

# 生地黄水提物对大鼠睡眠的影响及其机制研究

李尧善<sup>1,2</sup>, 申旻<sup>3</sup>, 王盼<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>西北大学化工学院;<sup>2</sup>西北大学生物医药研究院,西安 710069;

<sup>3</sup>陕西省太白酒业有限责任公司,宝鸡 722300

**摘要:**本实验旨在研究生地黄水提物对大鼠睡眠的影响,并探讨其可能的作用机制。参照《保健食品功能检验与评价方法》(2022版)中有助于改善睡眠的检验方法初步评价生地黄水提物的效果。进一步建立失眠大鼠模型,检测各给药组大鼠下丘脑中枢神经递质及相应受体的 mRNA 表达水平,并检测大鼠血清中炎症因子含量。结果显示生地黄水提物能改善大鼠睡眠且安全性良好,并且能显著增加失眠大鼠下丘脑中  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)和 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量,显著降低谷氨酸(glutamic acid, Glu)和多巴胺(dopamine, DA)含量,相应神经递质的受体 mRNA 表达量也发生同样的变化趋势,此外给药组大鼠血清中细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著下降,IL-10 的含量显著增加。说明生地黄水提物可通过调节神经递质和细胞炎症因子改善大鼠睡眠。

**关键词:**生地黄;改善睡眠;氯苯丙氨酸;神经递质;细胞炎症因子

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)11-1911-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.11.012

## Study on the effects and mechanism of Rehmanniae Radix water extract on sleep in rats

LI Yao-shan<sup>1,2</sup>, SHEN Min<sup>3</sup>, WANG Pan<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Chemical Engineering, Northwest University; <sup>2</sup>Biotech. & Biomed. Research Institute, Northwest University, Xi'an 710069, China; <sup>3</sup>Shaanxi Taibai Liquor Industry Co., Ltd., Baoji 722300, China

**Abstract:** The purpose of this experiment is to study the effect of Rehmanniae Radix water extract on sleep in rats and explore its possible mechanism. The effect of Rehmanniae Radix water extract was evaluated by referring to the *Functional Test and Evaluation Methods of Health Food* (2022 Edition) for sleep improvement tests. Furthermore, the insomnia rat model was established, and the central neurotransmitters in the hypothalamus and their corresponding receptors mRNA expression levels were detected, as well as the content of inflammatory factors in the serum of the rats. The results showed that the Rehmanniae Radix water extract could improve the sleep of rats, and the safety was good. Furthermore, it significantly increased the contents of gamma-aminobutyric acid (GABA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) and decreased the contents of glutamic acid (Glu) and dopamine (DA) in the hypothalamus of insomniac rats, and the expression of receptor mRNA of the corresponding neurotransmitters was affected similarly. In addition, the contents of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in serum decreased significantly and IL-10 increased significantly. These data indicated that the Rehmanniae Radix water extract could improve sleep in rats by regulating neurotransmitters and cellular inflammatory factors.

**Key words:** Rehmanniae Radix; improving sleep; chlorophenylalanine; neurotransmitter; cellular inflammatory factor

失眠在中医领域有多种名称,比如“不寐”“目不瞑”等,一般认为是机体受到外界及自身内部多种因素刺激进而导致的无法入睡、晨起困倦等心神

不宁的现象。失眠同时还伴有其他症状,比如难以启动和维持睡眠、晨起早醒、难以重新入睡等<sup>[1]</sup>。目前全球失眠症的患病率估计在 10%~40% 之间,不同程度的失眠都会对机体造成影响,比如短时间的失眠可使人面容憔悴、精神疲惫,而长时间的失眠极易导致焦虑、抑郁等消极情绪,甚至可能引起心理

收稿日期:2022-05-10 接受日期:2022-08-18

基金项目:国家自然科学基金(22108229);陕西省教育厅专项科研项目计划(20JK0938)

