

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*

梁宇¹, 孔德文¹, 周启蒙¹, 赵晓悦¹, 于子茹¹, 王静蓉², 李改云³, 杜冠华^{1**}

(¹ 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 药物筛选研究中心 药物靶点研究和新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050; ² 澳门科技大学药物及健康研究院 中药质量研究重点实验室, 澳门; ³ 中国林业科学研究院 木材工业研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 通过沉香气体吸入给药模拟沉香传统给药方式(熏香), 考查沉香气体吸入给药对正常小鼠及失眠小鼠睡眠的影响。方法: 采用正常小鼠和对氯苯丙氨酸(300 mg/kg)诱导的失眠小鼠模型, 通过多种行为学检测考察沉香气体吸入给药对动物睡眠与情绪的影响, 并检测不同脑区神经递质的变化。结果: 沉香气体吸入给药(0.3 g/6只, 0.5 g/6只)显著促进正常小鼠睡眠, 对其自主活动没有显著影响。与对照组相比, 失眠小鼠给药期间活动频率显著增加, 转棒掉落时间显著降低, 探洞次数与悬尾不动时间显著减少。沉香气体吸入给药能够显著降低给药期间活动频率, 对于失眠小鼠的生活质量与运动能力均具有显著改善作用, 但对于探头次数与悬尾不动时间没有显著影响。机制研究显示, 失眠小鼠下丘脑中谷氨酸/ γ -氨基丁酸比值增加, 而沉香气体吸入给药可以下调该比值。结论: 沉香气体吸入给药能够促进动物睡眠, 改善失眠状态, 但对情绪无显著影响, 这种作用主要与气体吸入给药对氨基酸类神经递质的调节作用有关。

关键词 失眠; 沉香; 气体吸入给药; 镇静催眠; 神经递质; 情绪

DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2019.06.016

睡眠障碍(Sleep disorders)是十分常见的精神疾病之一, 失眠(Insomnia)作为最常见的睡眠障碍影响着全球约30%~40%人的生活^[1-2]。失眠不仅是睡眠障碍患者的主要症状, 亦可能是心血管疾病(如高血压)、神经退行性疾病(如帕金森病)及其他精神疾病(如抑郁症)患者的重要并发症^[3-5]。此外, 失眠治疗难度大, 费用昂贵^[6]。目前失眠的首要治疗方式是通过镇静催眠药物调节睡眠, 这些药物虽能够快速发挥催眠作用, 但不能治愈疾病, 且长期用药伴随药物依赖和反跳现象。因此, 寻找新型调节睡眠和治疗失眠的药物十分重要。

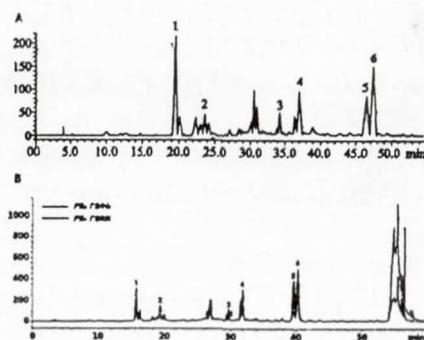
沉香为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 含有树脂的木材, 是我国传统的名贵药材, 其性味辛、苦、微温, 归脾、胃、肾经, 具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘等功效^[7]。现代化学研究表明, 沉香包含近300种化合物, 通过不同方式可以获取沉香提取物和挥发油, 其主要成分为倍半萜类成分、芳香族成分与2-(2-苯乙基)色酮类等^[8]。多项研究表明, 这些化合物具有抗炎、抗癌、抗氧化、抑菌等多种作用^[9-11]。值得注意的是, 其中一些化合物如苄基丙酮、(+)-白菖烯等具有明显的镇静催眠作用, 同时对于压力引发的焦虑抑郁情绪具有改善作用, 保护神经元^[12-14]。沉香熏香是传统应用沉香的主要方式, 通过加热使其挥发油扩散到空气中, 可以改善环境气味, 但这种使用方法是否能够对睡眠产生影响, 目前尚没有相关研究。

本项研究通过自主研发定量气体吸入给药装置, 以气体吸入给药方式模拟熏香, 该方法能通过实验装置客观评价药物疗效, 观察沉香气体吸入给药对正常和睡眠障碍模型小鼠睡眠的作用, 并进一步考察沉香气体吸入给药对小鼠脑内神经递质水平的影响, 探讨沉香气体吸入给药影响睡眠的机制。

1 材料与方

1.1 试验药物 沉香木材颗粒(符合2015版《中国药典》质量标准, 平均直径1 mm~2 mm)由广东宝盛沉香制品有限公司提

供。该公司以瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 为结香对象, 通过整体结香获得沉香。国家林业及草原局林业科学院木材工业研究所李改云研究员对所获沉香进行高效液相色谱分析, 并将所得图谱与中国药典中的标准图谱进行比对, 其中六个特征峰与对照药材标准图谱的特征峰一致, 证明该药材与国产沉香一致。其中, 保留时间因仪器等条件不同而出现差异, 不影响结果的一致性比较。



1: 沉香四醇; 3: 8-氯-2-(2-苯乙基)-5,6,7-三羟基-5,6,7,8-四氢色酮; 5: 6,4-二羟基-3-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮。

图1 沉香的对照高效液相特征图谱与样品特征图谱

以四批沉香药材粉末为样品, 对沉香进行化合物成分与含量的鉴定。经澳门科技大学药物及健康应用研究院、中药质量研究重点实验室王静蓉博士分析与鉴定, 以夹角余弦和相关系数作为评价方法, 四批沉香样品的整体相似度均在0.9以上。经鉴定, 四批沉香含有163种化合物, 共十类, 分别为Flindersia类型色酮类、四氢色酮类、单环氧色酮类、双环氧色酮类、二聚体色酮类、三聚体色酮类、芳香族类、倍半萜类、黄酮类与生物碱类, 相对含量如表所示。沉香内化合物种类与成分较为一致, 可用

