

沉香提取物对 PCPA (对氯苯丙氨酸) 致失眠大鼠的镇静催眠作用

李树根, 刘坤东, 王浩楠, 姚晓玲, 苏宁

(广州中医药大学基础医学院, 广东广州 510006)

摘要: 探究沉香提取物对 PCPA (P-chlorophenylalanine, PCPA) 致失眠大鼠的镇静催眠作用。选取 SD 大鼠 90 只, 10 只作为空白组, 余 80 只建立失眠大鼠模型, 分为模型组、沉香挥发油高剂量组、沉香挥发油低剂量组、沉香醇提取物高剂量组、沉香醇提取物低剂量组、沉香水提取物高剂量组、沉香水提取物低剂量组、地西洋组。观察各组下丘脑 5-羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA)、去甲肾上腺素 (NE)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、谷氨酸 (Glu) 含量及 GABAAR_{α1}、GABAAR_{γ2}、5-HT_{1A} 受体 mRNA 相对表达量。给药 6 d 后, 挥发油高剂量组、挥发油低剂量组、醇提取物高剂量组、醇提取物低剂量组下丘脑 5-HT 含量分别为 4.85 ng/mL、4.84 ng/mL、4.81 ng/mL、4.49 ng/mL, GABA 含量分别为 1.46 ng/mL、1.44 ng/mL、1.41 ng/mL、1.39 ng/mL, 高于模型组 ($p < 0.05$); 挥发油高剂量组、挥发油低剂量组、醇提取物高剂量组 5-HT_{1A} 受体 mRNA 相对表达量为 0.81、0.79、0.74, 高于模型组 ($p < 0.05$); GABAAR_{α1} mRNA 相对表达量分别为 0.94、0.84、0.85, GABAAR_{γ2} mRNA 相对表达量分别为 0.74、0.70、0.73, 高于模型组 ($p < 0.05$)。沉香提取物对 PCPA 致失眠大鼠具有一定镇静催眠作用。

关键词: 沉香提取物; PCPA; 失眠; 神经递质

文章编号: 1673-9078(2021)06-35-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.1031

Sedative and Hypnotic Effects of Agarwood Extract on PCPA-induced Insomnia Rats

LI Shu-gen, LIU Kun-dong, WANG Hao-nan, YAO Xiao-ling, SU Ning

(School of Basic Medical Science of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To explore the sedative and hypnotic effects of agarwood extract on PCPA (P-chlorophenylalanine, PCPA) - induced insomnia rats. Ninety SD rats were selected, 10 were used as the blank group, and the remaining 80 rats were used to establish insomnia rat models. They were divided into model group, agarwood volatile oil high-dose group, agarwood volatile oil low-dose group, agarwood alcohol extract high-dose group, and agarwood alcohol the low-dose extract group, the high-dose group of water extract of agarwood group, the low-dose group of water extract of agarwood group, and the diazepam group. Hypothalamic serotonin (5-HT), dopamine (DA), norepinephrine (NE), γ -aminobutyric acid (GABA), glutamic acid (Glu) content and GABAAR_{α1}, GABAAR_{γ2}, 5-HT_{1A} relative expression of body mRNA were observed. After 6 days of administration, the 5-HT contents of hypothalamus in the high-dose volatile oil group, low-dose volatile oil group, high-dose alcohol extract group, and low-dose alcohol extract group were 4.85 ng/mL, 4.84 ng/mL, 4.81 ng/mL, 4.49 ng/mL, respectively. GABA contents were 1.46 ng/mL, 1.44 ng/mL, 1.41 ng/mL, 1.39 ng/mL, respectively, which were higher than the model group ($p < 0.05$). The relative expression levels of GABAAR_{α1} mRNA in the high-dose volatile oil group, low-dose volatile oil group, and high-dose alcohol extract group were 0.94, 0.84, 0.85, respectively, all of them were higher than the model group ($p < 0.05$). The relative expression of GABAAR_{γ2} mRNA

引文格式:

李树根,刘坤东,王浩楠,等.沉香提取物对 PCPA(对氯苯丙氨酸)致失眠大鼠的镇静催眠作用[J].现代食品科技,2021,37(6):35-42,+19

LI Shu-gen, LIU Kun-dong, WANG Hao-nan, et al. Sedative and hypnotic effects of agarwood extract on PCPA-induced insomnia rats [J].

Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 35-42, +19

收稿日期: 2020-11-09

基金项目: 中国高等教育学会专项课题重点项目 (2020JXD08)

作者简介: 李树根 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治代谢性疾病

通讯作者: 苏宁 (1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中西医结合防治代谢性疾病

were 0.74, 0.70, 0.73, respectively, and the relative expression of 5-HT_{1A} receptor mRNA were 0.81, 0.79, 0.74, respectively, all of them were higher than the model group ($p < 0.05$). Agarwood extract has a certain sedative and hypnotic effect on PCPA-induced insomnia rats.

Key words: agarwood extract; PCPA; insomnia; neurotransmitter

失眠, 又称睡眠障碍 (Sleep disorder, SD), 是以频繁而持续的入睡困难或睡眠维持困难并导致睡眠满意度不足为特征的睡眠障碍。失眠表现为入睡困难、睡眠维持障碍、早醒、睡眠质量下降和总睡眠时间减少, 并伴有日间功能障碍, 是当代社会的一个公共健康问题, 病程较长且较难治愈, 严重者还可诱发和加重心脑血管疾病, 而且常与精神健康问题密切相关, 失眠影响了全球约 30%~40% 的人群^[1]。