\* 通信作者 E-mail:panwanghxy@nwu.edu.cn

障碍和精神疾病。因此改善睡眠质量,保障正常的生理作息规律,是亟待解决的社会和健康问题。

目前镇静催眠药物包括苯二氮草类药物(三唑仑、艾司唑仑、硝基安定等)、抗抑郁药、抗组胺药等,但连续用药会出现如宿醉、谵妄、共济失调等不良反应。国家“十四五”规划和2035年远景目标纲要指出,要推动中医药的传承和创新,发挥中药材在疾病预防中的重要优势。因此,探索我国传统中药材在改善睡眠等方面的作用成为新的研究热点。生地黄是玄参科多年生草本植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根,作为一种清热凉血、养阴生津的中药,应用非常广泛<sup>[2]</sup>。现代药理学研究表明,生地黄在心血管防治、免疫系统调节、降低血糖和血脂、抗衰老、保肝利胆、抗肿瘤、抑菌、止血等方面发挥重要作用<sup>[3]</sup>。此外,生地黄与其他中药材的联合使用,如生地黄与百合熬制的百合地黄汤,与酸枣仁、玄参、茯苓等配伍组成的参苓颗粒,与人参、云苓、当归等组成的天王补心丹等也具有镇静安神的效果。但是目前关于生地黄自身对于改善睡眠的功效和安全性研究较少,而相关机制研究则更少。因此本研究以《保健食品功能检验与评价方法》(2022版)为参考,初步判断生地黄水提取物改善睡眠的功效,进一步通过检测大鼠下丘脑神经递质含量及相应受体表达量的变化,及大鼠血清中细胞炎症因子含量的变化,探讨生地黄水提取物在改善睡眠方面的效果及可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料:生地黄(批号 C0402106072,陕西嘉禾生物科技股份有限公司);戊巴比妥钠、巴比妥钠(批号 P11011、B0500,美国 Sigma 公司);5-HT、GABA、NA、DA 和 Glu 检测试剂盒(批号 20210504、20210509、20210609、20210802、20210504,南京建成生物工程研究所);梓醇、地黄苷 D(批号 SB21678、S38002,北京谱析标准技术有限公司);TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-10 ELISA 酶联免疫吸附试剂盒(批号 RA20035、RA20020、RA20607,武汉伊莱特生物科技有限公司);RNAeasy<sup>TM</sup> 动物 RNA 提取试剂盒、BeyoRT<sup>TM</sup> II cDNA 反转录试剂盒、BeyoFast<sup>TM</sup> SYBR Green One-Step qRT-PCR 试剂盒(批号 R0024、D7168L-1、D7268M-1,碧云天生物技术有限公司)。

实验仪器:ME104E/02 型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);1260 型高效液相色谱

仪(美国 Agilent 公司);Z36-HK 型离心机(美国赛默飞);ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

实验动物:SPF 级 SD 雄性大鼠,购自中国人民解放军第四军医大学动物实验中心,体重 180 ~ 210 g(许可证号 SCXK(陕)2019-001);SPF 级 KM 小鼠,购自陕西省西安市西安交通大学医学部实验动物中心,体重 18 ~ 22 g(许可证号 SCXK(陕)2018-001)。饲养条件为屏障级动物房(温度 20 ~ 25  $^{\circ}$ C,相对湿度 50% ~ 60%),12 h 照明和 12 h 黑暗交替模拟正常生长环境,自由摄食和饮水。动物实验严格按照中华人民共和国《实验动物管理条例》进行,严格按照实验动物伦理要求操作,实验开展经过西北大学动物伦理委员会批准(NWU-AWC-20210809M)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生地黄水提物的制备及分析

取生地黄 200 g,捣碎后加 10 倍水浸泡 1 h,再煎煮 30 min,过滤后重复 3 次并合并滤液。经 60  $^{\circ}$ C 减压浓缩后经喷雾干燥(进风温度 140 ~ 190  $^{\circ}$ C,出风温度 75 ~ 85  $^{\circ}$ C),干燥后粉碎过 80 目筛密封保存,生地黄水提物的得率为 20%。生地黄水提取物成分分析参照《中国药典》(2020 版)中地黄的含量测定及通则 0512 进行<sup>[4]</sup>,梓醇检测以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以甲醇-0.1% 磷酸溶液(体积比 1:9)为流动相,检测波长为 210 nm;地黄苷 D 检测以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以甲醇-0.1% 磷酸溶液(体积比 1:19)为流动相,检测波长为 203 nm。

#### 1.2.2 生地黄水提取物改善大鼠睡眠的评价方法

为评估生地黄水提取物改善睡眠的效果,选择 SD 雄性大鼠,参照《保健食品功能检验与评价方法》(2022 版)中“有助于改善睡眠”的检验方法设置三组。每组均设 4 个亚组,每个亚组 10 只动物,分别为对照组、生地黄水提取物低剂量组(RR-L,150 mg/kg · BW,生药量折合人体剂量 3.75 g/d)、生地黄水提取物中剂量组(RR-M,300 mg/kg · BW,生药量折合人体剂量 7.5 g/d)、生地黄水提取物高剂量组(RR-H,600 mg/kg · BW,生药量折合人体剂量 15 g/d),每天给各剂量组动物灌胃给药一次,对照组给予等体积的 ddH<sub>2</sub>O 灌胃,连续进行 30 d 并每天记录大鼠的体重。直接睡眠实验通过判断末次给药后大鼠进入睡眠状态的数量,依据为当大鼠置于背卧位时,超过 30 ~ 60 s 不能翻正,即说明大鼠翻正反射消失,进入睡眠。延长戊巴比妥钠睡眠时间的试验通过预

