光学显微镜、CM1850 型冰冻切片机(德国 Leica 公司);KD-TS3A 型组织自动脱水仪(北京佳源兴业科技公司);YB6LF 型组织包埋机(湖北孝感亚光医用电子技术公司);QTRAP 4500 型质谱仪、7500 型 qRT-PCR 仪(美国 AB Sciex 公司);5810R 型冷冻离心机、AG 型普通 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);Tissuelyser-48 型全自动样品快速研磨仪(上海净信科技有限公司);KQ-4000B 型数字超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 萆澄茄素对正常小鼠的作用研究

**2.1.1 戊巴比妥钠阈下实验** 实验前首先进行戊巴比妥钠阈下剂量摸索,将 30 只小鼠随机分为戊巴比妥钠高、中、低剂量(35、30、25 mg/kg)组,小鼠 ip 戊巴比妥钠,记录入睡小鼠只数。阈下剂量选择使 90%~100%小鼠翻正反射不消失的最大剂量。另将 60 只小鼠随机分为对照组及萆澄茄素高、中、低剂量(100、50、25 mg/kg)组和地西洋(2 mg/kg)组,每组 12 只。药物用 0.5% CMC-Na 溶液研磨配制成混悬液,各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg),对照组 ig 等体积的溶剂。给药 30 min 后,ip 戊巴比妥钠阈下剂量,记录 30 min 内入睡小鼠只数。

**2.1.2 戊巴比妥钠阈上实验** 实验前首先进行戊巴比妥钠阈上剂量摸索,将 30 只小鼠随机分为戊巴比妥钠高、中、低剂量(50、45、40 mg/kg)组,小鼠 ip 戊巴比妥钠,记录入睡小鼠只数。阈上剂量选择使 100%小鼠翻正反射消失的最小剂量。另将 60 只动物按“2.1.1”项下方法进行分组和给药,给药 30 min 后,ip 戊巴比妥钠阈上剂量,记录小鼠的入睡潜伏期(注射后到翻正反射消失的时间)和睡眠

持续时间(翻正反射消失到恢复的时间)。

**2.1.3 氟马西尼拮抗实验** 取 40 只小鼠随机分为萆澄茄素+氟马西尼+戊巴比妥钠组、地西洋+氟马西尼+戊巴比妥钠组、溶剂(0.5% CMC-Na 溶液)+戊巴比妥钠组、地西洋+戊巴比妥钠组以及萆澄茄素+戊巴比妥钠组,每组 8 只。氟马西尼作为萆澄茄素机制研究的假设拮抗药物,在给药前 20 min ip 氟马西尼(5 mg/kg)<sup>[13]</sup>,然后 ig 萆澄茄素(100 mg/kg)、地西洋(2 mg/kg)或溶剂,30 min 后 ip 戊巴比妥钠阈下剂量,记录 30 min 内入睡小鼠只数。

**2.1.4 免疫组化法观察萆澄茄素对正常小鼠脑组织 GABAA $\alpha$ 1 蛋白表达的影响** 将小鼠分为对照组、萆澄茄素(100 mg/kg)组和地西洋(2 mg/kg)组,每组 10 只。各给药组 ig 相应药物后,小鼠脱颈椎处死,取出脑组织浸泡于组织固定液中,自来水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透化,石蜡包埋后切片(厚 5  $\mu$ m),于 42  $^{\circ}$ C 温水中展片。按照 DAB 试剂盒说明书,分别滴加 GABAA $\alpha$ 1 抗体及生物素标记的羊抗兔/鼠抗体,另设置阴性对照未加一抗。通过 Image J 软件统计 GABAA $\alpha$ 1 阳性表达面积占比。

### 2.2 萆澄茄素对睡眠剥夺小鼠的作用研究

将小鼠分为对照组、模型组、地西洋(2 mg/kg)组和萆澄茄素低、中、高剂量(10、20、40 mg/kg)组,每组 6 只。除对照组外,其余各组参照文献方法<sup>[14]</sup>制备失眠模型:采用厚度为 80 mm 玻璃制作 110 cm $\times$ 75 cm $\times$ 50 cm 的睡眠剥夺箱,箱内放置 12 个高度为 8 cm、直径为 6.3 cm 的金属平台,平台间相距 15 cm,箱内水深度为 7 cm,水温保持 22  $^{\circ}$ C,箱上置网盖,网盖上放置食物和水。除对照组小鼠外均放置在睡眠剥夺箱中的金属平台上,期间允许小鼠自由摄水摄食,每当小鼠要进入睡眠状态时,其全身骨骼肌张力明显降低,会垂头触水或落入水中而惊醒,无法进入睡眠,即为睡眠剥夺。1 周后,当造模小鼠出现摄食减少、惊恐状、易激惹、脱毛严重、相互撕咬等情况时,表明模型构建成功。造模成功后各给药组 ig 相应药物,对照组 ig 等体积的溶剂,1 次/d,连续 1 周,给药结束后进行旷场实验,收集脑组织。

