

# PCPA失眠大鼠大脑皮质中PACAP信号的表达及酸枣仁汤的干预作用

杜敏, 全睿, 王慧\*, 杨婷婷, 李悦

贵州中医药大学, 基础医学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年2月17日; 录用日期: 2023年3月14日; 发布日期: 2023年3月28日

## 摘要

目的: 采用氯苯丙胺(PCPA)制作失眠大鼠模型, 观察其大脑皮质中的垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)、PACAP R1A以及受体后信号蛋白PKC mRNA表达变化情况及酸枣仁汤(SZRD)的干预作用。方法: 64只大鼠分成7天正常组, 7天对照组、7天PCPA组、15天正常组、15天对照组、15天PCPA组、SZRD组、PCPA + SZRD组, 腹腔注射PCPA, 予酸枣仁汤灌胃治疗, 应用RT-PCR测定PACAP、PACAPR1A以及PKC mRNA表达含量的变化。结果: 7天PCPA组、15天PCPA组大鼠大脑皮质中PACAP、PACAPR1A及PKC mRNA的表达量均显著降低( $P < 0.05$ )。SZRD干预治疗后, 三者相对表达量则显著增加。结论: PCPA致失眠的机制可能与PACAP信号表达含量的降低有关, SZRD能够促使PACAP信号表达增加, 从而达到治疗失眠的效果。

## 关键词

失眠, 对氯苯丙胺, 酸枣仁汤, 中垂体腺苷酸环化酶激活肽, 实时荧光定量PCR

# Expression of PACAP Signals in the Cerebral Cortex of PCPA Insomnia Rats and the Interaction Effect of Suanzaoren Decoction

Min Du, Rui Quan, Hui Wang\*, Tingting Yang, Yue Li

School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Feb. 17<sup>th</sup>, 2023; accepted: Mar. 14<sup>th</sup>, 2023; published: Mar. 28<sup>th</sup>, 2023

\*通讯作者。

文章引用: 杜敏, 全睿, 王慧, 杨婷婷, 李悦. PCPA失眠大鼠大脑皮质中PACAP信号的表达及酸枣仁汤的干预作用[J]. 中医学, 2023, 12(3): 568-573. DOI: 10.12677/tcm.2023.123086

## Abstract

**Objective:** The insomnia rat model was established by chloramphetamine acid (PCPA). The changes of PACAP, PACAP R1A and PKC mRNA expression in the cerebral cortex and the intervention effect of SZRD were observed. **Methods:** Sixty-four rats were divided into 7 days normal group, 7 days control group, 7 days PCPA group, 15 days normal group, 15 days control group, 15 days PCPA group, SZRD group and PCPA + SZRD group. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of PACAP, PACAPR1A and PKC. **Results:** The expression of PACAP, PACAPR1A and PKC mRNA in the cerebral cortex of rats in the 7-day PCPA and 15-day PCPA groups were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The relative expressions of PACAP, PACAPR1A and PKC mRNA were significantly increased after the intervention of SZRD. **Conclusions:** The mechanism of PCPA causing insomnia may be related to the decrease of PACAP signal expression, and SZRD can induce the increase of PACAP signal expression, thus achieving the effect of treating insomnia.

## Keywords

Insomni, PCPA, Suanzaoren Decoction, PACAP, RT-qPCR

Copyright © 2023 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

失眠严重危害人类身心健康, 加强失眠的发病机制及治疗研究很有必要[1]。PACAP 作为一种下丘脑促垂体激素, 具有视神经下丘脑束共同传递体的作用。PACAP 及其受体通过  $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、腺苷酸环化酶或磷酸肌醇等作用于中枢与周围组织器官[2] [3] [4], 研究表明 PACAP 通过受体后信号蛋白激酶 C (PKC) 介导的一系列反应抑制多巴胺的分泌[5]; PACAP 还可通过类似于光的方式改变视交叉上核(Suprachiasmatic Nucleus, SCN)的活动节律, 暗示 PACAP 能通过某种途径调节睡眠和觉醒的转换, 参与失眠的机制调控[6]。

