

人参皂甙调节大鼠自发睡眠脑电结构的机制

洪芬芳^{1,2}, 王 新³, 杨树龙^{1*}, 张大雷¹, 杨 蓓¹, 吴 磊¹

(南昌大学 1. 基础医学院 生理教研室; 2 医学实验教学部, 江西 南昌 330006; 3. 南昌市西湖区疾控中心, 江西 南昌 330003)

摘要:目的 初步探索人参皂甙(GS)调节自发睡眠的作用机制。方法 大鼠随机分为对照、GS低和高(10和100 mg/kg)剂量组。在大鼠体内植入无线发射器,术后每日1次灌胃给药,共6 d。第1(急性)和6天(慢性)给药后记录自由活动大鼠脑电活动12 h。于第1和6天取下丘脑组织用免疫印迹方法检测 GABA_Aergic 系统蛋白表达。**结果** GS灌胃给药第1天,高剂量 GS显著增加非快动眼睡眠(NREM) [(8.002 ± 0.427)h vs (6.363 ± 0.542)h, $P < 0.05$]和总睡眠时间[(9.397 ± 0.313)h vs (7.548 ± 0.562)h, $P < 0.01$],减少觉醒[(2.463 ± 0.288)h vs (4.376 ± 0.572)h, $P < 0.01$]; GS低和高剂量都增强了下丘脑 GABA_A受体 α 、 β 亚型表达($P < 0.05$)。第6天,低、高剂量 GS均显著提高 NREM 睡眠[(7.587 ± 0.174)h, (7.610 ± 0.204)h vs (6.799 ± 0.302)h, $P < 0.05$]和总睡眠时间[(8.974 ± 0.191)h, (8.967 ± 0.249)h vs (8.008 ± 0.359)h, $P < 0.05$],减少觉醒[(3.130 ± 0.211)h, (3.294 ± 0.330)h vs (3.984 ± 0.389)h, $P < 0.05$];高剂量 GS显著增强下丘脑 GAD 蛋白表达水平($P < 0.05$)。结论 GS能时间和剂量依赖性地调节大鼠自发睡眠结构,其急性作用可能与下丘脑增加的 GABA_A受体 α 、 β 亚型蛋白表达有关,而慢性作用可能涉及经由上调 GAD 表达水平增加 GABA 产量。

关键词: 人参皂甙; 快动眼睡眠; 非快动眼睡眠; 脑电图; GABA_A受体

中图分类号: R 338.63 文献标志码: A

Mechanisms underlie ginsenosides regulating spontaneous sleep architecture in rats

HONG Fen-fang^{1,2}, WANG Xin³, YANG Shu-long^{1*}, ZHANG Da-lei¹, YANG Bei¹, WU Lei¹

(1. Dept. of Physiology of Basic Medical College; 2. Dept. of Experimental Teaching, Nanchang University, Nanchang 330006; 3. Disease Control Centers of Xihu District, Nanchang 330003, China)

Abstract: **Objective** To study the underling mechanism of the effect of ginsenosides(GS) on spontaneous sleep. **Methods** Adult SD rats were randomly divided into the control, GS 10 mg/kg (low dose) and 100 mg/kg (high dose) groups. Rats were instrumented with sleep-wake recording electrodes. After recovery from surgical operation, rats were orally administered GS 10 mg/kg and 100 mg/kg or water once per day for 6 days. On GS administration day 1 and day 6, Polygraphic signs of undisturbed sleep-wake activities were recorded for 12 h (07:30 ~ 19:30) after GS administration. **Results** On GS administration day 1 (acute), 10 mg/kg GS slightly ($P > 0.05$) but 100 mg/kg GS significantly ($P < 0.05$) increased the non-rapid eye movement (NREM) and total sleep and decreased wakefulness; compared with control, both low and high dose GS failed to change the level of glutamic acid

收稿日期: 2010-12-27 修回日期: 2011-04-08

基金项目: 江西省教育厅科研基金(2008GJJ09038); 南昌大学引进博士科研启动基金(300304)