实验确定戊巴比妥钠溶液剂量为 50 mg/kg · BW, 在末次给药 15 min 后,按 0.1 mL/10 g · BW 腹腔注射戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg · BW,开始观察大鼠是否有翻正反射,当翻正反射消失达 1 min 为睡眠指标,观察并记录生地黄水提物能否延长戊巴比妥钠睡眠时间。戊巴比妥钠阈下剂量的催眠试验通过预实验确定戊巴比妥钠的阈下催眠剂量为 30 mg/kg · BW。生地黄水提物于末次灌胃 15 min 后,给大鼠腹腔注射戊巴比妥钠阈下催眠剂量(30 mg/kg · BW),以翻正反射消失达 1 min 以上为入睡判断标准,记录 30 min 内入睡动物数。观察并记录规定时间内入睡的大鼠动物只数。巴比妥钠的睡眠潜伏期试验是在末次给药 15 min 后,大鼠腹腔注射 0.1 mL/10g · BW 的巴比妥钠(250 mg/kg · BW),观察并记录大鼠的睡眠潜伏期时间。

### 1.2.3 氯苯丙氨酸(PCPA)诱导失眠大鼠模型的建立

将 50 只 SD 大鼠分为两组,模型组( $n = 40$ )腹腔注射 PCPA 溶液(400 mg/(kg · d)),每天上午九点开始注射一次,连续注射三天。对照组( $n = 10$ )腹腔注射等体积 0.9% 的生理盐水。最后一次注射 24 h 后,对大鼠活动进行监测。失眠模型大鼠行为特征包括昼夜节律丧失、兴奋性和攻击性增强、尿液和粪便增多等现象。此外通过大鼠眼眶取血后测定血清中 5-HT 含量,定量判断失眠大鼠模型是否成功建立。

### 1.2.4 生地黄水提物对 PCPA 失眠大鼠的治疗给药

将 40 只建模成功的大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,分别为模型组,RR-L 组(生地黄水提物 150 mg/kg · BW)、RR-M 组(生地黄水提物 300 mg/kg · BW)、RR-H 组(生地黄水提物 600 mg/kg · BW)。每天给各剂量组动物灌胃给药一次,连续给药 7 d,对照组和模型组给予等体积的 0.9% 生理盐水。每天给药后放回笼内并保证笼内鼠粮和水。

### 1.2.5 大鼠下丘脑组织内中枢神经递质含量的测定

最后一次给药后开始断食供水,12 h 后 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉处死,快速剥离脑组织并确定下丘脑位置后取约 1 mm 深度的下丘脑组织,用已经预冷却的生理盐水清洗组织 3 次,再用干净的滤纸拭干,加入 9 倍质量的生理盐水,玻璃匀浆器匀浆(冰水浴条件下),采用低温 4 °C 方式(5 000 r/min)离心 10 min,取上清用于检测。严格按照 GABA、5-HT、Glu、DA、NA 各试剂盒步骤对其含量进行检测。

### 1.2.6 大鼠下丘脑中神经递质相关受体 mRNA 表达量的测定

低温条件下将收集的大鼠下丘脑组织进行总 RNA 的提取。利用反转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA,测定神经递质 GABA 的受体 GABA<sub>Aα1</sub> 和 GABA<sub>Aα2</sub>、5-HT 的受体 5-HT<sub>1α</sub> 和 5-HT<sub>2α</sub>、Glu 的受体 mGluR1 和 mGluR2、DA 受体 D2 的 mRNA 表达情况,内参基因为 β-actin。通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算相关受体基因的相对表达量。扩增引物的序列见表 1。

表 1 大鼠下丘脑中神经递质相关受体的引物序列

Table 1 Primer sequences for neurotransmitter-associated receptors in the rat hypothalamus

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	扩增长度 Amplification length (bp)
β-actin	F:TGTCACCAACTGGGACGATA R:GGGCTGTGAAGTCTCAAA	210
GABA <sub>Aα1</sub>	F:AGTGTGCTATGCCTTCGTGTTT R:ACTTCTTTTCGGTTCTATGGTTCG	246
GABA <sub>Aα2</sub>	F:ACCACACCACCACCGACAAC R:TGGATCAGAACTGGGACAAGG	247
5-HT <sub>1α</sub>	F:ATCTCGCTCACTTGGCTCAT R:GTGGTCTTGCTGATGGTG	111
5-HT <sub>2α</sub>	F:AACGGTCCATCCACAGAGAG R:ATGGGCACCACATTACAACA	111
mGluR1	F:CTCCCATGCCATTTTGTCC R:ACTGTACATGCTGAAGCGCA	194
mGluR2	F:CTGTTAATGAGCACCAGGCC R:GTAGGAGCATCACTGTGGGT	247
D2	F:ACCTGTCTGCTACGATGATG R:GCATGCCATACTAGTTGTAGTGG	105

### 1.2.7 大鼠血清中炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-10 含量的测定

最后一次给药后开始断食供水,12 h 后麻醉采血并迅速离心(5 000 r/min,5 min),收集血清,根据大鼠 TNF-α、IL-1β 和 IL-10 检测试剂盒检测相关炎症因子的含量。

### 1.2.8 生地黄水提物的小鼠急性毒性试验

急性毒性试验主要参照 GB15193.3-2014 的试验方法进行<sup>[5]</sup>。其中,小鼠急性经口毒性试验灌胃剂量分别为 15 000、30 000 mg/kg · BW(以样品干重计,下同),给药体积为 20 mL/kg 体重。