2017 年中国睡眠研究会制定“中国失眠症诊断和治疗指南”, 提出心理治疗是失眠治疗首选, 药物治疗应在心理治疗的前提进行。长期药物治疗具有依赖性、副作用等问题, 心理治疗在国内普遍率不高。中医药在治疗失眠上积累了丰富经验, 而且中药具有不良反应小、无药物依赖性等优势。沉香为瑞香科植物白木香含有树脂的木材, 作为中药, 具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘的作用^[2]。现代药理研究提示沉香含镇静中枢神经作用的成分: 沉香挥发油通过蒸汽吸入对小鼠给药, 结果显示具有抗焦虑作用^[3,4]; 沉香气体吸入给药对失眠小鼠具有一定质量作用, 能改善睡眠^[5]; 王帅等^[6]通过实验发现沉香挥发油、醇提物具有镇静催眠作用; 雷莉等^[7]通过沉香熏香的疗法治疗 120 例失眠障碍患者, 结果发现沉香熏香能显著改善患者睡眠质量、减轻失眠的严重程度。以沉香为原料制作的沉香茶, 是新一代纯天然绿色健康饮品, 有学者以沉香为主原料制备具有安神、温中、暖肾、纳气等功效的沉香茶^[8]。上述研究均提示沉香具有镇静催眠的作用, 但缺乏作用机制的研究。本文以沉香提取物为研究对象, 观察沉香提取物对 PCPA 致失眠大鼠脑镇静催眠的作用, 并探讨其治疗失眠的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

研究动物: SPF 级 SD 大鼠 90 只, 雌雄各半, 体重 180~220 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 合格证号: 00202800, 许可证号: SCXK(粤)2013-0034。饲养于广州中医药大学实验动物中心屏障环境 (SPF 级), 室温 23~25 °C, 湿度 55%~60%, 12 h 昼夜交替, 实验单位使用许可证编号: SYXK(粤)2018-0085。本文研究所做实验均获得伦理委员会批准。

主要试剂: 对氯苯丙氨酸 (PCPA, 批号: L1727016), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 大鼠 5-HT、DA、NE、GABA、Glu 酶联免疫吸附测定试剂盒 (批号: Oct 2018), 上海江莱生物科技有限公司; Maker I DNA Ladder (批号: M1100)、琼脂糖 (批号: A8201), 北京索莱宝科技有限公司; 逆转录试剂盒 (批号: 11119ES60)、PCR 预混合溶液 2×Hieff™ PCR Master Mix (批号: 10102ES03), 上海翊圣生物公司; TAE (批号: 680959191), biosharp 公司; 伊红染色液 (批号: No.20180920), 北京索莱宝科技有限公司; 苏木素染色液 (批号: No.20181025), 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器

主要仪器: 挥发油采集器、循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; 旋转蒸发仪 R-1001N, 郑州长城科工贸有限公司; CA-1115A 冷去水循环装置, 上海爱郎仪器有限公司; 真空冷冻干燥机, 广州贝立思仪器有限公司; Heal Force 低温高速离心机, 力康生物医疗科技控股有限公司; iMark 酶标仪, 美国 BIO-RAD 公司; 自制雾化吸入箱; 超声雾化器, 江苏鱼跃医疗设备股份有限公司; OLYMPUS 显微镜, 日本奥林巴斯公司; 凝胶成像系统, 美国 BIO-RAD 公司; PCR 仪器 T100 Thermal Cycler, 美国 BIO-RAD 公司; 电泳系统, 美国 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 沉香提取物溶液制备

沉香由广东宝盛沉香制品有限公司提供, 经广东宝盛沉香制品有限公司鉴定为正品。沉香挥发油: 取沉香药材, 适当粉碎, 过 3 号筛, 准确称取 50 g 粉末于 1000 mL 圆底烧瓶中, 加入 500 mL 蒸馏水, 利用挥发油采集器提取, 待煮沸后调至微沸状态煎煮 6~8 h, 关闭电源, 待温度降至室温时收集挥发油, 4 °C 储存备用。沉香醇提物: 取沉香药材, 适当粉碎, 过 3 号筛, 准确称取 50 g, 加入 500 mL 95%乙醇, 室温浸泡 48 h 后, 过滤, 收集滤液, 滤液减压浓缩后用适量 95%乙醇复溶, 均匀倾倒入表面皿中, 置于 -80 °C 冰箱过夜, 次日取出于冻干机中冻干过夜。24 h 后收集冻干粉末, -20 °C 储存备用。沉香水提物: 取沉香药材, 适当粉碎, 过 3 号筛, 准确称取 50 g, 加入 500 mL

蒸馏水煎煮 6~8 h 提取, 煮完后过滤, 所得滤液浓缩至 50 mL, 即为 1 g/mL 的沉香水提取物, 4 °C 储存备用。

1.3.2 建模及分组

大鼠适应性喂养 3 d 后, 腹腔注射 PCPA 混悬液 (350 mg/kg), 1 次/d, 连续 2 d。于第一次腹腔注射 36 h 后, 大鼠失去正常昼夜节律, 白天夜间皆活动不停, 表示模型复制成功。

将 90 只实验大鼠按雌雄分别进行编号 1~45, 然后分别称重, 记录好体重数据, 并将体重数据的结果按编号输入 EXCEL 表格, 按体重从小到大重新排序, 运用公式 RAND 进行随机分组, 随机分成空白组 10 只、模型组 10 只、沉香挥发油高剂量组 10 只、沉香挥发油低剂量组 10 只、沉香醇提取物高剂量组 10 只, 沉香醇提取物低剂量组 10 只, 沉香水提取物高剂量组 10 只, 沉香水提取物低剂量组 10 只, 地西洋组 10 只, 以上分组均是雌雄各半。空白组、模型组以等体积生理盐水灌胃, 每天 1 次。沉香醇提取物低剂量组 (0.5 g/kg, 按生药量计)、沉香醇提取物高剂量组 (2 g/kg, 按生药量计)、沉香水提取物低剂量组 (0.5 g/kg, 按生药量计)、沉香水提取物高剂量组 (2 g/kg, 按生药量计)、地西洋组 (2 mg/kg) 根据相应浓度灌胃等体积灌胃, 每天 1 次。沉香挥发油低剂量组 (50 μL)、沉香挥发油低剂量组 (100 μL) 采用超声雾化吸入给药, 将大鼠置于自制雾化吸入箱内, 预先将雾气充满, 在将大鼠置于箱内, 持续雾化 1 h, 每天 1 次。各组根据相应给药方式连续给药 6 d。