* 基金项目: 国家重点研发计划资助项目(No. 2016YFC1000905); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(No. 2017-42M-4-010)。

** 通讯作者。

于后续实验使用。

通过整体结香获得的沉香经切割制成沉香颗粒,用于本研究。

表1 四批沉香中各类成分总相对含量测定表(n=2)

成分	相对含量/(%)				RSD/(%)
	第一批	第二批	第三批	第四批	
Flindersia 类型色酮	79.65	77.37	65.91	71.28	8.4
四氢色酮	8.56	8.30	6.67	10.14	16.9
单环氧色酮	0.56	0.43	3.48	1.59	92.9
双环氧色酮	2.53	3.55	11.36	7.11	65.1
二聚体色酮	4.76	6.88	9.89	7.07	29.4
三聚体色酮	0.04	0.04	0.04	0.05	6.8
芳香族	0.07	0.08	0.04	0.02	44.4
倍半萜	3.59	3.10	2.24	1.89	28.8
黄酮	0.22	0.14	0.27	0.80	83.5
生物碱	0.02	0.12	0.10	0.07	56.0

1.2 动物 SPF 级雄性 ICR 小鼠,体重范围为(22 ± 2) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。动物均饲养于温度湿度适宜的环境中,适应性饲养 2 天,昼夜 12 h 交替。

1.3 试剂 戊巴比妥钠(批号:172866)购自武汉 Goodbio 技术有限公司;地西洋(批号:20170203)购自北京益民药业有限公司;对氯苯丙氨酸(p-chlorophenylalanine, PCPA,批号:SHBJ4632)购自 Sigma 公司;小鼠神经递质酶联免疫检测试剂盒(谷氨酸、5-羟色胺、 γ -氨基丁酸、去甲肾上腺素,均为相同批号:201812)购自北京冬歌博业生物科技有限公司。

1.4 仪器 小鼠气体暴露箱(山东济南益延科技发展有限公司与中国医学科学院药物研究所联合研制,共 8 室,单室长 155 mm × 宽 90 mm × 高 135 mm,其中 2 个室为对照室,与其它 6 个室的气体环境完全隔离;6 个室的底部为带孔的隔离板,隔离板下为熏香炉放置室,内置风扇实现气体均匀分布,保证动物接受均匀给药和正常呼吸);熏香炉(广东宝盛沉香制品有限公司);YLS-18A 悬尾测试仪、YLS-1C 小动物活动记录仪(山东济南益延科技发展有限公司);DXP-3 型大小鼠转棒仪、大小鼠自主活动箱、XDB-2 型小鼠洞板实验仪(中国医学科学院药物研究所研制);Spectra max M5 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.5 方法

1.5.1 造模、分组及给药 在沉香气体吸入给药对正常动物睡眠影响的实验中,动物按体重随机分为对照组、地西洋 2 mg/kg 组、沉香 0.1 g/6 只、0.3 g/6 只、0.5 g/6 只。沉香高、中、低组在当日夜间给予沉香气体吸入给药(0.1 g/6 只、0.3 g/6 只、0.5 g/6 只) 10 h(22:00 ~ 08:00),同时进行给药期间自主活动次数检测。气体给药结束后(次日),对照组给予生理盐水,地西洋组给予地西洋(2 mg/kg 0.1 mL/10 g)灌胃,于给药 1 h 后进行旷场实验、戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠实验等行为学检测。该部分的所有动物于给药后仅进行一项行为学实验。

在沉香气体吸入给药对失眠模型动物睡眠影响的实验中,为观察沉香气体吸入给药对 PCPA 诱导失眠小鼠的影响,将动物按体重随机分为对照组、PCPA 组(模型组)、PCPA + 地西洋组、PCPA + 沉香气体吸入给药(0.3 g/6 只)组与 PCPA + 沉香气体吸入给药(0.5 g/6 只)组。除对照组外,连续两天于每日 21:00 给与各组动物腹腔注射 PCPA(300 mg/kg 0.1 mL/10 g),当动物躁动不安、自主活动增强,表明模型制备成功。造模结束后,对照组、模型组于每晚 21:00 给予生理盐水灌胃,对其他各组动物进行连续七天的药物干预,阳性药组给予地西洋(2 mg/

kg)灌胃,沉香组动物于每晚 22:00 置于小鼠气体暴露箱中,气体吸入给药过夜。在给药期间,每只动物仅进行一次相同的行为学实验,且每项行为学均需完成。

气体吸入给药时将一定质量且颗粒大小较为均一的沉香木材颗粒放于熏香炉上,沉香气体吸入给药各组(低、中、高)的沉香用量分别为 0.1 g/6 只、0.3 g/6 只、0.5 g/6 只,熏香炉恒温 120 °C 加热 10 h,仪器外、内部环境温度稳定在(23 ± 2) °C。

1.5.2 行为学考察

1.5.2.1 给药期间自主活动实验 在给药期间,小动物活动记录仪记录 22:00 至次日 08:00 内每小时单室内动物自主活动次数与 10 h 内总活动次数。

在考察沉香气体吸入给药对正常动物的作用时,给药后将动物置于小鼠气体暴露箱中,在气体吸入给药的同时记录 10 h 内动物活动次数。失眠动物接受连续气体吸入给药七天,并记录动物每日给药期间自主活动次数。

1.5.2.2 戊巴比妥钠诱导正常小鼠睡眠实验 地西洋组动物灌胃给药 30 min 后、沉香组气体吸入给药 10 h 后分别腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg),对照组注射生理盐水。翻正反射消失 1 min 以上即认定动物进入睡眠状态,睡眠潜伏期是注射至翻正反射消失的时间,而将翻正反射消失到恢复的时间认定为睡眠时间。