选购 KM 小鼠 60 只(雄性 30 只,雌性 30 只),体重 18 ~ 22 g。观察 5 d 后,随机按体重分成 3 组,每组各 20 只,其中雄性(M)10 只,雌性(F)10 只。3 组分别为:急性毒性低剂量组(AT-L-M 组和 AT-L-

F组, 15 000 mg/kg · BW, 折合人体生药剂量为 75 g/d), 急性毒性高剂量组(AT-H-M组和AT-H-F组, 30 000 mg/kg · BW, 折合人体生药剂量为 150 g/d), 对照组(对照组-M, 对照组-F, 给予等体积的 ddH<sub>2</sub>O), 试验周期 14 d。每天观察试验小鼠的表现, 在试验周期的 0、3、7、14 d, 称量小鼠体重, 评价生地黄水提物对小鼠体重的影响。在小鼠灌胃给药后需连续观察 4 h, 注意小鼠的饮食情况等有无异常, 之后每天最少进行 1 次观察, 连续观察 14 d。试验结束后观察小鼠心、肝、脾、肺、肾等器官的组织、颜色和质地有无异常变化。

### 1.2.9 统计方法

用 SPSS 21.0 软件进行数据的转化和统计学分析。先对数据进行方差齐性检验, 若方差齐性, 采用单因素方差分析进行总体比较, 发现差异再用 Dunnett 法进行多个剂量组与一个对照组均数间的两两比较。若方差出现不齐现象, 则对原始数据进行适

当的变量转换, 满足方差齐性检验后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到方差齐性的目的, 改用秩和检验进行统计, 发现总体比较有差异, 则采用不要求方差齐性的 Tamhane's T<sub>2</sub> 检验进行两两比较。

## 2 结果

### 2.1 生地黄水提物成分分析

生地黄水提物经过干燥处理后得率为 20%。将生地黄水提物配置成 0.5 g/mL 溶液, 通过 HPLC-DAD 检测各成分浓度, 其中梓醇和地黄苷 D 的含量分别为 15、12 mg/mL。

### 2.2 生地黄水提物改善大鼠睡眠的试验评价

经口灌胃后连续记录大鼠的体重, 由表 2 可见, 与对照组相比, RR-L、RR-M 和 RR-H 三个给药组对大鼠体重无显著影响, 各组大鼠体重增长趋势一致, 皮毛有光泽, 饮食、活动正常, 表明不同剂量的生地黄水提物对大鼠正常生长无影响( $P > 0.05$ )。

表 2 生地黄水提物对大鼠体重的影响

Table 2 Effects of Rehmanniae Radix water extract on body weight in rats

组别 Group	动物数 Number of animals	初始体重 Initial weight(g)	最终体重 Final weight(g)	体重增加 Weight gain(g)
对照组 Control	10	197.75 ± 10.12	242.94 ± 12.86	45.19 ± 7.17
RR-L	10	196.76 ± 8.44	241.07 ± 8.88	44.31 ± 5.06
RR-M	10	198.64 ± 8.75	238.65 ± 6.61	40.01 ± 6.57
RR-H	10	194.21 ± 8.12	240.77 ± 7.61	46.56 ± 6.20

大鼠直接睡眠作用研究试验表明, 经口灌胃后, 对照组与 RR-L、RR-M 和 RR-H 三个给药组的大鼠在 30 min 内均没有出现进入睡眠的现象, 说明生地黄水提物的各剂量组均对大鼠无直接睡眠作用。

根据图 1A 可知, 经口灌胃给予各剂量组对应药物 30 d 后, 与对照组相比, RR-L、RR-M 和 RR-H 三个给药组均对戊巴比妥钠诱导的大鼠睡眠时间具

有延长作用, 延长率分别为 24.30%、25.19% 和 20.29%, 且与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。

戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验结果由表 3 可知, 各剂量组灌胃给予对应药物 30 d 后, RR-H 组睡眠发生率与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ), 说明生地黄水提物高剂量组(600 mg/kg · BW)与阈下剂量的戊巴比妥钠在助眠方面有协同增效的作用。

表 3 生地黄水提物对阈下剂量戊巴比妥钠诱导的大鼠睡眠发生率的作用

Table 3 Effects of Rehmanniae Radix water extract on the incidence of sleep in rats induced by subthreshold sodium pentobarbital

组别 Group	戊巴比妥钠 Sodium pentobarbital (mg/kg · BW)	动物数 Number of animals	入睡动物数 Number of sleeping animals	睡眠发生率 Sleeping incidence(%)	<i>P</i>
对照组 Control	30	10	2	20	-
RR-L	30	10	4	40	0.355
RR-M	30	10	5	50	0.177
RR-H	30	10	7	70	0.024

