

· 论著 ·

和胃安神方对失眠大鼠血浆及下丘脑食欲素 A 的影响

黎发根 李绍旦 杨明会 周建平 曹科 刘毅

【摘要】 目的 探讨和胃安神方对失眠大鼠血浆及下丘脑食欲素 A (orexin A) 的影响。**方法** 将30 只雄性 wistar 大鼠随机分为正常对照组、失眠模型组、和胃安神方中药组。除正常组外,其余两组大鼠均用对氯苯丙氨酸(PCPA)建立大鼠失眠模型。中药组给予和胃安神方水溶液 10 ml/kg 灌胃,其余两组给予等量生理盐水灌胃。6 天后处死并取血浆及下丘脑,采用放射免疫分析法检测血浆及下丘脑组织 orexin A 的含量。采用单因素方差分析方法进行组间比较。**结果** 和胃安神方中药组血浆 orexin A 含量为(22.35±4.33) pg/ml,模型组为(29.89±3.04) pg/ml,正常组为(21.28±4.02) pg/ml,中药组显著低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.01$),中药组与正常组比较无显著性差异($P>0.05$);和胃安神方中药组下丘脑 orexin A 含量为(21.34±2.94) pg/mg,模型组为(29.75±5.05) pg/mg,正常组为(18.84±3.08) pg/mg,中药组显著低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.01$),中药组与正常组比较无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 和胃安神方治疗失眠症的疗效机制可能与其下调 orexin A 水平有关。

【关键词】 和胃安神方; 失眠; 血浆; 下丘脑; 食欲素 A

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.11.001

Effect of Hewei Anshen Decoction on orexin A levels in plasma and hypothalamus of insomnic rats

LI Fa-gen, LI Shao-dan, YANG Ming-hui, et al. Institute of Traditional Chinese Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LI Shao-dan, E-mail: lsd301@126.com

【Abstract】 Objective To study the effect of Hewei Anshen Decoction (HWASD) on orexin A levels in plasma and hypothalamus in insomnic rats. **Methods** Thirty healthy male Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group, insomnia model group and HWASD treatment group. All rats but those in the normal control group were intraperitoneally injected with PCPA to be made into rat models of insomnia. The HWASD group were fed with Hewei Anshen Decoction (10 ml/kg) for 6 days, the other two groups with normal saline. After that, their plasma were collected, and hypothalamus were removed. Radioimmunoassay was used to measure the levels of orexin A in plasma and hypothalamus. **Results** The concentration of orexin A in the plasma of HWASD treatment group was (22.35±4.33) pg/ml, significantly lower than that of insomnia model group ($P<0.01$), similar with normal control group ($P>0.05$). The levels of orexin A in the hypothalamus of HWASD treatment group was (21.34±2.94) pg/mg, significantly lower than that of insomnia model group ($P<0.01$), similar with normal control group ($P>0.05$). **Conclusion** The therapeutic effect of Hewei Anshen Decoction on insomnia is partially attributed to decreased content of orexin A.

【Key words】 Hewei Anshen Decoction; Insomnia; Plasma; Hypothalamus; Orexin A

基金项目:国家自然科学基金(81173429);首都医学发展基金(SF-2009-II-16)

作者单位:100853 北京,解放军总医院中医研究所[黎发根(硕士研究生)、李绍旦、杨明会、曹科、刘毅];军事医学科学院毒物药物研究所(周建平)

作者简介:黎发根(1985-),2010 级在读硕士研究生。研究方向:中西医结合老年病。E-mail: lifagen5@163.com

通讯作者:李绍旦(1976-),博士,副主任医师。研究方向:中西医结合基础与临床。E-mail: lsd301@126.com

随着生活、工作节奏的加快以及各种社会压力的增大,失眠发生率逐渐上升,已经成为现代社会的流行病,严重影响人们的生活和工作。失眠发生的机制目前尚不完全清楚,有研究认为 orexin A 是参与机体睡眠-觉醒调节的重要物质之一^[1]。本研究应用失眠大鼠模型,通过观察其血浆及下丘脑食欲素 A(orexin A)的变化,来探讨和胃安神方治疗失眠症的可能疗效机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康清洁级 wistar 雄性大鼠 30 只,体重(200±20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(医学动物合格证 SCXK 京 2012-0001)。将大鼠按随机数字表法分为 3 组,即正常对照组(正常组)、失眠模型组(模型组)及和胃安神方组(中药组),每组 10 只。

