

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.22.013

实验研究

和胃安神方对失眠模型大鼠视交叉上核 Glu/GABA-Gln 循环的影响

刘子涵¹, 王硕¹, 邹涛¹, 田楚娇¹, 于泓洋¹, 底昂¹, 王亮², 陈琦², 王长振³, 李绍旦²✉

1. 中国人民解放军医学院, 北京市海淀区复兴路 28 号, 100853; 2. 中国人民解放军总医院第六医学中心; 3. 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

[摘要] **目的** 从视交叉上核 (SCN) 中谷氨酸 (Glu)/ γ -氨基丁酸 (GABA)-谷氨酰胺 (Gln) 循环探讨和胃安神方治疗失眠的可能作用机制。**方法** 将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、艾司唑仑组与和胃安神方低、中、高剂量组, 每组 10 只。除正常对照组外, 其余各组大鼠采用腹腔注射对氯苯丙氨酸法构建失眠大鼠模型。大鼠造模成功后正常对照组和模型对照组予 10 ml/kg 生理盐水灌胃, 艾司唑仑组予 0.33 mg/(kg·d) 艾司唑仑药液灌胃, 和胃安神方低、中、高剂量组分别予 1、2、4 g/ml 浓度的和胃安神方药液以 10 ml/kg 灌胃, 均每日 1 次, 连续 7 天。试验期间观察大鼠一般情况并每天记录体质量。灌胃结束后采用戊巴比妥钠协同实验记录大鼠睡眠潜伏期和睡眠时间, 采用 Western Blot 法和免疫荧光法检测大鼠 SCN 中 Glu/GABA-Gln 循环相关酶 [谷氨酸脱羧酶 (GAD)、 γ -氨基丁酸转氨酶 (GABA-T)、谷氨酰胺酶 (PAG)、谷氨酰胺合成酶 (GS)] 及转运体 [γ -氨基丁酸转运体 1 (GAT-1)、 γ -氨基丁酸转运体 3 (GAT-3)、谷氨酸转运体 1 (EAAT1)、谷氨酸转运体 2 (EAAT2)] 的蛋白水平。**结果** 与正常对照组同时间比较, 模型对照组给药第 1—7 天体质量均降低 ($P<0.01$)。与模型对照组同时间比较, 给药第 5、6、7 天时, 艾司唑仑组与和胃安神方中、高剂量组体质量升高 ($P<0.01$)。与艾司唑仑组同时间比较, 和胃安神方低剂量组第 6 天体质量降低 ($P<0.05$)。与正常对照组比较, 模型对照组睡眠潜伏期增加、睡眠时间缩短, SCN 中 GAD、EAAT1、EAAT2 蛋白水平及荧光强度降低, GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、GS 蛋白水平及荧光强度升高 ($P<0.01$)。与模型对照组比较, 各药物干预组睡眠潜伏期缩短、睡眠时间增加, 艾司唑仑组与和胃安神方高剂量组上述各指标均改善 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与艾司唑仑组比较, 和胃安神方低、中、高剂量组睡眠时间缩短, 和胃安神方低剂量组 GAD、EAAT1、EAAT2 蛋白水平降低, GAT-1 蛋白水平及荧光强度升高, 和胃安神方中剂量组 EAAT1 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与和胃安神方高剂量组比较, 和胃安神方低剂量组睡眠时间缩短, GAD、EAAT2 蛋白水平降低, GAT-1 蛋白水平及荧光强度升高 ($P<0.01$)。**结论** 和胃安神方可有效改善失眠模型大鼠的失眠状态, 其作用机制可能与调节 SCN 中 Glu/GABA-Gln 循环相关酶与转运体有关, 且以高剂量效果最佳。

[关键词] 失眠; 和胃安神方; 视交叉上核; 谷氨酸; γ -氨基丁酸; 谷氨酰胺

失眠是常见睡眠障碍, 目前临床上治疗失眠的药物多通过促进睡眠或抑制觉醒发挥作用^[1], 存在药物依赖、病情易复发等问题^[2]。失眠属中医学“不寐”范畴, 本课题组基于中医“胃不和则卧不安”理论角度, 认为通过“和胃”以达“胃和”,

则“卧安”而“夜寐”成, 拟定和胃安神方治疗失眠且已取得良好临床疗效^[3-4]。目前研究证实, 视交叉上核 (SCN) 的功能障碍与失眠密切相关^[5-6]。兴奋性神经递质谷氨酸 (Glu) 与抑制性神经递质 γ -氨基丁酸 (GABA) 对于维持正常的睡眠节律以及 SCN 功能十分重要, 而 Glu/GABA-谷氨酰胺 (Gln) 循环作为维持兴奋与抑制平衡的核心环节,

基金项目: 国家自然科学基金 (82174283)

✉ 通讯作者: lsd301@126.com

其相关酶与转运体紊乱会直接导致 GABA 和 Glu 的水平平衡^[7]。前期研究^[8]表明,和胃安神方可改善失眠模型大鼠的失眠状态并且调节大鼠下丘脑 Glu 与 GABA 的水平,但具体作用靶点尚不明确。因此,本研究从 SCN 内 Glu/GABA-Gln 循环相关酶与转运体角度探讨和胃安神方治疗失眠的可能作用机制,为其临床应用提供依据。本研究已通过中国人民解放军军事科学院军事医学研究院伦理委员会审批(批件号:IACUC-DWZX-2025-544)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 60 只,6 周龄,体重(200±10) g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,实验动物合格证号:SCXK(京)20190010。将所有大鼠置于 12 h 明暗周期控制的标准化动物房内饲养,温度(25±2)℃,相对湿度(45±5)%,自由进食及饮水。