巴比妥钠的睡眠潜伏期试验结果由图 1B 可见,经口灌胃给予各剂量组对应药物 30 d 后,与对照组相比,RR-M 和 RR-H 能显著缩短大鼠睡眠潜伏

期( $P < 0.05$ ),缩短率分别为 41.79% 和 43.18%。RR-L 组大鼠的睡眠潜伏期虽然也比对照组有所缩短,但差异无统计学意义。

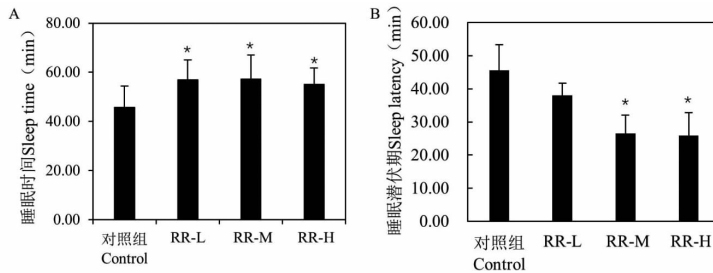


图 1 生地黄水提取物对大鼠睡眠时间及睡眠潜伏期的影响

Fig. 1 Effects of Rehmanniae Radix water extract on sleep time and sleep latency in rats

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。Note:Compared with control group,\* $P < 0.05$ 。

根据《保健食品功能检验与评价方法》(2022 版)中“有助于改善睡眠”的结果判定,本研究中生地黄水提取物各剂量均对大鼠体重无直接影响,对大鼠无直接睡眠作用,且能够延长戊巴比妥钠睡眠时间,增加阈下剂量戊巴比妥钠诱导大鼠的睡眠发生率,并且生地黄水提取物中、高剂量组能显著缩短大鼠睡眠潜伏期。综上结果,可判定生地黄水提取物具有有助于改善睡眠的作用。

### 2.3 失眠大鼠模型的建立

利用 PCPA 诱导动物是国际公认的一种研究失眠机制模型的方法。如图 2 所示,与正常组相比,模型组大鼠血清中 5-HT 含量显著降低,且模型组大鼠集中表现出昼夜节律消失、兴奋性和攻击性增强、尿液和粪便偏多等现象,说明本研究中失眠大鼠的模型已构建成功。

### 2.4 生地黄水提取物对失眠大鼠下丘脑内神经递质的影响

由表 4 可见,与对照组相比,模型组大鼠下丘脑中 GABA 和 5-HT 含量显著降低( $P < 0.01$ ),而

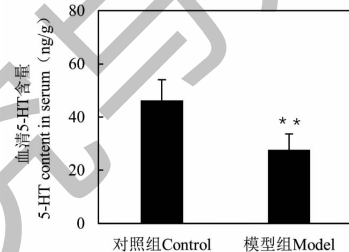


图 2 大鼠血清中 5-HT 的含量

Fig. 2 The content of 5-HT in rat serum

注:与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ 。Note:Compared with control group,\*\* $P < 0.01$ 。

GLu、NA 和 DA 均含量显著升高( $P < 0.05$ ),该结果符合失眠小鼠相关神经递质含量的变化趋势。

与模型组相比,生地黄水提取物各组均能显著提高大鼠下丘脑中 GABA 和 5-HT 的含量,且生地黄水提取物高剂量组对大鼠 GABA 和 5-HT 的效果更显著一些( $P < 0.01$ )。Glu 和 DA 含量在各给药组的含量显著降低( $P < 0.05$ ),而 NA 含量在各给药组虽有降低,但是结果不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 4 生地黄水提取物对大鼠下丘脑内神经递质含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effects of Rehmanniae Radix water extract on the content of neurotransmitters in hypothalamus of rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	GABA (mmol/mg)	Glu (nmol/mg)	5-HT (ng/g)	NA (ng/g)	DA (pg/mL)
对照组 Control	6.94 ± 0.69	23.98 ± 2.29	77.67 ± 14.06	252.67 ± 5.44	5615.72 ± 77.27
模型组 Model	3.42 ± 0.57 <sup>ΔΔ</sup>	31.74 ± 1.13 <sup>Δ</sup>	43.72 ± 10.08 <sup>ΔΔ</sup>	278.35 ± 8.65 <sup>Δ</sup>	5927.26 ± 88.93 <sup>Δ</sup>
RR-L	7.32 ± 0.11*	26.83 ± 1.58*	60.33 ± 10.27*	246.44 ± 11.52	5345.80 ± 107.26*
RR-M	7.91 ± 0.12*	25.75 ± 0.97*	86.67 ± 9.53*	252.76 ± 11.91	5078.68 ± 175.54*
RR-H	8.50 ± 0.51**	20.30 ± 1.57*	103.00 ± 11.09**	250.61 ± 12.75	4857.37 ± 220.93*

注:与对照组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

## 2.5 生地黄水提取物对大鼠下丘脑中神经递质相关受体 mRNA 表达的影响

由图 3 可见,与对照组相比,模型组大鼠的 GABA 受体  $GABA_{A\alpha 1}$  和  $GABA_{A\alpha 2}$  mRNA 表达量、5-HT 的受体 5-HT<sub>1 $\alpha$</sub>  和 5-HT<sub>2 $\alpha$</sub>  mRNA 表达量均显著降低 ( $P < 0.05$ ),而 Glu 的受体 mGluR1 和 mGluR2 mRNA 表达量、DA 的受体 D<sub>2</sub> mRNA 表达量显著提高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比,生地黄水提取物各组均能显著提高 GABA 受体  $GABA_{A\alpha 1}$  和  $GABA_{A\alpha 2}$ 、5-HT