*通信作者(corresponding author): slyang@ncu.edu.cn

decarboxylase (GAD) ($P > 0.05$) but enhanced the expressions of GABA_A receptor α , β not γ subunits in rat hypothalamus ($P < 0.05$). Following 6 days administration (chronic), both 10 and 100 mg/kg GS increased markedly NREM and total sleep and decreased wakefulness. Accordingly, low dose GS slightly ($P > 0.05$) but high dose GS significantly ($P < 0.05$) increased the level of GAD in rat hypothalamus, whereas the expressions of GABA_A receptor α , β and γ subunits were not affected ($P > 0.05$). **Conclusions** These primary results suggest that GS can regulate spontaneous sleep architecture in time and dose-dependent manner in which acute GS treatment is related to its up-regulating GABA_A receptor α , β subtypes whereas chronic GS administration involved in the raised GABA product produced by its over-expressing GAD in rat hypothalamus.

Key words: ginsenosides; rapid eye movement sleep; non rapid eye movement sleep; electroencephalogram; GABA_A receptor

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)被东方各国广泛应用于治疗临床疾病、保护新生神经细胞和改善身心健康^[1-2]。人参根皂苷(100 mg/kg)可改善电惊厥所致小鼠戊巴比妥钠诱发的睡眠^[3]。相反,中药制剂醒神胶囊(茶叶、人参等)可延长戊巴比妥钠催眠潜伏时间、缩短其睡眠时间^[4]。因此有必要进一步评估人参调节睡眠结构的作用及其机制。研究证明基底前脑和视前区的一些神经元睡眠时比觉醒时放电率更高, γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric Acid, GABA)是这些神经元主要抑制性神经递质^[5]。而来自基底前脑和视前区的GABA能神经元也投射到下丘脑后外侧^[6]。目前人参对睡眠的影响与GABA_Aergic系统之间的关系鲜有报道^[7],有关机制尚未完全清楚。本文对下丘脑内GABA_Aergic系统在人参调节睡眠觉醒中的作用机制进行了初步探索。

1 材料与方法

1.1 试剂

人参皂甙(Ginsenosides, GS)(韩国国立忠北大学药理毒理研究室吴教授惠赐),为人参根皂苷粉剂,GS含量为95%以上。兔抗GABA_A $\alpha 1$ 受体、兔抗GABA_A $\beta 1$ 多克隆抗体、山羊抗GABA_A受体 $\gamma 3$ 多克隆抗体和抗谷氨酸脱羧酶(*glutamic acid decarboxylase*, GAD)抗体,以及羊抗兔IgG、驴抗山羊IgG抗体(Santa Cruz Biotechnology公司)。

1.2 动物和手术

清洁级SD大鼠体质量250~350 g,36只,雌雄各半[南昌大学医学实验动物中心,编号:SCXK(赣)2008-0001]。单独饲养,活动不受限制,自由摄食饮水。所有大鼠均置于12 h/12 h明暗(光照

