

# 松郁安神方对失眠大鼠基底核腺苷受体与多巴胺受体的影响

王秀峰, 张瑜, 曾雪爱, 张一帆, 陈铭奇, 黄俊山\*

福建省中医药科学院, 福建省中医睡眠医学重点实验室, 黄俊山福建省名老中医药专家传承工作室,  
福建 福州  
Email: \*hjsh0825@163.com

收稿日期: 2020年12月15日; 录用日期: 2021年1月6日; 发布日期: 2021年1月15日

## 摘要

目的: 观察中药复方松郁安神方(SYF)对失眠大鼠基底核腺苷受体和多巴胺受体的调节作用。方法: 利用失眠大鼠模型, 造模成功后分别给予SYF高剂量、SYF低剂量和阿普唑仑用药1周。治疗过程中观察实验大鼠的一般情况变化。治疗结束后, 运用Western Blotting实验检测基底核组织腺苷A<sub>2A</sub>R受体和多巴胺受体D2DR蛋白表达水平。结果: 对照组大鼠一般生理状况正常, 模型组大鼠失眠引起的症状明显, SYF高剂量组和低剂量组大鼠失眠引起的症状显著改善。同对照组相比较, 模型组基底核组织中A<sub>2A</sub>R蛋白表达水平被显著下调( $P < 0.01$ ), D2DR蛋白表达水平被显著上调( $P < 0.01$ )。而阿普唑仑组、SYF高剂量组和低剂量组则使得失眠大鼠基底核组织中A<sub>2A</sub>R蛋白表达水平被显著上调( $P < 0.01$ ), D2DR蛋白表达水平被显著下调( $P < 0.01$ )。结论: SYF可以改善实验大鼠因失眠引起的症状, 其机制可能与调控失眠大鼠基底核腺苷受体和多巴胺受体的表达相关。

## 关键词

松郁安神方, 失眠, 腺苷受体, 多巴胺受体

## Effects of Songyu Anshen Prescription on Basal Adenosine Receptor and Dopamine Receptor in Insomnia Rats

Xiufeng Wang, Yu Zhang, Xue'ai Zeng, Yifan Zhang, Mingqi Chen, Junshan Huang\*

\*通讯作者。

文章引用: 王秀峰, 张瑜, 曾雪爱, 张一帆, 陈铭奇, 黄俊山. 松郁安神方对失眠大鼠基底核腺苷受体与多巴胺受体的影响[J]. 中医学, 2021, 10(1): 52-59. DOI: 10.12677/tcm.2021.101006

Inheritance Studio of Fujian Famous Traditional Chinese Medicine Expert HUANG Jun-Shan, Fujian Key Laboratory of Sleep Medicine of Traditional Chinese Medicine, Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou Fujian  
Email: \*hjsh0825@163.com

Received: Dec. 15<sup>th</sup>, 2020; accepted: Jan. 6<sup>th</sup>, 2021; published: Jan. 15<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

**Objective:** To observe the regulatory effects of the traditional Chinese medicine Songyu Anshen prescription (SYF) on basal adenosine and dopamine receptors in insomnia rats. **Methods:** Using the insomnia rat model, SYF high dose, SYF low dose and Alprazolam were administered for 1 week after successful modeling. The general changes of experimental rats were observed during the treatment. After treatment, the protein expression levels of adenosine A<sub>2A</sub>R receptor and dopamine receptor D2DR in basal ganglia were detected by Western Blotting experiment. **Results:** The rats in the control group generally had normal physiological conditions, and the symptoms caused by insomnia in the model group were obvious, while the symptoms caused by insomnia in the SYF high-dose group and the low-dose group were significantly improved. Compared with the control group, the expression level of A<sub>2A</sub>R protein in the basal ganglia of the model group was significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ); the expression level of D2DR was significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ). However, the Alprazolam group, the SYF high dose group and the low dose group significantly up-regulated the expression level of A<sub>2A</sub>R protein in basal ganglia of insomnia rats ( $P < 0.01$ ); the expression level of D2DR was significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** SYF can improve the symptoms caused by insomnia in experimental rats, and its mechanism may be related to the regulation of the expression of basal adenosine receptor and dopamine receptor in insomnia rats.