**2.2.1 旷场实验** 各给药组 ig 相应药物 30 min 后进行旷场实验,小鼠在旷场仪中适应 2 min,用相应仪器录制各组小鼠 10 min 内的总路程、平均速度、活动次数及时间、中央路程、中央平均速度等行为学指标。

**2.2.2** 免疫组化法观察苾澄茄素对睡眠剥夺小鼠脑组织中 GABA $\alpha$ 1 蛋白表达的影响 按“2.1.4”项下方法检测各组小鼠脑组织 GABA $\alpha$ 1 蛋白表达。

**2.2.3** qRT-PCR 检测皮层和海马组织中 GABA $\alpha$ 1 mRNA 表达 按照试剂盒说明书分别提取各组小鼠皮层和海马组织中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: GABA $\alpha$ 1 上游引物 5'-ACTGCTGGACGGTTATGACAATCG-3'、下游引物: 5'-GAGTGCCATCCTCTGTGATACGC-3';  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-AGGGAAATCGTGCGTGAC-3'、下游引物: 5'-AT-ACCCAGGAAGGAAGGCT-3'。

**2.2.4** LC-MS/MS 检测脑内神经递质含量变化 称定脑组织, 加入 10 倍的水制成脑匀浆后, 加入 4 倍体积的甲醇, 混匀后在冰上放置 25 min, 12 000 r/min 离心 15min, 每 100 微升样品加 10  $\mu$ L 内标(DHBA, 0.3 g/L), 进行 LC-MS/MS 分析<sup>[15-16]</sup>。

(1) 色谱条件: Hypersil GOLD HILIC 色谱柱 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9  $\mu$ m), 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 95% B; 3~4 min, 95%~8% B; 4~9 min, 8%~5% B; 9~10 min, 5%~2% B; 10~11 min, 2%~95% B; 11~12 min, 95% B。体积流量 0.3 mL/min; 进样量 1  $\mu$ L; 柱温 35  $^{\circ}$ C。

(2) 质谱条件: 以正离子多反应检测 (MRM) 模式进行扫描。神经递质检测离子对及质谱离子化条件见表 1。

(3) 方法学考察: ①专属性: 精密量取 GABA、Glu、5-HT、5-HIAA 对照品分别配制成 500 ng/mL 的溶液, 按色谱条件进行检测, 结果见图 1。②线性范围: 精密吸取上述对照品溶液, 稀释至 500、250、125、50、25、10、5、2.5、1 ng/mL 的系列溶液后进行 LC-MS/MS 检测, 结果见表 2。③精密度: 取上述线性范围内的对照品溶液低、中、高的对照品溶液各 3 份, 进行 LC-MS/MS 分析, 在同一天内每个样品重复进样 3 次, 计算精密度, 见表 3, 均符合生物样品的分析要求。

**2.3 统计学分析**

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 实验结果

表 1 质谱条件

Table 1 Mass spectrometry conditions

神经递质	Q1 $\rightarrow$ Q3 (m/z)	去簇电 压/V	入口电 压/V	碰撞能/ eV	碰撞室出口 电压/V
GABA	104.1 $\rightarrow$ 87.1	26	10	15	4
Glu	148.0 $\rightarrow$ 84.3	26	10	21	4
5HT	177.2 $\rightarrow$ 160.0	16	10	15	4
5HIAA	192.2 $\rightarrow$ 146.0	24	10	35	4
DHBA	140.1 $\rightarrow$ 123.1	10	10	17	4

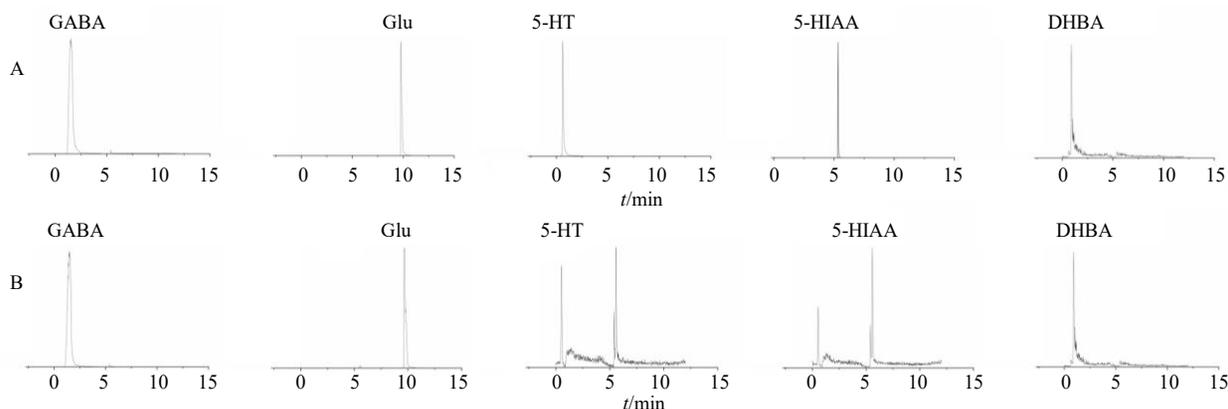


图 1 各神经递质对照品 (A) 与脑样品 (B) 的 LC-MS/MS 分析

Fig. 1 LC-MS/MS of each neurotransmitter reference substance (A) and brain sample (B)

