

· 药学基础 ·

远志与炆远志对心肾不交失眠大鼠学习记忆, HPA轴功能及神经递质的调控作用

赵鑫, 崔月莉, 吴鹏, 张智慧, 王悦, 张学兰*

(山东中医药大学药学院, 山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心, 济南 250355)

[摘要] 目的:比较远志与炆远志对心肾不交型失眠大鼠学习记忆、下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)功能及神经递质的调控作用。方法:多因素共同刺激致大鼠心肾不交失眠模型,造模结束后,给药组灌胃给予远志与炆远志提取物(给药剂量 $8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),正常组和模型组给予等体积生理盐水,连续灌胃7 d。采用Morris水迷宫检测各组大鼠学习记忆能力的变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定各组大鼠血清中促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),促肾上腺皮质激素(ACTH),皮质醇(CORT)水平;超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定大鼠下丘脑中5-羟色胺(5-HT),多巴胺(DA), γ -氨基丁酸(GABA)及谷氨酸(Glu)的含量。结果:与正常组比较,模型组大鼠空间学习记忆能力下降,在目标象限停留的次数和时间明显减少($P<0.05$, $P<0.01$);血清中CORT, CRH, ACTH水平显著升高($P<0.01$);下丘脑组织中GABA, DA, 5-HT含量显著降低($P<0.01$), Glu含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,远志与炆远志组大鼠空间学习记忆能力提高,在目标象限停留的次数和时间显著增加($P<0.05$, $P<0.01$);血清中CORT, CRH, ACTH水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);下丘脑组织中GABA, DA, 5-HT含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), Glu含量明显降低($P<0.05$);炆远志组各指标恢复程度均优于远志组。结论:远志与炆远志均可提高心肾不交型失眠大鼠的学习记忆能力,改善HPA轴功能,调节中枢神经递质水平,从而起到安神益智的功效,且炆远志作用优于远志。

[关键词] 远志; 炆远志; 失眠; 下丘脑-垂体-肾上腺轴; 神经递质; 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)

[中图分类号] R22; R256.23; R28; R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0147-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210151

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201120.1603.001.html>

[网络出版日期] 2020-11-23 9:53

Regulatory Effect of *Polygala tenuifolia* and Licorice-simmered *P. tenuifolia* on Learning and Memory, HPA Axis Function and Neurotransmitters in Rats with Heart-kidney Imbalance Insomnia

ZHAO Xin, CUI Yue-li, WU Peng, ZHANG Zhi-hui, WANG Yue, ZHANG Xue-lan*

(School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM),

Collaborative Innovation Center for Quality Control and Construction of Whole Industrial Chain of TCM in Universities of Shandong Province, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the regulatory effects of *Polygala tenuifolia* and licorice-simmered *P. tenuifolia* on learning and memory, hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA axis) function and neurotransmitters in rats with heart-kidney imbalance insomnia. **Method:** The rat model of insomnia induced by multi-factor stimulation was established. After the model being made, the administration groups were given the extracts of *P. tenuifolia* and licorice-simmered *P. tenuifolia* by gavage (dose of $8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), while the normal

[收稿日期] 20200918(011)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1707204);国家自然科学基金面上项目(81573606, 81973486, 81373968);国家公共卫生服务补助项目(财社[2015]78);山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心项目(CYLXTCX2020-01)

[第一作者] 赵鑫,在读博士,从事中药饮片制备技术及质量控制研究, E-mail: zhaoxin151223@126.com

[通信作者] *张学兰,教授,从事中药饮片制备技术及质量控制研究, Tel: 0531-89628200, E-mail: zhang8832440@sina.com

group and model group were given the same volume of normal saline for 7 days. Morris water maze was used to detect the changes of learning and memory ability of rats in each group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of corticotropin-releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol (CORT) in serum of rats from each group. The contents of 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamic acid (Glu) in the hypothalamus of rats were determined simultaneously by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Result:** Compared with the normal group, the spatial learning and memory ability of rats in the model group was decreased, the times and time of staying in target quadrant were significantly reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), the levels of CORT, CRH and ACTH in serum were significantly increased ($P<0.01$), the contents of GABA, DA, 5-HT in hypothalamus tissue were significantly decreased ($P<0.01$), and the content of Glu was significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the spatial learning and memory ability of rats in the *P. tenuifolia* group and licorice-simmered *P. tenuifolia* group were increased, the times and time of staying in the target quadrant were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$), the levels of CORT, CRH and ACTH in serum were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), the contents of GABA, DA and 5-HT in hypothalamus tissue were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the content of Glu was significantly decreased ($P<0.05$). The recovery degree of each index in the licorice-simmered *P. tenuifolia* group was better than that in the *P. tenuifolia* group. **Conclusion:** Both *P. tenuifolia* and licorice-simmered *P. tenuifolia* can improve the learning and memory ability, improve the function of HPA axis, regulate the level of central neurotransmitters, and have the effect of calming the mind and improving the intelligence of rats with heart-kidney imbalance insomnia. The effect of licorice-simmered *P. tenuifolia* is better than that of *P. tenuifolia*.

