

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.04.003

PCPA 失眠大鼠不同时间皮质前额叶 ATP 水平变化及  
酸枣仁汤的干预作用\*武静<sup>1</sup>,王慧<sup>2△</sup>,史琴<sup>3</sup>,藏印竹<sup>4</sup>

(贵阳中医学院:1.解剖教研室;2.功能实验室;3.生理教研室;4.研究生学院 550002)

**[摘要]** 目的 研究氯苯丙氨酸(PCPA)诱导的失眠大鼠前额皮质三磷酸腺苷(ATP)不同时间水平变化情况,探讨酸枣仁汤(SZRD)的干预机制。方法 大鼠分为正常对照组(不做任何操作),SZRD 对照组(第 1、2、3 天腹腔注射蒸馏水,第 4~10 天蒸馏水灌胃),空白对照组,模型组,SZRD 治疗组,5-羟色氨酸(5-HTP)组,5-HTP+SZRD 组。采用连续 3 d 腹腔注射 PCPA 的方法建立大鼠失眠模型,各组在实验的第 4、5、6、8、10 天分别取大鼠前额叶皮质,采用高效液相色谱法(HPLC)检测各组大鼠不同时间前额皮质 ATP 水平。结果 模型组大鼠实验第 4、5、6、8、10 天 ATP 水平显著下降,与空白对照组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ );SZRD 治疗组第 4、5、6、8、10 天 ATP 水平较模型组逐渐升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ , $P<0.01$ );SZRD 对照组前额皮质 ATP 水平与空白对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );空白对照组和正常对照组比较,前额皮质 ATP 水平差异无统计学意义( $P>0.05$ );5-HTP 组与 SZRD 对照组、5-HTP+SZRD 组之间比较差异也无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 SZRD 与 5-HTP 本身对正常大鼠前额皮质 ATP 水平变化无显著影响,SZRD 对前额皮质 ATP 的作用出现在 PCPA 所致失眠后。

**[关键词]** 腺苷三磷酸;芬克洛宁;入睡和睡眠障碍;酸枣仁汤;前额叶皮质**[中图分类号]** R2-031**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)04-0439-03Changes in prefrontal cortex ATP concentration over time after PCPA induced insomnia and  
the intervention effect of Suanzaoren decoction\*Wu Jing<sup>1</sup>, Wang Hui<sup>2△</sup>, Shi Qin<sup>3</sup>, Zang Yingzhu<sup>4</sup>

(1. Department of Anatomy; 2. Functional Laboratory; 3. Department of Physiology; 4. Graduat School, Guiyang College of TCM, Guizhou, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective** The study is intended to examine changes in prefrontal cortex ATP concentrations over time in PCPA induced insomnia rats, and to examine the intervention effects of Suanzaoren decoction. **Methods** SD rats randomly assigned to normal control, control, model, SZRD control, SZRD treatment, 5-HTP, and 5-HTP + SZRD groups. PCPA was injected intraperitoneally over three days to induce the insomnia model. One day after induction, at the fourth, fifth, sixth, eighth, and tenth days after experiment, subjects from each group were examined for prefrontal cortex ATP concentration using the HPLC method. **Results** Prefrontal cortex ATP concentrations in the PCPA Model group at the fourth, fifth, sixth, eighth, and tenth days were declined significantly compared with the Control group ( $P<0.01$ ). Compared with the PCPA Model group, the SZRD treatment group showed significant ( $P<0.05$ ) increase at the fourth, fifth, sixth, and eighth days after assay, and a significant increase ( $P<0.01$ ) on the tenth day. A comparison of the Control group with the Normal control group, and a comparison among the SZRD control group, the 5-HTP, and 5-HTP+SZRD groups showed no significant differences in prefrontal cortex ATP concentrations. **Conclusion** SZRD with 5-HTP itself has no significant effect on normal rats prefrontal cortex ATP levels, SZRD role of the prefrontal cortex appear to the ATP after PCPA caused insomnia.

**[Key words]** adenosine triphosphate; fenclonine; sleep initiation and maintenance disorders; insomnia; prefrontal cortex

酸枣仁汤(cuanzaoren decoction, SZRD)作为治疗失眠症的经典方剂疗效确切,被历代医家推崇。笔者前期的研究表明,PCPA 所致失眠大鼠脑内的神经胶质细胞被激活,SZRD 对激活的神经胶质细胞具有一定的调节作用<sup>[1]</sup>。研究表明,神经胶质细胞能分泌 ATP 等物质调节多种神经功能活动<sup>[2]</sup>,有研究发现睡眠活动与脑内 ATP 的水平有密切关系<sup>[3]</sup>,脑内 ATP 在氯苯丙氨酸(PCPA)失眠大鼠发展过程中是如何变化的,其在失眠的不同时间段表现又如何?是值得研究的问题。本研究以 PCPA 失眠模型大鼠为对象,利用高效液相色谱