1.2 药物

和胃安神方组成:姜半夏 10 g,薏苡仁 15 g,白术 15 g,茯神 15 g,石菖蒲 15 g,制远志 15 g,炒枣仁 15 g,柏子仁 15 g,甘草 5 g。上述饮片均购自中国人民解放军总医院中药房,遵循煎药规范煎煮后所得水煎液再分别浓缩成含生药 1、2、4 g/ml 浓度的药液,冷却后 4℃冰箱保存备用。艾司唑仑片(批号:230520,规格 1 mg/片),山东信谊制药有限公司,制备为浓度 0.033 mg/ml 的艾司唑仑药液,4℃冰箱保存备用。

1.3 主要试剂与仪器

对氯苯丙氨酸(PCPA,货号:C6506-25g),Sigma 公司;戊巴比妥钠(货号:AM00469),北京化学试剂公司;4%多聚甲醛(货号:G1101L)、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(货号:G2026-1000T),Servicebio 公司;RIPA 总蛋白裂解液(货号:BL504A),Biosharp 公司;重组谷氨酸脱羧酶(GAD)抗体(货号:ab183999)、重组 γ-氨基丁酸转氨酶(GABA-T)抗体(货号:ab216465)、重组谷氨酰胺酶(PAG)抗体(货号:ab317032)、重组谷氨酸转运体 1(EAAT1)抗体(货号:ab181036)、重组谷氨酸转运体 2(EAAT2)抗体(货号:ab313454)、谷氨酰胺合成酶(GS)抗体(货号:ab64613),Abcam 公司;γ-氨基丁酸转运体 1(GAT-1)多克隆抗体(货号:PA5-85766)、γ-氨基丁酸转运体 3(GAT-3)多克隆抗体(货号:PA5-104150),Invitrogen 公司;HRP 标记山羊抗兔

(货号:5220-0336)、HRP 标记山羊抗小鼠(货号:5220-0341),Seracare 公司;酪胺-CY3(货号:B5014-1)、DAPI(货号:B0011),武汉百仟度生物公司。

包埋机(型号:JB-P5),武汉俊杰电子有限公司;台式离心机(型号:TGL-16c),上海安亭科学仪器厂;电泳仪(型号:SVE-2),Servicebio 公司。

1.4 动物分组与造模

采用随机数字表法将 60 只大鼠分为正常对照组、模型对照组、艾司唑仑组与和胃安神方低、中、高剂量组,每组 10 只。除正常对照组外,其余各组大鼠采用腹腔注射 PCPA 进行造模^[9]:按 500 mg/kg 体质量于每天 8:00—9:00 腹腔注射 PCPA;正常对照组腹腔注射 10 ml/kg 生理盐水,均每天 1 次、连续 2 天。腹腔注射 PCPA 约 24 h 后,大鼠出现明显昼夜节律紊乱,攻击性增强,毛发灰暗,易撕咬打斗,活动大幅度增多但饮食减少,粪便稀溏;结合腹腔注射 48 h 后翻正反射实验结果,相比于正常对照组大鼠,造模大鼠睡眠潜伏期显著延长、睡眠时间显著缩短,差异具有统计学意义,提示造模成功^[10]。

1.5 给药方式

所有大鼠均造模成功后,于每天 8:00—9:00 对各组大鼠进行灌胃。根据大鼠与 60 kg 成人临床用量等效剂量进行换算^[11],和胃安神方低、中、高剂量组分别予 1、2、4 g/ml 浓度的和胃安神方药液 10 ml/kg 灌胃,其中中剂量为临床等效剂量;艾司唑仑组予 0.033 mg/ml 艾司唑仑药液 10 ml/kg 灌胃,正常对照组与模型对照组予 10 ml/kg 生理盐水灌胃。各组均每天灌胃 1 次,连续 7 天。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 大鼠一般情况观察 试验期间观察各组大鼠的毛发、饮食、粪便、睡眠等情况,每天记录体质量。

1.6.2 戊巴比妥钠协同实验 末次给药次日腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(35 mg/kg)诱导大鼠睡眠,利用翻正反射变化评定基本疗效^[10, 12]:注射戊巴比妥钠后记录此刻为注射结束时间,待大鼠自主活动停止时将其置于仰卧位,若持续≥60 s 无法自行恢复俯卧位则判定翻正反射消失,记录此刻为入睡时间;当大鼠首次出现自主翻身尝试时重新置于仰卧位,若 30 s 内恢复俯卧位则判定觉醒,并记录觉醒时间。睡眠潜伏期定义为注射结束至入睡的时间间隔,睡眠时间为入睡时间至觉醒时间的持续时

长。药物干预后,相比于模型对照组大鼠睡眠潜伏期缩短、睡眠时间增加即可初步判断药物具有镇静催眠的疗效。

1.6.3 Western Blot 法检测大鼠 SCN 中 Glu/GABA-Gln 循环相关酶与转运体蛋白水平 GAD、GABA-T、PAG、GS 为 Glu/GABA-Gln 循环相关酶, GAT-1、GAT-3、EAAT1、EAAT2 为 Glu/GABA-Gln 循环相关转运体。戊巴比妥钠协同实验次日,各组大鼠采用随机数字表法选取 3 只,以 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠,断头,快速取脑,冰上分离 SCN,液氮速冻,置入 -80 ℃ 冰箱冷冻保存备用。用预冷的 PBS 缓冲液漂洗 2 或 3 次,去除血污,置于匀浆器中,加入裂解液,冰浴彻底匀浆。4 ℃、13 000 g 离心 15 min (离心半径为 8 cm),收集上清。BCA 蛋白质浓度测定后确定上样量,95~100 ℃ 沸水浴 5 min。浓缩胶 50 V、分离胶 120 V 进行恒压电泳。按 100 V 恒压转膜。将转好的膜加入封闭液室温封闭 1 h,之后除去封闭液,分别滴加一抗 (GAD、GABA-T 稀释比例为 1:1000, GAT-1、GAT-3、PAG、EAAT1、EAAT2、GS 稀释比例为 1:2000) 4 ℃ 过夜。回收一抗,用 TBST 洗 3 次,每次 5 min。加入相应二抗 (稀释比例为 1:50 000),室温孵育 30 min,室温下用 TBST 在摇床上洗 4 次,每次 5 min,随后 ECL 发光法行胶片曝光。以 β -actin 为内参蛋白,用 ImageJ 1.8.0 软件分析结果。