[Key words] *Polygala tenuifolia*; licorice-simmered *P. tenuifolia*; insomnia; hypothalamus-pituitary-adrenal axis; neurotransmitters; ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

传统中医学认为,失眠是各种原因所致脏腑机能紊乱,阴阳转化失常,阳不入阴,气血互衰,以致心神不安所引起的。心肾不交型失眠是中医学上常见的失眠类型,严重影响着失眠患者的心理健康和身体健康。随着社会压力和工作压力的增加,失眠的发病率也逐年升高。失眠发病机制复杂,涉及生物、心理、社会等多方面,目前认为其主要与下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)功能的失调及中枢神经递质的紊乱有关^[1-2]。

远志具有安神益智、交通心肾、祛痰、消肿的功效,中医临床上将其作为治疗心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸、神志恍惚等证的基础中药。远志生用有“戟人咽喉”和令人呕吐的副作用,故其历代入药均以炮制品为主。历代对远志的炮制方法主要有去心、甘草汁煮制、甘草炙制、黑豆煮、蜜炙、蜜蒸等。炙远志为江西建昌帮特色炮制饮片,收载于2008年版《江西省中药饮片炮制规范》,其炮制方法为将甘草与远志共同放入药罐中加水炙制,远志经炙制后不仅可消除“戟人咽喉”的副作用,还能增强其益智安神之功^[3]。现代药理研究表明,远志能

增加老年失眠大鼠的体质量,改善其记忆能力,延长戊巴比妥诱发的睡眠时间,提高老年失眠大鼠海马中5-羟色胺(5-HT)和 γ -氨基丁酸(GABA)水平,降低谷氨酸(Glu)水平^[4];远志中远志皂苷B能提高学习记忆能力,具有治疗认知功能障碍和阿尔茨海默病的潜力^[5];细叶远志皂苷能通过激活GABA能系统和抑制去甲肾上腺素能系统,显著增强对小鼠的催眠作用^[6];远志经炙制后化学成分比关系会发生明显改变^[7]。但目前关于远志炙制前后药效学变化的研究尚未见报道。基于此,本实验拟比较远志与炙远志对心肾不交失眠大鼠学习记忆,HPA轴功能及神经递质的调控作用,以期对炙远志炮制增效原理研究及其临床应用提供实验依据。

1 材料

1260型高效液相色谱仪和G6420A型三重四极杆质谱仪(美国Agilent公司),352型酶标仪(Thermo Electron公司),TG16W型微量高速离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)。

对氯苯丙氨酸(PCPA,上海麦克林生化科技有限公司,批号C10007807);促肾上腺皮质激素释放

激素(CRH),促肾上腺皮质激素(ACTH),皮质醇(CORT)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号分别为190729KE9,190729KE10,190729KE11); γ -氨基丁酸(GABA),多巴胺(DA),谷氨酸(Glu),5-羟色胺(5-HT)对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为Z07J10H79273,S05J6G2,S12A10I85582,F25F7E10127,纯度分别为99.2%,98.5%,99.1%,98.8%);L-2-氯苯丙氨酸(2-CLP)对照品[上海麦克林生化科技有限公司,批号C10007807,纯度98.6%,作为内标物(IS)用],水为屈臣氏蒸馏水,甲醇、乙腈为色谱醇,其余试剂均为分析纯。

远志饮片(批号190301,产地河北)和甘草饮片(批号180620,产地甘肃)均购于山东百味堂中药饮片有限公司,经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰教授分别鉴定为远志科植物 *Polygala tenuifolia* 的干燥根和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎。

SPF级雄性SD大鼠,体质量(200 ± 20) g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,合格证号SCXK(鲁)2019-0003。本文涉及的动物实验操作经山东中医药大学动物实验伦理委员会批准,批准号SDUTCM20191106001。实验前于温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度50%~70%,12 h光照/黑暗循环环境中适应性饲养1周,实验期间动物自由饮水、饮食。

2 方法

2.1 炆远志的制备 按2008年版《江西省中药饮片炮制规范》^[3],取净甘草片与远志饮片,置炆药坛内,加入相当于远志饮片5倍量的40 $^{\circ}\text{C}$ 温水,拌匀,盖好坛盖,放置围灶内,坛底两边以砖架起,用足量的干糠堆满坛四周,点火后炆制6 h,至罐内汁水基本吸尽,糠尽灰冷时,起坛倒出,拣去甘草,60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,得炆远志饮片;每100 kg远志,用甘草6 kg。

2.2 远志与炆远志提取物的制备 称取同质量远志与炆远志粗粉,分别加10,8,8倍量70%乙醇超声提取3次,每次1 h,合并3次滤液,减压浓缩至一定体积,冷冻干燥。将制得的冻干粉用水配成生药质量浓度均为1 g $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

2.3 PCPA注射液的配制 取 Na_2CO_3 3.392 g,精密称定,加水至320 mL;另称取 Na_2HCO_3 1.512 g,加水至180 mL;将两溶液搅拌混合,配制成碳酸盐缓冲液(pH 10.1)。称取PCPA粉末适量,用碳酸盐缓冲液配制成质量浓度为45 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 的混悬液,大鼠腹腔