表 2 标准曲线及线性范围

Table 2 Standard curve and linear range

神经递质	线性范围/ (ng $\cdot$ mL $^{-1}$ )	回归方程	R $^2$
GABA	5.0~250.0	$y=7.66\times 10^4x+5.24\times 10^5$	0.992 9
GLU	2.5~500.0	$y=0.95\times 10^3x+1.48\times 10^4$	0.999 2
5-HT	5.0~500.0	$y=2.9\times 10^4x+2.32\times 10^5$	0.995 3
5-HIAA	5.0~250.0	$y=239x+3.96\times 10^3$	0.990 6

以  $\bar{x}\pm s$  表示, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐采用 LSD 法, 方差不齐采用 Games-Howell 法。

**3 结果**

**3.1 苾澄茄素对正常小鼠的作用**

**3.1.1** 戊巴比妥钠协同实验 阙下实验结果 (表 4) 表明, 与对照组比较, 地西洋组和苾澄茄素中、高

表 3 准确度及精密度

Table 3 Accuracy and precision

神经递质	质量浓度/(ng·mL <sup>-1</sup> )	准确度 RSD/%	精密度 RSD/%
GABA	5	0.85	7.81
	50	0.80	2.31
	250	1.34	1.30
GLU	2.5	0.56	2.86
	50	4.05	3.38
	500	2.44	2.52
5-HT	5	0.07	5.06
	50	0.32	4.62
	500	0.43	1.84
5-HIAA	5	0.14	6.60
	50	0.57	2.48
	250	0.75	1.15

表 4 萆澄茄素联合戊巴比妥钠阈下剂量 (30 mg·kg<sup>-1</sup>) 对小鼠睡眠的影响 (n = 12)

Table 4 Effects of cubebin combined with pentobarbital sodium subthreshold dose (30 mg·kg<sup>-1</sup>) on sleep of mice (n = 12)

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	入睡率/%
对照	—	10
地西洋	2	90**
萆澄茄素	25	50
	50	80**
	100	90**

与对照组比较: \*\*P<0.01, 下表同

\*\*P<0.01 vs control group, same as below tables

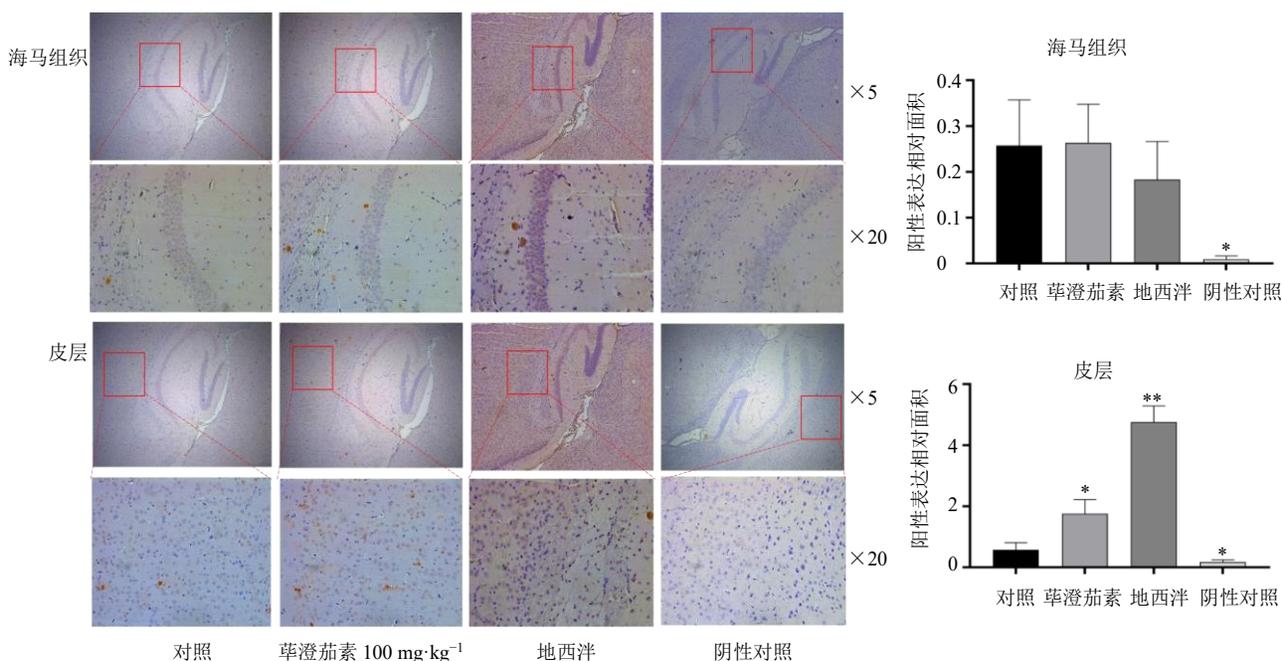
剂量组均能显著增加入睡动物数 (P<0.01), 且萆澄茄素诱导小鼠入睡率呈剂量相关性。阈上实验结果 (表 5) 表明, 与对照组比较, 地西洋可以明显缩短动物入睡潜伏期时间 (P<0.01), 萆澄茄素各剂量组均能显著延长小鼠睡眠时间 (P<0.01), 且呈剂量相关性。