1.6.4 免疫荧光法检测大鼠 SCN 中 Glu/GABA-Gln 循环相关酶与转运体蛋白水平 各组剩余大鼠采用随机数字表法选取 3 只,2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后,4% 多聚甲醛心脏灌注,断头取脑,完整脑组织置于多聚甲醛中固定。PBS 清洗以及脱水后进行石蜡包埋,连续冠状切片,选取 SCN 切片脱蜡并进行抗原修复,结束后 PBS 清洗,放入 3% 双氧水溶液,室温避光孵育 25 min。PBS 洗涤 3

次,每次 5 min。滴加 10% 山羊血清室温孵育 30 min。滴加一抗 (GAD 稀释比例为 1:400, GABA-T、GAT-1、GAT-3、PAG、EAAT1、EAAT2、GS 稀释比例为 1:200),4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。滴加相应二抗 (稀释比例为 1:400),避光室温孵育 50 min, PBS 洗涤后滴加酪胺-CY3 室温孵育 20 min。再次 PBS 洗涤后滴加 DAPI 染液,避光室温孵育 10 min。封片后镜下观察,并采集图像。通过 Image-Pro Plus 6.0 软件进行免疫荧光强度定量分析。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.5 和 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料均满足正态分布且方差齐,以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

正常对照组大鼠毛发整洁、粪便干燥成形,饮食正常,日间以静息行为为主,睡眠节律稳定;模型对照组大鼠毛发蓬乱无光泽、饮食减少且粪便溏稀灰暗,并伴随日间活动亢进、睡眠节律紊乱及易激惹等异常行为;各药物干预组大鼠以上各方面均有不同程度的改善。表 1 示,与正常对照组同时间比较,模型对照组给药第 1—7 天大鼠体质量均降低 ($P<0.01$)。与模型对照组同时间比较,给药第 5、6、7 天艾司唑仑组与和胃安神方中、高剂量组大鼠体质量均升高,给药第 7 天和胃安神方低剂量组大鼠体质量升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与艾司唑仑组同时间比较,给药第 6 天和胃安神方低剂量组体质量降低 ($P<0.05$)。和胃安神方各剂量组同时间体质量比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间体质量比较

Table 1 Comparison of body weight in rats among different groups at various time points (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	给药 第 1 天	给药 第 2 天	给药 第 3 天	给药 第 4 天	给药 第 5 天	给药 第 6 天	给药 第 7 天
正常对照组	10	258.72 $\pm$ 5.18	267.73 $\pm$ 8.95	274.81 $\pm$ 6.40	282.97 $\pm$ 6.44	294.04 $\pm$ 6.02	299.67 $\pm$ 6.42	303.32 $\pm$ 6.58
模型对照组	10	231.69 $\pm$ 12.52 ^{a)}	227.35 $\pm$ 8.10 ^{a)}	232.41 $\pm$ 4.87 ^{a)}	236.00 $\pm$ 10.86 ^{a)}	237.90 $\pm$ 5.08 ^{a)}	246.90 $\pm$ 4.32 ^{a)}	255.20 $\pm$ 8.62 ^{a)}
艾司唑仑组	10	228.89 $\pm$ 13.90	230.70 $\pm$ 8.93	235.07 $\pm$ 9.42	243.43 $\pm$ 7.58	253.26 $\pm$ 9.15 ^{b)}	262.34 $\pm$ 4.54 ^{b)}	275.08 $\pm$ 10.87 ^{b)}
和胃安神方低剂量组	10	234.45 $\pm$ 10.72	228.55 $\pm$ 8.25	232.68 $\pm$ 7.66	240.33 $\pm$ 6.45	246.92 $\pm$ 7.02	253.31 $\pm$ 6.40 ^{d)}	267.42 $\pm$ 9.24 ^{c)}
和胃安神方中剂量组	10	229.87 $\pm$ 12.74	230.33 $\pm$ 10.73	237.05 $\pm$ 11.27	241.89 $\pm$ 8.50	251.20 $\pm$ 10.48 ^{b)}	258.82 $\pm$ 7.60 ^{b)}	269.96 $\pm$ 10.07 ^{b)}
和胃安神方高剂量组	10	230.82 $\pm$ 13.71	233.00 $\pm$ 10.48	238.14 $\pm$ 8.27	244.74 $\pm$ 6.22	253.52 $\pm$ 8.87 ^{b)}	260.15 $\pm$ 7.95 ^{b)}	272.10 $\pm$ 6.83 ^{b)}

注: a) 与正常对照组同时间比较, $P<0.01$; b) 与模型对照组同时间比较, $P<0.01$; c) 与模型对照组同时间比较, $P<0.05$; d) 与艾司唑仑组同时间比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠戊巴比妥钠协同实验结果比较

表2示,与正常对照组比较,模型对照组大鼠睡眠潜伏期增加,睡眠时间缩短($P<0.01$)。与模型对照组比较,各药物干预组大鼠睡眠潜伏期均缩短,睡眠时间增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与艾司唑仑组比较,和胃安神方低、中、高剂量组睡眠时间缩短($P<0.01$);与和胃安神方高剂量组比较,和胃安神方低剂量组睡眠时间缩短($P<0.01$)。