1.5.2.3 旷场实验 气体吸入给药结束后,将正常与失眠小鼠置于开放的场地内,动物适应 2 min,记录小鼠在 5 min 内的运动情况,主要分析小鼠的运动距离、运动时间等,并观察其运动特性。视频内容由 SuperMaze 动物行为学视频分析软件 V2.0 版(上海欣软信息科技有限公司)分析。

1.5.2.4 转棒实验 气体吸入给药结束后,将小鼠放置在转棒上,先以较慢转速使动物适应。然后将转速调整至 15 r/min 开始计时,记录小鼠在转棒上停留时间,超过 2 min 则记作 2 分钟。

1.5.2.5 探洞实验 气体吸入给药结束后,将小鼠放置在洞板实验仪上,观察动物 5 min 内的探洞次数。

1.5.2.6 悬尾实验 气体吸入给药结束后,将小鼠尾部 1/3 用医用胶布固定并倒位悬挂于支架上,适应两分钟并观察动物的状态,记录小鼠悬尾后 2 min ~ 6 min 内的不动时间。

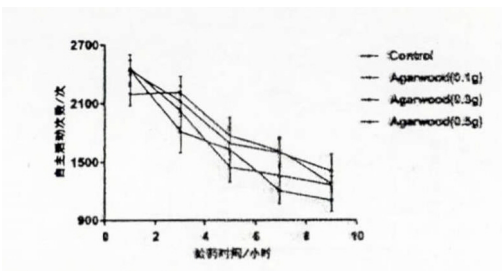
1.5.3 氨基酸类与单胺类神经递质检测 取各组动物皮层、下丘脑,按 ELISA 酶联免疫试剂盒说明书操作。取一定质量的脑组织于生理盐水中研磨,于 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min,取上清 50 μ L 与 HRP 标记抗体混匀,于 37 °C 孵育 1 h,洗涤后加入 A、B 液,37 °C 孵育 30 min 后加入终止液,于 450 nm 读取 OD 值。将谷氨酸(Glutamic acid, Glu)与 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA) OD 值作比后进行比较,并比较去甲肾上腺素(Noradrenaline, NE)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)在皮层与下丘脑中的表达水平。

2 结果

2.1 沉香气体吸入给药对正常小鼠的影响

2.1.1 沉香气体吸入给药对正常小鼠给药期间自主活动的影响 如图 2 在正常小鼠接受沉香气体吸入给药过程中,动物于夜间初始阶段(22:00 ~ 00:00)活动能力较强,随时间延长活动次数逐渐减少。通过两小时分段计数发现沉香气体吸入给药对此变化趋势无明显影响。对各组动物于相同时间点的活动次数

比较,沉香(0.1 g/6 只)气体吸入给药对动物活动水平无影响,沉香(0.3 g/6 只、0.5 g/6 只)气体吸入给药后小鼠活动次数不仅逐渐下降,与对照组活动频率差距逐渐增加。



与模型组比较 * P<0.05, ** P<0.01(下同)。

图2 沉香气体吸入给药对正常小鼠自主活动次数的影响

2.1.2 沉香气体吸入给药对正常小鼠旷场实验的影响 旷场实验是反映动物自发运动特性的一项行为学实验。沉香(0.1 g/6 只)气体吸入给药对动物基本无影响,因此对沉香(0.3 g/6 只、0.5 g/6 只)气体吸入给药作用进行后续探究。如表2所示,给予沉香气体吸入给药后,各组小鼠的运动时间、距离均无明显差异,而且沉香气体吸入给药不会影响动物的理毛等行为,对动物正常活动与行为能力无显著影响。

2.1.3 沉香气体吸入给药对戊巴比妥钠诱导正常小鼠睡眠的影响 动物气体吸入给药10 h后(次日09:00)腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg),观察动物翻正反射消失时间与恢复时间。由表3可知,地西洋组动物的睡眠潜伏期较对照组明显缩短,睡眠时间显著增加。与对照组相比,沉香气体吸入给药各剂量组动物睡眠潜伏期无明显变化,睡眠时间显著延长。

表2 沉香气体吸入给药对正常小鼠旷场实验中运动距离与运动时间的影响($\bar{x} \pm s, n=11 \sim 12$)

组别	剂量/ (g/6 只)	运动距离/ ($\times 10^4$ mm)	运动时间/ (s)
空白对照	-	1.9 \pm 0.4	193.6 \pm 22.9
地西洋	2 mg/kg	2.2 \pm 0.4	211.1 \pm 24.9
沉香气体吸入给药	0.3	2.4 \pm 0.5	214.9 \pm 35.3
沉香气体吸入给药	0.5	1.9 \pm 0.5	200.6 \pm 37.0

表3 沉香气体吸入给药对戊巴比妥钠诱导正常小鼠睡眠的影响($\bar{x} \pm s, n=12 \sim 15$)

组别	剂量/ (g/6 只)	睡眠潜伏期/(s)	睡眠时间/(min)
空白对照	-	313.6 \pm 75.0	20.5 \pm 6.2
地西洋	2 mg/kg	236.4 \pm 53.9 **	27.7 \pm 6.9*
沉香气体吸入给药	0.3	291.3 \pm 56.0	27.9 \pm 7.9*
沉香气体吸入给药	0.5	284.8 \pm 56.3	29.2 \pm 8.8*

与对照组比较 * P<0.05, ** P<0.01(下同)。

2.2 沉香气体吸入给药对PCPA诱导失眠小鼠作用

2.2.1 沉香气体吸入给药对PCPA诱导失眠小鼠的影响 动物腹腔注射PCPA(300 mg/kg)建立小鼠失眠模型,给药过程中对各组动物个体特征进行监控,发现对照组小鼠毛色正常且皮毛光亮,模型组小鼠毛色逐渐发暗,皮毛不顺错乱,烦躁且攻击性较强;给予地西洋的小鼠运动迟缓,不好动,毛发较顺;沉香组小鼠较为活跃,但攻击性一般,皮毛较顺。