**3.1.2 免疫组化实验** 如图 2 所示, 萆澄茄素和地西洋显著增加小鼠皮层 GABAA $\alpha$ 1 蛋白表达 (P<0.05、0.01), 而对海马组织 GABAA $\alpha$ 1 表达无明显影响, 表明萆澄茄素可能是通过作用于皮层 GABAA $\alpha$ 1 发挥作用。

表 5 萆澄茄素联合戊巴比妥钠阈上剂量 (45 mg·kg<sup>-1</sup>) 对小鼠睡眠的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 5 Effects of cubebin combined with pentobarbital sodium suprathreshold dose (45 mg·kg<sup>-1</sup>) on sleep of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	入睡潜伏期/min	睡眠时间/h
对照	—	3.63±0.94	1.55±0.39
地西洋	2	2.29±0.66**	6.35±1.52**
萆澄茄素	25	3.23±0.50	6.95±1.56**
	50	3.20±0.93	8.85±2.93**
	100	3.08±0.59	10.00±0.00**



与对照组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01

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

图 2 萆澄茄素对正常小鼠脑内 GABAA $\alpha$ 1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Effect of cubebin on GABAA $\alpha$ 1 protein expression in brain of normal mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**3.1.3 氟马西尼拮抗实验** 如图 3 所示, 单用萆澄茄素组, 小鼠入睡率为 87.5%, 与氟马西尼合用后, 小鼠入睡率为 62.5%, 由此表明氟马西尼可拮抗高剂量萆澄茄素促睡眠的作用, 因此可以推断萆澄茄素的镇静催眠作用与苯二氮草类受体的参与有关。

**3.2 萆澄茄素对失眠小鼠的作用**

**3.2.1 旷场实验** 如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠总路程、平均速度和中央路程、中央平均速度均显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 萆澄茄素各剂量组均能显著降低小鼠的总路程、平均速度、中央路程、中央平均速度、活动时间 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 显著增加小鼠的活动次数 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

**3.2.2 qRT-PCR 检测小鼠海马和皮层组织中 *GABAA1* mRNA 表达** 如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马和皮层组织中 *GABAA1* mRNA

表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 与模型组比较, 萆澄茄素中剂量组海马组织中 *GABAA1* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 各给药组小鼠皮层

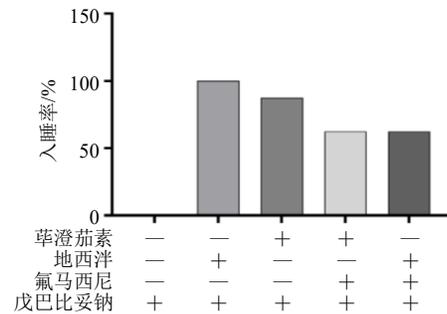
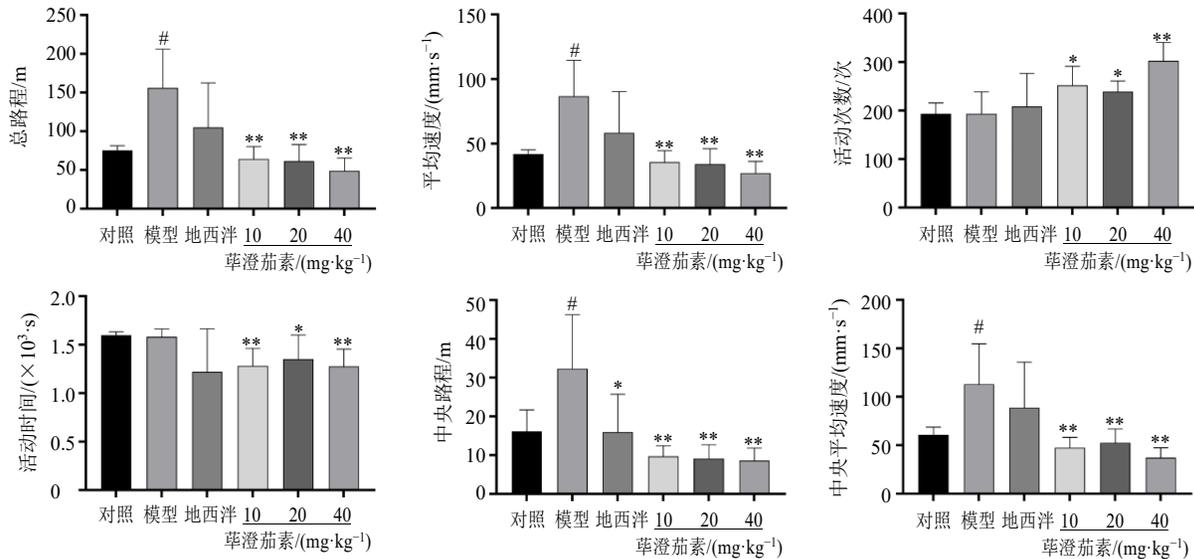


图 3 氟马西尼联合戊巴比妥钠阈下剂量诱导各组小鼠的入睡率 ( $n = 8$ )