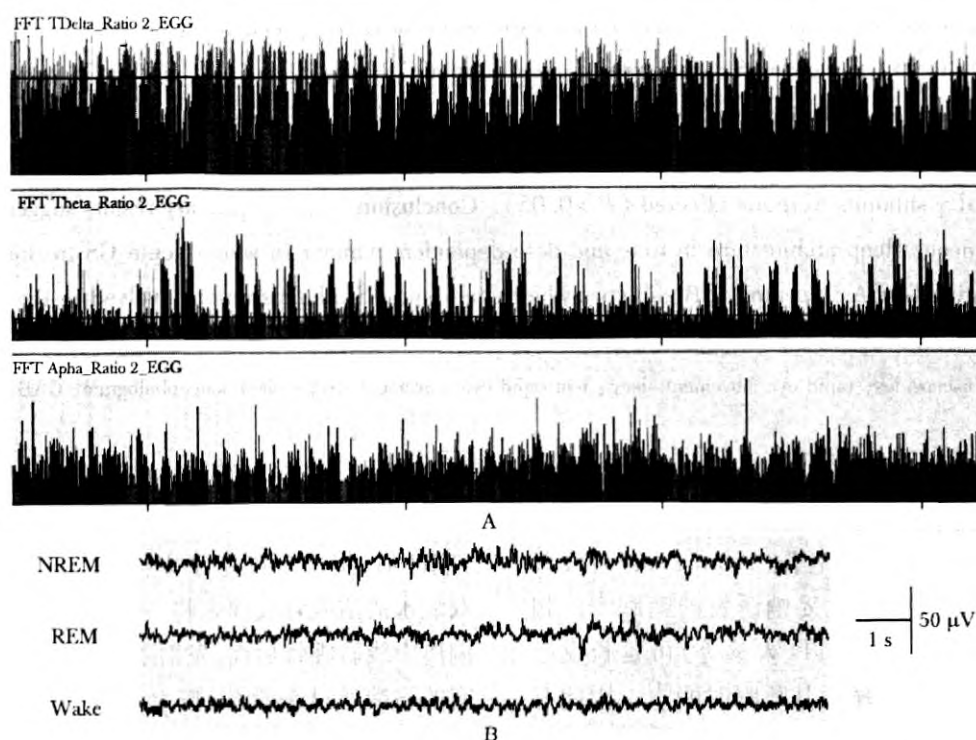
07:00~19:00)通风环境中,室温(22 ± 2)℃。经过3 d驯化期,给大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,将头部固定于立体定位仪上,暴露颅骨,双氧水清洁颅骨表面。将一个无线发射器植入皮下偏离中线肩胛骨后面,发射器导联经皮下走行,其裸露的终端通过头骨孔,按Paxinos和Watson大鼠立体定位图谱安放在硬脑膜接触处(A:2.0[前囟], L:1.5; P:7.0[前囟], L:1.5对侧),该电极以牙科水泥固定于颅骨上。如文献[8]所述,发射器通过遥感勘测记录脑电活动。

1.3 实验分组和GS给药

按随机方法将大鼠分为对照组、GS低剂量(10 mg/kg)和高剂量(100 mg/kg),每组12只(其中8只用于脑电EEG记录,4只用于免疫印迹分析)。手术恢复1周后,以蒸馏水稀释GS成适当浓度,灌胃给药,每日1次,连续6日,对照组以同样方式给予等量蒸馏水。

1.4 数据采集

在给药第1天(急性)和第6天(慢性)分别记录自由活动大鼠睡眠觉醒脑电活动12 h。皮质脑电遥测和活动记录按照以前报道方法^[8]。脑波信号检测时,信号发射机增益定为 $-0.5/+0.5$ 伏特/单位 $\times 2$,从发射器产生的原始信号频率范围为0.5~20.0 Hz。这些信号由数据科学模拟转换器进行处理并传递给连接在计算机上的一个AD转换器。AD转换器在128 Hz将脑电活动信号数字化,数字化的数据再传输到电脑以图像的形式显示出来。经Hanning窗处理后,一种在线快速傅立叶变换(Fourier transformation, FFT)以每2 s内256个样本完成对脑电数据加工(图1A)。该FFT以0.5 Hz分辨率分析产生的功率密度值从0.0到20.0 Hz。FFT数



A. FFT δ , θ and α wave; B. the representative EEG patterns of NREM, REM sleep and Wakefulness

图1 SleepSign 软件分析 FFT δ 、 θ 和 α 波及大鼠 REM、NREM 和觉醒状态脑电特征记录图

Fig 1 FFT of δ , θ and α wave by SleepSign software analysis and a representative EEG patterns of NREM, REM sleep and Wakefulness stages

据每10 s为单位在0~20 Hz范围进一步平均。每10 s睡眠数据和FFT结果保存到计算机硬盘以备进一步离线分析。与遥测接收器有关的动物运动产生晶体管逻辑脉冲,可以收集来计数动物活动。

1.5 行为状态分析

使用睡眠分析软件SleepSign 2.1,从10 s作为时间参考标准的特定瞬时的数字化数据中,分析测定觉醒、非快速眼睡眠(non rapid eye movement, NREM)和快速眼睡眠(rapid eye movement, REM)睡眠状态下各自所用的时间量。简单来说,该软件将觉醒识别为高频低幅脑电图;NREM睡眠是基于脑电慢波内散布梭形波来计分的(图1B)。REM睡眠脑电功率是低频 δ 波(0.75~4.0 Hz)明显减少, θ 波(活动范围5.0~9.0 Hz,峰值在7.5 Hz)则增加。先对NREM、REM和总睡眠(NREM+REM)状态所用的时间和睡眠觉醒周期进行处理,以获得每只大鼠12 h总量。再进一步计算觉醒、NREM和REM睡眠状态各自所占用的时间。