## Keywords

Songyu Anshen Prescription, Insomnia, Adenosine Receptors, Dopamine Receptor

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

失眠是最常见的睡眠障碍表现之一。失眠患者人数每年都在不断增长,严重影响患者的工作效率和生活质量。目前,失眠的机制还不是很明确,临床缺乏理想的失眠治疗药物。中医药在失眠治疗上有一定的优势,疗效也得到认可。中医学认为失眠多肝郁[1],治疗应以疏肝为主,安神为辅。松郁安神方是黄俊山教授临床治疗失眠的经验方,对肝郁失眠患者的疗效确切。该方治疗失眠的药理机制还不是很明确。课题组近期研究发现,松郁安神方对失眠大鼠前列腺素 D<sub>2</sub> [2]、褪黑素[3]的释放以及海马区 CREB 的基因表达[4]和 5-HT<sub>1A</sub> 受体介导的 cAMP/PKA 信号通路[5] [6]具有调节作用。但是,该方对失眠大鼠基底核腺苷受体和多巴胺受体是否具有调节作用还未知。因此,本研究通过失眠大鼠模型,给予松郁安神方和西药阿普唑仑进行治疗,以失眠大鼠基底核腺苷受体和多巴胺受体途径为药理机制切入点,探讨松郁安神方治疗失眠的药理机制。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体重  $220 \pm 10$  g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(许可证号: SCXK(沪)20017-0005)。饲养于福建省中医药科学院动物实验室, 恒温( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ )和 12:12 固定明暗节律的安静环境下, 自由摄取食物和水[2]。本研究所涉及动物实验过程遵守动物福利, 经我院实验动物福利伦理委员会批准。

### 2.2. 实验药物

松郁安神方(SYF)由甘松 10 g, 郁金 15 g, 玫瑰花 10 g, 酸枣仁 15 g, 生龙骨 30 g (先煎), 珍珠母 30 g (先煎), 夜交藤 30 g, 丹参 15 g 组成[2]。以上中药饮片均购于福州鹭燕医药有限公司。由药剂室一次性煎煮, 分装后 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。阿普唑仑片(批号: 20190417), 购于福建省第二人民医院。

### 2.3. 主要试剂和仪器

抗体 Adenosine  $A_{2A}$ -R (7F6-G5-A2) (Santa Cruz: sc-32261)和 D2DR Antibody (B-10) (Santa Cruz: sc-5303)购于 Santa Cruz 公司。内参 GAPDH (14C10) Rabbit mAb (CST: #2118S); 二抗 Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (CST: #7076S)和 Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (CST: #7074S)购于 CST 公司。对氯苯丙氨酸(PCPA) (货号: C6506-25G)购于 Sigma 公司。酶标仪(美国 BioTek, 800TS)。

### 2.4. 失眠大鼠模型的建立方法

失眠大鼠模型的建立参照文献报道方法[7]: 将 PCPA 溶于弱碱性生理盐水, 配置成 300 mg/kg 混悬液。连续给实验大鼠腹腔注射 PCPA 混悬液 2 天。使用该方法建立失眠大鼠模型, 简单易操作, 目前比较公认。模型成功的实验大鼠出现昼夜节律消失, 白天活动增多, 睡眠减少, 易惊觉, 体重减轻, 毛色欠光泽等整体观察异于正常组的表现。