(HPLC)法连续检测 PCPA 失眠后第 4、5、6、8 和第 10 天大脑皮质 ATP 动态变化过程,探讨皮质 ATP 在 PCPA 失眠过程中的作用及其变化规律,同时观察 SZRD 的干预作用,以期进一步探讨 SZRD 治疗失眠的作用机制。

**1 材料和方法****1.1 实验材料**

**1.1.1 实验动物** 健康成年清洁级 SD 雄性大鼠 245 只,体质量 200~220 g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,许可证号:[SCXK(渝)2012-000J]。置于安静、温度保持恒定(22±

2)℃、避免强光的环境中饲养 7 d。

**1.1.2 仪器** LC-10AT 高效液相色谱仪、SPD-10A 紫外检测器(日本岛津公司);Milli-pore 0.22 μm 滤膜和过滤器(美国 Milli-pore 公司);AUM220D 电子分析天平(日本 Shimadzu 公司);低温离心机(北京时代北利离心机有限公司)。

**1.1.3 试剂和药物** 磷酸二氢钾、氢氧化钠、高氯酸、丙二醇均为市售分析纯,购自武汉华创化工有限公司;PCPA(批号 1001685258)、5-羟色氨酸(5-HTP,批号 101399644)购自 Sigma 公司。酸枣仁、川芎、知母、茯苓、甘草均购自贵阳中医学院第一附属医院中药房。

## 1.2 方法

**1.2.1 药物制备** SZRD:由酸枣仁 18 g,知母 10 g,茯苓 10 g,川芎 5 g,甘草 3 g 组成,称取以上 5 味药材 10 付,共计 460 g,加 10 倍量水,浸泡 1 h 后煎煮,煮沸后 30 min 滤过,药渣加 5 倍量水煎煮,煮沸后 20 min 滤过,合并滤液,浓缩成 150% 的水提物,分装灭菌,4℃冰箱储存备用。

**1.2.2 动物分组与模型制备** SD 成年大鼠 245 只,分为以下 7 个大组(每个大组 35 只大鼠,每个大组又在实验的第 4、5、6、8、10 天各分为一个亚组,共 5 个亚组,每个亚组 7 只大鼠):空白对照组、模型组、SZRD 治疗组、5-HTP 组、5-HTP+SZRD 组、SZRD 对照组、正常对照组。根据以往的实验方法并结合预实验结果,制作 PCPA 失眠模型大鼠,具体方法为:按 350 mg/kg 以 10 mL/kg 体积腹腔注射 PCPA,于每天上午 8:00~9:00 进行,每天 1 次,持续 3 d。

**1.2.3 给药方法** 空白对照组第 1、2、3 天腹腔注射蒸馏水,第 4~10 天蒸馏水灌胃;模型组第 1、2、3 天腹腔注射 PCPA (350 mg/kg),第 4~10 天蒸馏水灌胃;5-HTP 组第 1、2、3 天腹腔注射 5-HTP(25 g/kg),第 4~10 天蒸馏水灌胃;SZRD 治疗组第 1、2、3 天腹腔注射 PCPA,第 4~10 天 SZRD(浓度为 15 g/kg,即含生药 1.5 g/mL)灌胃;5-HTP+SZRD 组第 1、2、3 天腹腔注 5-HTP(25 g/kg),第 4~10 天 SZRD(10 mL/kg)灌胃;SZRD 对照组第 1、2、3 天腹腔注射蒸馏水,第 4~10 天 SZRD 灌胃;正常对照组不进行任何操作。

**1.2.4 取材** 各组在进行实验的第 4、5、6、8、10 天分别取材,取材方法如下:末次给药后 2 h,40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后处死大鼠,冰上快速取出大鼠脑组织,去掉嗅球、小脑及低位脑干,取大脑皮质放入液氮,移至-80℃保存备用。