2.2.2 沉香气体吸入给药对失眠小鼠给药期间自主活动次数的影响 在连续给药七天过程中,比较观察到模型组动物的整体活动频率较对照组偏高,地西洋具有一定的抑制自主活动的的能力,而沉香吸入给药(0.3 g/6 只, 0.5 g/6 只)后失眠动物活动频率显著降低,明显抑制失眠动物自主活动。见图3。

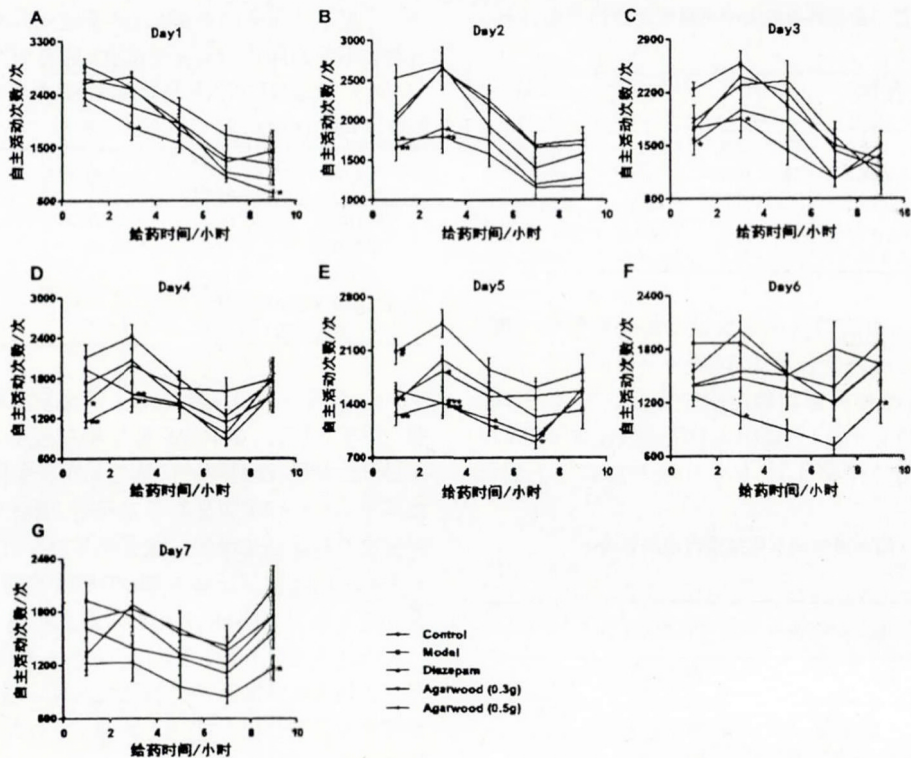


图3 沉香气体吸入给药对失眠小鼠自主活动次数的影响

随着给药天数的增加,在给药期间同一时间内,模型组动物活动次数较对照组偏高,地西洋对于动物活动能力的抑制作

用也逐渐降低,而沉香气体吸入给药对动物自主活动的抑制作用逐渐增强,且抑制作用较为稳定,见图4。

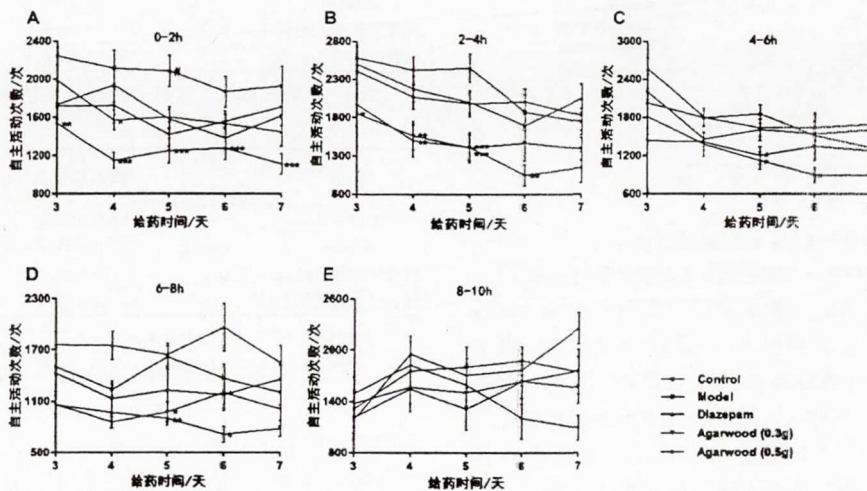


图4 沉香气体吸入给药对失眠小鼠夜间相同时间段内自主活动次数的影响

2.2.3 沉香气体吸入给药对失眠小鼠旷场实验的影响 将动物置于宽阔安静的环境中使其自由活动,PCPA 诱导失眠小鼠的自主活动行为与正常组无显著差异,但模型小鼠的活动范围显著减小。地西洋和沉香(0.5 g/6 只)气体吸入给药对模型动物的运动特性无显著影响,但对动物进出中央区域次数有轻微影响,有助于增加动物的活动范围,见表4。