### 2.5. 实验大鼠的分组、给药及取材

除对照组外, 造模成功后的实验大鼠随机分成以下几组: 模型组、SYF 低剂量组、SYF 高剂量组和西药阿普唑仑组, 每组大鼠 12 只。SYF 低剂量组按 8.5 g/kg 灌胃给药, SYF 高剂量组按 17 g/kg 灌胃给药[5]。阿普唑仑用生理盐水配置成 0.04 mg/kg 混悬液, 灌胃给药。对照组和模型组给予同等体积的生理盐水灌胃。以上各组, 均按 15 mL/kg 体质量灌胃, 1 次/天, 共 1 周。治疗结束后, 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血后, 剪开头皮, 揭去颅骨和硬脑膜, 迅速取出大鼠的整个脑组织。用预冷的生理盐水溶液冲洗干净, 置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存[8]。

### 2.6. 腺苷 $A_{2A}$ R 受体和多巴胺 D2DR 受体蛋白表达水平检测

采用 Western blotting 实验方法进行检测。将大鼠基底核组织剪成细小的碎片, 按 20 mg/200  $\mu\text{L}$  加入 RIPA 裂解液, 经低温超声粉碎后 12,000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行蛋白定量,  $95^{\circ}\text{C}$ 变性。然后, 进行 PAGE 凝胶电泳, 浓缩胶 80 V, 30 min 和分离胶 120 V, 90 min。电泳结束后, 电源 300 mA, 120 min 转膜。转膜后, 使用封闭液室温封闭 PVDF 膜 1 h。弃去封闭液, 加入一抗  $A_{2A}$ R (1:200)、D2DR (1:200) 或 GAPDH (1:1000),  $4^{\circ}\text{C}$ 摇床反应过夜。次日, 经 PBST 洗膜 3 次后加入 HRP 标记的二抗(1:2000)室温孵育 1 h, 洗膜后加入 ECL 显色, 读取图像。实验重复 3 次。应用 Image J 分析软件对图像进行半定量分析 [8]。

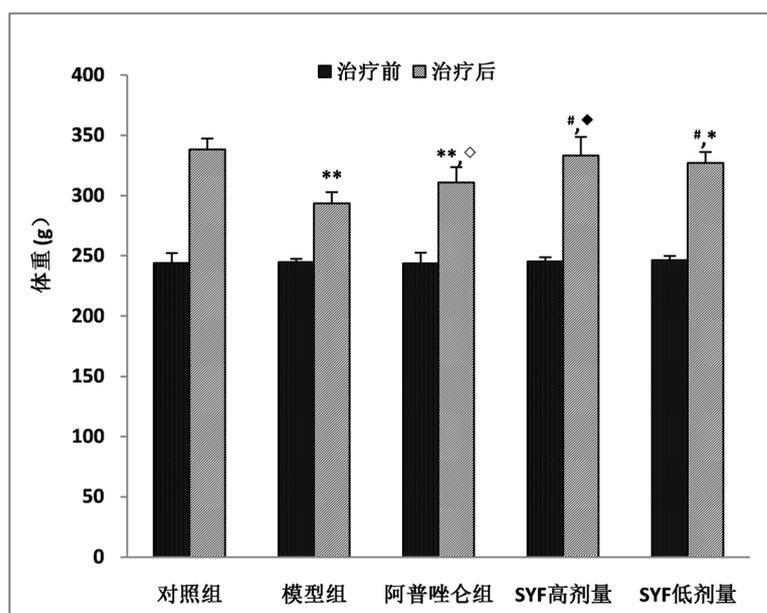
## 2.7. 统计学方法

所有实验数据使用 SPSS20.0 软件进行分析, 多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异存在统计学意义。实验结果用图显示。