表2 各组大鼠戊巴比妥钠协同实验睡眠潜伏期及睡眠时间比较

Table 2 comparison of sleep latency and sleep duration in the pentobarbital sodium-induced experiment among different groups (min, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	睡眠潜伏期	睡眠时间
正常对照组	10	4.84±0.48	55.11±3.10
模型对照组	10	5.70±0.70 ^{a)}	33.40±5.15 ^{a)}
艾司唑仑组	10	4.59±0.33 ^{b)}	59.74±4.57 ^{b)}
和胃安神方低剂量组	10	5.02±0.46 ^{c)}	39.20±3.92 ^{c) d) e)}
和胃安神方中剂量组	10	4.95±0.51 ^{c)}	48.02±3.96 ^{b) d)}
和胃安神方高剂量组	10	4.87±0.61 ^{b)}	51.98±5.26 ^{b) d)}

注: a) 与正常对照组比较, $P<0.01$; b) 与模型对照组比较, $P<0.01$; c) 与模型对照组比较, $P<0.05$; d) 与艾司唑仑组比较, $P<0.01$; e) 与和胃安神方高剂量组比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠SCN区域Glu/GABA-Gln循环相关酶与转运体蛋白荧光强度比较

表3示,与正常对照组比较,模型对照组GAD、EAAT1、EAAT2蛋白荧光强度降低,GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、GS蛋白荧光强度升高($P<0.01$)。与模型对照组比较,艾司唑仑组与和胃安神方中、高剂量组GAD、EAAT1、EAAT2蛋白荧光强度升高,GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、GS蛋白荧光强度

降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);和胃安神方低剂量组GAD、EAAT1蛋白荧光强度升高,GAT-3、GABA-T、PAG、GS蛋白荧光强度降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与和胃安神方低剂量组比较,艾司唑仑组与和胃安神方高剂量组GAT-1蛋白荧光强度降低($P<0.01$)。各组大鼠SCN区域GAD、GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、EAAT1、EAAT2、GS蛋白荧光图见附件(请扫描本文二维码获取)。

2.4 各组大鼠SCN中Glu/GABA-Gln循环相关酶与转运体蛋白水平比较

表4示,与正常对照组比较,模型对照组大鼠GAD、EAAT1、EAAT2蛋白水平降低,GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、GS蛋白水平升高($P<0.01$)。与模型对照组比较,艾司唑仑组与和胃安神方高剂量组GAD、EAAT1、EAAT2蛋白水平升高,GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、GS蛋白水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);和胃安神方中剂量组GAD、EAAT2蛋白水平升高,GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、GS蛋白水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);和胃安神方低剂量组EAAT2蛋白水平升高,GAT-3、GABA-T、PAG、GS蛋白水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与艾司唑仑组比较,和胃安神方低剂量组GAD、EAAT1、EAAT2蛋白水平降低,GAT-1蛋白水平升高,和胃安神方中剂量组EAAT1蛋白水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与和胃安神方高剂量组比较,和胃安神方低剂量组GAD、EAAT2蛋白水平降低,GAT-1蛋白水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠SCN中GAD、GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、EAAT1、EAAT2、GS蛋白电泳图见图1、图2。

表3 各组大鼠SCN区域GAD、GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、EAAT1、EAAT2、GS蛋白荧光强度比较

Table 3 Comparison of immunofluorescence intensity of GAD, GAT-1, GAT-3, GABA-T, PAG, EAAT1, EAAT2, and GS proteins in the SCN of rats across different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GAD	GAT-1	GAT-3	GABA-T	PAG	EAAT1	EAAT2	GS
正常对照组	3	1.00±0.06	1.00±0.12	1.00±0.27	1.00±0.28	1.00±0.24	1.00±0.08	1.00±0.21	1.00±0.20
模型对照组	3	0.42±0.10 ^{a)}	1.98±0.05 ^{a)}	2.27±0.14 ^{a)}	2.29±0.48 ^{a)}	1.85±0.12 ^{a)}	0.47±0.07 ^{a)}	0.41±0.08 ^{a)}	2.13±0.18 ^{a)}
艾司唑仑组	3	0.87±0.09 ^{b)}	1.46±0.29 ^{b) d)}	1.21±0.14 ^{b)}	1.12±0.19 ^{b)}	1.16±0.14 ^{b)}	0.95±0.26 ^{b)}	0.93±0.12 ^{b)}	1.30±0.14 ^{b)}
和胃安神方低剂量组	3	0.69±0.18 ^{c)}	1.94±0.04	1.43±0.26 ^{b)}	1.47±0.15 ^{c)}	1.32±0.16 ^{c)}	0.79±0.04 ^{c)}	0.67±0.20	1.44±0.17 ^{b)}
和胃安神方中剂量组	3	0.76±0.07 ^{c)}	1.54±0.10 ^{b)}	1.47±0.10 ^{b)}	1.19±0.38 ^{b)}	1.20±0.22 ^{b)}	0.80±0.08 ^{c)}	0.89±0.08 ^{b)}	1.35±0.24 ^{b)}
和胃安神方高剂量组	3	0.78±0.14 ^{b)}	1.44±0.07 ^{b) d)}	1.12±0.24 ^{b)}	1.11±0.25 ^{b)}	1.13±0.19 ^{b)}	0.86±0.11 ^{c)}	0.94±0.11 ^{b)}	1.28±0.28 ^{b)}

注: SCN, 视交叉上核; GAD, 谷氨酸脱羧酶; GAT-1, γ -氨基丁酸转运体1; GAT3, γ -氨基丁酸转运体3; GABA-T, γ -氨基丁酸转氨酶; PAG, 谷氨酰胺酶; EAAT1, 谷氨酸转运体1; EAAT2, 谷氨酸转运体2; GS, 谷氨酰胺合成酶。

a) 与正常对照组比较, $P<0.01$; b) 与模型对照组比较, $P<0.01$; c) 与模型对照组比较, $P<0.05$; d) 与和胃安神方低剂量组比较, $P<0.01$ 。