1.3.3 样品采集及处理

大鼠末次给药 4 h 后, 给予过量戊巴比妥钠腹腔注射麻醉处死大鼠, 迅速取出大脑, 冰生理盐水洗净血液, 冰盘迅速分离下丘脑, 取一部分下丘脑组织, 用预冷的 PBS 冲洗组织, 去除组织残留血液, 称重而后将组织用剪刀剪碎, 将剪碎的组织与对应体积的 PBS 加入玻璃匀浆器中 (相应体积是根据 1:9 的重量体积比, 即 1 g 的下丘脑组织样品对应 9 mL 的 PBS), 然后冰上充分研磨, 最后将匀浆液置于低温离心机进行离心, 设置参数为 5000×g 的离心力, 离心 10 min, 离心后取上清液置于 -80 °C 保存备用。取部分下丘脑组织投入到 4% 多聚甲醛液进行固定, 备用用于 HE 染色。取一部分下丘脑组织置于 -80 °C 保存备用。

1.3.4 5-HT、DA、NE、GABA、Glu 含量检测

取已制备好的上清液, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 5-HT、DA、NE、GABA、Glu 含量, 根据试剂盒说明书步骤操作。

1.3.5 GABAAR_{α1}、GABAAR_{γ2} 和 5-HT_{1A} 受体 mRNA 表达水平检测

取出下丘脑组织, 运用 RT-PCR 法检测 GABAAR_{α1}、GABAAR_{γ2} 和 5-HT_{1A} 受体 mRNA 表达情况。操作方法: (1) 设计引物: 根据 GABAAR_{α1}、GABAAR_{γ2}、5-HT_{1A}、β-actin 核苷酸序列设计引物, 由广州擎科生物科技有限公司合成。β-actin: F: ATATCGCTGCGCTGGTCGTC, R: AGGATGGCGTGAGGGAGAGC。GABAAR_{α1}: F: 5'-AGACAAAACCA CCAGAACCC-3', R: 5'-TTGACGAATAAAAACATA AGCAC-3'; GABAAR_{γ2}: F: 5'-CGTGGTTTGCTTACT CCCTA-3', R: 5'-TCCGACAATCCAATACTTTT-3; 5-HT_{1A}: F: 5'-AAGGTGGAAAAGAAGGGAGC-3', R: 5'-AATAACTGGGTTGAGCAGGG-3'。(2) 提取下丘脑总 RNA, 然后进行逆转录, 最后进行 PCR 实验, PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C~60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30~60 s/kb, 由变性、退火、延伸经过 35 循环, 最后 72 °C 终延伸 10 min。

(3) 电泳: 取 10 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

(4) 定量分析: 运用凝胶成像系统对所拍摄的照片进行密度扫描, 以 GABAAR_{α1}、GABAAR_{γ2}、5-HT_{1A} 对 β-actin 的光密度值的比值表示相应的相对量。

1.3.6 HE 染色

取出已用 4% 多聚甲醛固定好的下丘脑组织, 按以下步骤进行: (1) 脱水透明。使用全自动脱水机进行组织脱水。设定程序要求: 让组织按从低浓度到高浓度酒精的顺序进行梯度脱水, 酒精浓度一般为 75%、85%、95%、100% 无水乙醇; 浸泡时间: 95% 的酒精浸泡两次, 浸泡第二次时间约 12 h, 其余浸泡时间约 2 h。将脱水后的组织放入酒精和二甲苯溶液中浸泡, 浸泡时间大约 30 min。(2) 浸蜡: 将保温箱温度调到 56 °C, 将组织置于已经融化的石蜡中, 在放入溶蜡箱中保温, 浸蜡 40 min。(3) 包埋: 使用镊子将下丘脑组织块置于入包埋盒中, 浸上石蜡, 而后迅速转移至冷冻台上, 使蜡块冷冻后, 最后取出蜡块组织。(4) 蜡块切片: 使用切片机, 将切片厚度调到 3 μm, 同时调节刀片角度 (约 5 °), 切出完整切片后, 平摊于 40 °C 温水的恒温水箱中。平摊约 5~10 min, 然后用载玻片轻轻捞起, 置于摊平器上, 最后放入恒温箱中 60 °C 烘干过夜。(5) 脱蜡、HE 染色: 这个过程使用全自动染色机, 调节程序按以下参数进行设置: 切片浸入二甲苯脱蜡 30 min, 而后行梯度乙醇, 从高浓度到低浓度 100%、95%、85%、75%, 接着予水冲洗 5 min, 然后浸润苏木精 30 min, 水冲洗 10 min, 浸伊红 5 s, 再予水冲洗 2 min, 最后再行梯度乙醇, 按低浓度到高浓度 75%、85%、95%、100%, 浸二甲苯 I、II。(6) 封片、烤片: 在载玻片上滴石蜡中性树胶, 小心谨慎

盖上盖玻片进行封固,注意盖的时候需排空气泡。(7)显微镜下观察并拍片:运用 Olympus 显微拍照一体机,对下丘脑组织进行形态学观察,对所需视野拍片,编号并保存。

显微镜下观察每组切片,细胞质明显淡染,尼氏体明显减少的神经元细胞为发生病理性改变的细胞,定义为阳性细胞,运用 Image J 1.8 软件对 HE 染色图片进行分析,人工计数同一高倍视野阳性细胞数量并进行统计学分析取已制备好的上清液,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 5-HT、DA、NE、GABA、Glu 含量,根据试剂盒说明书步骤操作。

1.4 统计学处理方法

采用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析,计量资料符合正态分布的使用($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,不符合正态分布则用 $M(P_{25}, P_{75})$ 描述;符合正态分布与方差齐性的多组资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA);不符合正态分布与方差齐性的多组计量资料比较采用秩合检验(Kruskal-Wallis),两两比较用 Dunn-Bonferroni 检验。 $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 各组大鼠一般状态情况