## 3. 结果

### 3.1. 实验过程中大鼠的一般状态表现差异

实验过程中对照组的实验大鼠, 睡眠活动正常, 饮食正常, 体重缓慢增加, 毛色有光泽, 其他生理状况正常。在造模和用药期间, 模型组大鼠的饮食减少, 白天和夜间活动比对照组增加, 睡眠减少, 精神状态差, 烦躁, 皮毛颜色欠光泽, 体重增长与对照组比较有显著差异( $P < 0.01$ ) (图 1)。SYF 高剂量和低剂量组大鼠的饮食、睡眠等生理活动与对照组相似, 阿普唑仑组大鼠昼夜活动趋于正常, 毛色欠光泽, 精神状态没有 SYF 治疗组好。与模型组大鼠体重比较, SYF 高剂量和低剂量组均具有显著性差异( $P < 0.01$ ), 阿普唑仑组也具有统计学差异( $P < 0.05$ ) (图 1)。SYF 高剂量同阿普唑仑组大鼠体重比较差异显著( $P < 0.01$ ), SYF 低剂量同阿普唑仑组大鼠体重比较具有统计差异( $P < 0.05$ ) (图 1)。中药复方 SYF 在改善失眠引起的症状上优于西药阿普唑仑。



注: 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, # $P < 0.01$ ,  $\diamond P < 0.05$ ; 与阿普唑仑组比较,  $\blacklozenge P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ 。

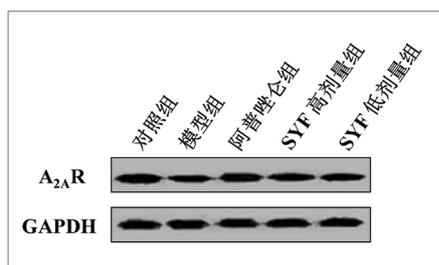
**Figure 1.** Comparison of weight changes of rats in each group before and after treatment

**图 1.** 治疗前后各组大鼠体重变化比较

### 3.2. SYF 对失眠大鼠基底核组织中腺苷 $A_{2A}R$ 表达的影响

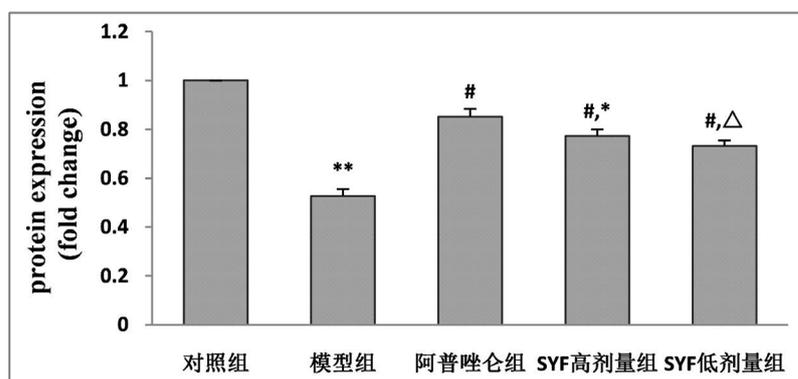
为了进一步验证中药复方 SYF 是否对失眠大鼠基底核腺苷受体的表达水平有影响。我们运用 Western Blotting 实验对各组大鼠基底核组织中腺苷  $A_{2A}R$  的表达进行检测。结果见图 2 和图 3 所示: 失眠大鼠模型组基底核组织中腺苷  $A_{2A}R$  的表达水平相比较正常对照组被显著的下调( $P < 0.01$ )。西药阿普唑仑组、SYF 高剂量组和低剂量组实验大鼠基底核组织中腺苷  $A_{2A}R$  的表达水平与失眠大鼠模型组比较, 均被显

著性的上调( $P < 0.01$ )。SYF 高剂量组同阿普唑仑组比较,腺苷  $A_{2A}R$  的表达水平具有统计学差异( $P < 0.05$ )。SYF 低剂量同阿普唑仑组腺苷  $A_{2A}R$  的表达水平相比较差异显著( $P < 0.01$ )。



**Figure 2.** Effect of SYF on  $A_{2A}R$  protein expression in basal ganglia of rats

**图 2.** SYF 对大鼠基底核组织  $A_{2A}R$  蛋白表达的影响



注: 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, # $P < 0.01$ ; 与阿普唑仑组比较, \* $P < 0.05$ ,  $\Delta P < 0.01$ 。