1.6 膜蛋白制备和免疫印迹

GS给药第1天(急性)和第6天(慢性),将动

物深麻醉后(由乙醚诱导)断头处死,大脑很快被转移到冰冷的盐水中,速取下丘脑组织进行干冰冷冻并储存在-80℃冰箱中。应用时取冰冻组织样品加入PREPTM蛋白提取液(INTRON Biotechnology, Inc.)匀浆,并在4℃15 000×g离心20 min,回收上清液。采用牛血清白蛋白作为对照测定总蛋白含量用于免疫印迹分析。12%聚丙烯酰胺用于凝胶电泳(SDS/page),将40 μg膜蛋白上样在各泳道。使用半干转移系统将电泳分离的蛋白质转移到PVDF膜(Amersham Hybond-P, GE Healthcare, U.K.)上,用增强的BM化学发光试剂盒进行检测(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)。受体检测应用一抗有:兔抗GABA α 1受体(1:1 000稀释于含0.5% Tween20的PBS)兔抗GABA β 1多克隆抗体(1:1 000),山羊抗GABA γ 3多克隆抗体(1:1 000),和抗GAD抗体(1:1 000),辣根过氧化物酶二抗:羊抗兔IgG(1:5 000稀释),驴抗山羊IgG抗体(1:3 000)。经过洗涤剥离后,膜再与兔抗GAPDH一抗(1:1 000)和羊抗兔IgG二抗检测以确认各泳道蛋白质相等。检测到的蛋白条带用吸光度

扫描进行定量分析,以目的蛋白/内参照吸光度比值 $\bar{x} \pm s$ 表示。

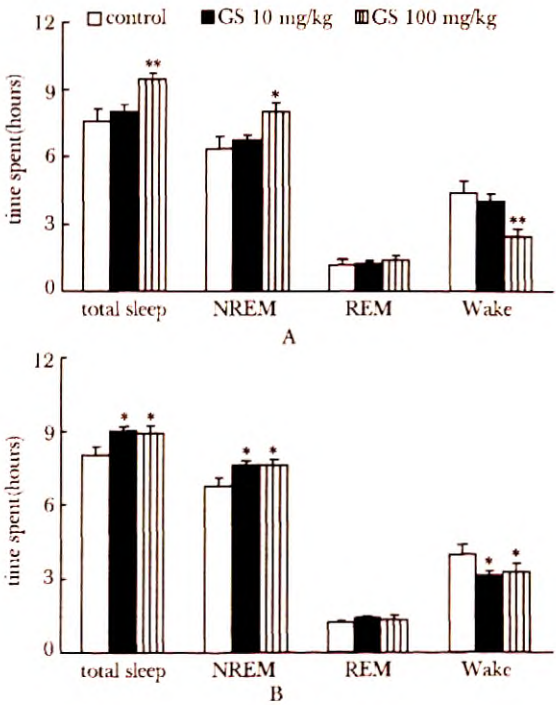
1.7 统计学分析

所有数据值以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 17.0 软件分析。单因素方差分析差异显著性后,进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 GS 对睡眠结构的影响

GS 灌胃给药第 1 天,高剂量 GS 显著增加 NREM 睡眠 ($P < 0.05$) 和总睡眠时间 ($P < 0.01$),减少觉醒 ($P < 0.01$) (图 2A)。连续 6 d 给药后,低、高剂量 GS 均显著提高 NREM 睡眠 ($P < 0.05$) 和总睡眠时间 ($P < 0.05$),减少觉醒 ($P < 0.05$) (图 2B)。