Fig. 3 Proportion of sleep of mice in each group induced by flumazenil combined with pentobarbital sodium subthreshold dose ( $n = 8$ )



与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.05$ , 下图同  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group, same as below figures

图 4 各组小鼠旷场实验活动情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Activity of mice in each group in open field experiment ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

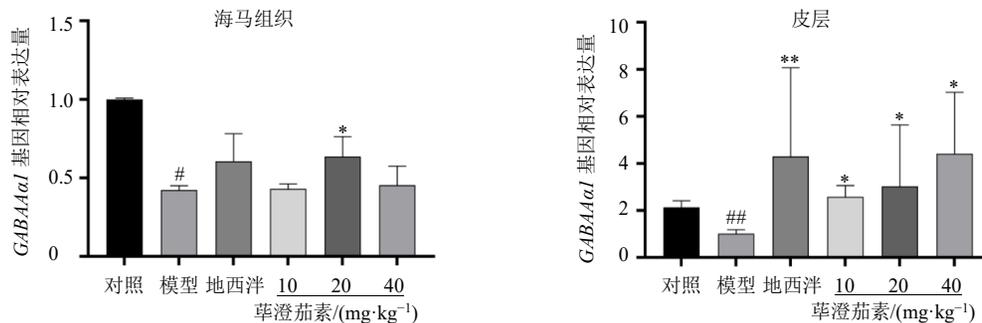


图 5 萆澄茄素对睡眠剥夺小鼠海马组织和皮层中 *GABAA1* 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Effect of cubeben on *GABAA1* gene expression in hippocampus and cortex of sleep deprived mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

GABAA $\alpha$ 1 mRNA 表达均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

**3.2.3 免疫组化检测小鼠海马和皮层组织中 GABAA $\alpha$ 1 蛋白表达** 如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马和皮层组织中 GABAA $\alpha$ 1 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 苾澄茄素低、高剂量组小鼠皮层组织中 GABAA $\alpha$ 1 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), 苾澄茄素高剂量组小鼠海马组织中 GABAA $\alpha$ 1 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), 地西洋组海马和皮层组织中 GABAA $\alpha$ 1 蛋白表达均

显著升高 ( $P < 0.05$ )。

**3.2.4 LC-MS/MS 检测小鼠海马和皮层组织中神经递质含量** 如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马组织中 GABA、Glu、5-HT 及 5-HIAA 水平无显著变化; 与模型组比较, 苾澄茄素高剂量组海马组织中 Glu 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 苾澄茄素中、高剂量组海马组织中 GABA 水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠皮层组织中 GABA、5-HT、Glu 水平均显著降