**Figure 3.** Semi-quantitative analysis of  $A_{2A}R$  protein expression in basal ganglia of rats in each group

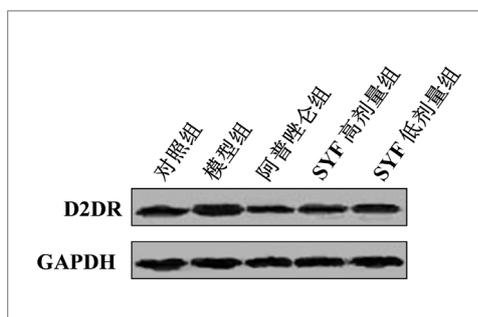
**图 3.** 各组大鼠基底核组织  $A_{2A}R$  蛋白表达半定量分析

### 3.3. SYF 对失眠大鼠基底核组织中多巴胺 D2DR 表达的影响

同时,我们还通过 Western Blotting 实验检测了 SYF 是否对失眠大鼠基底核多巴胺受体也具有调节作用。检测结果如图 4 和图 5 所示: 失眠大鼠模型组基底核组织中的多巴胺 D2DR 表达水平同正常对照组相比被显著上调( $P < 0.01$ )。SYF 高剂量组、低剂量组和阿普唑仑组大鼠基底核组织中多巴胺 D2DR 的表达水平与失眠大鼠模型组比较被显著下调( $P < 0.01$ )。SYF 高剂量组同阿普唑仑组多巴胺 D2DR 的表达水平相比较无统计学差异( $P > 0.05$ ), SYF 低剂量组同阿普唑仑组和 SYF 高剂量组多巴胺 D2DR 的表达水平比较均具有显著性差异( $P < 0.01$ )。

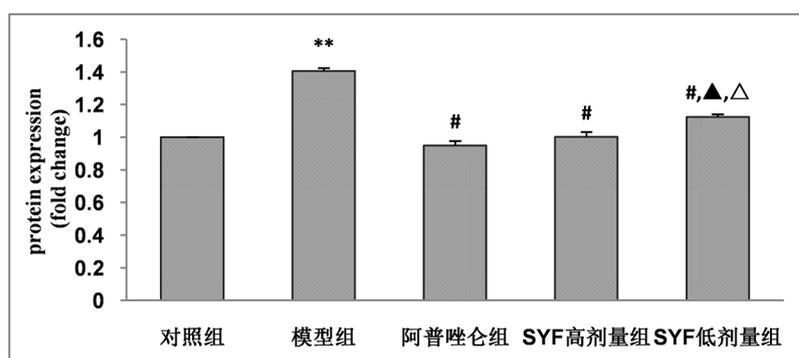
## 4. 讨论

睡眠和觉醒受到复杂的生理机制调控, 该机制目前还没有完全被揭示。偶尔性的失眠会造成第二天疲倦和动作不协调, 经过人体自身的休息调整, 很快会恢复。但如果是长期性的失眠, 会给人带来严重的负面效应[9]。因此, 加深中医药治疗失眠的机制研究, 寻求更有效的方法来防治失眠具有一定的科学意义。本研究通过动物实验也发现了, 中药复方 SYF 在改善由失眠引起的症状上比西药阿普唑仑效果好, 这也就证实了中医药治疗失眠的优势。



**Figure 4.** Effect of SYF on D2DR protein expression in basal ganglia of rats

**图 4.** SYF 对大鼠基底核组织 D2DR 蛋白表达的影响



注: 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, # $P < 0.01$ ; 与阿普唑仑组比较, ▲ $P < 0.01$ ; 与 SYF 高剂量组比较, △ $P < 0.01$ 。