酸枣仁汤(Suanzaoren Decoction, SZRD)是传统医学治疗失眠的经典方, 其作用机制可能与激活脑皮质内谷氨酸受体的表达[7]、调控 NG2 细胞的功能、NMDA 受体的表达[8]和中枢神经递体及其受体的表达有关[9]。对氯苯丙胺酸(PCPA)是 5-羟色胺(5-HT)合成抑制剂, 可致睡眠昼夜节律紊乱, 常用来制作大鼠失眠模型[10]。PCPA 抑制 5-HT 导致失眠的机制是否与 PACAP 及其受体后信号有关, 目前未见报道。本研究选用腹腔注射(ip)PCPA 制备大鼠失眠模型, 观察其大脑皮质 PACAP、PACAP 特异性受体(PACAPR1A)及受体后信号 PKC 活动变化, 并使用 SZRD 干预治疗, 进一步探讨失眠的机理, 为临床合理用药提供实验依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验动物

SD 大鼠, 雄性, 体重在  $200 \pm 20$  之间, 购于重庆腾信生物科技有限公司(证书编号: SCXK (Jun) 2012-0012)提供。按照实验伦理委员会要求和规定开展动物实验。选择室温  $20^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$ , 避免强光照射的环境下适应性喂养 1 周。

## 2.2. 试剂与仪器

PCPA (美国 Sigama 公司, C-6506); SZRD 购于贵阳同仁堂药店; Trizol (Life technologies 公司); 分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司); 7500 RT-PCR 仪(美国 ABI 公司); cDNA 反转录试剂盒(Thermo Scientific 公司); ChemiDoc™ XRS + with Image Lab™ Software (BIO-RAD), RT-PCR 引物由上海生工生物技术服务有限公司合成。

## 3. 方法

### 3.1. 药物制备

SZRD 组成药物包括酸枣仁 18 g, 知母 10 g, 茯苓 10 g, 川穹 5 g, 甘草 3 g 组成, 按量称取 10 剂, 加 8 倍纯水浸泡, 60 min 后煎煮, 煮沸 30 min 取滤液, 滤渣再加 6 倍纯水, 再煎煮 20 min 后过滤, 将两次滤液混合浓缩至 15 g/ml 浓度, 4℃冰箱保存备用。

PCPA 悬浮液: 称取 PCPA 粉末, 边加入生理盐水边研磨, 配制成 2.5 mg/ml 浓度的 PCPA 溶液[11], 4℃冰箱保存备用。

### 3.2. 分组、造模与给药

SD 大鼠 64 只, 雄性, 随机分成 8 组, 每组 8 只。分别为 7 天正常组: 不做任何处理; 7 天对照组: ip 生理盐水 7 天; 7 天 PCPA 组: ip PCPA 7 天; 15 天正常组: 不做任何处理; 15 天对照组: ip 生理盐水 7 天, 生理盐水连续灌胃 8 天; 15 天 PCPA 组: ip PCPA 7 天, 生理盐水连续灌胃 8 天; SZRD 组 ip 生理盐水 7 天, SZRD 连续灌胃 8 天; PCPA + SZRD: ip PCPA 7 天, SZRD 连续灌胃 8 天。参照已有研究[1], PCPA 按 0.35 g/kg 的体质量、等体积生理盐水予腹腔注射, SZRD 按 15 g/kg 的体质量、等体积生理盐水予灌胃治疗。

### 3.3. 取材

最后一次给药后, 麻醉, 冰上取出大脑皮质, 分离前额叶, 置于-80℃冰箱保存备用。

### 3.4. 引物的设计

根据 NCBI Genbank 基因数据库, 设计 PCPAP 基因特异性引物, 由上海生工生物技术服务有限公司合成, 见表 1。

**Table 1.** Primer sequences for fluorescence quantitative PCR

**表 1.** 荧光定量 PCR 引物序列

基因名称	引物名称	基因序列(5'-3')	产物长度
GAPDH	GAPDH-F	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252 bp
	GAPDH-R	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
PACAP	PACAP-F	AGCTGTCCGCCAGGAAGTACC	123 bp
	PACAP-R	CTGTGAAGATGCCGTCCGAGTG	
PACAPR1A	PACAPR1A-F	ACTACCTGTCGGTGAAGGCTCTC	91 bp
	PACAPR1A-R	CGGAAGCGGCACAAGATGACC	
PKC	PKC-F	tcc ctg atc cca aaa gtg ag	229 bp
	PKC-R	aac ttg aac cag cca tcc ac	