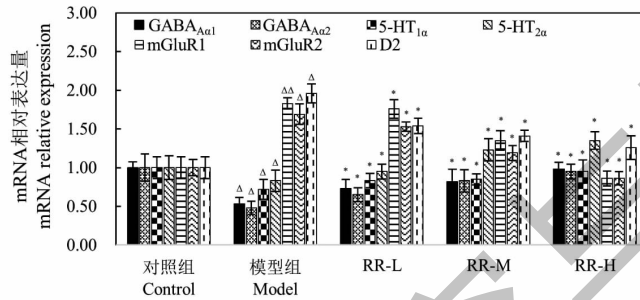


图 3 大鼠下丘脑中各神经递质受体的 mRNA 表达情况

Fig. 3 mRNA expression of neurotransmitter receptors in rat hypothalamus

注:与对照组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与模型组相比, $* P < 0.05$ , $** P < 0.01$ 。Note:Compared with control group, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ; Compared with model group, $* P < 0.05$ , $** P < 0.01$ 。

组相比,生地黄水提取物各组均能显著降低 TNF- $\alpha$  的含量 ( $P < 0.05$ ),而 RR-M 组和 RR-H 组均可以显

受体 5-HT<sub>1 $\alpha$</sub>  和 5-HT<sub>2 $\alpha$</sub>  的 mRNA 表达量 ( $P < 0.05$ ),显著降低 Glu 的受体 mGluR1 和 mGluR2、DA 受体 D<sub>2</sub> mRNA 的表达量 ( $P < 0.05$ )。

## 2.6 生地黄水提取物对失眠大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-10 含量的影响

由表 5 可见,与对照组相比,模型组大鼠血清中炎症因子 TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) 和 IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ) 含量显著增加,IL-10 含量显著减少 ( $P < 0.05$ )。与模型

著减低 IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ) 和提高 IL-10 的含量 ( $P < 0.05$ )。

表 5 生地黄水提取物对大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-10 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effects of Rehmanniae Radix water extract on the contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 in rat serum ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IL-1 $\beta$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IL-10 ( $\mu\text{g/mL}$ )
对照组 Control	205.25 $\pm$ 18.74	30.25 $\pm$ 3.16	95.68 $\pm$ 5.48
模型组 Model	279.35 $\pm$ 12.75 $\Delta\Delta$	36.08 $\pm$ 4.18 $\Delta$	68.23 $\pm$ 6.98 $\Delta$
RR-L	243.25 $\pm$ 10.45*	35.48 $\pm$ 7.65	73.15 $\pm$ 8.48
RR-M	231.85 $\pm$ 8.93*	30.91 $\pm$ 2.14*	89.79 $\pm$ 10.21*
RR-H	215.74 $\pm$ 12.56**	28.93 $\pm$ 5.83*	98.82 $\pm$ 6.93**

注:与对照组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与模型组相比, $* P < 0.05$ , $** P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;Compared with model group, $* P < 0.05$ , $** P < 0.01$ 。

## 2.7 生地黄水提取物对小鼠的急性毒性试验

为了评估生地黄水提取物的安全性,对生地黄水提取物进行急性毒性试验。试验期间雄(M)、雌性(F)小鼠体重情况如图 4 所示。与对照组的健康小鼠相比,急性毒性低剂量组(AT-L-M 组和 AT-L-F 组)和高剂量组(AT-H-M 组和 AT-H-F)小鼠在同一时间段体重差异不显著 ( $P > 0.05$ ),并且试验组中各小鼠均未出现惊厥不安、腹泻或者便秘、竖毛等急性不良反应,无动物死亡,各剂量组小鼠心、肝、脾、

肾等脏器均未见肉眼可见的异常情况。

## 3 讨论与结论

目前改善睡眠的实验研究大多从动物行为学和神经递质等方面开展工作。本实验通过动物行为的药理学研究,探讨了生地黄对大鼠直接睡眠、戊巴比妥钠及阈下剂量所致大鼠睡眠发生率和时间、巴比妥钠所致大鼠睡眠潜伏期的影响。由于药物对中枢系统的兴奋或抑制可通过大鼠的行为进行反应,通过大鼠的自主活动证明了生地黄能够显著减少大鼠