注射PCPA剂量为450 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.4 造模与给药^[8] 将大鼠随机分为正常组、模型组、远志组、炆远志组,每组10只。模型组及给药组大鼠均接受1~14 d不同刺激条件,每天随机安排1~2种刺激,主要包括4 $^{\circ}\text{C}$ 冰水游泳,45 $^{\circ}\text{C}$ 热水游泳,潮湿垫料24 h,无垫料,昼夜颠倒,夹尾,震动鼠笼,禁食和禁水,以避免大鼠对外界刺激产生适应性,第15天开始大鼠腹腔注射PCPA混悬液,每日1次,连续3 d,大鼠昼夜节律消失,白天少睡,精神萎靡,毛发枯槁易脱落,表明心肾不交失眠大鼠模型复制成功。正常组大鼠在第1~14天内正常供给饲料和饮水,不接受任何刺激,第15~17天一次性腹腔注射等体积生理盐水。造模结束后,给药组灌胃远志与炆远志提取物(8 g $\cdot\text{kg}^{-1}$,以生药量计),正常组和模型组给予等量的生理盐水,每天1次,连续灌胃7 d。

2.5 大鼠体质量测定 在实验开始前和实验的第7,14,17,24天时分别称定每只大鼠的体质量。

2.6 大鼠一般行为学评价 观察各组大鼠的行为状态(跳跃、撞击、缚卧、眯眼),活动程度(迟缓、减弱、一般、活跃),失眠状态(东张西望、易惊、狂躁、兴奋),皮肤毛发(枯乱、不泽、一般、光亮)和精神状态(萎靡、睡眠、正常、兴奋),大鼠状态观察时间为每天10:30~12:30。

2.7 大鼠学习记忆能力测试 于实验的第19天按照Morris水迷宫训练实验操作对各组大鼠进行4 d定位航行试验和1 d空间探索试验。定位航行试验为水池等分成4个象限(右上、左上、左下、右下分别为一至四象限),在第三象限的中心位置放置1个站台,站台低于水平面下2.5 cm,选择每个象限弧的中点作为大鼠固定入水点,检测大鼠在水迷宫中的学习、记忆能力。空间探索试验为第23天撤掉站台,所有实验大鼠均面朝池壁在第一象限放入水中,记录大鼠在120 s内穿越原站台位置的次数及在第三象限的游泳时间。

2.8 大鼠血清中CRH,ACTH,CORT水平测定 末次给药2 h后,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,静置1 h后,离心(3 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$,离心半径10 cm)15 min后取出上清,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。按照试剂盒说明书,采用ELISA检测各组大鼠血清中CRH,ACTH,CORT的水平。

2.9 大鼠下丘脑组织中神经递质含量的测定

2.9.1 大鼠下丘脑中神经递质的提取^[2] 大鼠腹主动脉取血,于冰上取出脑组织并迅速分离出下丘脑,称取各组大鼠下丘脑组织0.1 g置于离心管中,

放入钢珠,加入10倍量冰乙腈,利用组织匀浆机匀浆1 min,于4℃离心(1万 $r\cdot\min^{-1}$,10 min,离心半径8 cm,下同),取上清液600 μL ,加入内标溶液10 μL 和乙腈-水(5:95,内含0.2%甲酸水溶液)90 μL ,涡旋5 min,离心,将上清液转移至4 mL离心管中,氮气吹干,残渣用乙腈-水(5:95)400 μL 复溶,精密吸取5 μL 注入液质联用仪进行分析。

2.9.2 UPLC-MS/MS检测条件 色谱条件为 Halo C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,2.7 μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~4 min,5%B,4~5 min,5%~20%B),流速0.3 mL $\cdot\min^{-1}$,柱温30℃,进样量5 μL 。

质谱条件为采用正离子模式检测,电喷雾离子源(ESI),鞘气流速9 L $\cdot\min^{-1}$,鞘气温度350℃,干燥气流速9 L $\cdot\min^{-1}$,干燥器温度350℃,雾化气压力310.3 kPa,毛细管电压4 kV。各神经递质及内标质谱参数信息见表1。

表1 神经递质和内标UPLC-MS/MS分析的质谱信息
Table 1 Mass spectral information of neurotransmitters and internal standard for UPLC-MS/MS analysis

化合物	分子式	母离子 m/z	子离子 m/z	裂解 电压/V	碰撞 能量/V
GABA	C ₄ H ₉ NO ₂	104.0	87.0	75	8
DA	C ₈ H ₁₁ NO ₂	137.0	91.1	135	20
Glu	C ₅ H ₉ NO ₄	148.0	84.1	70	8
5-HT	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	160.1	115.0	155	30
IS	C ₉ H ₁₀ ClNO ₂	200.1	154.1	85	10

2.9.3 混合对照品溶液和内标溶液的制备 分别精密称取GABA,DA,Glu,5-HT对照品适量,加乙腈-水(5:95)溶解并稀释成质量浓度分别为0.35,0.20,0.35,0.21 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 的单一对照品储备液。分别精密量取单一对照品储备液适量,加乙腈-水(5:95)逐级稀释,得上述对照品质量浓度分别为420,0.96,60,2.4 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品贮备液。精密称取2-CLP对照品(IS)适量,加甲醇使溶解,得0.1 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 内标储备液,再加乙腈-水(5:95)稀释至质量浓度为500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,冷藏备用。