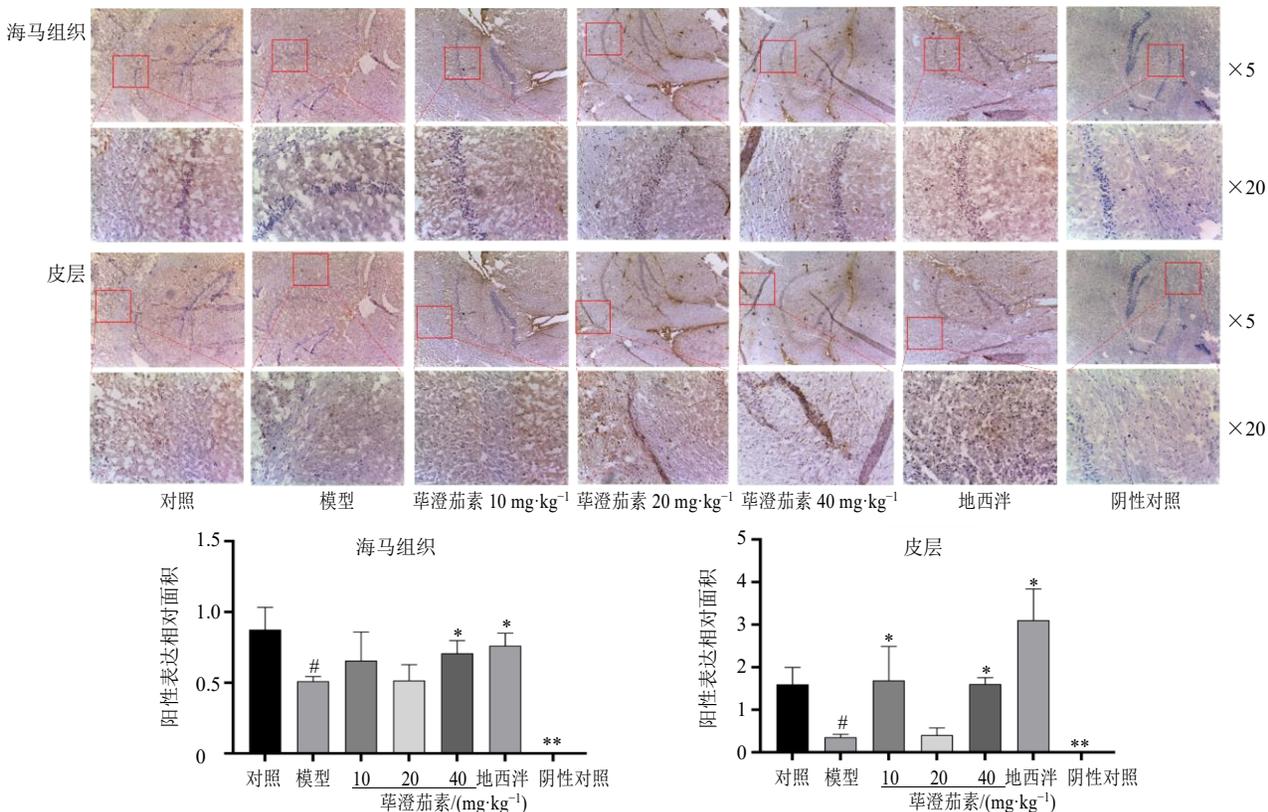


图 6 苾澄茄素对睡眠剥夺小鼠海马组织和皮层组织中 GABAA $\alpha$ 1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 Effect of cubebin on GABAA $\alpha$ 1 protein expression in hippocampus and cortex of sleep deprived mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

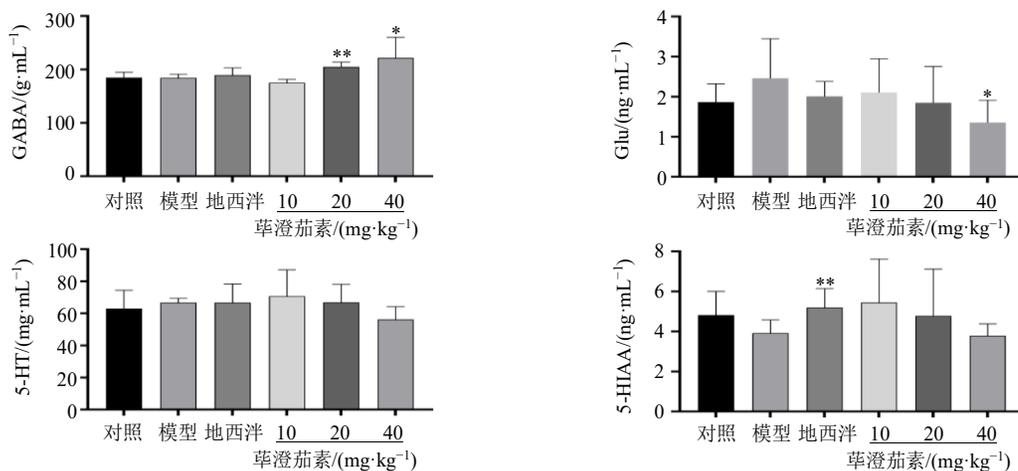


图 7 苾澄茄素对睡眠剥夺小鼠海马组织中神经递质含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Effect of cubebin on neurotransmitter content in hippocampus of sleep deprived mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

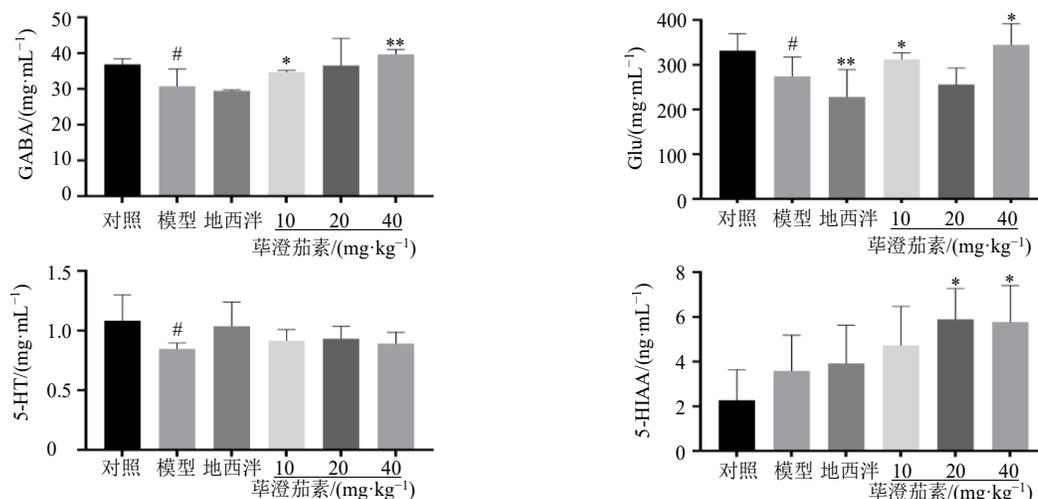


图 8 菝澄茄素对睡眠剥夺小鼠皮质中神经递质含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 8 Effect of cubebin on neurotransmitter content in cortex of sleep deprived mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

低 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，菝澄茄素低、高剂量可显著升高皮质组织中 GABA、Glu 水平 ( $P < 0.05, 0.01$ )，菝澄茄素中、高剂量组皮质组织中代谢产物 5-HIAA 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )，地西洋组皮质组织中 Glu 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