1.2 主要试剂与药物

对氯苯丙氨酸(PCPA)购自美国 Sigma 公司(C6506); orexin A 放射免疫试剂盒购自美国 phoenix 公司。中药和胃安神方由半夏 10 g、薏苡仁 15 g、陈皮 15 g、茯苓 15 g、石菖蒲 10 g、合欢皮 10 g、炒枣仁 15 g、夜交藤 15 g 组成,所有饮片均经解放军总医院中药房提供并鉴定。将上述诸药按传统煎药法获取汤剂,以恒温水浴锅浓缩成分别含生药 1.75 g/ml 的药液,玻璃瓶密闭盛装,4℃冰箱保存备用。

1.3 动物造模及给药

采用目前公认的 PCPA 失眠模型。除正常对照组外,其余各组大鼠参照文献^[2]并结合预实验结果,按 300 mg/kg 体质量以 10 ml/kg 体积腹腔注射 PCPA,于每天上午 8:00~8:30 进行,每天 1 次,连续 2 天。于第 1 次腹腔注射 28~30 小时后,动物出现昼夜节律消失,白天也活动不停,整体观察与正常对照组有明显不同,表明模型复制成功^[3]。于第 3 天开始每天上午 8:00 灌胃给药,中药组大鼠给予 10 ml/kg 体积 1.75 g/ml 中药水煎液(17.5 g/kg 生药);正常组和模型组给予同体积的生理盐水,每天 1 次,连续灌胃 6 天。

1.4 实验指标检测

参考文献^[4]方法,于末次给药后 24 小时,用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉各组大鼠,心脏采血 3 ml,加入抑肽酶 40 μl,3500 r/min 低温离心 5 分

钟,分离血浆,于-20℃保存待测。采血后立即将大鼠脱颈处死,断头取脑,分离下丘脑,充分匀浆后 4000 r/min 低温离心 10 分钟,取上清液于-20℃保存待测。用放射免疫法检测 orexin A 的含量,具体操作严格参照 orexin A 放射免疫试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理

运用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

模型组大鼠血浆及下丘脑 orexin A 含量较正常组显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);中药组大鼠血浆及下丘脑 orexin A 含量明显低于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。中药组与正常组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠血浆及下丘脑组织 orexin A 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血浆	下丘脑
		orexin A (pg/ml)	orexin A (pg/mg)
正常组	10	21.28±4.02	18.84±3.08
模型组	10	29.89±3.04 ^a	29.75±5.05 ^a
中药组	10	22.35±4.33 ^b	21.34±2.94 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$ 。

3 讨论

失眠是一种常见的睡眠障碍性疾病,其发生率高,长期的失眠会严重影响人们的身心健康^[5-6]。笔者认为当前导致失眠最主要的直接因素就是现代生活方式改变和饮食结构习惯变化,这些变化导致人体脾胃、肠道的消化功能紊乱,意即众多原发性失眠者多存在“胃不和”。针对原发性失眠者的“胃不和”,笔者采用和胃安神方以治之。前期的临床研究证实其对失眠症的治疗效果良好^[6-7],但其疗效机制尚不明确。

Orexin(又名 hypocretin)是一种由下丘脑外侧区合成和分泌的具有促进摄食作用的小分子神经多肽^[8-9],食欲素 A 和食欲素 B 是它的两个单体。目前研究认为 orexin A 是参与机体睡眠-觉醒调节的重要物质^[1]。Piper 等^[10]在大鼠的脑室内注射食欲素 A,通过记录大鼠的脑电图和肌电图观察大鼠的睡眠和觉醒周期变化,发现大鼠的觉醒时间与剂量相关,证明了食欲素的睡眠调节作用。Terao

等^[11]发现大鼠随着睡眠剥夺时间的延续,食欲素原 mRNA 的表达越来越高,认为觉醒状态可能需要高水平的食欲素维持。更有新近研究表明^[12],通过透光基因技术反复刺激自由活动小鼠 orexin 神经元,可以增加快速眼动或非快速眼动睡眠到觉醒的转换次数,这说明食欲素可能在睡眠-觉醒的调节中起到一种类似“开关”的作用。