2.9.4 混合对照品工作液和质控样品制备 精密吸取上述混合对照品贮备液适量,用乙腈-水(5:95)稀释,得系列混合对照品工作液(GABA分别为1.5,3.0,6.0,12.0,24.0,30.0,42.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$;DA分别为4,8,16,32,64,80,96 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;Glu分别为0.25,0.5,1.0,2.0,4.0,5.0,6.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$;5-HT分别为10,20,40,80,

150,200,240 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),4℃冷藏备用。取-80℃条件下保存的各组下丘脑组织0.1 g,室温下解冻,加入10倍量冰乙腈,组织匀浆后作为空白基质样品。各取上清液600 μL 于2 mL离心管中,分别加入内标溶液10 μL ,乙腈-水(5:95)90 μL 和系列混合对照品工作液50 μL 。同法配制低、中、高3个质量浓度的质控样品,其中GABA质量浓度分别为3,12,30 mg $\cdot\text{L}^{-1}$,DA质量浓度分别为8,32,80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,Glu质量浓度分别为0.5,2.0,5.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$,5-HT质量浓度分别为20,80,200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.9.5 生物分析方法验证 按照生物样品定量分析方法验证指导原则,分别取空白下丘脑、空白下丘脑加混合对照品溶液,按照生物样品预处理分析方法,进行UPLC-MS/MS检测,考察专属性。将配制好的系列质量浓度的混合对照品工作液进行检测,作线性回归分析,求得4种神经递质线性范围和回归方程。配制低、中、高3个质量浓度的质控样品($n=6$),按2.9.1项下下丘脑样品处理方法操作,运用UPLC-MS/MS进行分析,分别在同1 d和连续3 d测定,考察日内、日间准确度和精密度。配制低、中、高3个质量浓度的质控样品($n=6$),按2.9.1项下方法处理,运用UPLC-MS/MS进行分析,得到的色谱峰面积记为A;同时取下丘脑空白基质600 μL ,按2.9.1项下方法处理,氮气流吹干后,以含与质控样品相同浓度的混合对照品溶液复溶后进行检测($n=6$),得到的色谱峰面积记为B;同时直接进样低、中、高3个质量浓度的混合对照品溶液($n=6$),得到的色谱峰面积记为C,按公式提取回收率= $A/B\times 100\%$ 和基质效应= $B/C\times 100\%$ 分别计算。配制3种不同浓度的质控样品($n=6$),考察下丘脑组织样品短期室温稳定性(25℃下放置4 h),冻融稳定性(-80℃反复冻融循环3次),进样器稳定性(样品在自动进样器中4℃放置24 h)和长期稳定性(-80℃放置14 d)。

2.10 统计学分析 采用SPSS 23.0软件进行数据处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠体质量的影响 由表2可知,给予不同条件刺激7 d后,模型组与正常组大鼠比较体质量显著下降($P<0.01$)。末次给药结束后,与模型组比较,远志组与炆远志组大鼠体质量均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),且炆远志组增加程度高于远志组。

3.2 对大鼠一般行为学的影响 当造模结束后,与

表 2 远志与炆远志对心肾不交型失眠大鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of *Polygala tenuifolia* and licorice-simmered *P. tenuifolia* on body weight of rats with heart-kidney imbalance insomnia ($\bar{x}\pm s, n=10$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	实验前	第 7 天	第 14 天	第 17 天	第 24 天
正常		201.80±3.48	243.47±7.17	271.67±8.24	307.72±9.64	330.30±10.47
模型		200.51±5.73	217.92±7.43 ¹⁾	239.55±6.99 ¹⁾	249.78±7.17 ¹⁾	258.84±9.84 ¹⁾
远志	8	200.67±5.43	217.75±7.34	240.50±7.44	250.19±7.04	267.19±6.29 ²⁾
炆远志	8	201.18±6.09	218.39±9.52	240.87±9.05	249.93±9.18	275.65±8.06 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表 4,5 同)。

正常组比较,造模大鼠白天少睡,毛发枯槁易脱落,精神萎靡,反应迟钝,爪甲冰凉,病理表现接近中医临床上心肾不交失眠患者证候。远志与炆远志提取物给药干预后,与模型组比较,远志组与炆远志组大鼠白天活动明显减少,倦卧,昼夜节律开始恢复,皮毛逐渐顺滑有光泽。

3.3 对大鼠学习记忆能力的影响 由表 3 可知,与正常组比较,模型组大鼠穿越原站台的次数显著减少($P<0.01$),在第三象限停留时间明显缩短($P<0.05$)。与模型组比较,远志组与炆远志组大鼠穿越原站台次数和在第三象限停留时间均明显增加($P<0.05, P<0.01$),且炆远志组增加更为明显。

表 3 远志与炆远志对心肾不交型失眠大鼠学习记忆能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of *P. tenuifolia* and licorice-simmered *P. tenuifolia* on learning and memory ability of rats with heart-kidney imbalance insomnia ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越原站台数/次	第三象限停留时间/s
正常		8.20±1.55	28.36±5.24
模型		6.10±1.52 ²⁾	22.52±4.17 ¹⁾
远志	8	8.60±2.46 ³⁾	29.63±6.74 ³⁾
炆远志	8	10.20±2.74 ⁴⁾	36.92±8.38 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

3.4 对大鼠血清中 CORT, CRH, ACTH 水平的影响 由表 4 可知,与正常组比较,模型组大鼠血清中 CORT, CRH, ACTH 水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,远志与炆远志均能不同程度的降低大鼠血清中 CORT, CRH, ACTH 水平($P<0.05, P<0.01$),且炆远志调控效果更好。