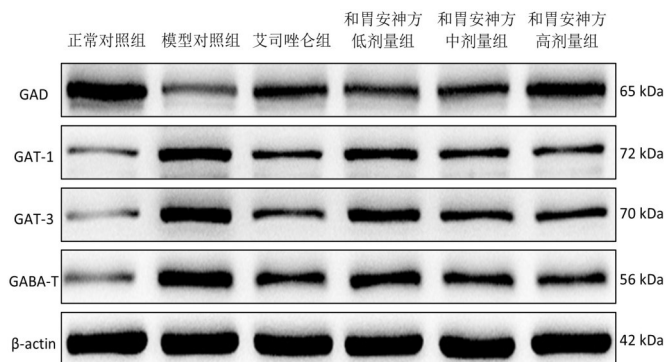
表 4 各组大鼠 SCN 中 GAD、GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、EAAT1、EAAT2、GS 蛋白水平比较

Table 4 Comparison of relative protein expression levels of GAD, GAT-1, GAT-3, GABA-T, PAG, EAAT1, EAAT2, and GS in the SCN of rats among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GAD	GAT-1	GAT-3	GABA-T	PAG	EAAT1	EAAT2	GS
正常对照组	3	1.00±0.16	1.00±0.08	1.00±0.07	1.00±0.05	1.00±0.08	1.00±0.06	1.00±0.03	1.00±0.15
模型对照组	3	0.57±0.10 ^{a)}	2.34±0.43 ^{a)}	2.00±0.25 ^{a)}	1.91±0.19 ^{a)}	1.69±0.08 ^{a)}	0.56±0.06 ^{a)}	0.59±0.07 ^{a)}	1.60±0.15 ^{a)}
艾司唑仑组	3	0.94±0.12 ^{b)}	1.18±0.18 ^{b)}	1.24±0.18 ^{b)}	1.23±0.20 ^{b)}	1.11±0.11 ^{b)}	0.84±0.07 ^{b)}	0.87±0.06 ^{b)}	1.17±0.06 ^{b)}
和胃安神方低剂量组	3	0.64±0.08 ^{d) f)}	2.00±0.14 ^{d) f)}	1.45±0.06 ^{c)}	1.33±0.12 ^{b)}	1.27±0.18 ^{c)}	0.66±0.04 ^{d)}	0.73±0.05 ^{c) d) g)}	1.30±0.04 ^{c)}
和胃安神方中剂量组	3	0.82±0.09 ^{e)}	1.34±0.30 ^{b)}	1.27±0.18 ^{b)}	1.27±0.23 ^{b)}	1.16±0.19 ^{b)}	0.61±0.09 ^{e)}	0.85±0.04 ^{b)}	1.20±0.12 ^{b)}
和胃安神方高剂量组	3	0.92±0.06 ^{b)}	1.28±0.24 ^{b)}	1.21±0.27 ^{b)}	1.22±0.22 ^{b)}	1.10±0.22 ^{b)}	0.75±0.07 ^{c)}	0.90±0.06 ^{b)}	1.13±0.04 ^{b)}

注：SCN，视交叉上核；GAD，谷氨酸脱羧酶；GAT-1， γ -氨基丁酸转运体 1；GAT-3， γ -氨基丁酸转运体 3；GABA-T， γ -氨基丁酸转氨酶；PAG，谷氨酰胺酶；EAAT1，谷氨酸转运体 1；EAAT2，谷氨酸转运体 2；GS，谷氨酰胺合成酶。

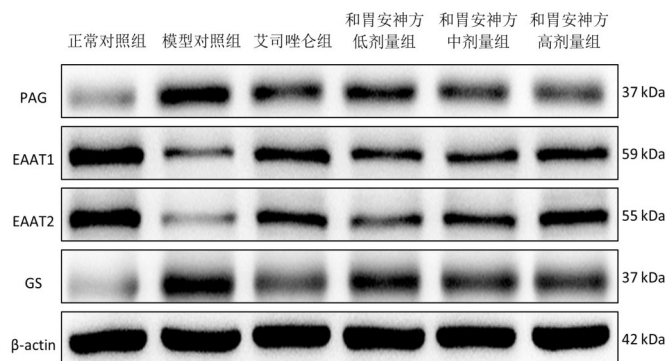
a) 与正常对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型对照组比较， $P<0.05$ ；d) 与艾司唑仑组比较， $P<0.05$ ；e) 与艾司唑仑组比较， $P<0.01$ ；f) 与和胃安神方高剂量组比较， $P<0.05$ ；g) 与和胃安神方高剂量组比较， $P<0.01$ 。



注：SCN，视交叉上核；GAD，谷氨酸脱羧酶；GAT-1， γ -氨基丁酸转运体 1；GAT-3， γ -氨基丁酸转运体 3；GABA-T， γ -氨基丁酸转氨酶。

图 1 各组大鼠 SCN 中 GAD、GAT-1、GAT-3、GABA-T 蛋白电泳图

Figure 1 Comparison of protein expression of GAD, GAT-1, GAT-3, and GABA-T in SCN among different groups



注：SCN，视交叉上核；PAG，谷氨酰胺酶；EAAT1，谷氨酸转运体 1；EAAT2，谷氨酸转运体 2；GS，谷氨酰胺合成酶。

图 2 各组大鼠 SCN 中 PAG、EAAT1、EAAT2、GS 蛋白电泳图

Figure 2 Comparison of protein expression of PAG, EAAT1, EAAT2, and GS in SCN among different groups