本研究采用广泛应用的对氯苯丙氨酸(PCPA)腹腔注射诱导的失眠大鼠模型,其结果显示,模型组大鼠血浆及下丘脑中 orexin A 的含量显著增加,中药组大鼠经和胃安神方治疗后,其血浆及下丘脑中 orexin A 的含量明显低于模型组($P<0.01$),且大鼠睡眠节律得以恢复。结果提示,对 orexin A 的调节作用很可能是和胃安神方治疗失眠的内在机制之一。

另有研究发现^[13-14],orexin 除了主要分布于中枢神经系统的下丘脑外,还广泛分布于包括胃肠系统的外周组织。orexin 在促进食欲的同时,还能通过中枢和外周途径调节胃肠运动和消化液的分泌。本实验对血浆食欲素 A 的测定也证实了外周食欲素系统的存在。这说明食欲素同时存在于胃肠道和神经中枢,具有调节胃肠功能以及作为神经递质调节睡眠的双重作用,这与和胃安神方具有和胃与安神的功效有着相通之处,由此推测食欲素可能是“胃不和”与“卧不安”两者之间的生物物质基础之一,至于食欲素是如何发挥胃肠功能和睡眠之间的协调作用,还须进一步研究和探索。

参 考 文 献

- [1] Lecea LD, Jones BE, Boutrel B, et al. Addiction and arousal: alternative roles of hypothalamic peptides [J]. J Neurosci, 2006, 26(41): 10372-10375.
- [2] 肖成荣, 马增春, 李海静, 等. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制[J]. 药理毒理学杂志, 2007, 21(4): 326.
- [3] 余敏, 唐成林, 刘祖丽, 等. 不同强度电针刺激对失眠大鼠下丘脑 orexinA 的影响研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2011, 8(1): 70-74.
- [4] 黎发根, 李绍旦, 杨明会, 等. 和胃安神方对失眠模型大鼠血浆及下丘脑胆囊收缩素 8 的影响[J]. 环球中医药, 2012, 5(9): 664.
- [5] 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.
- [6] 罗海鸥, 李绍旦, 杨明会, 等. 和胃安神汤对失眠症患者睡眠及生活质量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(6): 18-20.
- [7] 李绍旦, 杨明会. 和胃安神方治疗亚健康失眠的临床研究[J]. 中国全科医学, 2010, 13(22): 2519-2520.
- [8] de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus specific peptides neuroexcitatory activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(1): 322-327.
- [9] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior[J]. Cell, 1998, 92(4): 573-585.
- [10] Piper DC, Upton N, Smith MI, et al. The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats[J]. Eur Neurosci, 2000, 12(2): 726-730.
- [11] Terao A, Peyron C, Ding J, et al. Prepro-hypocretin (prepro-orexin) expression is unaffected by short-term sleep deprivation in rats and mice[J]. Sleep, 2000, 23(7): 867-874.
- [12] Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, et al. Neural substrates awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons[J]. Nature, 2007, 450(7168): 420-424.
- [13] Krowicki Z, Burmeister M, Berthoud H, et al. Orexins in rat dorsal motor nucleus of the vagus potentially stimulate gas-tric motor function[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283: 465-472.
- [14] Kirchgesner AL, Liu M. Orexin synthesis and response in the gut[J]. Neuron, 1999, 24: 941-951.

(收稿日期: 2012-09-25)

(本文编辑: 秦楠)

· 信息之窗 ·

本刊对来稿中图、表的有关要求

凡能用文字说明者,尽量不用图表。图表均应有简要的图题和表题。图、表序号一律用阿拉伯数字,分别按其在正文出现的先后次序连续编码,并在正文相应位置标示。

图 在 WORD 文档中出现的图,印刷效果不好,要求另附图片原始文件。

表 一律采用“三线表”,其内容不可与文字和图重复。表内不设备注栏,如有需说明的事项(如 P 值等),以简炼文字写在表的下方,表内依次用 ^a、^b、^c、^d 号标注在相应内容的右上角。表内参数的单位应尽量相同,放在表的右上方;如各栏参数的单位不同,则放在各栏的表头内,(均值±标准差)用($\bar{x} \pm s$),置于表的右上方。表内数据要求同一指标保留的小数位数相同,一般比可准确测量的精度多一位。统计学处理结果统一用 ^a、^b、^c、^d 表示 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 。