表4 沉香气体吸入给药对失眠小鼠在旷场实验中的运动距离、运动时间、中央运动距离/总运动距离与进入中央区域次数的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量/(g/6 只)	总路程/(mm)	总运动时间/(s)	中央路程/总路程 ($\times 10^{-1}$)	中央进入次数/次
空白对照	-	2.2 ± 0.8	203.9 ± 47.9	2.4 ± 0.7	28 ± 9*
模型对照	-	2.2 ± 0.7	195.2 ± 31.4	2.1 ± 0.6	19 ± 6
地西洋	2 mg/kg	2.0 ± 1.0	202.3 ± 53.7	2.4 ± 1.0	25 ± 1
沉香气体吸入给药	0.3	2.1 ± 0.6	197.7 ± 21.4	2.0 ± 0.5	20 ± 5
沉香气体吸入给药	0.5	2.0 ± 0.3	206.4 ± 16.8	2.4 ± 0.9	24 ± 7

2.2.4 沉香气体吸入给药对失眠小鼠运动能力的影响 PC-PA 诱导失眠小鼠运动能力显著降低,转棒掉落时间减少,四肢不协调。地西洋显著改善模型动物运动能力,延长运动时间。沉香(0.3 g/6 只,0.5 g/6 只)气体吸入给药明显改善 PCPA 小鼠的运动能力,提高身体平衡能力,延长动物在转棒仪上的行走时间,见表5。

表5 沉香气体吸入给药对失眠小鼠掉落时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量/(g/6 只)	掉落时间/(s)
空白对照	-	98.8 ± 24.0**
模型对照	-	42.7 ± 15.2
地西洋	2 mg/kg	78.5 ± 22.1**
沉香气体吸入给药	0.3	84.8 ± 39.1**
沉香气体吸入给药	0.5	92.9 ± 17.4**

2.2.5 沉香气体吸入给药对失眠小鼠情绪的影响 探洞实验是反映动物好奇心与探究能力的行为学实验,通过检测动物的探洞次数反映动物的焦虑情绪。对照组小鼠好奇心较强,探洞次数较多,而模型小鼠探洞次数显著下降。给予地西洋的动物探洞次数得到显著改善,沉香(0.3 g/6 只,0.5 g/6 只)气体吸入给药后动物探洞次数并无显著差异,见表6。

悬尾实验是考察动物抑郁情绪的行为实验之一。PCPA 诱导的小鼠不动时间明显减少,给予地西洋和沉香气体吸入给药的动物不动时间均没有显著变化,见表6。

表6 沉香气体吸入给药对失眠小鼠探洞次数与悬尾不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

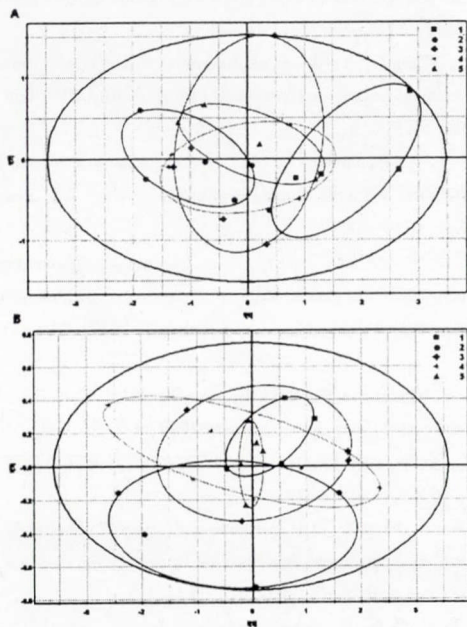
组别	剂量/(g/6 只)	探洞次数/次	悬尾不动时间/(s)
空白对照	-	98 ± 11**	46.0 ± 20.1*
模型对照	-	78 ± 9	31.2 ± 18.0
地西洋	2 mg/kg	94 ± 17**	32.7 ± 25.9
沉香气体吸入给药	0.3	82 ± 14	29.1 ± 18.4
沉香气体吸入给药	0.5	78 ± 11	29.2 ± 14.3

2.2.6 沉香气体吸入给药对失眠小鼠氨基酸类神经递质的影响 由表7可知,在 PCPA 组动物皮层中 Glu/GABA 与对照组无显著性差异,给药组的比值也无明显变化。在下丘脑部位,模型组中 Glu/GABA 明显高于对照组,表明模型组下丘脑部位中兴奋性氨基酸表达增强。给予地西洋与沉香(0.5 g/6 只)气体吸入给药的动物下丘脑中 Glu/GABA 显著下降,作用明显,但沉香(0.3 g/6 只)气体吸入给药对此无影响。

通过主成分分析(图5)可以进一步确认,失眠小鼠的皮层与下丘脑中氨基酸类神经递质发生明显变化,给予地西洋与沉香气体吸入给药治疗(0.5 g/6 只)的动物不同脑区的氨基酸类神经递质含量均得到改善。

表7 沉香气体吸入给药对失眠小鼠不同脑区内 Glu/GABA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/ (g/6只)	Glu/GABA	
		皮层	下丘脑
对照		5.83 ± 0.42	5.72 ± 0.55*
模型对照		5.93 ± 0.40	6.62 ± 0.95
地西洋		5.76 ± 0.79	5.70 ± 0.61*
沉香	0.3	5.28 ± 0.76	6.22 ± 0.84
沉香	0.5	5.51 ± 0.56	5.68 ± 0.45*



1: 正常对照; 2: 模型对照; 3: 地西洋 2 mg/kg; 4: 沉香气体吸入给药 0.3 g/6 只; 5: 沉香气体吸入给药 0.5 g/6 只。

图5 沉香气体吸入给药对失眠小鼠皮层(A)与下丘脑(B)中氨基酸类神经递质的影响(n=4~5)

2.2.7 沉香气体吸入给药对失眠小鼠单胺类神经递质的影响

失眠小鼠皮层与下丘脑中的 5-HT 较对照组轻微降低,地西洋对此有一定改善。然而沉香气体吸入给药对 5-HT 并无显著影响。PCPA 抑制小鼠皮层与下丘脑内 NE 表达,沉香气体吸入给药对动物皮层与下丘脑中 NE 水平无显著改善作用,见表 8。