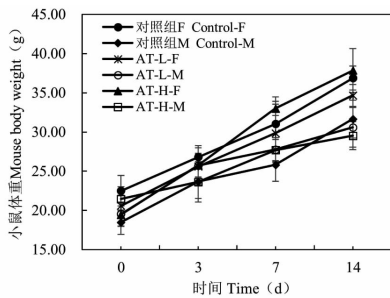


图4 小鼠的体重变化图

Fig. 4 The change of body weight in mice

活动,具有明确的改善睡眠效果。此外,生地黄水提物高剂量组的大鼠对戊巴比妥钠阈下剂量所致的大鼠睡眠发生率显著提高也说明生地黄在改善睡眠方面与肝酶的代谢无关。小鼠急性毒性试验研究表明当生地黄水提物为 30 000 mg/kg · BW(折合人体生药剂量为 150 g/d)时,小鼠各特征指标均无明显变化,根据文献报道的药物毒性分级标准,当  $LD_{50} > 15\ 000$  mg/kg 剂量时,即认为该物质属于无毒级<sup>[6]</sup>,本试验中最大剂量组已超过 15 000 mg/kg,所以可认定生地黄水提物属于无毒级别,具有良好的安全性,机体能够长期服用。

神经递质对于睡眠调节至关重要<sup>[7,8]</sup>,可以作为失眠的内源性指标。本实验研究了氨基酸类神经递质和单胺类神经递质及其受体蛋白的 mRNA 表达情况,探索生地黄水提物改善大鼠睡眠的潜在作用机制。GABA 和 Glu 是一类氨基酸类神经递质,其中 GABA 是人和哺乳动物脑中的一种抑制性递质,Glu 是一种兴奋性递质,两种氨基酸类神经递质存在着循环通路,GABA 主要是由 Glu 经谷氨酸脱羧酶催化脱羧获得,Glu 又可以由 GABA 经  $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶催化而成。因此,GABA 与 Glu 的稳态平衡对机体的睡眠至关重要<sup>[9]</sup>。Gao 等<sup>[10]</sup>研究发现酸枣仁-五味子醇水双提物可以显著提高 PCPA 所致失眠大鼠的 GABA 含量,并且降低 Glu 水平及 Glu/GABA 的比例,可以改善 PCPA 所致的失眠大鼠的睡眠情况。Yu 等<sup>[11]</sup>发现五味子醋的镇静催眠及抗焦虑作用与脑组织中 GABA 含量的增加及 Glu 含量的降低有关。本实验中生地黄水提物各组均可以显著提高失眠大鼠下丘脑中 GABA 含量,Glu 含量及 Glu/GABA 比例相比对照组也有所降低。进一步研究发现 GABAA 受体能够与 GABA 特异性结合而在突触间产生抑制作用,其中  $GABA_{A\alpha 1}$  和  $GABA_{A\alpha 2}$  亚型是常见的两种受体亚型。如二氮苄类

药物药物可以与  $GABA_{A\alpha 1}$  受体结合发挥镇静作用,与  $GABA_{A\alpha 2}$  受体结合发挥抗焦虑作用<sup>[12]</sup>。代谢型谷氨酸受体属于 G 蛋白偶联受体,其中 mGluR1 和 mGluR2 能显著影响神经系统的谷氨酸调节紊乱现象<sup>[13]</sup>。病理情况下,谷氨酸在中枢神经系统中可大量积累,导致  $Ca^{2+}$  通道的开放与  $Ca^{2+}$  超载,破坏神经元重要成分,引发失眠的发生<sup>[14]</sup>。通过对给药组中 GABA 和 Glu 相关受体的基因表达水平测定,发现生地黄水提物能够影响 GABAA 受体基因的表达水平,显著上调  $GABA_{A\alpha 1}$  和  $GABA_{A\alpha 2}$  受体 mRNA 表达水平,降低 mGluR1 和 mGluR2 受体 mRNA 表达水平,这一调节效应也将增强对 GABA 神经信号的传递,抑制 Glu 积累导致的中枢神经紊乱,从而诱导大鼠的睡眠的发生。

5-HT、NA 和 DA 是一类单胺类神经递质,其中 5-HT 可以调节中枢神经稳态并参与睡眠过程的发生<sup>[12]</sup>,国际上广泛应用的 PCPA 诱导动物失眠模型就是根据 PCPA 抑制 5-HT 合成的方法使动物出现相应失眠症状。NA 通过促进神经元兴奋达到维持觉醒的目的<sup>[15]</sup>,DA 在睡眠的觉醒中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。本研究中这三种神经递质在生地黄水提物作用于大鼠时下丘脑中相关含量变化如表 4 所示,与模型组相比,其中给药组 NA 含量略有降低,但是不具有统计学意义,可能受多种因素的共同作用,结果有待于进一步分析。5-HT 和 DA 的含量均有变化,特别是生地黄水提物中、高剂量组有显著性变化。由于 5-HT 发挥作用必须与相应受体相结合,在已知的受体中,与抗失眠研究相关性最高的是  $5-HT_{1\alpha}$  和  $5-HT_{2\alpha}$  受体,主要参与睡眠的觉醒活动,其含量多少与他们觉醒周期的长短密切相关<sup>[17]</sup>。本研究发现给药组的下丘脑中  $5-HT_{1\alpha}$  和  $5-HT_{2\alpha}$  受体 mRNA 表达量显著增加,结合 5-HT 含量变化,提示生地黄水提物改善睡眠的途径和 5-HT 的含量增加,使其受体介导的生理作用发生变化相关。由于多巴胺受体 D2 是维持觉醒的重要的受体<sup>[18]</sup>,通过检测给药之后大鼠多巴胺受体 D2 的 mRNA 表达水平显著下降,说明生地黄水提物能够从调节多巴胺及其受体方面改善大鼠睡眠。