PCPA 是 5-HT 合成抑制剂,能高度选择作用于色氨酸羟化酶,通过抑制酶的活性抑制 5-HT 的合成,有学者研究指出在足量注射 PCPA (350 mg/kg) 每天 1 次,连续 2 d 后可较理想复制失眠大鼠模型,在注射后 3 d 睡眠觉醒百分比开始发生变化,6 d 达到高峰,此时几乎可以造成完全失眠的状态,7 d 睡眠便开始恢复,9 d 时已恢复正常,但此时脑内 5-HT 仍处于较低水平^[9]。本研究观察各组大鼠一般状态情况,正常组:白天安静多倦卧,夜晚活动,性情温和,不易攻击同类,饮食基本正常,皮毛顺滑有光泽;模型组:造模后第 1~3 d 大鼠行为较活跃,表现出一定兴奋性,稍受声光等刺激就异常狂躁,同类相互攻击性增多,昼夜节律紊乱,皮毛较蓬松光泽少。造模后第 4~6 d,大鼠疲劳状态,兴奋性降低,精神状态欠佳、活动减少,团缩,行走不稳,皮毛光泽进一步减退;挥发油高剂量组、挥发油低剂量组、醇提取物高剂量组、醇提取物低剂量组、地西洋组:给药 1~3 d,白天活动减少,倦卧;给药 4~6 d,白天活动进一步减少,倦卧,有睡意,能入睡,精神改善。水提取物高剂量组、水提取物低剂量组:实验过程中大鼠行为表现与模型组表现基

本一致。从结果得知,模型组大鼠行为学表现与文献报道基本一致,给药干预后沉香挥发油、沉香醇提取物可以改善大鼠失眠情况。

2.2 各组大鼠 5-HT、DA、NE 水平比较

脑中缝核含 5-HT 神经元胞体,杨岑等^[10]研究发现 5-HT 具有促进睡眠的作用,提示 5-HT 是调节睡眠的重要神经递质。DA 主要存在于下丘脑与大脑黑质,脑内 DA 神经元兴奋则诱发睡眠觉醒,有学者研究发现失眠大鼠在治疗后比治疗前 DA 含量显著的降低^[11],提示若 DA 神经元兴奋性降低则睡眠可能增加,觉醒可能减少。NE 能神经元胞体主要位于中脑网状结构、脑桥的蓝斑以及延髓网状结构的腹外侧部分,上行部分投射到大脑皮层、边缘前脑和下丘脑,有研究表明在抑制脑内酪氨酸羟化酶后,NE 含量减少而睡眠时间相应增加^[12],提示 NE 含量减少时睡眠可能增加。本研究结果如表 1、表 2、表 3 所示。

表 1 各组大鼠下丘脑中 5-HT 含量结果比较

Table 1 Comparison of 5-HT contents in hypothalamus of rats in each group [$M(P_{25}, P_{75}), n=10$]

组别	剂量	5-HT/(ng/mL)	P_1	P_2
空白组	-	(4.46, 5.70)	/	/
模型组	-	(3.64, 3.83) [△]	0.00	/
挥发低组	50 μ L	(4.72, 4.98) [*]	/	0.00
挥发高组	100 μ L	(4.61, 4.89) [*]	/	0.00
醇低组	0.5 g/kg	(4.06, 4.86) [*]	/	0.02
醇高组	2 g/kg	(4.21, 5.30) [*]	/	0.00
水低组	0.5 g/kg	(3.78, 4.07)	/	1.00
水高组	2 g/kg	(4.01, 4.26)	/	1.00
地西洋组	2 mg/kg	(3.67, 3.91)	/	1.00

注: P_1 与空白组比较: $\Delta p < 0.05$; P_2 与模型组比较: $* p < 0.05$ 。下表同。

表 2 各组大鼠下丘脑中 DA 含量结果比较

Table 2 Comparison of DA contents in hypothalamus of rats in each group [$M(P_{25}, P_{75}), n=10$]

组别	剂量	DA/(pg/mL)	P_1	P_2
空白组	-	(269.05, 286.77)	/	/
模型组	-	(307.82, 329.12) [△]	0.02	/
挥发低组	50 μ L	(257.44, 276.83) [*]	/	0.00
挥发高组	100 μ L	(272.61, 284.57) [*]	/	0.01
醇低组	0.5 g/kg	(259.58, 289.11) [*]	/	0.01
醇高组	2 g/kg	(272.49, 286.25) [*]	/	0.01
水低组	0.5 g/kg	(295.91, 331.19)	/	1.000
水高组	2 g/kg	(257.57, 340.25)	/	0.24
地西洋组	2 mg/kg	(284.44, 307.55)	/	1.00

模型组大鼠 5-HT 含量为 3.72 ng/mL, 低于正常组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$); 模型组大鼠 DA、NE 含量分别为 320.50 pg/mL、1.86 ng/mL, 均高于正常组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。给药干预后, 沉香挥发油高剂量组、沉香挥发油低剂量组、沉香醇提取物高剂量组、沉香醇提取物低剂量组, 5-HT 含量显著上升, DA、NE 含量显著下降, 挥发油高剂量组、挥发油低剂量组、醇提取物高剂量组、醇提取物低剂量组下丘脑 5-HT 含量分别为 4.85 ng/mL、4.84 ng/mL、4.81 ng/mL、4.49 ng/mL, 均高于模型组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$); DA 含量分别为 277.96 pg/mL、269.11 pg/mL、277.34 pg/mL、275.00 pg/mL, NE 含量分别为 1.56 ng/mL、1.54 ng/mL、1.57 ng/mL、1.58 ng/mL, 均显著低于模型组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。上述研究结果说明, 沉香挥发油、沉香醇提取物能够增加 5-HT 含量, 降低 DA、NE 含量, 对 PCPA 致失眠大鼠具有镇静催眠作用。

表 3 各组大鼠下丘脑中 NE 含量结果比较

Table 3 Comparison of NE contents in hypothalamus of rats in each group [$M(P_{25}, P_{75}), n=10$]

组别	剂量	NE/(ng/mL)	P_1	P_2
空白组	-	(1.48, 1.63)	/	/
模型组	-	(1.77, 1.94) ^Δ	0.03	/
挥发低组	50 μL	(1.51, 1.57) [*]	/	0.00
挥发高组	100 μL	(1.44, 1.66) [*]	/	0.03
醇低组	0.5 g/kg	(1.55, 1.60) [*]	/	0.04
醇高组	2 g/kg	(1.52, 1.60) [*]	/	0.02
水低组	0.5 g/kg	(1.87, 2.04)	/	1.00
水高组	2 g/kg	(1.71, 1.82)	/	1.00
地西洋组	2 mg/kg	(1.83, 2.09)	/	1.00