3.5 生物分析方法验证

3.5.1 选择性 图 1 为生物分析方法专属性结果,由图 1 可知,下丘脑中的内源性杂质不影响下丘脑中 4 种成分的检测,分离度较好。

3.5.2 线性关系及定量下线 以待测成分与内标

表 4 远志与炆远志对心肾不交型失眠大鼠血清中 CORT, CRH, ACTH 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of *P. tenuifolia* and licorice-simmered *P. tenuifolia* on CORT, CRH and ACTH levels in serum of rats with heart-kidney imbalance insomnia ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CORT/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	CRH/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	ACTH/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
正常		174.73±13.10	64.32±4.49	57.05±6.45
模型		220.38±17.91 ¹⁾	95.60±7.48 ¹⁾	87.07±6.34 ¹⁾
远志	8	202.68±9.98 ²⁾	87.02±6.37 ²⁾	80.38±7.28 ²⁾
炆远志	8	180.14±13.83 ³⁾	70.53±7.89 ³⁾	61.54±7.33 ³⁾

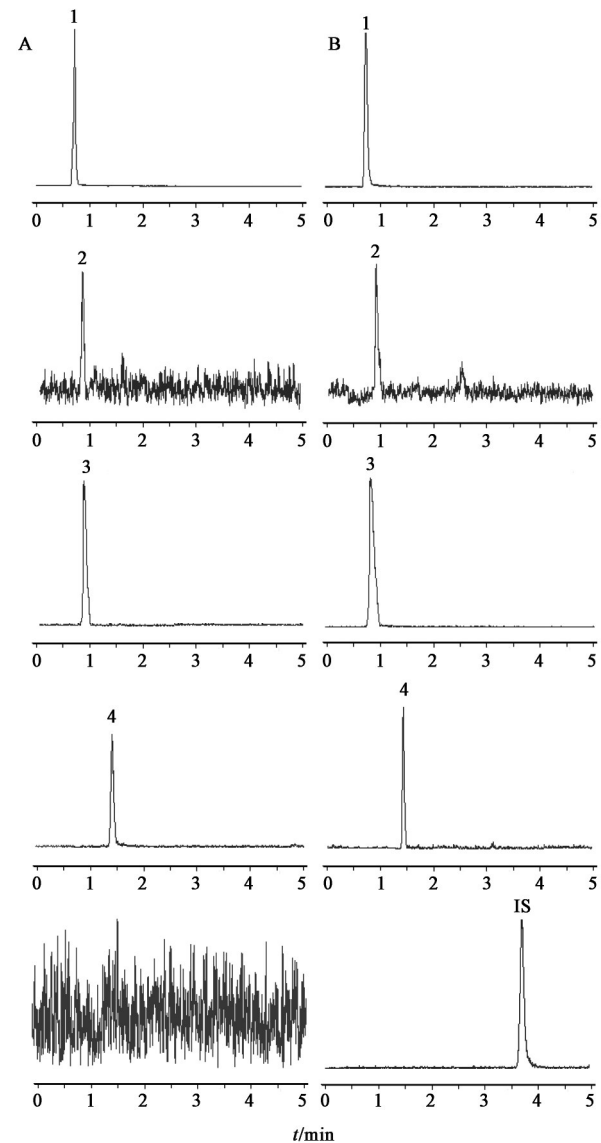
质量浓度的比值为横坐标,待测成分峰面积与空白基质峰面积的差值相对于内标峰面积的比值为纵坐标,绘制标准曲线,得到 GABA, DA, Glu 和 5-HT 的回归方程分别为 $Y=0.188\ 5X+0.163\ 8(r=0.997\ 1)$, $Y=1.138\ 9X-0.025\ 8(r=0.998\ 3)$, $Y=0.104\ 7X+0.092\ 4(r=0.997\ 4)$, $Y=1.074\ 7X+0.047\ 6(r=0.998\ 6)$, 四者线性范围依次为 1 500~42 000, 4~96, 250~6 000, 10~240 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 四者定量下限分别为 1 500, 4, 250, 9.99 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其信噪比(S/N)均>10。

3.5.3 准确度与精密度 各成分日内和日间精密度的 RSD 均<15%, 准确度 RE 在 -7.9%~8.2%, 符合生物样品测定要求。

3.5.4 提取回收率与基质效应 各成分的提取回收率在 78.25%~101.35%, 基质效应在 79.35%~105.78%, RSD 均<15%, 表明无明显基质效应。

3.5.5 稳定性 下丘脑组织样品的短期室温稳定性(RSD≤6.4%), 冻融稳定性(RSD≤8.7%), 进样器稳定性(RSD≤6.9%)和长期稳定性(RSD≤6.3%)良好, 上述 4 种成分在相应的条件下均能保持稳定。

3.6 对大鼠下丘脑中 GABA, DA, Glu, 5-HT 含量的影响 由表 5 可知,与正常组比较,模型组大鼠下丘脑中 GABA, DA, 5-HT 水平均显著降低($P<0.01$), 而 Glu 水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,远志组与炆远志组大鼠下丘脑中 GABA, DA, 5-HT 水平均明显升高($P<0.05, P<0.01$), 而 Glu 水平明显