#### 4. 讨论

本研究通过探讨菝澄茄素对正常小鼠以及睡眠剥夺小鼠的作用来阐述其药效及潜在作用机制。在镇静催眠药物的药效学研究中通常可用延长或缩短戊巴比妥钠所致翻正反射消失时间长短来反映药物的催眠效果<sup>[17]</sup>。本研究利用戊巴比妥钠协同实验反映菝澄茄素对正常小鼠的作用，发现其增加了小鼠睡眠持续时间以及入睡只数，具有较好的镇静、催眠的效果。刘正<sup>[13]</sup>利用苯二氮草的解毒剂——氟马西尼来研究药物的潜在作用靶点，本研究通过氟马西尼联合戊巴比妥钠阈下剂量发现氟马西尼有拮抗菝澄茄素镇静催眠的作用。并通过免疫组化实验发现菝澄茄素增加了正常小鼠皮质 GABA $\alpha$ 1 的表达。由此推断菝澄茄素可能作用于 GABA 来发挥作用。基于以上结果，进一步研究了菝澄茄素对睡眠剥夺小鼠的作用，参照文献方法<sup>[14]</sup>建立小鼠睡眠剥夺模型，在给予菝澄茄素后进行旷场实验发现菝澄茄素显著降低失眠小鼠的活动量，并通过免疫组化实验和 qRT-PCR 检测发现菝澄茄素显著增加了皮质中 GABA $\alpha$ 1 表达；此外利用 LC-MS/MS 技术检测菝澄茄素对睡眠剥夺小鼠脑内神经递质含量的影响，发现菝澄茄素增加海马组织和皮质中 GABA 含量，并调控皮质中 5-HIAA、Glu 的水平。

研究显示，脑内的神经递质如 GABA、5-HT 及

Glu 等神经递质均参与睡眠-觉醒的转换<sup>[18]</sup>。其中 GABA 是介导睡眠重要的神经递质，其受体在参与睡眠的过程中也相当重要，其主要分布在丘脑、海马、皮质层等区域<sup>[19]</sup>。研究发现 GABA 的含量与睡眠-觉醒的发生呈正相关<sup>[20]</sup>。GABA 受体包括 GABA $\alpha$ 、GABA $\beta$  以及 GABA $\gamma$  3 种受体类型<sup>[21]</sup>，其中，GABA $\alpha$  受体是大脑中参与睡眠的主要的受体类型，GABA 通过结合神经元上的受体后，激活氯离子通道，导致 Cl<sup>-</sup>内流，产生抑制性突触后电位<sup>[22]</sup>。GABA $\alpha$  受体由不同亚单位共同组成，主要有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\sigma$  亚单位<sup>[23]</sup>。研究表明，GABA 与不同的亚型结合是药物产生不同药效的原因，而苯二氮草类药物结合的受体亚型中包括  $\alpha$  和  $\gamma$ ，其中  $\alpha$ 1 亚单位在苯二氮草诱导的镇静中起着重要作用<sup>[24]</sup>。本研究通过菝澄茄素联合氟马西尼拮抗实验以及免疫组化实验发现其作用和 GABA $\alpha$  受体的参与有关，并利用 LC-MS/MS 技术检测到菝澄茄素增加了失眠小鼠脑内 GABA 的含量，由此证明菝澄茄素通过作用于 GABA 能神经元系统发挥其镇静催眠的作用。

综上所述，菝澄茄素可以诱导正常小鼠发生睡眠以及缓解失眠小鼠的症状，其作用机制可能与调节 GABA 能神经系统有关。通过查阅文献发现 GABA $\alpha$  受体的激活可以增加 GABA 的含量，抑制 GABA 转运体的功能也会影响 GABA 的含量<sup>[25]</sup>，Bertelsen 等<sup>[26]</sup>发现 GABA 水平的增加可以改变苯二氮草类的配体构型，从而改变配体亲和力。本研究发现 GABA 水平有所提高，菝澄茄素是否会因 GABA 水平的提高从而改变其受体亲和力，以及是