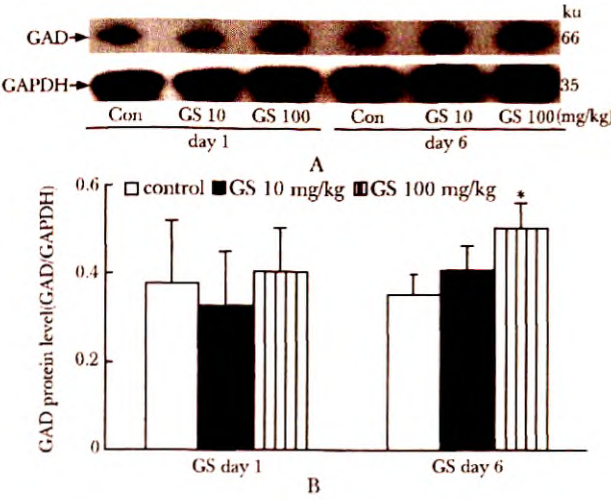
A. the effects of acute GS treatment on sleep architecture; B. the effects of chronic GS treatment on sleep architecture; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control

图 2 急性和慢性 GS 灌胃给药对大鼠睡眠结构的影响
Fig 2 Effects of acute and chronic Ginsenosides (GS) administration on sleep architecture in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

2.2 GS 急性、慢性给药对下丘脑 GAD 蛋白表达的影响

与对照组相比,连续给药后第 6 天,高剂量 GS

显著增强下丘脑 GAD 蛋白表达水平 ($P < 0.05$) (图 3,表 1)。



A. the bands of GAD with Western blotting method; B. densitometric analysis of autoradiogram showing the intensity of the band of GAD; * $P < 0.05$ compared with control

图 3 GS 急性、亚急性给药对大鼠下丘脑 GAD 蛋白表达的影响
Fig 3 Expressions of GAD in rat hypothalamus during acute and chronic GS administration ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

表 1 GS 急性、亚急性给药对大鼠下丘脑 GAD 蛋白表达的影响
Table 1 Expressions of GAD in rat hypothalamus during acute and chronic GS administration ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

group	GS day 1	GS day 6
control	0.376 \pm 0.141	0.352 \pm 0.045
GS 10 mg/kg	0.327 \pm 0.119	0.407 \pm 0.055
GS 100 mg/kg	0.404 \pm 0.101	0.503 \pm 0.054 *

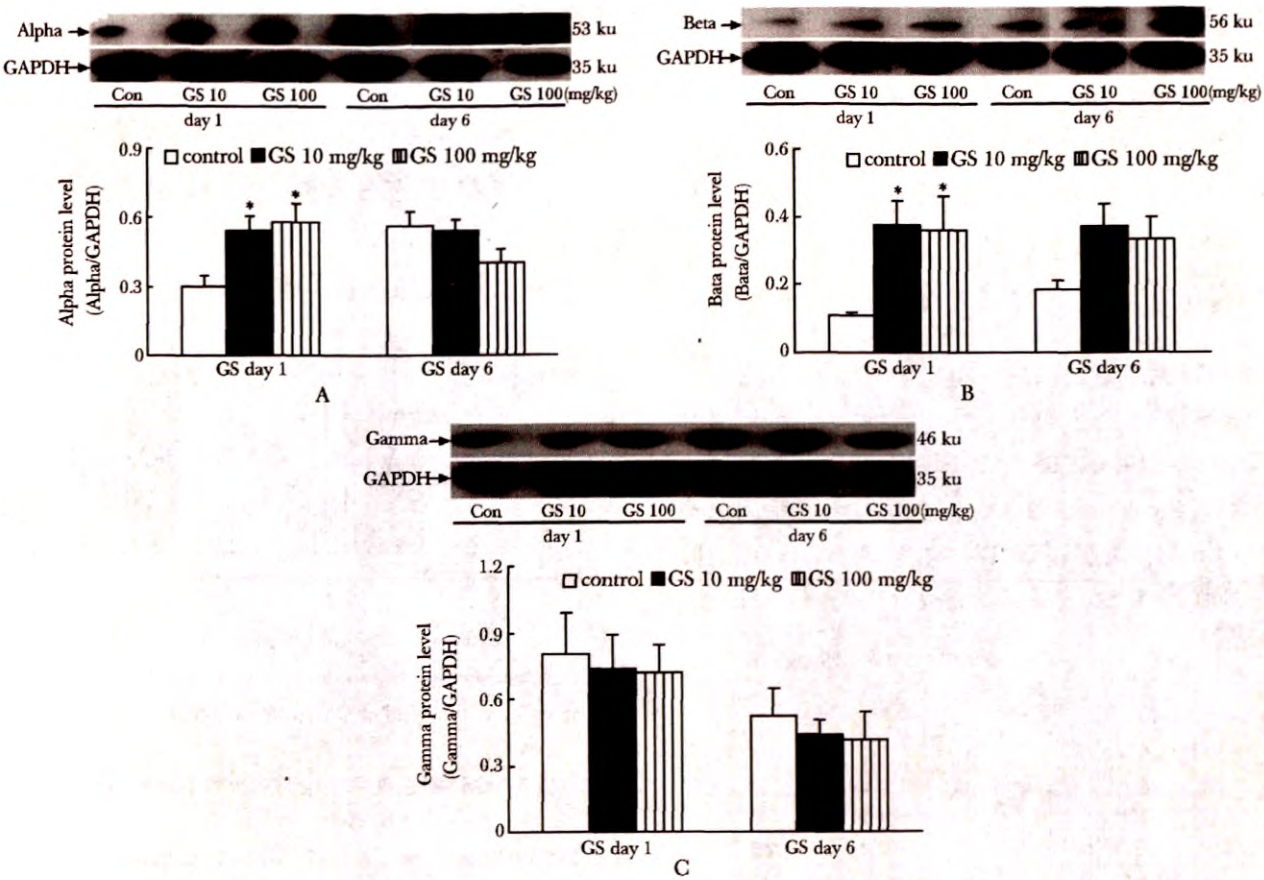
* $P < 0.05$ compared with control.