### 3.5. 总 RNA 的提取, cDNA 的合成和反应条件

Trizol 法提取 RNA, 按照逆转录试剂盒操作, 逆转录 cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。采用两步法, 以 GAPDH 为内参基因, 按照以下反应条件进行 40 个 PCR 循环:  $50^{\circ}\text{C}$  2 min,  $95^{\circ}\text{C}$  2 min,  $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  60 s, 每个基因重复三次。

### 3.6. 统计学分析

采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因相对表达量, 采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行单因素方差分析, 用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  判定差异有统计学意义,  $P < 0.01$  为差异具有显著统计学意义。

## 4. 结果

### 4.1. PCPA 引起大鼠皮质 PACAP mRNA 表达变化及 SZRD 的干预作用

与 7 天对照组相比, 7 天 PCPA 组大鼠皮质 PACAP mRNA 表达量显著降低 (\*\* $P < 0.01$ , 表 2), 15 天 PCPA 组大鼠皮质 PACAP mRNA 表达量下降 (\* $P < 0.05$ , 表 2)。与 15 天 PCPA 组相比, 酸枣仁汤干预后, PCPA + SZRD 组大鼠皮质 PACAP mRNA 表达增加 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

### 4.2. PCPA 引起的大鼠皮质 PACAP R1A mRNA 表达变化及 SZRD 的干预作用

与 7 天对照组相比, 7 天 PCPA 组大鼠皮质 PACAP R1A mRNA 表达量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 15 天 PCPA 组大鼠皮质 PACAP R1A mRNA 表达量也显著降低 ( $P < 0.01$ )。SZRD 组与 15 天对照组相比大鼠皮质 PACAP R1A mRNA 表达量显著降低 (\* $P < 0.05$ )。与 15 天 PCPA 组天相比, 酸枣仁汤干预后, PCPA + SZRD 组大鼠皮质 PACAP R1A mRNA 表达显著增加 ( $^{##}P < 0.01$ ), 见表 2。

### 4.3. PCPA 引起大鼠皮质 PKC mRNA 表达的变化及 SZRD 的干预作用

与 7 天对照组相比, 7 天 PCPA 组大鼠皮质 PKC mRNA 表达量降低 (\* $P < 0.05$ ), 15 天 PCPA 组大鼠皮质 PKC mRNA 表达量显著下降 (\*\* $P < 0.01$ ) 与 15 天 PCPA 组相比, 酸枣仁汤干预后, PCPA + SZRD 组大鼠皮质 PKC mRNA 表达增加 ( $^{#}P < 0.05$ ), 见表 2。

**Table 2.** Expression of PACAP, PACAPR1A and PKC mRNA in cerebral cortex of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

**表 2.** 各组大鼠皮质 PACAP、PACAPR1A 和 PKC mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	PACAP mRNA	PACAPR1A mRNA	PKC mRNA
7 天正常组	1.02 $\pm$ 0.12	0.86 $\pm$ 0.15	1.06 $\pm$ 0.14
7 天对照组	1.00 $\pm$ 0.09	0.86 $\pm$ 0.12	1.11 $\pm$ 0.12
7 天 PCPA 组	0.67 $\pm$ 0.06**	0.35 $\pm$ 0.03**	0.82 $\pm$ 0.09*
15 天正常组	0.87 $\pm$ 0.10	0.87 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.07
15 天对照组	0.95 $\pm$ 0.13	0.80 $\pm$ 0.06	1.11 $\pm$ 0.15
15 天 PCPA 组	0.79 $\pm$ 0.02*	0.22 $\pm$ 0.06**	0.75 $\pm$ 0.13**
PCPA + SZRD 组	1.06 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	0.76 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup>	1.14 $\pm$ 0.09 <sup>#</sup>
SZRD 组	0.77 $\pm$ 0.12	0.39 $\pm$ 0.08*	0.90 $\pm$ 0.09