## 1.3 PCPA 失眠后不同时间前额叶皮质 ATP 水平检测方法

**1.3.1 ATP 标准储备液的配制** 精密称取 ATP 标准对照品

10.00 mg,置于 10 mL 棕色容量瓶中,加超纯水至刻度,摇匀,即得 1.00 mg/mL 的 ATP 标准液,置于 4℃冰箱避光保存。

**1.3.2 HPLC 法检测 PCPA 给药后不同时间前额叶皮质 ATP 水平** (1)色谱条件:色谱柱,Phenomenex C18(4.6×150 mm,5 μm);流动相比比例号甲醇-磷酸盐缓冲液=2:98(V/V);流速 0.8 mL/min;柱温 25℃;检测波长 254 nm。(2)样品前处理:精密称取大鼠前额叶皮质组织 0.1 g 加入 0.4 mol/L 高氯酸 1.0 mL,冰上研磨 1 min,低温高速离心 10 min(4℃,11 200 r/min),取上清液过 0.22 μm 滤膜即成测定样品。(3)定性分析:将 ATP 标准液在色谱仪上以 20 μL 进样作色谱分析。在标准液的定性分析中,根据保留时间及紫外谱图判定该物质。ATP 标准品的保留时间是 4.598 min。(4)标准曲线的制备:在选定的色谱条件下,按外标定量法,配制 ATP 质量浓度分别为:0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL,取 20 μL,依次进样,以 ATP 的峰面积为纵坐标,质量浓度(C,μg/mL)为横坐标进行线性回归,得标准曲线方程为  $Y=1E+06X+98548(R^2=0.9987)$ 。(5)样品水平测定:依前法检测各组标本。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS21.0 软件进行统计分析,计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 模型制备结果** 模型组大鼠腹腔注射 PCPA 3 d 造成失眠后,第 4 天 ATP 水平下降,在 PCPA 失眠第 5、6、8、10 天 ATP 水平均处于较低水平,与空白对照组相比差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见表 1。

**2.2 SZRD 对失眠大鼠前额叶皮质 ATP 水平的影响。**

**2.2.1 SZRD 治疗组与模型组比较** SZRD 治疗组 PCPA 失眠第 4 天 ATP 水平较低,但在 PCPA 失眠第 5、6、8、10 天 ATP 水平逐渐上升,与模型组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),见表 1。

**2.2.2 SZRD 对照组与空白对照组比较** 从实验第 4~10 天前额叶皮质 ATP 水平变化差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示 SZRD 本身不能引起大脑皮质 ATP 水平变化。

**2.2.3 正常对照组与空白对照组比较** 从实验第 4~10 天前额叶皮质 ATP 水平变化差异无统计学意义( $P>0.05$ ),表明腹腔注射与灌胃等手术操作对大脑皮质前额叶皮质 ATP 水平变化无明显影响。

表 1 各组大鼠不同时间前额皮质 ATP 水平( $\bar{x}\pm s$ ,μg/L, $n=7$ )

组别	实验第 4 天	实验第 5 天	实验第 6 天	实验第 8 天	实验第 10 天
空白对照组	23.11±1.25	23.33±1.26	23.34±1.20	23.40±1.10	23.45±1.23
模型组	7.77±1.32 <sup>a</sup>	7.73±1.20 <sup>a</sup>	7.40±0.30 <sup>a</sup>	7.66±0.40 <sup>a</sup>	7.78±0.65 <sup>a</sup>
SZRD 治疗组	7.79±0.79	10.68±1.12 <sup>b</sup>	18.51±1.27 <sup>c</sup>	23.66±0.77 <sup>c</sup>	23.09±0.29 <sup>c</sup>
正常对照组	23.31±0.10	23.67±0.38	23.79±0.60	23.65±0.42	23.74±0.19
5-HTP 组	23.77±0.46 <sup>c</sup>	23.28±0.27 <sup>c</sup>	23.11±0.10 <sup>c</sup>	23.28±0.70 <sup>c</sup>	23.58±0.68 <sup>c</sup>
5-HTP+SZRD 组	23.19±0.24 <sup>c</sup>	23.62±0.65 <sup>c</sup>	23.38±0.42 <sup>c</sup>	23.06±0.50 <sup>c</sup>	23.32±1.39 <sup>c</sup>
SZRD 对照组	23.09±0.09 <sup>c</sup>	23.07±0.69 <sup>c</sup>	23.91±0.19 <sup>c</sup>	23.56±0.42 <sup>c</sup>	23.92±0.57 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与空白对照组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,与模型组比较。

### 3 讨 论

ATP 是体内的能量货币单位,能够维持脑细胞正常的生理功能<sup>[4]</sup>。近年来,ATP 被认为是一种神经递质<sup>[5]</sup>,能调节兴奋性和抑制性的神经信息传递,它可作为神经递质调节神经元之间和神经元-神经胶质细胞之间信号传递<sup>[6]</sup>。研究发现,大鼠 ATP 含量在基底前脑、皮质扣带回及额叶觉醒时保持相对稳定,但在睡眠开始的几个小时内 ATP 的量大量上升,与心电图(EEG)的慢波形成对应关系,表明睡眠活动与脑内 ATP 水平有密切关系<sup>[7]</sup>。

PCPA 失眠模型是通过 PCPA 阻断脑内 5-HT 的合成,造成动物失眠,是目前国内外较为公认的失眠模型<sup>[8-9]</sup>。PCPA (350 mg/kg)连续 3 d 对大鼠进行腹腔注射,大鼠逐渐饮水增多、饮食增加、明显活跃,对外界刺激较敏感,睡眠昼夜节律消失,提示复制失眠大鼠成功。