3 讨论

失眠是重大的公共卫生问题，全球成人失眠的患病率约为 10%^[13]。本课题组基于“胃不和则卧不安”中医理论及临床实践积累，发现失眠与现代饮食结构、方式改变所引起的脾胃不和以及其诱发的食积、痰湿、气血不足等相关。脾胃为人体气机升降枢纽、后天之本，脾胃不和，一则食积化火（郁而化热），胃火（或夹带浊气）上逆，扰动心神，故见失眠伴心烦、嗳腐吞酸、口臭等；二则脾虚水停，聚湿成痰，易阻气机且郁久化热上扰心神，出现失眠多梦、头重如裹、痰多等；三则气血生化不足，心神失养，症见眠浅多梦易醒、头晕目眩、面色无华、神疲乏力等。因此，我们认为应当“和胃”以“安神”，如此则可寐安。和胃安神方中姜半夏燥湿化痰、降逆止呕，薏苡仁利水渗湿、健脾，白术健脾益气，通过调和脾胃、疏通中焦以针对脾胃不和导致的失眠，达安神之目的；炒酸枣仁、茯神、柏子仁宁心安神，石菖蒲芳香开窍宁神，制远志交通心肾而安神；甘草既助白术健运中焦，又可制姜半夏辛燥之性，兼能调和诸药，全方通过调和胃气与心神而安神助眠。前期研究显示，和胃安神方治疗失眠患者已取得满意临床疗效^[14-15]。

本研究通过腹腔注射 PCPA 制备稳定且可重复的 SD 大鼠失眠模型，结果显示，相较于正常对照组，模型对照组大鼠在连续 2 日腹腔注射 PCPA 后呈现典型失眠特征，具体表现为睡眠节律紊乱、睡眠质量下降、毛发无光泽、粪便溏稀、日间活动亢进、易激惹等；进一步通过翻正反射实验证实，相较于正常大鼠，造模大鼠睡眠潜伏期延长、睡眠时间缩短，提示造模成功。灌胃给药 7 天后，和胃安神方中、高剂量组和艾司唑仑组大鼠给药第 5、6、

7 天体质量较模型对照组升高。戊巴比妥钠协同实验结果显示,与模型对照组比较,各药物干预组大鼠睡眠潜伏期缩短、睡眠时间延长;和胃安神方低、中、高剂量组较艾司唑仑组睡眠时间缩短;和胃安神方高剂量组较低剂量组睡眠时间延长;各药物干预组组间比较睡眠潜伏期差异无统计学意义。以上提示和胃安神方与艾司唑仑均可改善大鼠失眠状态,且在增加睡眠时间方面和胃安神方高剂量效果优于低剂量,艾司唑仑效果优于和胃安神方各剂量,但在改善睡眠潜伏期方面和胃安神方各剂量和艾司唑仑相当。

SCN 位于双侧视交叉上方,沿大脑中线靠近第三脑室室管膜内膜,被称为大脑的“主时钟”^[16],其通过固有的光敏性视网膜神经节细胞接收有关环境光水平的信息,并通过突触和激素机制将昼夜节律信息传递给大脑的其他部分,通过这种方式协调生理和行为的日常周期^[17]。研究^[18]表明,破坏 SCN 会导致动物丧失昼夜节律。GABA、Glu 分别是主要抑制性神经递质与兴奋性神经递质,二者通过其在 SCN 中神经元-星形胶质细胞的联合作用参与调节昼夜节律的过程^[6]。生物节律的相位可塑性和周期可塑性需要 GABA 参与^[19],胞外 Glu 水平升高能够可逆性损害 SCN 神经元的昼夜节律同步性^[20],Glu、GABA 的信号传递协同作用可维持 SCN 细胞同步性、相位离散(波动)以及整体周期的特性^[21]。研究^[22]表明,GABA 与 Glu 的水平失衡会影响 SCN 维持昼夜节律的功能,而维持 Glu 与 GABA 的动态平衡需依赖于 Glu/GABA-Gln 循环相关酶与转运体的精密配合。GABA 由 GAD 催化 Glu 产生^[23],生成的 GABA 被转移到突触间隙发挥作用;突触释放 GABA 后,其信号主要通过 GAT-1、GAT-3 将其从突触间隙快速重摄取来终止,这是维持神经元兴奋性与抑制性平衡的关键机制^[24]。GABA 由神经元与星形胶质细胞共表达的 GAT-1^[25]、星形胶质细胞表达的 GAT-3 摄取^[26],被摄取到神经元或星形胶质细胞的 GABA 被 GABA-T 降解为琥珀酸半醛^[27],后续补充三羧酸循环。由于 Glu 无法通过血脑屏障,所以 SCN 中 Glu 主要由神经元和星形胶质细胞利用 Gln 通过 PAG 合成^[28]。Glu 被释放于突触间隙后,主要由神经元与星形胶质细胞共表达的 EAAT2^[29]、星形胶质细胞表达的 EAAT1 再摄取将其从突触间隙中去除来终止信号传导,从而维持神经元兴奋性与抑制性平衡以及避免兴奋性毒性^[30]。被摄取的 Glu 在星形胶质细胞中 GS 的作用下转化

为 Gln^[31]。Gln 由星形胶质细胞释放并被递送至神经元中,PAG 将其水解转化为 Glu,用于下一次信号传递,或作为生成 GABA 的直接前体,亦或参与三羧酸循环^[31-32]。由于 Gln 是 GABA 的间接前体和 Glu 的直接前体,并且 Gln 可以补充 GABA、Glu 的再摄取与代谢导致的神经递质池的消耗,故将有关 GABA、Glu 在神经元和星形胶质细胞之间的合成、代谢、释放、摄取的这一过程称为 Glu/GABA-Gln 循环,其对于基本的突触功能以及抑制性与兴奋性信号传导的平衡至关重要^[33]。无论是 Gln 稳态中断,还是神经递质摄取、代谢紊乱,都会导致 SCN 中 GABA、Glu 水平失衡,进而破坏昼夜节律的稳定性和同步性,诱发失眠^[34-35]。