**Figure 5.** Semi-quantitative analysis of D2DR protein expression in basal ganglia of rats in each group

**图 5.** 各组大鼠基底核组织 D2DR 蛋白表达半定量分析

基底核(Basal ganglia, BG)在睡眠与觉醒的转换中起着重要的作用。基底核由纹状体、苍白球、丘脑下核和黑质组成,其中高表达腺苷  $A_{2A}$  受体和多巴胺 D2 受体[10]。腺苷作用于腺苷  $A_{2A}$  受体抑制觉醒,促进睡眠。多巴胺作用于多巴胺 D2 受体抑制睡眠,促进觉醒。两者起着相反的调控睡眠和觉醒的作用。因此,我们借助失眠大鼠模型,以基底核腺苷和多巴胺受体途径为切入点,探讨 SYF 治疗失眠的药理机制。

腺苷是一种主要的内源性促睡眠物质,腺苷及其受体作为镇静催眠的新靶点具有很好的开发前景[11]。腺苷通过不同的腺苷受体发挥特定的作用。研究发现,咖啡因可以阻断伏隔核中腺苷对其  $A_{2A}$  受体的作用,进而引起较强觉醒效应[12]。激活腺苷  $A_{2A}$  受体阳性神经元,可引起 NREM 睡眠时间增加。相反情况下,抑制腺苷  $A_{2A}$  受体阳性神经元活性,使得睡眠时间缩短[13]。还有文献报道,使用腺苷  $A_{2A}$  受体激动剂激活腺苷  $A_{2A}$  受体,可以诱导实验大鼠生理性睡眠[14]。本研究通过实验发现:失眠大鼠基底核腺苷  $A_{2A}R$  的表达水平相比较对照组被显著下调( $P < 0.01$ ),中药复方 SYF 高剂量组和低剂量组均能够显著上调失眠大鼠基底核腺苷  $A_{2A}R$  的表达水平( $P < 0.01$ )。说明 SYF 能够激活失眠大鼠基底核腺苷  $A_{2A}R$  受体,促进睡眠。

多巴胺是典型的促觉醒类神经递质,多巴胺及其受体在失眠的机制研究中也是非常重要的靶点之一。文献报道,多巴胺 D2R 受体在维持觉醒中起重要作用[15]。基因敲除多巴胺 D2 受体的动物觉醒时间明显减少,REM 和 NREM 睡眠时间增加[16]。本研究发现:失眠大鼠基底核多巴胺 D2DR 的表达水平相比

较对照组显著上调( $P < 0.01$ ), 中药复方 SYF 高剂量组和低剂量组均能够显著下调失眠大鼠基底核组织中多巴胺 D2DR 的表达水平( $P < 0.01$ )。说明 SYF 能够抑制失眠大鼠基底核多巴胺 D2DR 受体, 促进睡眠。

本研究利用失眠大鼠模型, 证明了松郁安神方在改善由失眠引起的症状上优于西药阿普唑仑。该方能够通过影响失眠大鼠基底核腺苷 A<sub>2A</sub>R 受体和多巴胺 D2DR 受体的表达水平, 改善其失眠症状, 进而丰富了中医药防治失眠的药理机制。但是, 中药复方成分复杂, 具有多靶点作用。具体有哪些主要成分可以作用于基底核腺苷受体和多巴胺受体系统, 以及更深一步的调控机制还不是很清楚, 这些问题还需要继续探索。

## 5. 结论

综上所述, 松郁安神方能够通过影响失眠大鼠基底核腺苷 A<sub>2A</sub>R 受体和 D2DR 受体的表达, 改善由失眠引起的症状。关于该方是通过什么信号通路调控腺苷 A<sub>2A</sub>R 受体和 D2DR 受体的机制, 以及其主要的药效成分是什么还需要更深入的研究去证实。