表8 沉香气体吸入给药对失眠小鼠皮层与下丘脑中 5-羟色胺、去甲肾上腺素的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/ (g/6只)	5-羟色胺/($\mu\text{g/g}$)		去甲肾上腺素/($\mu\text{g/g}$)	
		皮层	下丘脑	皮层	下丘脑
空白对照	-	489.6 ± 113.8	5612 ± 4591	22.5 ± 4.3	220 ± 196
模型对照	-	418.2 ± 50.2	4498 ± 1711	19.6 ± 2.8	160 ± 53
地西洋	2 mg/kg	430.4 ± 84.6	5559 ± 3773	16.5 ± 2.9	184 ± 128
沉香气体吸入给药	0.3	412.2 ± 60.8	4082 ± 1735	16.8 ± 3.6	132 ± 56
沉香气体吸入给药	0.5	418.8 ± 43.7	4353 ± 926	15.5 ± 1.7	133 ± 21

3 讨论

沉香熏香是传统的沉香给药方式,本实验结果显示,模拟沉香熏香的气体吸入给药方式可以对小鼠的睡眠产生影响,证明了熏香的合理性。通过对正常小鼠与失眠小鼠进行多项行为验证,证实沉香气体吸入给药对睡眠的调节作用。为保留沉香特性,本研究使用自制仪器进行动物吸入式给药。为评价该给药方式的有效性,通过调控沉香气体吸入给药时间与沉香质量控制,各组动物接受药物量,给药方法具有可控性,能够达到实验目的。在设定条件下,该仪器能够保证加热时挥发类化合物在仪器内充分扩散,而无其他异味干扰。同时,该方法能够维持恒定的药物浓度,对动物产生持续且稳定的功效,且合理控制内部温度对动物个体状态影响较小。该给药方式合理且稳定,有助于突出药物特性。此外,人体进行沉香气体吸入给药多为日间给药,因此动物夜间进行沉香气体吸入给药更能模拟实际情况。以往研究多以动物日间行为活动变化作为模型判断指标,尽管小鼠于日间、夜间均可以睡眠,其中夜间清醒时间较长,但由于小鼠睡眠呈现片段化,觉醒转换频繁,不仅模型组动物日间活动增加表明失眠,且夜间活动频率增加更能突出失眠对动物正常行为的影响。同时,本研究记录 22:00~08:00 内的动物活动情况,包含一定的日间活动变化特征,因此以观察模型组给药期间自主活动频率较对照组是否增加作为检测模型是否成功的重要指标之一,具有实际意义^[15,16]。因此本实验在夜间进行沉香气体吸入给药,并于给药 10 h(次日)考察沉香气体吸入给药对睡眠以及其他行为的影响。

沉香气体吸入给药对正常动物行为活动无影响,而对睡眠具有调控作用。小鼠自主活动实验是常见的用于检测药物镇静催眠作用的行为学实验之一^[17]。不同剂量的沉香气体吸入给药对动物给药期间活动影响各异,0.1 g/6 只组动物给药期间活动与对照组相近,0.3 g/6 只组、0.5 g/6 只组气体吸入给药轻微抑制动物活动能力,因此选用沉香 0.3 g/6 只、0.5 g/6 只组作为后续气体吸入给药剂量。戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠是检测镇静催眠药物作用的一项常用药理实验方法^[18]。正常小鼠在给药后经戊巴比妥钠诱导的睡眠时间显著增加,表明沉香气体吸入给药具有一定的促睡眠作用。同时,不同剂量的沉香气体吸入给药对正常小鼠的自主活动无显著干扰作用。因此,沉香气体吸入给药对正常动物自主活动具有轻微抑制作用,但能显著促进动物睡眠。

沉香气体吸入给药对睡眠障碍模型小鼠的行为能力具有一定改善作用。5-羟色胺是调节痛觉、睡眠和体温等生理功能的重要神经递质,对氯苯丙氨酸(p-chlorophenylalanine, PCPA)通过抑制 5-羟色胺合成而影响睡眠,PCPA 诱导的失眠动物模型建立简便、成功率高且用时短,可用于考察沉香气体吸入给药对失眠动物的作用特点^[19,20]。实验结果发现,与对照组相比,模型组动物毛色等明显较差,而沉香气体吸入给药可以轻微在一定程度上改善动物状态。在给药期间自主活动方面,整体观察模型组动物活动频次明显偏高,且沉香 0.3 g/6 只、0.5 g/6 只组气体吸入给药显著降低模型动物自主活动频次,具有一定的镇静作用。在运动能力方面,失眠动物转棒掉落时间较对照组明显降低,沉香组动物的掉落时间较模型组显著增加,表明沉香气体吸入给药可以改善动物的运动能力。虽然地西洋对失眠小鼠运动能力有所改善,但该药物的致肌松特性使该组动物的运动能力较沉香组弱^[21]。因此,沉香气体吸入给药可以降低模型小鼠的夜间活动水平,对动物运动能力具有一定的改善作

用,并呈现一定的剂量依赖性。

通过考察动物探洞次数与动物不动时间反应其焦虑与抑郁情绪,对于 PCPA 模型动物,地西洋(2 mg/kg) 具有较好的抗焦虑作用,因此地西洋增加 PCPA 小鼠的探头次数,但未能缓解动物抑郁情绪^[22]。沉香组动物的探洞次数与悬尾不动时间并无显著变化,但有研究显示沉香挥发油具有一定的缓解焦虑抑郁的作用,这可能与挥发油中特定成分含量变化或与抑郁模型有关,同时也需要继续研究沉香气体吸入给药对情绪的调控作用^[13, 23]。