与 7 天对照组相比, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ; 与 15 天 PCPA 组相比,  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{#}P < 0.05$ 。

## 5. 讨论

失眠的发病机制较为复杂, 脑内 5-HT 含量降低是引发失眠的主要原因, DA 含量降低可减少觉醒次

数, 促进睡眠[12]。PCPA 能抑制 5-HT 的合成, 导致脑内 5-HT 含量降低而引起失眠[13], 本研究发现当脑内 5-HT 含量下降后, PACAP、PACAPR1A 及 PKC mRNA 相对表达量都减少, 受体后信号蛋白 PKC mRNA 表达水平降低。

目前 PACAP 已被证明能够影响神经传递、神经保护、神经调节和免疫抑制等多种生理活动。PACAP 可能通过改变大脑皮层、黑质、纹状体和海马等重要脑区的神经细胞死亡或突触可塑性[14], 参与认知障碍, 而海马突触可塑性是学习记忆形成和巩固的基础, 对睡眠稳态具有调节作用[15]。研究发现 PCPA 致大鼠失眠后, 大脑皮质  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性显著降低, 引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度上升从而刺激大脑星形胶质细胞(Ast)释放 ATP [16], 且脑内 5-HT 含量降低后引起大脑皮层 PACAP 信号系统 mRNA 表达量的改变, 提示 PACAP 信号参与了脑内 5-HT 合成障碍导致胶质细胞和能量代谢改变过程, 前期的实验发现脑内 5-HT 含量下降后大鼠 Ast 被激活, PCPA 诱导失眠后大脑皮质 ATP 水平明显降低, 提示星形胶质细胞上可能存在 PACAP 特异性结合位点, 5-HT 含量的变化可能与 PACAP 共同作用于胶质细胞, 调节胶质细胞的活动, 进而影响皮层的兴奋性。本研究显示 PCPA 失眠大鼠 PACAP mRNA 水平降低, 而 SZRD 干预治疗后其水平显著增高, 暗示 PACAP 与失眠症的发病机制及治疗密切相关。

PACAPR1A 是 PACAP 的特异性受体, 具有 7 个跨膜结构域的 G 蛋白偶联受体。PACAPR1A 在脑内中枢神经系统分布[17], 在皮质和海马体中, PACAPR1A 与腺苷酸环化酶结合的功能表达与 PACAP 的 mRNA 表达密切相关[18]。本结果显示 PCPA 失眠大鼠 PACAPR1A mRNA 表达水平降低, 具有显著性差异, SZRD 干预后其表达水平明显增高, 揭示 PACAPR1A 与睡眠机制及治疗密切相关。

PKC 能够促进神经递质的释放和基因表达, 影响细胞内信号的传导, 还可改变神经细胞神经突触的可塑性, 研究表明失眠患者被治疗后 PKC 的转录水平会显著增高[19], 还有研究发现 PKC 具有抑制 DA 分泌的作用[5]。本研究显示 PCPA 失眠大鼠 PKC mRNA 水平显著降低, 这可能导致 DA 分泌量增多, 促使失眠的发生。而 SZRD 的干预作用能使 PACAP 受体基因表达上调, PACAPR1A 及 PKC mRNA 的表达量也明显升高, 说明 SZRD 可通过调节皮层 PACAP 信号通路活动来调节皮层的兴奋性, 提示 PACAP 信号可能是 SZRD 干预失眠症的一个潜在靶点。

综上所述, 脑内 5-HT 含量下降使大鼠大脑皮质 PACAP、受体 PACAPR1A 以及受体后信号 PKC 基因表达下调, PACAP 与 5-HT 的相互作用可能与星形胶质细胞活动相关, PACAP 信号可能是 SZRD 干预失眠症的一个潜在靶点, 本研究结果为 SZRD 临床运用提供了新的理论依据。