## 基金项目

国家自然科学基金项目(81703843)。

## 参考文献

- [1] 张娅, 黄俊山, 曾雪爱, 张一帆. 失眠当重肝郁[J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(2): 61-62.
- [2] 曾雪爱, 周春权, 张一帆, 王秀峰, 张瑜, 黄俊山. 松郁安神方对对氯苯丙氨酸致失眠大鼠血浆中前列腺素 D<sub>2</sub> 的影响[J]. 世界睡眠医学杂志, 2020, 7(1): 9-10.
- [3] 张一帆, 李星, 张瑜, 李璟怡, 王秀峰, 曾雪爱, 张娅, 黄俊山. 松郁安神方对肝郁证失眠大鼠机体褪黑素水平的影响[J]. 世界睡眠医学杂志, 2020, 7(3): 548-551.
- [4] 曾雪爱, 周春权, 王秀峰, 张一帆, 黄俊山. 松郁安神方对异相睡眠剥夺大鼠海马 CREB 表达的影响[J]. 福建中医药, 2018, 49(2): 14-16.
- [5] 李璟怡, 黄俊山, 陈沁, 魏敏, 王海生, 陈铭奇. 松郁安神方对肝郁失眠大鼠行为学及 5-HT<sub>1A</sub> 受体基因表达的影响[J]. 福建中医药, 2019, 50(6): 22-24, 29.
- [6] 李璟怡, 黄俊山, 陈沁, 王秀峰, 张瑜, 张一帆. 松郁安神方对失眠大鼠海马 cAMP/PKA 信号通路的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(3): 212-217.
- [7] 肖成荣, 马增春, 李海静, 谭洪玲, 梁乾德, 王宇光, 陆倍倍, 高月. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 326.
- [8] 王秀峰, 李星, 张瑜, 曾雪爱, 张一帆, 黄俊山. 疏肝安神法防治失眠与多巴胺受体途径的相关性研究[J]. 中医学, 2019, 8(2): 74-80.
- [9] 赵忠新. 临床睡眠障碍学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2003: 26-27.
- [10] 黄志力. 腺苷和多巴胺受体调控睡眠觉醒的作用与机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(9): 737.
- [11] 周娇娇, 陈旭, 王刚. 作用于腺苷受体改善失眠药物的研究进展[J]. 中国医刊, 2019, 54(1): 24-26.
- [12] Lazarus, M., Shen, H.Y., Cherasse, Y., Qu, W.M., Huang, Z.L., Bass, C.E., Winsky-Sommerer, R., Semba, K., Fredholm, B.B., Boison, D., Hayaishi, O., Urade, Y. and Chen, J.F. (2011) Arousal Effect of Caffeine Depends on Adenosine A<sub>2A</sub> Receptors in the Shell of the Nucleus Accumbens. *Journal of Neuroscience*, **31**, 10067-10075. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6730-10.2011>
- [13] Yuan, X.S., Wang, L., Dong, H., Qu, W.M., Yang, S.R., Cherasse, Y., Lazarus, M., Schiffmann, S.N., d'Exaerde, A.D.K., Li, R.X. and Huang, Z.L. (2017) Striatal Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Neurons Control Active-Period Sleep via Parvalbumin Neurons in External Globus Pallidus. *eLife*, **6**, e29055. <https://doi.org/10.7554/eLife.29055>
- [14] 刘炜, 黄志力, 曲卫敏. 腺苷 A<sub>2A</sub> 受体激动剂 CGS21680 模拟前列腺素 D<sub>2</sub> 诱发大鼠生理性睡眠[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(23): 1786-1790.
- [15] 许奇, 曲卫敏, 黄志力. 多巴胺 D<sub>2</sub> 受体调控睡眠 - 觉醒研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(4):

361-366.

- [16] Qu, W.M., Xu, X.H., Yan, M.M., Wang, Y.Q., Urade, Y. and Huang, Z.L. (2010) Essential Role of Dopamine D<sub>2</sub> Receptor in the Maintenance of Wakefulness, but Not in Homeostatic Regulation of Sleep, in Mice. *Journal of Neuroscience*, **30**, 4382-4389. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4936-09.2010>