本研究结果显示,与正常对照组比较,模型对照组大鼠 SCN 中 GAD、EAAT1、EAAT2 蛋白水平降低,GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、GS 蛋白水平升高;与模型对照组比较,艾司唑仑组与和胃安神方高剂量组大鼠 SCN 中 GAD、EAAT1、EAAT2 蛋白水平升高,GAT-1、GAT-3、GABA-T、PAG、GS 蛋白水平降低,提示和胃安神方可调节失眠模型大鼠 SCN 中 Glu/GABA-Gln 循环相关酶与转运体的蛋白水平。各药物干预组组间比较发现,阳性药物艾司唑仑与和胃安神方高剂量总体改善效果优于和胃安神方低、中剂量。

综上,和胃安神方可能是通过影响 SCN 中 Glu/GABA-Gln 循环相关酶与转运体的表达从而调节昼夜节律,发挥治疗失眠的作用。然而本研究尚未进行体外实验,后续将开展更深入的研究进行探讨。

参考文献

- [1] CLARKE K, ORLOV N, SOONG C. Treatment of chronic insomnia in adults[J]. Can Fam Physician, 2024, 70(3): 176-178.
- [2] SCHUELTER-TREVISOL F, CIPRIANO FELIPPE F, CAMARGO B, et al. Incidence of adverse effects and misuse of zolpidem[J]. J Pharm Technol, 2025, 14: 87551225251324856. doi: 10.1177/87551225251324856.
- [3] 罗海鸥, 杨明会, 李绍旦, 等. 和胃安神方治疗失眠 117 例临床观察[J]. 激光杂志, 2012, 33(5): 88-90.
- [4] 李绍旦, 周登峰, 黎发根, 等. 和胃安神法治疗失眠症的临床研究[J]. 北京中医药, 2014, 33(11): 807-809.
- [5] YU S, SHEN Z, XU H, et al. Top-down and bottom-up alterations of connectivity patterns of the suprachiasmatic nucleus in chronic insomnia disorder[J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2024, 274(2): 245-254.

- [6] HASTINGS MH, MAYWOOD ES, BRANCACCIO M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19(8): 453–469.
- [7] JIANG C, WANG H, QI J, et al. Antidepressant effects of cherry leaf decoction on a chronic unpredictable mild stress rat model based on the Glu/GABA-Gln metabolic loop[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(8): 2883–2901.
- [8] 黎发根, 李绍旦, 杨明会, 等. 和胃安神方对失眠大鼠脑组织谷氨酸与 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(2): 50–52.
- [9] 郭海波, 王慧. 对氯苯丙氨酸在动物失眠模型中的应用概述[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(6): 135–140.
- [10] 夏天吉, 闫明珠, 王智, 等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3): 428–435.
- [11] NAIR AB, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human[J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7(2): 27–31.
- [12] 胡金, 韦姗姗, 邱祥玉, 等. 筛选镇静催眠药物的动物实验评价[J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(4): 133–140.
- [13] MORIN CM, JARRIN DC. Epidemiology of insomnia: prevalence, course, risk factors, and public health burden[J]. *Sleep Med Clin*, 2022, 17(2): 173–191.
- [14] 李东岳, 梅荣, 李绍旦, 等. 和胃安神方治疗原发性失眠的临床研究[J]. *环球中医药*, 2012, 5(8): 585–587.
- [15] 田楚娇, 王亮, 王硕, 等. 和胃安神方治疗应激性失眠男性患者 52 例随机对照试验[J]. *中医杂志*, 2024, 65(22): 2326–2331.
- [16] SCHWARTZ JR, ROTH T. Neurophysiology of sleep and wakefulness: basic science and clinical implications[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2008, 6(4): 367–378.
- [17] CAO L, FENG R, GAO Y, et al. Suprachiasmatic nucleus functional connectivity related to insomnia symptoms in adolescents with major depressive disorder[J]. *Front Psychiatry*, 2023, 14: 1154095. doi: 10.3389/fpsy.2023.1154095.
- [18] RALPH MR, FOSTER RG, DAVIS FC, et al. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period[J]. *Science*, 1990, 247(4945): 975–978.
- [19] AZZI A, EVANS JA, LEISE T, et al. Network dynamics mediate circadian clock plasticity[J]. *Neuron*, 2017, 93(2): 441–450.
- [20] HASTINGS MH, ROBERTS AC, HERBERT J. Neurotoxic lesions of the anterior hypothalamus disrupt the photoperiodic but not the circadian system of the Syrian hamster[J]. *Neuroendocrinology*, 1985, 40(4): 316–324.
- [21] SCHMAL C, HERZOG ED, HERZEL H. Measuring relative coupling strength in circadian systems[J]. *J Biol Rhythms*, 2018, 33(1): 84–98.
- [22] YU X, LI W, MA Y, et al. GABA and glutamate neurons in the VTA regulate sleep and wakefulness[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(1): 106–119.
- [23] MARTIN DL, RIMVALL K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain[J]. *J Neurochem*, 1993, 60(2): 395–407.
- [24] SEARS SM, HEWETT SJ. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(9): 1069–1083.
- [25] KANG JQ. Defects at the crossroads of GABAergic signaling in generalized genetic epilepsies[J]. *Epilepsy Res*, 2017, 137: 9–18. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2017.08.013.
- [26] DELEEUW MB, SHEN W, TIAN X, et al. 4-Phenylbutyrate restored GABA uptake, mitigated seizures in SLC6A1 and SLC6A11 microdeletions/3p- syndrome: from cellular models to human patients[J]. *Epilepsy Res*, 2025, 210: 107514. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2025.107514.
- [27] PARK MG, LIM J, KIM D, et al. Suppressing astrocytic GABA transaminase enhances tonic inhibition and weakens hippocampal spatial memory[J]. *Exp Mol Med*, 2025, 57(2): 379–389.
- [28] MCKENNA MC. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain[J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(15): 3347–3358.
- [29] TAKAHASHI K, ISHIBASHI Y, CHUJO K, et al. Neuroprotective potential of L-glutamate transporters in human induced pluripotent stem cell-derived neural cells against excitotoxicity[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16): 12605.
- [30] STORCK T, SCHULTE S, HOFMANN K, et al. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(22): 10955–10959.
- [31] BAEK JH, PARK H, KANG H, et al. The role of glutamine homeostasis in emotional and cognitive functions[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1302.
- [32] GONZÁLEZ-GONZÁLEZ IM, CUBELOS B, GIMÉNEZ C, et al. Immunohistochemical localization of the amino acid transporter SNAT2 in the rat brain[J]. *Neuroscience*, 2005, 130(1): 61–73.
- [33] ANDERSEN JV. The glutamate/GABA-glutamine cycle: insights, updates, and advances[J]. *J Neurochem*, 2025,