2.3 各组大鼠 GABA、Glu 水平比较

表 4 各组大鼠下丘脑中 GABA 含量结果比较

Table 4 Comparison of GABA contents in hypothalamus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	GABA/(ng/mL)	P_1	P_2
空白组	-	1.43±0.06	/	/
模型组	-	1.16±0.06 ^Δ	0.00	/
挥发低组	50 μL	1.44±0.17 [*]	/	0.00
挥发高组	100 μL	1.46±0.14 [*]	/	0.00
醇低组	0.5 g/kg	1.39±0.09 [*]	/	0.00
醇高组	2 g/kg	1.41±0.07 [*]	/	0.00
水低组	0.5 g/kg	1.28±0.14	/	0.79
水高组	2 g/kg	1.27±0.13	/	0.75
地西洋组	2 mg/kg	1.58±0.18 [*]	/	0.00

GABA 和 Glu 为氨基酸类神经递质。GABA 是中枢神经系统中较为广泛的神经递质, 是重要的抑制性神经递质, 具有镇静、催眠等功能。Glu 广泛分布于脑内, 对丘脑、大脑皮层、小脑的神经元起兴奋性作用。在缺乏有效睡眠时, Glu 功能增强, GABA 与 Glu 是脑内主要的抑制性与兴奋性神经递质, Glu 在脑内多属中间代谢产物, 只有少数发挥神经递质的作用, Glu 是 GABA 合成的重要原料, 而 GABA 本身不能通过血脑屏障, 因此大脑中的 GABA 均由脑内 Glu 作为原料而生成, 故实验中常以 Glu 与 GABA 的比值作为客观评价中枢神经系统功能兴奋和抑制状态的指标^[13,14]。研究表明, GABA 与 Glu 在不同脑区的含量及相应受体功能的改变参与睡眠-觉醒的过程, 在睡眠调节中起着重要作用^[15,16]。本研究结果如表 4、表 5、表 6 所示。

表 5 各组大鼠下丘脑中 Glu 含量结果比较

Table 5 Comparison of Glu contents in hypothalamus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	Glu/(pg/mL)	P_1	P_2
空白组	-	8.780.59	/	/
模型组	-	9.85±0.43 ^Δ	0.00	/
挥发低组	50 μL	8.94±0.46 [*]	/	0.00
挥发高组	100 μL	8.73±0.39 [*]	/	0.00
醇低组	0.5 g/kg	8.85±0.46 [*]	/	0.00
醇高组	2 g/kg	8.55±0.54 [*]	/	0.00
水低组	0.5 g/kg	9.79±0.52	/	0.79
水高组	2 g/kg	9.78±0.39	/	0.75
地西洋组	2 mg/kg	8.53±0.53 [*]	/	0.00

表 6 各组大鼠下丘脑中 Glu/GABA 含量结果比较

Table 6 Comparison of Glu/GABA contents in hypothalamus of rats in each group [$M(P_{25}, P_{75}), n=10$]

组别	剂量	Glu/GABA	P_1	P_2
空白组	-	(5.71, 6.47)	/	/
模型组	-	(8.09, 8.91) ^Δ	0.00	/
挥发低组	50 μL	(5.46, 7.10) [*]	/	0.02
挥发高组	100 μL	(5.63, 6.32) [*]	/	0.00
醇低组	0.5 g/kg	(6.20, 6.68) [*]	/	0.04
醇高组	2 g/kg	(5.76, 6.39) [*]	/	0.00
水低组	0.5 g/kg	(6.67, 8.55)	/	1.00
水高组	2 g/kg	(7.11, 8.68)	/	1.00
地西洋组	2 mg/kg	(4.90, 5.99) [*]	/	0.00

模型组大鼠 GABA 含量为 1.16 ng/mL, 低于正常组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$); 模型组大鼠 Glu 含量为 9.85 pg/mL, 高于正常组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$); 模型组大鼠 Glu/GABA 为 8.51, 高于正

常组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。给药干预后, 沉香挥发油高剂量组、沉香挥发油低剂量组、沉香醇提取物高剂量组、沉香醇提取物低剂量组, GABA 含量显著上升, Glu 含量显著下降, Glu/GABA 显著降低, 挥发油高剂量组、挥发油低剂量组、醇提取物高剂量组、醇提取物低剂量组 GABA 含量分别为 1.46 ng/mL、1.44 ng/mL、1.41 ng/mL、1.39 ng/mL, 高于模型组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$); Glu 含量分别为 8.73 pg/mL、8.94 pg/mL、8.55 pg/mL、8.85 pg/mL, 低于模型组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$); Glu/GABA 分别为 6.00、6.31、6.09、6.37, 低于模型组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。上述研究结果说明, 沉香挥发油、沉香醇提取物能够增加 GABA 含量, 降低 Glu 含量, 降低 Glu/GABA, 对 PCPA 致失眠大鼠具有镇静催眠作用。

2.4 各组大鼠 GABAAR α 1、GABAAR γ 2 和

5-HT $_{1A}$ 受体 mRNA 表达水平比较

Sookoian 等^[17]发现处于冬眠期的松鼠其大脑内 5-HT $_{1A}$ 受体的表达较非冬眠期增加, 通过相应检测手段也显示 5-HT $_{1A}$ 受体 mRNA 在此时期是处于高表达水平。GABA $_A$ 受体在成熟脑组织内含量较多, GABA 能神经元效应的发挥多数是通过 GABA $_A$ 受体介导调控的, GABA $_A$ 受体上含有 GABA 识别点、氯离子通道、苯二氮草识别点, 因此当 GABA 与 GABA $_A$ 受体上的 GABA 识别点结合后, 氯离子通道开放而使氯离子内流, 氯离子内流引起膜电位改变使神经元去极化, 从而发挥 GABA 的中枢性抑制作用, 其中在成熟脑组织中 GABAAR α 1、GABAAR γ 2 是组合较多的亚型之一, 有学者研究失眠动物 GABAAR α 1、GABAAR γ 2、5-HT $_{1A}$ 受体 mRNA 表达降低, 使用抗失眠药物干预表达升高^[18]。本研究结果如表 7、表 8、表 9 所示。