## 基金项目

国家自然科学基金(81760816)。

## 参考文献

- [1] 曹敏玲, 王慧, 史琴, 赵云华. PCPA 失眠大鼠大脑皮质星形胶质细胞 GFAP 和 P2X7 受体表达的变化及酸枣仁汤的干预作用[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(11): 2442-2466.
- [2] Mackenzie, C.J., Lutz, E.M., Johnson, M.S., *et al.* (2001) Mechanisms of Phospholipase C Activation by the Vasoactive Intestinal Polypeptide/Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Type 2 Receptor. *Endocrinology*, **142**, 1209-1217. <https://doi.org/10.1210/endo.142.3.8013>
- [3] See, V., Kech, B. and Loeffler, J.P. (2001) C2-Ceramide and Reactive Oxygen Species Inhibit Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP)-Induced Cyclic-AMP-Dependent Signalling Pathway. *Journal of Neurochemistry*, **76**, 778-788. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00106.x>
- [4] 唐胜球, 董小英, 邹晓庭. 垂体腺苷酸环化酶激活肽的分布及其生物学功能[J]. 生命科学, 2004, 16(2): 109-113.
- [5] 刘继红, 陈智, 尹春萍. 蛋白激酶 C 对大鼠肾上腺嗜铬细胞烟碱受体通道电流的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(12): 1564.

- [6] Zee, P.C. and Manthena, P. (2007) The Brain's Master Circadian Clock: Implications and Opportunities for Therapy of Sleep Disorders. *Sleep Medicine Reviews*, **11**, 59-70. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2006.06.001>
- [7] 左文彪, 臧印竹, 王慧. 酸枣仁汤对 PCPA 致失眠大鼠大脑皮质代谢型谷氨酸受体 mGluR1、mGluR2 的影响[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(3): 4-7.
- [8] 郭海波, 全睿, 滕柳, 等. PCPA 失眠大鼠脑干 NG2 细胞和 NMDA 受体的表达及酸枣仁汤的干预作用[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(3): 15-18.
- [9] 石鹏, 滕柳, 郭海波, 王慧. PCPA 对大鼠大脑皮质 P450scc、CB1R、MAP2 基因表达的影响及酸枣仁汤的干预作用研究[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(2): 14-17.
- [10] 全世建, 林杏娥, 刘妮. PCPA 大鼠失眠模型的证候属性研究[J]. 中医药学刊, 2006, 24(3): 450-451.
- [11] Reddy, D.S. (2010) Neurosteroids: Endogenous Role in the Human Brain and Therapeutic Potentials. *Progress in Brain Research*, **186**, 113-137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7>
- [12] 刘彬, 臧佩林. 保神开郁冲剂影响失眠鼠中枢递质的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2000, 27(2): 92-94.
- [13] 郭小肃. 垂体腺苷酸环化酶激活多肽对慢性低灌注引起的认知障碍的保护作用[D]: [博士学位论文]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [14] 董艳, 韩晞, 唐铁山, 等. 垂体腺苷酸环化酶激活肽减轻谷氨酸引起的大鼠海马神经元细胞内钙离子浓度升高的可能机理[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16(4): 261-264.
- [15] 李悦, 王慧, 姚欣雨, 等. 酸枣仁汤对 PCPA 失眠大鼠学习记忆功能及海马突触可塑性相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 12-20.
- [16] Otto, C., Martin, M. and Wolfer, D.P. (2001) Altered Emotional Behavior in PACAP-Type-I-Receptor-Deficient Mice. *Molecular Brain Research*, **92**, 78-84. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00153-X](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00153-X)
- [17] D'Agata, V., Cavallaro, S., Stivala, F., Travali, S. and Canonico, P.L. (1996) Tissue-Specific and Developmental Expression of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Receptors in Rat Brain. *European Journal of Neuroscience*, **8**, 10-18. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01215.x>
- [18] 史琴, 王慧, 武静, 等. PCPA 失眠后大鼠不同时间大脑皮质钠-钾 ATP 酶和钙-镁 ATP 酶活性变化及酸枣仁汤的干预作用[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1050-1052.
- [19] 马涛, 黄璐, 赵阳, 等. 针灸对肝郁化火型失眠患者 NE 及 PKC, BDNF 表达水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(21): 4071-4074.