在神经系统中,多种神经递质参与信号的传递与神经元功能的调控,失眠患者脑内胆碱类、单胺类与下丘脑分泌素类神经递质稳态被破坏^[24]。通过检测脑部神经递质发现,失眠动物下丘脑中 Glu/GABA 明显增加,表明 PCPA 主要破坏下丘脑中氨基酸神经递质稳态。地西洋和沉香气体吸入给药 0.5 g/6 只组通过降低失眠动物下丘脑中 Glu/GABA 比值改善睡眠,这一结果与沉香挥发油作用机理一致,可能与促进 GABA 受体表达与 Cl⁻内流有关^[25]。对于单胺类神经递质,模型组皮层与下丘脑中 5-HT 轻微下降,与 PCPA 的作用特点一致,而沉香气体吸入给药对此并无明显改善作用。因此,沉香气体吸入给药可能主要通过降低 Glu/GABA 改善睡眠,但无法改善情绪,表明沉香气体吸入给药的治疗作用具有一定局限。

目前针对慢性失眠最佳的治疗手段为非药物治疗,主要包括认知行为疗法等,此法对控制失眠症状十分有效^[26]。若在认知行为疗法上辅以沉香熏香,可能产生更佳的治疗效果。

综上,沉香气体吸入给药不仅能够促进正常动物睡眠,而且能够对失眠动物产生镇静作用,改善失眠动物的运动能力与自主活动特点,这些作用可能与降低 Glu/GABA 水平有关。因此,沉香熏香用于直接治疗失眠可能存在一定的局限,但作为其他药物治疗的辅助疗法具有一定的应用前景。

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 (ICSD). *Sleep Med*, 2015, 16 (4): 477 ~ 482.

[2] Pushpanathan M E, Loftus A M, Thomas M G, et al. The relationship between sleep and cognition in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Sleep Med Rev*, 2016, 26: 21 ~ 32.

[3] 黄俊卿, 魏建和, 张争, 等. 沉香结香方法的历史记载、现代研究及通体结香技术. *中国中药杂志*, 2013, 38 (3): 302 ~ 306.

[4] Bathgate C J, Edinger J D, Wyatt J K, et al. Objective but not subjective short sleep duration associated with increased risk for hypertension in individuals with insomnia. *Sleep*, 2016, 39 (5): 1037 ~ 1045.

[5] Bao Y P, Han Y, Ma J, et al. Cooccurrence and bidirectional prediction of sleep disturbances and depression in older adults: meta-analysis and systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 75: 257 ~ 273.

[6] Wickwire E M, Shaya F T, Scharf S M, et al. Health economics of insomnia treatments: the return on investment for a good night's sleep. *Sleep Med Rev*, 2016, 30: 72 ~ 82.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 中国医药科技出版社, 2015年6月第1版, 2015: 185 ~ 186.

[8] Wang S Y, Zhang X, Wang C H, et al. Chemical constituents and pharma-

logical activity of agarwood and aquilaria plants. *Molecules*, 2018, 23 (2): 342 ~ 362.

[9] Okugawa H, Ueda R, Matsumoto K, et al. Effects of agarwood extracts on the central nervous system in mice. *Planta Med*, 1993, 59 (1): 32 ~ 36.

[10] Wang S L, Tsai Y C, Fu S L, et al. 2-(2-phenylethyl)-4H-chromen-4-one derivatives from the resinous wood of *Aquilaria sinensis* with anti-inflammatory effects in LPS-induced macrophages. *Molecules*, 2018, 23 (2): 289 ~ 300.

[11] Dahham S S, Tabana Y M, Iqbal M A, et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, 2015, 20 (7): 11808 ~ 11829.

[12] Takemoto H, Ito M, Shiraki T, et al. Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components. *J Nat Med*, 2008, 62 (1): 41 ~ 46.

[13] Wang S, Wang C, Yu Z, et al. Agarwood essential oil ameliorates restraint stress-induced anxiety and depression by inhibiting HPA axis hyperactivity. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (11): 3468 ~ 3481.

[14] Miyoshi T, Ito M, Isomori S, et al. Sedative effects of inhaled benzylacetone and structural features contributing to its activity. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36 (9): 1474 ~ 1481.

[15] Kroeger D, Ferrari LL, Petit G, et al. Cholinergic, glutamatergic, and GABAergic neurons of the pedunculopontine tegmental nucleus have distinct effects on sleep/wake behavior in mice. *J Neurosci*, 2017, 37 (5): 1352 ~ 1366.

[16] Soltani S, Chauvette S, Bukhtiyarova O, et al. Sleep-wake cycle in young and older mice. *Front Syst Neurosci*, 2019, 13: 51 ~ 64.

[17] 董静文, 史源, 唐丽娜, 等. 化合物 H1208 镇静催眠作用研究. *药理学学报*, 2014, 49 (6): 869 ~ 874.

[18] Li Y, Wu P, Ning Y, et al. Sedative and hypnotic effect of freeze-dried paeoniflorin and Sini San freeze-dried powder in pentobarbital sodium-induced mice. *J Tradit Chin med*, 2014, 34 (2): 184 ~ 187.

[19] Izquierdo A, Carlos K, Ostrander S, et al. Impaired reward learning and intact motivation after serotonin depletion in rats. *Behav Brain Res*, 2012, 233 (2): 494 ~ 499.

[20] Tu Y, Cheng S X, Sun H T, et al. Ferulic acid potentiates pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. *Neurosci Lett*, 2012, 525 (2): 95 ~ 99.

[21] Divljakovic J, Milic M, Timic T, et al. Tolerance liability of diazepam is dependent on the dose used for protracted treatment. *Pharmacol Rep*, 2012, 64 (5): 1116 ~ 1125.

[22] Naderi N, Haghparast A, Saber-Tehrani A, et al. Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behavior of mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 89 (1): 64 ~ 75.

[23] 武敬文, 施家希, 李灿涛, 等. 不同品牌沉香样品的药效初步比较. *中药材*, 2018, 41 (12): 2911 ~ 2915.