模型组大鼠 GABAAR α 1、GABAAR γ 2、5-HT $_{1A}$ 受体 mRNA 相对表达量分别为 0.55、0.35、0.46, 均低于正常组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。给药干预后, 沉香挥发油高剂量组、沉香挥发油低剂量组、沉香醇提取物高剂量组, GABAAR α 1、GABAAR γ 2、5-HT $_{1A}$ 受体 mRNA 表达显著升高, 挥发油高剂量组、挥发油低剂量组、醇提取物高剂量组 GABAAR α 1 mRNA 相对表达量分别为 0.94、0.84、0.85, GABAAR γ 2 mRNA 相对表达量分别为 0.74、0.70、0.73, 5-HT $_{1A}$ 受体 mRNA 相对表达量为 0.81、0.79、0.74, 均高于模型组, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$)。上述研究结果表明, 沉香挥发油、沉香

醇提取物能够增加 GABAAR α 1、GABAAR γ 2、5-HT $_{1A}$ 受体 mRNA 表达, 进一步证明对 PCPA 致失眠大鼠具有镇静催眠作用。

表 7 各组大鼠下丘脑中 GABAAR α 1 mRNA 结果比较

Table 7 Comparison of GABAAR α 1 mRNA contents in hypothalamus of rats in each group [$M(P_{25}, P_{75}), n=10$]

组别	剂量	光密度值/ β -actin	P_1	P_2
空白组	-	(1.08, 1.17)	/	/
模型组	-	(0.53, 0.57) ^{Δ}	0.00	/
挥发低组	50 μ L	(0.82, 0.86) [*]	/	0.02
挥发高组	100 μ L	(0.91, 0.97) [*]	/	0.00
醇低组	0.5 g/kg	(0.73, 0.77)	/	1.00
醇高组	2 g/kg	(0.83, 0.87) [*]	/	0.01
水低组	0.5 g/kg	(0.52, 0.54)	/	1.00
水高组	2 g/kg	(0.53, 0.58)	/	1.00
地西洋组	2 mg/kg	(0.76, 0.79) [*]	/	0.00

表 8 各组大鼠下丘脑中 GABAAR γ 2 mRNA 结果比较

Table 8 Comparison GABAAR γ 2 mRNA contents in hypothalamus of rats in each group [$M(P_{25}, P_{75}), n=10$]

组别	剂量	光密度值/ β -actin	P_1	P_2
空白组	-	(0.81, 0.84)	/	/
模型组	-	(0.32, 0.37) ^{Δ}	0.00	/
挥发低组	50 μ L	(0.69, 0.71) [*]	/	0.02
挥发高组	100 μ L	(0.72, 0.75) [*]	/	0.00
醇低组	0.5 g/kg	(0.62, 0.67)	/	0.37
醇高组	2 g/kg	(0.72, 0.74) [*]	/	0.00
水低组	0.5 g/kg	(0.48, 0.50)	/	1.00
水高组	2 g/kg	(0.48, 0.52)	/	1.00
地西洋组	2 mg/kg	(0.76, 0.78) [*]	/	0.00

表 9 各组大鼠下丘脑中 5-HT $_{1A}$ mRNA 结果比较

Table 9 Comparison 5-HT $_{1A}$ mRNA contents in hypothalamus of rats in each group [$M(P_{25}, P_{75}), n=10$]

组别	剂量	光密度值/ β -actin	P_1	P_2
空白组	-	(0.83, 0.93)	/	/
模型组	-	(0.43, 0.48) ^{Δ}	0.00	/
挥发低组	50 μ L	(0.78, 0.81) [*]	/	0.00
挥发高组	100 μ L	(0.80, 0.81) [*]	/	0.00
醇低组	0.5 g/kg	(0.70, 0.72)	/	0.06
醇高组	2 g/kg	(0.73, 0.75) [*]	/	0.03
水低组	0.5 g/kg	(0.49, 0.53)	/	1.00
水高组	2 g/kg	(0.51, 0.53)	/	1.00
地西洋组	2 mg/kg	(0.46, 0.49)	/	1.00

2.5 各组大鼠病理组织学观察

如图 1 所示, 空白组大鼠下丘脑神经元细胞形态

正常，结构完整，细胞界限清晰，细胞核居中，细胞质染色深，细胞质内尼氏体均匀分布；模型组可见神经元细胞核居中，细胞质染色淡，尼氏体比空白组减少；给药干预后，挥发油高剂量组、挥发油低剂量组、醇提取物高剂量、醇提取物低剂量组以及地西洋组神经元细胞形态正常，结构完整，细胞核居中，细胞质染色较深，尼氏体分布较均匀。水提取物高剂量及低剂量组神经元细胞核尚无明显偏位，但细胞质染色淡，尼氏体减少。

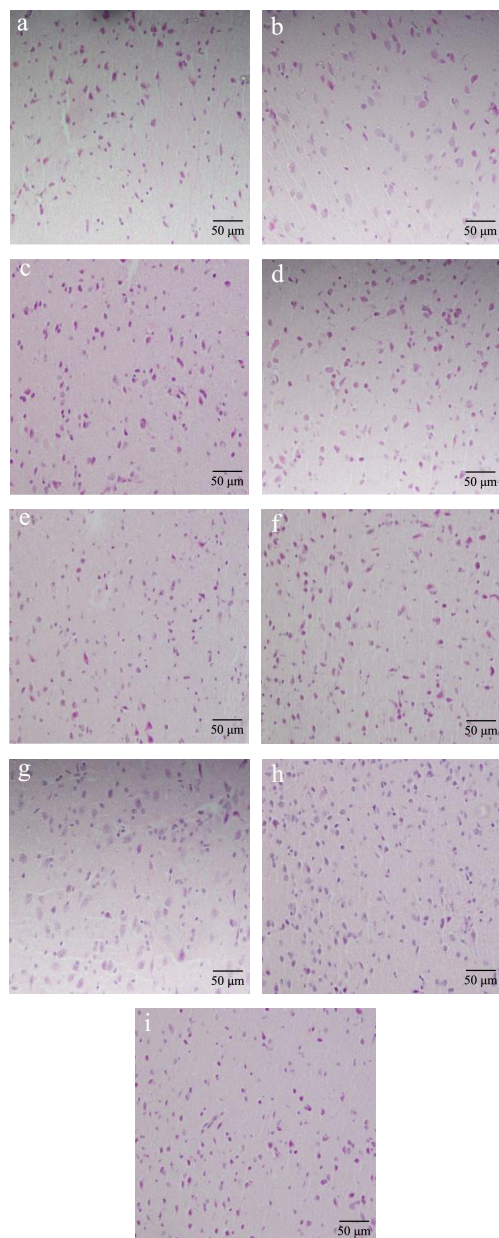


图 1 沉香提取物对 PCPA 致失眠大鼠下丘脑细胞形态学的影响 (HE, ×400)

