

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.06.003

花生红衣水提物对小鼠的镇静催眠作用*

孙 涛 林 娜 李 军[△] 齐汝霞 林丽文 张 鹏

(济宁医学院基础医学院, 济宁 272067)

摘 要 **目的** 探讨花生红衣水提物对小鼠的镇静催眠作用及机制。**方法** 采用小鼠自主活动测试仪观察记录小鼠自主活动,协同戊巴比妥钠致小鼠睡眠实验观察花生红衣水提物对小鼠的镇静催眠作用,酶联免疫吸附法(ELISA)测定小鼠脑组织中 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)含量。**结果** 自主活动实验表明,与空白对照组相比,低剂量组花生红衣水提物可抑制小鼠自主活动能力($P < 0.05$);协同戊巴比妥催眠实验结果显示,与空白对照组相比,低剂量组花生红衣水提物显著增加阈下剂量戊巴比妥钠小鼠的入睡率($P < 0.05$),能缩短阈上剂量戊巴比妥钠小鼠的入睡潜伏期($P < 0.05$),延长睡眠持续时间($P < 0.05$);ELISA 测定结果显示,低剂量组花生红衣水提物可显著升高小鼠脑组织中 GABA 含量($P < 0.05$)。花生红衣水提物各剂量组之间不存在量效关系。**结论** 花生红衣水提物有一定的镇静催眠作用,其作用机制可能与提高小鼠脑内 GABA 水平有关。

关键词 花生红衣水提物;镇静催眠;小鼠

中图分类号:R963, R971.3 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)12-388-05

Experimental study of peanut red skin water extract on sedative and hypnotic effects in mice

SUN Tao, LIN Na, LI Jun[△], QI Ruxia, LIN Liwen, ZHANG Peng

(College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the Sedative and hypnotic effects of peanut red skin extract and explore the potential mechanism. **Methods** Sedative-hypnotic experiments were conducted to observe the spontaneous activity in mice and its sleep effect on the superthreshold and subthreshold doses of sodium pentobarbital. ELISA method was employed to detect the contents of GABA in brain of mice. **Results** Low doses of peanut red skin water extract could significantly reduced the number of spontaneous activity in mice ($P < 0.05$), and showed synergic effect on pentobarbital sodium of subthreshold dose by increased the sleep rate of mice ($P < 0.05$), decreased the sleep latency time and prolonged the sleeping time with superthreshold dose of pentobarbital sodium ($P < 0.05$). The ELISA results showed that low doses of peanut red skin water extract could increased the content of GABA in brain of mice significantly ($P < 0.05$). There was no dose-effect relationship among the three dose groups of peanut red skin water extract. **Conclusion** The peanut red water extract has a function of sedative and hypnotic and its mechanism may be related to the increase of GABA level in brain of mice.

Keywords: Peanut red skin water extract; Sedative and hypnotic; Mice

随着社会经济的飞速发展,生活节奏的日益加

快,失眠的发病率逐年攀升,严重危害人类的身心健康,失眠已成为严重的社会和医学问题。目前临床上治疗失眠的药物主要是苯二氮卓类镇静催眠药,但长期服用这些药物不仅会产生头昏、乏力等副作用,而且可产生明显的耐受性、依赖性和“日间宿醉反应”。纯植物提取物在改善睡眠方面有

* [基金项目] 济宁市医药卫生科技项目(2013JNWK52);
济宁医学院青年基金项目(JYQ2011KM011);
山东省医药卫生科技发展计划项目(2017
WS773)

[△] [通信作者] 李军, E-mail: 372425326@qq.com

着独特优势,具有毒副作用小,无成瘾性等特点,是目前研究镇静催眠药物的新方向。花生茎叶提取物有镇静催眠作用^[1-2],花生叶水煎液(落花安神合剂)已应用于临床且疗效显著^[3]。花生红衣(花生的种皮)具有抗氧化、抗过敏、降血糖、降血脂、止血等药理作用^[4],但目前国内外对其镇静催眠作用研究尚未见报道。本文通过对小鼠自主活动、协同戊巴比妥钠催眠作用以及小鼠脑组织中 GABA 含量变化的研究,初步探讨花生红衣水提物的镇静催眠作用及作用机制,为进一步开发利用花生红衣提供基础实验依据和理论支持。

1 材料

1.1 动物

昆明种小鼠,雄性,体重(20 ± 2.0)g,由济宁医学院实验动物中心提供。动物管理均遵循国家实验动物饲养管理条件和使用指南以及济宁医学院实验动物管理条件。

1.2 药物与试剂

花生红衣,购于济宁广联药店中药房;地西洋注射液(湖北制药厂,批号:971101);戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司,批号:F20021216);GABA 试剂盒(厦门慧嘉生物科技有限公司,批号:201505221922)。