A. 空白; B. 空白+对照品+IS; 1. GABA; 2. DA; 3. Glu; 4. 5-HT; IS. 2-CLP
图 1 大鼠下丘脑中 4 种神经递质的 MRM

Fig. 1 MRM of four neurotransmitters in rat hypothalamus
降低 ($P<0.05$), 且炆远志调控作用更为明显。

4 讨论

PCPA 是脑内 5-HT 生物合成的特异性抑制剂, 腹腔注射 PCPA 可使动物失眠, 是国内外较为常用的失眠模型; 而多因素共同刺激建立的失眠大鼠模型, 能导致大鼠能量代谢紊乱、活动度降低和 HPA

轴激活^[8], 表现出更多符合中医心肾不交所致失眠的临床证候, 并且该造模方法成功率高, 可靠性、稳定性亦较好, 是一种较为理想的研究失眠药效和机制的模型。

失眠与 HPA 轴功能障碍及神经递质水平紊乱密切相关。HPA 轴分泌的 3 个激素 (CRH, ACTH, CORT) 相互关联、相互影响, 在应激状态下, 杏仁核会被激活, 导致 HPA 轴的激活和 CRH 的分泌增加, ACTH 和 CORT 的浓度也随之增加, 从而导致觉醒效应^[1]。中老年慢性失眠患者有 HPA 轴相关的内分泌失衡, 表现为总睡眠时间 <5 h 时, CORT 水平明显增高, CORT 和 ACTH 水平与总睡眠时间呈负相关^[9]。GABA 是一种促进睡眠的因子, 通过与 GABA 受体结合来抑制唤醒系统以促进睡眠, 是许多镇静催眠药物治疗失眠的主要靶点^[10]。Glu 是中枢神经系统中重要的兴奋性神经递质, 能刺激神经元的活动, 对于学习与记忆功能具有重要的影响^[11]。5-HT 和 DA 是体内重要的单胺类神经递质, 参与睡眠-觉醒的调控, DA 在下丘脑中含量最高, 当大脑中 DA 的浓度增加时, 脑电波变快, 表明中枢神经系统处于兴奋状态。5-HT 通过减少快速眼动睡眠和减少唤醒反应来改善睡眠, 在中枢部位其含量的减少与失眠有关^[12]。前人研究报道, 细叶远志皂苷可明显延长小鼠总睡眠时间, 显著增加小鼠腹外侧视前区、蓝斑及穹隆周区 GABA 水平, 具有促进睡眠的活性^[13]。

本文研究结果发现, 造模后大鼠昼夜节律消失, 反应迟钝, 毛发枯槁, 能引起 HPA 轴亢奋, 表现为 CRH, ACTH 和 CORT 水平的显著增加, 也会导致失眠大鼠下丘脑中 4 种神经递质 (GABA, DA, Glu 和 5-HT) 水平发生紊乱, 而经过远志和炆远志干预后大鼠昼夜节律恢复, 皮毛变得顺滑有光泽, 能显著下调失眠大鼠血清 HPA 轴的各激素水平, 不同程度的恢复下丘脑中神经递质的表达水平, 改善失眠大鼠的睡眠行为, 且炆远志调节作用更为显著, 提示远志与炆远志治疗失眠的作用机制可能与改善

表 5 远志与炆远志对心肾不交型失眠大鼠下丘脑中 GABA, DA, 5-HT, Glu 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of *P. tenuifolia* and licorice-simmered *P. tenuifolia* on contents of GABA, DA, 5-HT and Glu in hypothalamus of rats from each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	GABA	DA	Glu	5-HT
正常		63 164.10 $\pm$ 4 353.64	101.00 $\pm$ 18.75	7 606.87 $\pm$ 1 348.93	333.06 $\pm$ 41.66
模型		45 090.15 $\pm$ 2 474.08 ¹⁾	66.56 $\pm$ 9.31 ¹⁾	9 483.66 $\pm$ 824.65 ¹⁾	122.28 $\pm$ 26.90 ¹⁾
远志	8	49 837.13 $\pm$ 4 765.27 ²⁾	88.70 $\pm$ 11.93 ³⁾	8 538.37 $\pm$ 1 105.51 ²⁾	220.75 $\pm$ 28.90 ³⁾
炆远志	8	56 559.08 $\pm$ 4 149.41 ³⁾	99.22 $\pm$ 13.14 ³⁾	8 281.51 $\pm$ 1 024.00 ²⁾	242.28 $\pm$ 27.19 ³⁾

心肾不交失眠大鼠HPA轴功能亢奋和下丘脑中神经递质水平紊乱有关,远志经炮制后可增强其对心肾不交失眠大鼠HPA轴功能亢奋和下丘脑中神经递质水平紊乱的调控作用。虽然本实验在分子水平上支持了远志安眠作用与HPA轴异常活动、神经递质的含量变化和比例失衡密切相关,但其亦存在一定的局限性,后续会在本文研究基础上进一步采用多成分、多靶点、多途径的方法研究远志及其不同炮制品对失眠的干预作用,进行更加深入的安眠信号通路机制研究。