2.3 GS 急性、慢性给药对下丘脑 GABA_A 受体表达的影响

与对照组相比,低、高剂量 GS 急性给药,均增强大鼠下丘脑 GABA_A 受体 α 、 β 亚型表达 ($P < 0.05$) (图 4A、B,表 2)。

3 讨论

人参提取物可减轻妇女绝经前后的睡眠障



A, B and C represent respectively the expressions of GABA_A alpha, beta and gamma subunits in rat hypothalamus; **P* < 0.05 compared to control

图4 GS急性、亚急性给药对大鼠下丘脑 GABA_A受体 α、β 和 γ 亚基表达的影响
Fig 4 Expressions of GABA_A alpha, beta and gamma receptors in rat hypothalamus during acute and chronic GS administration ($\bar{x} \pm s$, *n* = 4)

表2 GS急性、亚急性给药对大鼠下丘脑 GABA_A受体 α、β 和 γ 亚基表达的影响
Table 2 GABA_A alpha, beta and gamma subunits in rat hypothalamus during acute and chronic GS administration ($\bar{x} \pm s$, *n* = 4)

group	GABA _A -α/GAPDH		GABA _A -β/GAPDH		GABA _A -γ/GAPDH	
	GS day 1	GS day 6	GS day 1	GS day 6	GS day 1	GS day 6
control	0.298 ± 0.052	0.561 ± 0.066	0.108 ± 0.010	0.185 ± 0.028	0.801 ± 0.191	0.522 ± 0.124
GS 10 mg/kg	0.543 ± 0.061 *	0.543 ± 0.047	0.375 ± 0.073 *	0.371 ± 0.066	0.736 ± 0.152	0.437 ± 0.067
GS 100 mg/kg	0.576 ± 0.082 *	0.402 ± 0.058	0.360 ± 0.101 *	0.334 ± 0.066	0.721 ± 0.124	0.417 ± 0.129

**P* < 0.05 compared with control.

碍^[9],现已被临床用于治疗失眠症^[10]。本实验表明GS剂量和时间依赖地调节了睡眠结构尤其是非快动眼睡眠。上述结果与以前的报道基本一致^[11]。

下丘脑有两个睡眠/觉醒调控相关的重要核团,腹外侧视前区(ventrolateral preoptic area, VLPO)即睡眠中心,组胺结节乳头体核(tuberomammillary nu-

cleus, TMN)即觉醒中心^[12]。VLPO将特定的抑制性GABA能以及甘丙肽能传出神经投射到TMN即组胺能系统兴奋起源部位。VLPO神经元可能也直接诱导NREM睡眠或发送抑制信号到TMN下调觉醒神经元。已知人参的作用与GABAergic系统有关。人参皂甙成分Majonoside-R2可在小鼠中逆转