否影响 GABA 转运体的功能也有待进一步研究。另外研究发现 GABA 并不只是发挥抑制神经元兴奋的作用,而是通过与其他神经递质相互作用而起到兴奋或抑制神经元的作用,投射到不同的大脑核团也发挥不同的作用<sup>[27]</sup>。本研究初步发现萆澄茄素也调节了 Glu 及 5-HT 代谢产物 5-HIAA 的水平,推断萆澄茄素诱导睡眠的作用靶点有多种途径,萆澄茄素是否通过调节 Glu、5-HT 水平及投射路径来发挥治疗失眠的作用,以及不同神经递质之间的相互调节的程度有待深入研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Capman J L, Comas M, Hoyos C M, *et al.* Is metabolic rate increased in insomnia disorder? A systematic review [J]. *Front Endocrinol*, 2018, 9: 374.
- [2] Beaudin A E, Raneri J K, Ahmed S, *et al.* Association of insomnia and short sleep duration, alone or with comorbid obstructive sleep apnea, and the risk of chronic kidney disease [J]. *Sleep*, 2022, 45(7): zsac088.
- [3] 吴恩来, 张雨青, 王健, 等. 失眠伴抑郁与单纯失眠患者失眠认知行为治疗的疗效分析 [J]. *中华精神科杂志*, 2020, 53(2): 140-145.
- [4] 王振杰, 赵蔓, 陈婷蔚, 等. 中国老年人睡眠障碍患病率的 Meta 分析 [J]. *中国全科医学*, 2022, 25(16): 2036-2043.
- [5] 刘帅, 张斌. 《中国失眠障碍诊断和治疗指南》解读 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2017, 17(9): 633-638.
- [6] Curado D F, de Barros V V, Noto A R, *et al.* Dependence on hypnotics: A comparative study between chronic users of benzodiazepines and Z-drugs [J]. *Braz J Psychiatry*, 2022, 44(3): 248-256.
- [7] 吴艳, 刘炳林. 失眠症中药新药临床试验设计的考虑 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(3): 285-288.
- [8] Neres N B R, Montagnini D, Ferreira D S, *et al.* *In vivo* and *in silico* trypanocidal activity evaluation of (-)-cubebin encapsulated in PLGA microspheres as potential treatment in acute phase [J]. *Chem Biodivers*, 2021, 18(6): e2100052.
- [9] Lima T C, Lucarini R, Volpe A C, *et al.* *In vivo* and *in silico* anti-inflammatory mechanism of action of the semisynthetic (-)-cubebin derivatives (-)-hinokinin and (-)-*O*-benzylcubebin [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(2): 176-179.
- [10] Coimbra H D O S S, Royo V D E A, de Souza V A, *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of (-)-*O*-benzyl cubebin, a (-)-cubebin derivative, obtained by partial synthesis [J]. *Boll Chim Farm*, 2004, 143(2): 65-69.
- [11] Rajalekshmi D S, Kabeer F A, Madhusoodhanan A R, *et al.* Anticancer activity studies of cubebin isolated from *Piper cubeba* and its synthetic derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(7): 1767-1771.
- [12] Somani G S, Nahire M S, Parikh A D, *et al.* Neuroprotective effect of cubebin: A dibenzylbutyrolactone lignan on scopolamine-induced Amnesia in mice [J]. *Indian J Med Res*, 2017, 146(2): 255-259.
- [13] 刘正. 建立镇静催眠药临床前药效学评价方法和研究西红花有效成分的催眠作用及机制 [D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [14] 厚玉姣, 石晓静, 苗雯蓉, 等. 睡眠剥夺动物模型最新研究进展 [J]. *世界睡眠医学杂志*, 2020, 7(4): 740-744.
- [15] 漆明, 王宇, 李春, 等. 超高效液相-串联质谱法快速测定癫痫患者血清 4 种氨基酸类神经递质的应用研究 [J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(2): 210-214.
- [16] 高耀, 王鹏, 许腾, 等. 逍遥散抗抑郁代谢特征综合分析及其调节能量代谢和神经递质机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(5): 1360-1368.
- [17] 岳小芳, 李帅帅, 刘杰, 等. 坤泰胶囊对初老雌性小鼠的戊巴比妥钠睡眠增强作用及其机制研究 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(3): 433-437.
- [18] Atkin T, Comai S, Gobbi G. Drugs for insomnia beyond benzodiazepines: Pharmacology, clinical applications, and discovery [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(2): 197-245.
- [19] Weber F, Chung S, Beier K T, *et al.* Control of REM sleep by ventral medulla GABAergic neurons [J]. *Nature*, 2015, 526(7573): 435-438.
- [20] 魏彦照, 何凡, 王帅, 等.  $\gamma$ -氨基丁酸系统与常见重性精神疾病的关系探讨 [J]. *临床精神医学杂志*, 2018, 28(6): 429-430.
- [21] Ernst M, Sieghart W. GABAA receptor subtypes: Structural variety raises hope for new therapy concepts [J]. *e-Neuroforum*, 2015, 6(4): 97-103.
- [22] Xie K Q, Wu C H, Chi Z Y, *et al.* Enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and other health-promoting metabolites in germinated broccoli by mannose treatment [J]. *Sci Hort*, 2021, 276: 109706.
- [23] Simeone X, Koniuszewski F, Müllegger M, *et al.* A benzodiazepine ligand with improved GABAA receptor  $\alpha 5$ -subunit selectivity driven by interactions with loop C [J]. *Mol Pharmacol*, 2021, 99(1): 39-48.
- [24] Dauvilliers Y, Evangelista E, Lopez R, *et al.* Absence of  $\gamma$ -aminobutyric acid-a receptor potentiation in central hypersomnolence disorders [J]. *Ann Neurol*, 2016, 80(2): 259-268.
- [25] 王秀峰, 唐娜娜, 张瑜, 等. 基于阴阳寤寐学说的交泰丸调节失眠大鼠 GABA 信号通路的药理作用机制研究 [J]. *世界睡眠医学杂志*, 2021, 8(11): 1861-1866.
- [26] Bertelsen F, Landau A M, Vase K H, *et al.* Acute *in vivo* effect of valproic acid on the GABAergic system in rat brain: A [<sup>11</sup>C]Ro15-4513 microPET study [J]. *Brain Res*, 2018, 1680: 110-114.
- [27] Venner A, de Luca R, Sohn L T, *et al.* An inhibitory lateral hypothalamic-preoptic circuit mediates rapid arousals from sleep [J]. *Curr Biol*, 2019, 29(24): 4155-4168.

[责任编辑 李亚楠]