[24] Holst S C, Valomon A, Landolt H P. Sleep pharmacogenetics: personalized sleep-wake therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 56: 577 ~ 603.

[25] Wang S, Wang C H, Peng D Q, et al. Agarwood essential oil displays sedative-hypnotic effects through the GABAergic system. *Molecules*, 2017, 22 (12): 2190 ~ 2207.

[26] Cunningham D, Junge M F, Fernando A T, et al. Insomnia: prevalence, consequences and effective treatment. *Med J Aust*, 2013, 199 (8): S36 ~ 40.

Effect of Agarwood Gas on the Sleep of Mice by Regulating Neurotransmitters*

Liang Yu¹, Kong Dewen¹, Zhou Qimeng¹, Zhao Xiaoyue¹, Yu Ziru¹, Wang Jingrong², Li Gaiyun³, Du Guanhua^{1**}

(¹ Beijing Key Laboratory of Drug Target and Screening Research, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050; ² State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicines, Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Macau, China; ³ Research Institute of Wood Industry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100050)

Objective: To simulate traditional administration of agarwood (incense), inhalation of agarwood gas was established to investigate the influence on sleep of control and insomnia mice. **Methods:** Multiple behavior tests were conducted to examine the influence of agarwood gas on the sleep and emotion of control mice and insomnia mice induced by p-chlorophenylalanine (300 mg/kg). Also, the concentration of neurotransmitters in the different regions were detected. **Results:** Inhalation of agarwood gas (0.3 g/six mice, 0.5 g/six mice) promoted sleep in normal mice and showed no significant effect on autonomic activity. Compared with the control group, autonomic activity of insomnia mice was increased during inhalation administration, the falling time in rotarod test was reduced, the number of head dips in hole-board test and immobility duration were decreased during administration. Inhalation of agarwood gas inhibited the autonomic activity, and improved both life quality and motor ability of insomnia mice. The ratio of glutamine/GABA in hypothalamus tissue was increased in insomnia mice, and it was alleviated by agarwood gas inhalation. **Conclusion:** Inhalation of agarwood gas promotes sleeping and alleviates insomnia with no obvious influence on emotion. This may be related to the regulation on amino acid neurotransmitters by inhalation of agarwood gas.

Key words insomnia, agarwood, inhalation administration, sedative-hypnotic, neurotransmitter, emotion

安息香防治结合给药对脑缺血模型大鼠的作用*

郭晓庆¹, 王建^{1**}, 谢倩¹, 付尹¹, 陈海¹, 李红燕¹, 樊亚梅¹, 龚道银²

(¹ 成都中医药大学药学院, 成都 611137; ² 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

摘要 目的: 考察安息香不同剂量防治给药对永久性局灶性脑缺血(pMCAO)模型大鼠的影响, 为阐明安息香脑保护的作用机制及量效关系提供参考。方法: 采用改良线栓法制备pMCAO模型, 参照mNSS和Zea Longa评分法, 评价大鼠脑缺血各时间点的神经功能; 测量给药30 min后大鼠体温, 观察大鼠体温变化; TTC染色观察大鼠脑梗死率; ELISA法检测血清中VEGF、TEK、ANG-1、TGF- β 1含量; HE染色观测缺血侧脑组织形态。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠体温、神经功能评分、脑梗死率均显著升高, 模型组和溶剂模型组血清VEGF、TEK、ANG-1、TGF- β 1浓度均显著降低, 海马、神经元结构异常。与模型组比较, 溶剂模型组各指标均无显著性差异; 尼莫地平组大鼠神经功能评分、脑梗死率显著降低; 安息香0.5 g/kg和1 g/kg组体温、神经功能评分、脑梗死率显著降低, VEGF、TEK、ANG-1、TGF- β 1浓度显著升高, 可显著改善皮层及海马CA1区损伤; 安息香0.25 g/kg组体温、脑缺血48 h、72 h神经功能评分显著降低。结论: 安息香通过活血、开窍醒神功效改善脑缺血损伤进而发挥脑保护作用。

关键词 安息香; 脑缺血; 神经功能评分; 脑梗死率; 脑组织形态

DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2019.06.017

安息香为安息香科植物白花树 *Styrax tonkinensis* (Pierre) Craib ex Hart. 的干燥树脂。其味辛、苦, 性平, 归心、脾经, 具有开窍醒神、行气活血、止痛功效^[1], 临床上相关制剂有苏合香丸、至宝丹, 治疗中风痰厥、中恶昏迷、心腹疼痛。

脑血管疾病是临床上常见的神经系统疾病, 其中缺血性脑血管疾病约占85%。大量流行病学资料显示, 缺血性脑血管疾病已严重影响患者的生活质量, 给社会和家庭带来沉重的负担^[2], 且缺血机制繁多复杂, 包括谷氨酸神经毒性、自由基生

成、细胞内钙离子超载、炎症反应、神经递质和神经活性物质的异常、血脑屏障受损、能量代谢障碍、细胞凋亡、自噬等机制^[3,4]。课题组曾考察了安息香单剂量预防给药对pMCAO模型大鼠的脑保护作用, 对神经功能、脑水肿率、脑梗死率等多个药效指标进行初步探究^[5]。本研究在此基础上延长脑缺血时间, 于不同时间点评判大鼠神经功能, 通过防治结合给予pMCAO大鼠不同剂量安息香, 探讨其抗脑缺血的"量-时-效"关系, 为阐释安息香抗脑缺血损伤, "开窍醒神、活血"的科学内涵研

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81873023; 81473371; 81873073)。

** 通讯作者: 王建, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中

药药性理论及应用研究, E-mail: jianwang08@163.com;

作者简介: 郭晓庆, 硕士研究生, 研究方向: 中药药性理论及应用研究, E-mail:

2462266215@qq.com。