本课题组前期研究表明,远志经甘草炮制后阿魏酸和3,4,5-三甲氧基肉桂酸含量明显增加^[14],并增加新成分甘草苷、甘草酸^[7]。阿魏酸可升高失眠小鼠海马和下丘脑组织中5-HT水平,3,4,5-三甲氧基肉桂酸可激活谷氨酸脱羧酶和GABA受体,发挥催眠作用^[15-16]。甘草苷、甘草酸可通过抑制氧化应激和神经凋亡,改善 β 淀粉样蛋白1-42诱导的空间学习记忆障碍^[17]。另外,中医临床常用甘草治疗失眠伴有心悸的患者^[18]。根据本文研究结果并结合文献报道,笔者推测远志炮制后安神益智药效增强可能与远志炮制后阿魏酸,3,4,5-三甲氧基肉桂酸含量升高以及辅料甘草的加入有关,具体机制还有待于进一步研究证实。

远志为临床常用的安神益智中药,在中医防治疑难病阿尔茨海默病的临床用药方剂中,远志出现的频次高居第二位^[19]。本文研究结果显示,远志与炮远志可提高心肾不交失眠大鼠学习记忆能力,降低血清中CORT,CRH,ACTH水平和下丘脑中Glu含量,升高下丘脑中GABA,DA和5-HT的含量,且炮远志调控作用更强,从而达到治疗失眠的效果,该结果验证了炮制可增强远志安神益智作用的传统理论,可为临床合理使用远志炮制品提供科学依据,还可为炮远志炮制原理研究提供借鉴。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] VGONTZAS A N, PUZINO K, FERNANDEZ-MENDOZA J, et al. Effects of trazodone versus cognitive behavioral therapy in the insomnia with short sleep duration phenotype: a preliminary study [J]. J Clin Sleep Med, 2020, doi: 10. 5664/jcsm. 8740.
- [2] YAN Y, LI Q, DU H Z, et al. Determination of five neurotransmitters in the rat brain for the study of the hypnotic effects of Ziziphi Spinosae Semen aqueous extract on insomnia rat model by UPLC-MS/MS [J].

Chin J Nat Med, 2019, 17(7): 551-560.

- [3] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2008: 81.
- [4] REN X J, WANG G Y, ZHANG X P, et al. Sedative and hypnotic effects and transcriptome analysis of *Polygala tenuifolia* in aged insomnia rats [J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(6): 434-441.
- [5] WANG L, JIN G F, YU H H, et al. Protective effects of tenuifolin isolated from *Polygala tenuifolia* Willd roots on neuronal apoptosis and learning and memory deficits in mice with Alzheimer's disease [J]. Food Funct, 2019, 10(11): 7453-7460.
- [6] LI X H, CUI J, YU Y, et al. Traditional Chinese nootropic medicine Radix Polygalae and its active constituent onjisaponin B reduce β -amyloid production and improve cognitive impairments [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151147.
- [7] 崔月莉, 吴鹏, 张丹捷, 等. 远志与炮远志HPLC指纹图谱比较[J]. 中药材, 2020, 43(3): 575-581.
- [8] 杨钰涵, 孙雨, 王珺, 等. 中医病证相符的大鼠心肾不交失眠模型的建立及其血清代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 383-390.
- [9] D'AUREA C, POYARES D, PIOVEZAN R D, et al. Objective short sleep duration is associated with the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in insomnia [J]. Arq Neuropsiquiatr, 2015, 73(6): 516-519.
- [10] 蔡艳, 叶玉妹, 张涛, 等. 桂枝甘草龙骨牡蛎汤加减治疗阴虚火旺型更年期失眠疗效及对患者睡眠质量、神经递质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 38-42.
- [11] BENSON K L, BOTTARY R, SCHOERNING L, et al. ¹H-MRS measurement of cortical GABA and glutamate in primary insomnia and major depressive disorder: relationship to sleep quality and depression severity [J]. J Affect Disord, 2020, 274: 624-631.
- [12] 闫雪丽, 于远东, 杨丹丹. 清心汤合枕中丹加减治疗心肾不交型失眠的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(9): 64-68.
- [13] CAO Q, JIANG Y, CUI S Y, et al. Tenuifolin, a saponin derived from Radix Polygalae, exhibits sleep-enhancing effects in mice [J]. Phytomedicine, 2016, 23(14): 1797-1805.
- [14] 宋梦哈, 吴鹏, 张学兰, 等. HPLC法比较远志3种炮制品中8种有机酸[J]. 中成药, 2016, 38(7): 1565-1569.
- [15] LIU C S, CHEN L, HU Y N, et al. Self-microemulsifying drug delivery system for improved

- oral delivery and hypnotic efficacy of ferulic acid[J].
Int J Nanomed, 2020, 15:2059-2070.
- [16] LEE C I, HAN J Y, HONG J T, et al. 3, 4, 5-Trimethoxycinnamic acid (TMCA), one of the constituents of Polygalae Radix enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic systems in mice[J]. Arch Pharm Res, 2013, 36(10):1244-1251.
- [17] JIA S L, WU X L, LI X X, et al. Neuroprotective effects of liquiritin on cognitive deficits induced by soluble amyloid- β_{1-42} oligomers injected into the hippocampus[J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18(12):1186-1199.
- [18] 单迪. 炙甘草汤治疗失眠并伴心悸的临床观察[J]. 世界睡眠医学杂志, 2019, 6(10):1349-1351.
- [19] 李强, 崔远武, 张玉莲. 中医药治疗老年性痴呆临床应用药文献分析[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(7):1207-1210.
- [责任编辑 刘德文]