Fig.1 Effect of agarwood extract on morphology of hypothalamic cells in rats with insomnia caused by PCPA (HE, ×400)

注: a: 空白组; b: 模型组; c: 挥发油低剂量组; d: 挥

发油高剂量组; e: 醇提取物低剂量组; f: 醇提取物高剂量组; g: 水提取物低剂量组; h: 水提取物高剂量组; i: 地西洋组。

对各组阳性细胞进行细胞计数并进行统计分析，如表 10 所示，模型组大鼠下丘脑阳性细胞数均值为 48.30，高于空白组，差异具有显著性 ($p < 0.05$)；给药干预后沉香挥发油高剂量组、沉香挥发油低剂量组、醇提取物高剂量组、醇提取物低剂量组阳性细胞数显著降低，挥发油高剂量组、挥发油低剂量组、醇提取物高剂量组、醇提取物低剂量组阳性细胞数均值分别为 12.00、18.00、15.50、23.20，均低于模型组，差异具有显著性 ($p < 0.05$)。结合上述实验研究结果，使用沉香挥发油、醇提取物对 PCPA 致失眠大鼠进行干预，出现 5-HT、GABA 含量升高，Glu、DA、NE 含量降低，Glu/GABA 降低，GABAAR $_{\alpha 1}$ 、GABAAR $_{\gamma 2}$ 、5-HT $_{1A}$ 受体 mRNA 表达增加，说明沉香挥发油、醇提取物具有镇静催眠活性。段宙位等^[19]研究沉香茶脱涩方法，制作复合型沉香茶饮料，口感更佳，营养更丰富；韩卫娟^[20]通过实验研究表明沉香茶具有保护 DNA 氧化损伤活性；陈地灵等^[21]研究发现沉香茶具有抗氧化、降血脂，可作为保健类茶饮。因此沉香在应用上除熏香安神外，同时可作为养生保健茶饮，可制作为养生保健茶，成为家庭养生保健的一个重要方法，为沉香产品进一步开发应用提供新的途径。

表 10 各组大鼠下丘脑中阳性细胞数结果比较

Table 10 Comparison of positive cell mass results in the hypothalamus of each group of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	阳性细胞/(个/HP)	P_1	P_2
空白组	-	0.30±0.48	/	/
模型组	-	48.30±3.83 ^A	0.00	/
挥低组	50 μ L	18.00±2.26*	/	0.00
挥高组	100 μ L	12.00±1.83*	/	0.00
醇低组	0.5 g/kg	23.20±2.78*	/	0.00
醇高组	2 g/kg	15.50±2.17*	/	0.00
水低组	0.5 g/kg	46.70±3.20	/	0.17
水高组	2 g/kg	47.20±3.22	/	0.34
地西洋组	2 mg/kg	4.30±1.77*	/	0.00

3 结论

对 PCPA 所致失眠大鼠，沉香挥发油、醇提取物使大鼠 5-HT、GABA 含量升高，DA、NE、Glu 含量降低，以及增加 GABAAR $_{\alpha 1}$ 、GABAAR $_{\gamma 2}$ 、5-HT $_{1A}$ 受体 mRNA 表达，改善失眠大鼠睡眠情况，具有镇静催眠的作用，对失眠的治疗具有一定作用。由此初步筛选对失眠具有治疗作用的沉香提取物，并推断沉香挥发油、醇提取物对单胺类、氨基酸类神经递质具有调节

作用。从神经递质含量变化推断在一定范围内,对睡眠的作用程度与沉香挥发油、醇提取物的浓度呈正相关,沉香水提物对睡眠无明显作用。沉香挥发油可通过吸入的方式给药,从给药方式的简便性、满足家庭性用药需求的角度,沉香挥发油的作用更优,更有利于临床的应用与日常保健的推广,有望为治疗失眠提供新颖、有效、简便的治疗方式。