炎症因子的调控也能够影响睡眠-觉醒过程的发生。正常睡眠时细胞炎症因子的分泌具有规律性,而睡眠障碍会导致免疫反应的异常。例如长期慢性睡眠限制导致脑内促炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  含量的升高,但是过度的升高也会损害睡眠,

抗炎性细胞因子 IL-10 含量显著降低<sup>[19]</sup>, 而夜间睡眠总时间减少也可导致系统性炎症状态的改变<sup>[20]</sup>。Porkka 等<sup>[21]</sup>也揭示了睡眠节律和免疫活动之间的关系, 睡眠不足会导致与免疫相关的基因表达发生变化, 并增加促炎因子的产生和释放。因此炎症因子的紊乱也是失眠的重要影响因素。本研究中生地黄水提物在改善大鼠睡眠的同时, 细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-10 均发生了变化, 推测生地黄水提物改善睡眠的与细胞炎症因子的调节也密切相关。Sun 等<sup>[22]</sup>研究双夏汤的催眠镇静作用时也发现炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 在失眠大鼠中含量显著降低, 此外 5-HT 及其代谢物 HIAA、受体 5-HT<sub>1A</sub> 和 5-HT<sub>2A</sub> 在失眠大鼠中含量增加, 说明 5-HT 系统和免疫系统参与其中, 并且认为 PCPA 诱导的失眠大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质 (HPA) 轴兴奋, 这可能是由于 5-HT 阻滞剂降低了 5-HT 水平, 导致 TNF- $\alpha$  大量升高, 从而促进 5-HT 的再合成。结合本实验中中枢神经递质含量及受体的变化, 说明生地黄水提物可通过调节神经递质和细胞炎症因子共同改善大鼠睡眠。

综上所述, 本研究在初步判断生地黄水提物能够改善大鼠睡眠和安全性的基础上, 进一步采用 PCPA 失眠大鼠模型探讨了生地黄水提物改善睡眠的作用机制。结果表明生地黄水提物能显著改善失眠大鼠下丘脑中 GABA、5-HT、Glu 和 DA 神经递质的水平和相应受体 mRNA 的表达, 此外细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-10 含量也相应发生变化, 说明生地黄水提物可通过调节神经递质和细胞炎症因子改善大鼠睡眠。关于生地黄水提物中主要成分的生理功能, 以及如何进一步改善睡眠的途径和作用机制需要未来开展更加深入的研究。

#### 参考文献

- Cruz M, Kryger M, Morin CM, et al. Comorbid insomnia and sleep apnea: mechanisms and implications of an underrecognized and misinterpreted sleep disorder [J]. *Sleep Med*, 2021, 84:283-288.
- Zhang LJ, Wang JX, Tu WQ. Comparison of the contents of 5 glycosides and total polysaccharides in *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:566-571.
- Chen JP, Zhang KX, Liu Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52:1772-1784.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:176.
- GB15193.3-2014, Food Safety National Standard Acute Oral toxicity Test (食品安全国家标准急性经口毒性试验) [S]. Beijing: China Standards Press, 2014.
- Shen JZ. Animal Toxicology (动物毒理学) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2002, 83-97.
- Manor R, Kumarnsit E, Samerphob N. Characterization of pharmaco-EEG fingerprint and sleep-wake profiles of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil inhalation and diazepam administration in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276:114193.
- Yan Y, Li Q, Du HZ, 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, 17:551-560.
- Bruni O, Ferinistrambi L, Giacomoni E, et al. Herbal remedies and their possible effect on the gabaergic system and sleep [J]. *Nutrients*, 2021, 13:530.
- Gao JR, Ji WB, Jiang H, et al. Effects of extracts from *Ziziphi Spinosae Semen* and *Schisandrae Chinensis Fructus* on amino acid neurotransmitter in rats with insomnia induced by PCPA [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2013, 36:1635-1639.
- Yu ZP, Gao JQ, Liu C, et al. Sedative, Hypnotic and anxiolytic effect and mechanism of *Schisandrae Chinensis Fructus* vinegar [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2018, 24:139-143.
- Jayakar SS, Zhou X, Chiara DC, et al. Multiple propofol-binding sites in a  $\gamma$ -aminobutyric acid type areceptor (GABAAR) identified using a photoreactive propofol analog [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289:27456-27468.
- Qian F, Tang FR. Metabotropic glutamate receptors and interacting proteins in epileptogenesis [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14:551-562.
- Cattani D, Dlocv L, Rieg CH, et al. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity [J]. *Toxicology*, 2014, 320:34-45.
- Liang Y, Shi W, Xiang AF, et al. The NAergic locus coeruleus-ventrolateral preoptic area neural circuit mediates rapid arousal from sleep [J]. *Curr Biol*, 2021, 31:3729-3742.