·书讯·

原发性干燥综合征患者 IFN- γ , IL-10, IL-4 水平及其临床意义 ——评《战胜干燥综合征》

干燥综合征是一种主要累及人体外分泌腺的慢性自身免疫性疾病,以侵犯唾液腺和泪腺为主,还有其他部位外分泌腺及腺体外多器官受累,而出现的多系统损害的复杂表现。主要表现为口干,眼干,腮腺肿大,吞咽干性食物困难,眼睛有异物感,皮肤干燥,关节疼痛等,可伴有消化系统、呼吸系统、神经系统受损的症状。在临床中,面对本病复杂的症状,若没有整体把握好疾病的发生、发展,极易诊断为其他疾病而进行治疗,甚至得到相反的治疗效果,极大地影响了患者的身体健康,延误了治疗的最佳时机。《战胜干燥综合征》是一部兼顾学术性和实用性的医学丛书,原发性干燥综合征患者的 IFN- γ , IL-10, IL-4 水平具有重要临床意义,本书中有较详细的介绍。

《战胜干燥综合征》一书由吴英萍,张丽莉,王姝主编,中国科学技术出版社组织出版。本书共分为三章,采用一问一答的形式,生动、形象地论述了什么是干燥综合征、如何治疗及生活中如何调摄等相关问题。第1章初识干燥综合征,包括干燥综合征的表现,什么是干燥综合征,患干燥综合征的高发人群有哪些?为什么会得干燥综合征,干燥综合征的病因有哪些,干燥综合征的发病机制是什么等内容。第2章名医治疗干燥综合征,包括干燥综合征的西医治疗,干燥综合征目前的西医治疗方针是什么,干燥综合征怎样治疗等。第3章干燥综合征的调养与康复,包括中医药疗法,何谓阴虚?阴虚的症状有哪些?临床上治疗干燥综合征的常用滋阴中药有哪些等。

该书最显著的特点在于既追求治疗的有效性,又探寻风湿骨病的病因和病理,以实现“既治已病,又治未病”的功效。“英平风湿骨病治疗体系”认为,人的脏腑功能失调、免疫能力下降,是导致风湿病发生的内因;而作息不周、风寒湿邪侵入,则是风湿病发作的外因。内因为本,外因为末,舍本求末则百病难除。因此,应对风湿骨病的治本之道是调节脏腑功能、重建机体平衡和增强免疫能力。根据这一理念,吴英萍教授从100多味纯中药中成功研制出10余种国家专利保护的中成药,形成有效治疗风湿骨病的“核心技术”。传统医药学和现代医药学是我国医药学的“一体两翼”,共同承担着维护人民健康的重任。中医药和西医药各有所长,又各有所短。实现中西医药的有机融合,扬长避短,取长补短,是我国医药学发展的最大优势。“英平风湿骨病治疗体系”的可贵之处就在于探索出一条将中西医融为一体的路子,在风湿病的预防、诊断、治疗、康复等各个环节,将药物疗法、经络疗法、物理疗法、营养疗法、功能训练等各种中西医治疗手段科学组合,综合运用,从而收到标本兼治的良好效果。在《战胜干燥综合征》一书中主要介绍了原发性干燥综合征患者的 IFN- γ , IL-10, IL-4 水平的临床意义,具体如下:人体存在两种分泌不同细胞因子的 CD₄ 辅助,为 Th1 细胞和 Th2 细胞。Th1 型细胞分泌 Th1 型细胞因子(如 IFN- γ),它可促进细胞免疫反应, Th2 型细胞分泌 Th2 型细胞因子如 IL-10, Th2 型细胞因子可以促进体液反应,抑制细胞免疫。在机体抗肿瘤免疫功能中,细胞介导的细胞免疫是重要方式。近年来发现,在肿瘤疾病时 Th1/Th2 细胞因子网络失衡, Th2 占优势状态,并且肿瘤细胞自发分泌 IL-10 等细胞因子,使肿瘤局部的 T 细胞处于免疫无能状态且凋亡率增加,抗肿瘤免疫处于瘫痪状态,导致肿瘤逃避宿主的免疫监视。IFN- γ 属于 Th1 型细胞因子,它具有多种抗肿瘤作用和免疫调节作用,包括激活巨噬细胞和增强 T 细胞介导的细胞免疫。结果表明,在急性白血病时, IFN- γ 降低,从而降低细胞上 MHC 分子表达,降低 T 细胞的免疫功能。另外也不能有效诱导产生趋化因子如 IL-10 和单核因子,使血管生成的抑制作用减弱。因此急性白血病时机体的抗肿瘤功能降低,不利于白血细胞的清除,肿瘤不断生长,病情发展。

《战胜干燥综合征》一书中资料翔实,观点新颖,语言简洁、通俗易懂,重点突出实用,理论与临床兼顾,可以帮助患者及亲属深入了解本病,解除干燥综合征患者的困惑,指导其客观、正确认识本病并配合临床医生治疗,树立战胜疾病的信心,可供干燥综合征患者、患者家属及对本病感兴趣的读者阅读。

(作者赵悦,河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000)