1.3 仪器

HH-SJ 数显恒温磁力搅拌油浴锅(金坛市友联仪器研究所);电子天平(北京赛多利仪器系统有限公司);ACS-30 型电子计价秤(武义县金宇衡器有限公司);ZZ-6 小鼠自主活动测试仪(成都泰盟科技有限公司);Thermo MK3 酶标仪(上海赛默科技生物发展有限公司)。

2 方法

2.1 花生红衣水提物的制备^[5]

取花生红衣生 500g,加入 12 倍量的蒸馏水,100℃回流 2 次,每次 2h,过滤,合并两次滤液,用蒸发皿蒸发浓缩成干浸膏,加生理盐水配成浓度为 1250、625、312.5mg/kg 的花生红衣水提物备用。

2.2 花生红衣水提物对小鼠自主活动的影响

取 50 只小鼠,适应性喂养一周后,随机分成 5 组:空白对照组、地西洋阳性对照组(2mg/kg)、花生红衣水提物高、中、低剂量组(1250mg/kg、625mg/kg、312.5mg/kg),每组 10 只。花生红衣各剂

量组每只小鼠每日灌胃给予相应剂量的药物,给药容积为 0.2ml/10g,空白对照组给予等体积生理盐水,1 次/d,连续给药 7d。地西洋阳性对照组灌胃等体积生理盐水,连续 6d,第 7 天时一次性灌胃给予 2mg/kg 地西洋,给药容积为 0.2ml/10g。

小鼠末次给药 30min 后,将各组小鼠放置于自主活动记录仪中,先适应 10min,再开始记录,记录各组小鼠 5min 内的自主活动次数。

2.3 戊巴比妥钠阈下和阈上睡眠剂量测定

2.3.1 阈下剂量^[6] 取 50 只小鼠,随机分为 5 组,每组 10 只。各给药组分别腹腔注射戊巴比妥钠 27、28、29、30mg/kg,空白对照组注射相同容量的生理盐水。记录 15min 内翻正反射消失超过 1min 的小鼠数量,并使之作为入睡指标。

2.3.2 阈上剂量^[6] 取小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只。各给药组分别腹腔注射戊巴比妥钠 32、35、40、45 mg/kg,空白对照组注射等容量的生理盐水。记录 15min 内翻正反射消失超过 1min 的小鼠数量,并使之作为入睡指标。

2.3.3 判断指标^[7] 翻正反射消失:小鼠四肢朝上仰卧 1min 内没有翻转过来,说明已进入翻正反射消失阶段。

翻正反射恢复:小鼠可以自由翻转并且 1min 内不再翻转不过去,说明翻正反射恢复。

入睡潜伏期:从注射药物开始到翻正反射消失之间所用的时间。

睡眠时间:从翻正反射消失到翻正反射恢复所用的时间。

2.4 花生红衣水提物对阈下剂量戊巴比妥钠小鼠入睡率的影响

动物分组、灌胃给药方法同“2.2”,各组小鼠按照相应的药物连续灌胃 7d。并在末次给药后 30min,给各组小鼠腹腔注射戊巴比妥钠阈下剂量 29 mg/kg,给药体积为 0.1ml/10g。观察并记录给药后 15min 内各组小鼠的入睡情况并记录各组小鼠的入睡只数,以翻正反射消失 > 1min 为入睡判断标准,计算各组小鼠睡眠发生百分率(入睡率)。

入睡率(%) = 入睡动物数/动物总数 × 100%

2.5 花生红衣水提物对阈上剂量戊巴比妥钠小鼠入睡潜伏期和睡眠时间的影响

动物分组、灌胃给药方法同“2.2”,各组小鼠按照相应的药物连续灌胃 7d。于末次给药 30min 后,给各组小鼠腹腔注射戊巴比妥钠阈上剂量 40

mg/kg, 给药体积为 0.1 ml/10g。观察并记录各组小鼠的入睡潜伏期及睡眠持续时间。

2.6 小鼠脑组织内 GABA 含量测定

末次药后 30 min, 脱臼处死小鼠, 取出大脑, 冰冷生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 称重, 匀浆机匀浆, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照试剂盒说明书, 采用 ELISA 法测定 GABA 含量。

2.7 脏器系数^[8]