参考文献

- [1] Chung K F, Yeung W F, Ho F Y, et al. Cross-cultural and comparative epidemiology of insomnia: the diagnostic and statistical manual (DSM), International classification of diseases (ICD) and International classification of sleep disorders [J]. *Sleep Med*, 2015, 16(4): 477-482
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015:185-186
Nationally Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 185-186
- [3] 董梅月,杨中一,马祯,等.国产沉香化学成分及药理作用研究进展[J].山东中医杂志,2020,39(2):189-193
DONG Mei-yue, YANG Zhong-yi, MA Zhen, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of domestic agarwood [J]. *Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 39(2): 189-193
- [4] 李月菲,田从魁,孟嘉星,等.沉香的化学成分及药理作用研究进展[J].国际药学研究杂志,2019,46(7):498-504
LI Yue-fei, TIAN Cong-kui, MENG Jia-xing, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of agarwood [J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2019, 46(7): 498-504
- [5] 梁宇,孔德文,周启蒙,等.沉香气体吸入给药通过影响神经递质调节小鼠睡眠的作用研究[J].中药药理与临床,2019, 35(6):71-76
LIANG Yu, KONG De-wen, ZHOU Qi-meng, et al. Study on the effect of inhaled administration of agarwood gas on regulating mice's sleep by affecting neurotransmitters [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2019, 35(6): 71-76
- [6] 王帅,周岳,马富超,等.通体沉香对小鼠催眠和自主活动抑制作用[J].国际药学研究杂志,2016,43(6):1082-1086
WANG Shuai, ZHOU Yue, MA Fu-chao, et al. The inhibitory effect of whole body agarwood on hypnosis and voluntary activities in mice [J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2016, 43(6): 1082-1086
- [7] 雷莉,张婷,高东,等.沉香熏香疗法对失眠障碍患者的临床疗效观察[J].中风与神经疾病杂志,2019,36(7):609-612
LEI Li, ZHANG Ting, GAO Dong, et al. Observation on the clinical efficacy of agarwood incense therapy for patients with insomnia [J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2019, 36(7): 609-612
- [8] 王剑,金兆元.沉香肾茶袋泡茶及其制备工艺[P].中国专利:200710065657.6,2007-08-08
WANG Jian, JIN Zhao-yuan. Agarwood kidney tea bag tea and its preparation process [P]. Chinese Patent: 200710065657.6, 2007-08-08
- [9] 郭海波,王慧.对氯苯丙氨酸在失眠动物模型中的应用概述[J].中国比较医学杂志,2019,29(6): 135-140
GUO Hai-bo, WANG Hui. Overview of the application of p-chlorophenylalanine in insomnia animal models [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2019, 29(6): 135-140
- [10] 杨岑,冉明梓,欧阳鹏荣,等.五羟色胺在睡眠-觉醒中作用[J].现代生物医学进展,2015,11(53):2191-2193
YANG Cen, RAN Ming-zi, OUYANG Peng-rong, et al. The role of serotonin in sleep-wakefulness [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 11(53): 2191-2193
- [11] 李丽,余琼,梁伟民.多巴胺能神经系统对睡眠-觉醒和认知的调控作用[J].现代生物医学进展,2014,36(14):7172-7174
LI Li, YU Qiong, LIANG Wei-min. The regulation of dopaminergic nervous system on sleep-wake and cognition [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2014, 36(14): 7172-7174
- [12] 程国良,钱彦方,李静,等.失眠机制研究进展[J].世界睡眠医学杂志,2016,3(3):174-176
CHENG Guo-liang, QIAN Yan-fang, LI Jing, et al. The regulation of dopaminergic nervous system on sleep-wake and cognition [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2014, 36(14): 7172-7174
- [13] 郭海波,王慧.酸枣仁汤治疗失眠现代机制研究进展与探讨[J].中华中医药学刊,2019,37(12):2964-2966
GUO Hai-bo, WANG Hui. Research progress and discussion on modern mechanism of suanzaoren decoction in the treatment of insomnia [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 37(12): 2964-2966

(下转第 19 页)

- Research and Applied Sciences, 2013, 6(2): 31-37
- [28] Xu J Y, Zhao L, Chong Y, et al. Protection effect of sanguinarine on whole-body exposure of X radiation in BALB/c mice [J]. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 50(1): 101-106
- [29] Yao Y, Wang L, Jin P, et al. Methane alleviates carbon tetrachloride induced liver injury in mice: anti-inflammatory action demonstrated by increased PI3K/Akt/GSK-3 β -mediated IL-10 expression [J]. Journal of Molecular Histology, 2017, 48(4): 301-310
- [30] Loguercio C, De Simone T, Federico A, et al. Gut-liver axis: a new point of attack to treat chronic liver damage? [J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(8): 2144-2146
- [31] Sheth A A, Garcia-tsoa G. Probiotics and liver disease [J]. J Clin Gastroenterol, 2008, 42(6): S80-S84
- [32] Touchefeu Y, Montassier E, Nieman K, et al. Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis-current evidence and potential clinical applications [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2014, 40(5): 409-422
- [33] Isolauri E, Salminen S. Probiotics, gut inflammation and barrier function [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2005, 34(3): 437-450
- [34] Hakansson A, Molin G. Gut microbiota and inflammation [J]. Nutrients, 2011, 3(6): 637-682
- [35] In Kim H, Kim J-K, Kim J-Y, et al. *Lactobacillus plantarum* LC27 and *Bifidobacterium longum* LC67 simultaneously alleviate high-fat diet-induced colitis, endotoxemia, liver steatosis, and obesity in mice [J]. Nutrition Research, 2019, 67: 78-89
- [36] Qu J, Wang W, Zhang Q, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation of chicken liver tissue by selenomethionine via TLR4-NF- κ B-NLRP3 signaling pathway [J]. Biological Trace Element Research, 2020, 195(1): 205-214

(上接第 42 页)

- [14] 赵日霞.睡眠剥夺对大鼠脑组织氨基酸类神经递质含量的影响[D].昆明:云南中医学院,2016
ZHAO Ri-xia. The effect of sleep deprivation on the content of amino acid neurotransmitters in rat brain tissue [D]. Kunming: Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, 2016
- [15] 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):565-567
LIN Bing-qi, LI Feng, MA Jie, et al. Explore the mechanism of insomnia based on the GABAergic system pathway [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2018, 18(3): 565-567
- [16] Wang S, Wang C H, Peng D Q, et al. Agarwood essential oil displays sedative-hypnotic effects through the GABAergic system [J]. Molecules, 2017, 22(12): 2190-2207
- [17] Sookoian S, Gemma C, Giantti T F, et al. Serotonin and serotonin transporter gene variant in the rotating shift workers [J]. Sleep, 2007, 30(8): 1049
- [18] Holst S C, Valomon A, Landolt H P. Sleep pharmacogenetics: personalized sleep-wake therapy [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2016, 56: 577-603
- [19] 段宙位,谢辉,窦志浩,等.复合型沉香茶饮料的制备研究[J].食品科技,2016,41(12):62-65
DUAN Zhou-wei, XIE Hui, DOU Zhi-hao, et al. Study on the preparation of compound agarwood tea beverage [J]. Food Science and Technology, 2016, 41(12): 62-65
- [20] 韩卫娟.沉香茶保护 DNA 氧化损伤的活性及其机制研究[D].广州:广州中医药大学,2013
HAN Wei-juan. Study on the activity and mechanism of agarwood tea in protecting DNA from oxidative damage [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2013
- [21] 陈地灵,吴祎,林励,等.沉香茶提取物的体外抗氧化和体内降血脂作用评价[J].现代食品科技,2013,29(6):1198-1242
CHEN Di-ling, WU Yi, LIN Li, et al. Evaluation of *in vitro* antioxidant and *in vivo* hypolipidemic effects of agarwood tea extract [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1198-1242