本研究结果表明,PCPA 能导致大鼠前额皮质 ATP 水平下降,从失眠第 4 天至第 10 天 ATP 水平仍处于低水平。SZRD 治疗组前额皮质 ATP 从失眠第 5 天开始至第 10 天水平增加,表明 SZRD 能增加 PCPA 失眠大鼠前额皮质的 ATP 水平。

有研究表明 PCPA 能够影响脑内前额皮质神经元功能,PCPA 失眠 3 d 后线粒体开始肿胀,逐渐空泡化<sup>[10]</sup>。本课题组前期研究结果表明 PCPA 失眠大鼠大脑皮质中 ATP 酶活性发生变化<sup>[11]</sup>,导致细胞内、外离子分布失衡,进而影响神经细胞兴奋性变化。胡晓辉等<sup>[12]</sup>也证实 PCPA 失眠大鼠中缝背核 galanin 神经元发生变化,影响脑内的能量代谢过程。

本研究前期的实验发现 SZRD 可作用于 PCPA 失眠大鼠脑内的星形胶质细胞和小胶质细胞<sup>[1]</sup>,目前已知脑内的星形胶质细胞能释放 ATP 作为胶质递质,星形胶质细胞通过胞内钙离子依赖释放 ATP<sup>[13]</sup>,影响神经元的生物学活动<sup>[14]</sup>。结合前期实验结果,本研究推测 SZRD 可能作用于神经胶质细胞,通过影响神经胶质细胞的功能而改变脑内 ATP 的水平。本研究还发现,SZRD 不改变正常大鼠前额皮质的 ATP 水平,在未失眠大鼠,SZRD 与 5-HTP 也无协同作用,灌胃与腹腔注射及手术操作也未显著影响前额皮质 ATP 水平,5-HTP 组、5-HTP + SZRD 组及 SZRD 对照组从实验第 4~10 天,前额叶皮质 ATP 水平与模型组相比处于较高水平,进一步证明 PCPA 失眠能导致前额叶皮质 ATP 水平下降。本研究提示,SZRD 对大脑皮质 ATP 的作用只发生在 PCPA 所致失眠后,其具体机制还有待进一步阐明。

SZRD 是《金匱要略》中治疗失眠的经典方剂,疗效确切,至今临床仍广泛应用,SZRD 对前额皮质 ATP 作用可能是其发挥治疗睡眠障碍的环节之一,本实验为 SZRD 治疗失眠的机制研究提供了实验依据。

### 参考文献

[1] 王慧,罗坤,武静. 酸枣仁汤对失眠大鼠中脑中缝背核神

经胶质细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,21(21):235-239.

[2] Dworak M, Mccarley RW, Kim T, et al. Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep[J]. J Neurosci, 2010,30(26):9007-9016.

[3] 朱国庆,恽慧秀,王敏,等. 侧脑室注射 cAMP 和 ATP 对大鼠睡眠的影响[J]. 安徽医科大学学报,1993,82(3):171-172.

[4] Jerome YY, Robert MB, Robert CV. Cerebral energy metabolism during hypoxic ischemia and early recovery in immature rats[J]. Am J Physiol, 1992,65(2):672-677.

[5] Burnstock G. Purinergic co-transmission[J]. Exp Physiol, 2009,94(1):20-24.

[6] Burnstock G, Krügel U, Abbracchio MP, et al. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function[J]. Prog Neurobiol, 2011,95(2):229-274.

[7] Chikahisa S, Séi H. The role of ATP in sleep regulation [J]Front Neurol, 2011,2(2):1-5.

[8] 何华香,赵仓焕,陆雪,等. 中医中药对 PCPA 致失眠大鼠脾脏 HPA 轴相关单胺类神经递质及激素影响的研究进展[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2015,36(2):155-159.

[9] 许晓伍,陈群,马春媚,等. PCPA 致大鼠失眠后不同时间点神经元线粒体形态和功能的变化[J]. 解剖学研究, 2014,36(1):34-38.

[10] 许晓伍. 基于线粒体途径探讨安寐汤抑制失眠大鼠皮质神经元兴奋机制[D]. 广州:广州中医药大学,2013.

[11] 史琴,王慧,武静. 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,2016,26(5):1050-1052.

[12] 胡晓辉,李柱一. PCPA 致失眠模型大鼠中缝背核 galanin 阳性神经元的表达与 5-HT 关系的研究[D]. 北京:中国人民解放军第四军医大学,2010.

[13] 杨俊华. 星形胶质细胞来源的 ATP 促进丘脑中的突触删除[D]. 杭州:浙江大学,2015.

[14] Lalo U, Palygin O, Rasooli-Nejad S, et al. Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex [J]. PLoS Biol, 2014, 12(4): e1001857.

(收稿日期:2016-09-10 修回日期:2016-10-18)