- 169(3): e70029.
- [34]ZHANG XH, ZHANG X, LIU XW, et al. Examining the role of GLU/GABA to GLN metabolic cycle in the pathogenesis of post-stroke depressive disorder and insomnia [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2023, 19: 2833–2840. doi: 10.2147/NDT.S443844.
- [35]QIAO T, WANG Y, LIANG K, et al. Effects of the Radix Ginseng and Semen Ziziphi Spinosae drug pair on the GLU/GABA-GLN metabolic cycle and the intestinal microflora of insomniac rats based on the brain-gut axis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1094507. doi: 10.3389/fphar.2022.1094507.

Effect of *Hewei Anshen Formula* (和胃安神方) on the Glu/GABA-Gln Cycle in the Suprachiasmatic Nucleus of Insomnia Model Rats

LIU Zihan¹, WANG Shuo¹, ZOU Tao¹, TIAN Chujiao¹, YU Hongyang¹, DI Ang¹, WANG Liang², CHEN Qi², WANG Changzhen³, LI Shaodan²

1. PLA Medical School, Beijing, 100853; 2. Sixth Medical Center of the PLA General Hospital; 3. The Academy of Military Medical Sciences, People's Liberation Army Academy of Military Sciences

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Hewei Anshen Formula* (和胃安神方, HAF) in the treatment of insomnia by investigating the Glu/GABA-Gln cycle in the suprachiasmatic nucleus (SCN). **Methods**

Sixty male SD rats were randomly divided into normal control group, model control group, eszopiclone group, and HAF low-, medium-, and high-dose group, with 10 rats in each group. Except for the normal control group, insomnia model rats were induced by intraperitoneal injection of para-chlorophenylalanine. After the model was established, the normal and model control groups were given 10 ml/kg of normal saline by gastric gavage, while the eszopiclone group was given 0.33 mg/(kg·d) of eszopiclone by gastric gavage, and the low-, medium-, and high-dose HAF group was given 10 ml/kg of HAF by gastric gavage at concentrations of 1, 2, and 4 g/ml, respectively; all treatments were administered once a day for 7 consecutive days. During the experiment, the general condition of the rats was observed, and body weight was recorded daily. After the treatment, sleep latency and sleep duration were recorded using a pentobarbital sodium-induced experiment. The protein levels of Glu/GABA-Gln cycle-related enzymes including glutamic acid decarboxylase (GAD), γ -aminobutyric acid transaminase (GABA-T), glutaminase (PAG), and glutamine synthetase (GS), and the transporters including GABA transporter 1 (GAT-1), GABA transporter 3 (GAT-3), glutamate transporter 1 (EAAT1), and glutamate transporter 2 (EAAT2)) in the SCN of the rats were measured using Western Blot and immunofluorescence methods. **Results** Compared to the normal control group, the body weight of the rats in the model control group decreased on day 1–7 of administration ($P<0.01$). Compared to the model control group, the body weight of the rats in the eszopiclone group and the medium- and high-dose HAF groups increased on day 5, 6, and 7 ($P<0.01$). Compared to the eszopiclone group, the body weight of the rats in the low-dose HAF group decreased on day 6 ($P<0.05$). Compared to the normal control group, the model control group had an increased sleep latency, shortened sleep duration, and decreased relative expression of GAD, EAAT1, and EAAT2 proteins in the SCN, as well as increased expression of GAT-1, GAT-3, GABA-T, PAG, and GS proteins ($P<0.01$). Compared to the model control group, the sleep latency in all drug intervention groups was shortened, and sleep duration increased, with the eszopiclone group and the high-dose HAF group showing the most significant improvement ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to the eszopiclone group, the sleep duration of all three HAF groups was shorter, with the low-dose HAF group showing a decrease in GAD, EAAT1, and EAAT2 protein expression, and an increase in GAT-1 protein expression as well as decrease in EAAT1 protein relative expression in medium-dose HAF group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to the high-dose HAF group, the low-dose group had a shorter sleep duration, decreased GAD and EAAT2 protein expression, and increased GAT-1 protein expression ($P<0.01$). **Conclusion**

HAF can effectively improve the insomnia status in insomnia model rats. The mechanism of action may be related to the regulation of Glu/GABA-Gln cycle-related enzymes and transporters in the SCN, with the high dose showing the best effect.

Keywords insomnia; *Hewei Anshen Formula* (和胃安神方); suprachiasmatic nucleus; glutamate; γ -aminobutyric acid; glutamine

(收稿日期: 2025-07-31; 修回日期: 2025-09-26)

[编辑: 邓媛]