因社会孤立应激诱导造成的戊巴比妥睡眠减少,此作用经 GABA_A 受体复合物的神经甾体位点介导^[13]。最近报道发酵人参改进首夜睡眠作用可能与其经 GABAergic 系统调制抗焦虑效应有关^[7]。亦有研究显示,人参皂甙抑制效果并不归属于对 GABA_A 受体激活的调节作用^[14]。本实验在检查 GS 急性、慢性给药对睡眠结构影响的同时,进一步考察了大鼠下丘脑内 GAD 和 GABA_A 受体 α 、 β 和 γ 亚基的蛋白表达情况。结果发现,GS 急性给药对大

鼠自然睡眠结构的调节作用可能与下丘脑过度表达由 α 、 β 而非 γ 亚单位组成的 GABA_A 受体复合物有关,但不涉及 GAD 生成 GABA 量的改变。而 GS 慢性给药对大鼠的自然睡眠结构调节作用可能是经由上调 GAD 表达从而增加 GABA 产量,与下丘脑 GABA_A 受体各亚型无关。我们的初步研究为临床应用人参等传统中药治疗失眠症等睡眠障碍提供了实验理论依据。

参考文献:

- [1] Kennedy DO, Scholey AB. Ginseng: potential for the enhancement of cognitive performance and mood [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 75: 687-700.
- [2] 段萍, 邢孟韬, 许燕, 等. 人参皂苷 Rb1 减轻 A β 25~35 所致新生神经细胞损伤 [J]. *基础医学与临床*, 2010, 30: 966-970.
- [3] 倪小虎, 于多, 孙文虹, 等. 人参皂苷对电激痉挛所致小鼠神经失调的改善作用的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2004, 15: 257-258.
- [4] 邢雅玲, 余林中, 江爱达, 等. 醒神胶囊对抗小鼠中枢及躯体疲劳的作用初探 [J]. *中成药*, 2005, 27: 441-443.
- [5] Murillo-Rodriguez E, Arias-Carrion O, Sanguino-Rodriguez K, *et al.* Mechanisms of sleep-wake cycle modulation [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2009, 8: 245-253.
- [6] Henny P, Jones BE. Vesicular glutamate (VGLut), GABA (VGAT), and acetylcholine (VACht) transporters in basal forebrain axon terminals innervating the lateral hypothalamus [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 496: 453-467.
- [7] Kitaoka K, Uchida K, Okamoto N, *et al.* Fermented ginseng improves the first-night effect in humans [J]. *Sleep*, 2009, 32: 413-421.
- [8] Sanford LD, Yang L, Liu X, *et al.* Effects of tetrodotoxin (TTX) inactivation of the central nucleus of the amygdala (CNA) on dark period sleep and activity [J]. *Brain Res*, 2006, 1084: 80-88.
- [9] Rotem C, Kaplan B. Phyto-Female Complex for the relief of hot flushes, night sweats and quality of sleep: randomized, controlled, double-blind pilot study [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2007, 23: 117-122.
- [10] Xiang YZ, Shang HC, Gao XM, *et al.* A comparison of the ancient use of ginseng in traditional Chinese medicine with modern pharmacological experiments and clinical trials [J]. *Phytother Res*, 2008, 22: 851-858.
- [11] Rhee YH, Lee SP, Honda K, *et al.* Panax ginseng extract modulates sleep in unrestrained rats [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990, 101: 486-488.
- [12] Ferre S, Diamond I, Goldberg SR, *et al.* Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry implications for drug addiction, sleep and pain [J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 83: 332-347.
- [13] Nguyen TT, Matsumoto K, Yamasaki K, *et al.* Majonoside-R2 reverses social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice: possible involvement of neuroactive steroids [J]. *Life Sci*, 1997, 61: 395-402.
- [14] Lee SH, Yang SC, Park JK, *et al.* Reduction of electrically evoked neural activity by ginseng saponin in rat hippocampal slices [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23: 411-414.