实验结束后, 各小组小鼠脱臼处死前称体重, 解剖取出其心、肝、脾、肺、肾组织, 除去上述器官周围脂肪结缔组织, 用滤纸吸干脏器表面血液后称重, 并计算脏器系数: 脏器湿重(mg)/体重(g)

2.8 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析, 所有多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 花生红衣水提取物对小鼠自主活动的影响

与空白对照组比较, 地西洋阳性对照组和花生红衣低剂量组均可显著减少小鼠 5min 内的自主活动次数和站立次数($P < 0.05$), 表明花生红衣水提取物具有抑制小鼠的自主活动的作用。红衣水提取物 3 剂量组之间不存在量效关系。见表 1。

表 1 花生红衣水提取物对小鼠自主活动的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	小鼠自主活动次数	小鼠站立次数
空白对照组	-	9.625 ± 5.476	41.625 ± 15.771
地西洋阳性对照组	2.0	3.375 ± 2.595 *	14.75 ± 18.57 *
花生红衣高剂量组	1250	3.500 ± 2.673 *	28.625 ± 26.785
花生红衣中剂量组	625	3.375 ± 2.92 *	26.125 ± 31.966
花生红衣低剂量组	312.5	3.375 ± 4.24 *	17.38 ± 10.809 **
F 值		4.092	1.817
P		0.008	0.148

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与地西洋阳性对照组比较, # $P > 0.05$ 。

3.2 戊巴比妥钠阈下、阈上睡眠剂量

戊巴比妥钠 27 mg/kg、28 mg/kg 小鼠入睡率为 0%; 29 mg/kg 小鼠入睡率为 10%; 30、32、35 mg/kg 小鼠入睡率分别为 20%、30%、90%; 40 mg/kg 和 45 mg/kg 小鼠入睡率 100%。因此, 戊巴比

妥钠阈下睡眠剂量确定为 29 mg/kg, 阈上睡眠剂量确定为 40 mg/kg。见表 2。

表 2 不同浓度戊巴比妥钠对小鼠的镇静催眠作用
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	入睡动物数/只	入睡率/%
空白对照组	-	0	0
戊巴比妥钠	27	0	0
	28	0	0
	29	1	10
	30	2	20
	32	3	30
	35	9	90
	40	10	100
	45	10	100

3.3 花生红衣水提取物对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠催眠作用的影响

与空白对照组相比, 地西洋阳性对照组和花生红衣水提取物低剂量组小鼠入睡率明显增加, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而花生红衣水提取物高、中剂量组小鼠入睡率无显著增加。提示花生红衣低剂量组与戊巴比妥钠阈下剂量具有协同作用, 可提高小鼠入睡率。红衣水提取物 3 剂量组之间不存在量效关系。见表 3。

表 3 阈下剂量小鼠入睡只数及入睡率
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	入睡动物数/只	入睡率/%
空白对照组	-	1	10
地西洋阳性对照组	2.0	6	60 *
花生红衣高剂量组	1250	1	10
花生红衣中剂量组	625	0	0
花生红衣低剂量组	312.5	5	50 **

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与地西洋阳性对照组比较, # $P > 0.05$ 。

3.4 花生红衣水提取物对阈上剂量戊巴比妥钠致小鼠催眠作用的影响

与空白对照组相比, 花生红衣水提取物高、中剂量组虽可缩短小鼠睡眠潜伏期并且延长小鼠睡眠持续时间, 但差异并无统计学意义($P > 0.05$); 花生红衣水提取物低剂量组和地西洋阳性对照组均可缩短小鼠入睡潜伏期并且延长小鼠睡眠持续时间,

差异显著($P < 0.05$)。红衣水提物 3 剂量组之间不存在量效关系。见表 4。

表 4 阈上剂量小鼠入睡潜伏期及睡眠时间 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	入睡潜伏期/min	睡眠时间/min
空白对照组	—	5.62 ± 1.56	23.71 ± 22.84
地西洋阳性对照组	2.0	$2.98 \pm 0.59^*$	$81.01 \pm 20.14^*$
花生红衣高剂量组	1250	5.45 ± 1.48	$40.29 \pm 22.07^{**}$
花生红衣中剂量组	625	4.61 ± 1.62	$40.55 \pm 32.53^{**}$
花生红衣低剂量组	312.5	$2.91 \pm 0.93^*$	$58.49 \pm 22.73^{* \#}$
F 值		5.634	6.228
P		0.001	0.001

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与地西洋阳性对照组比较, # $P > 0.05$;与空白对照组比较, ** $P > 0.05$ 。

3.5 花生红衣水提物对小鼠脑内 GABA 含量影响
与空白对照组相比,花生红衣水提物高剂量组虽可升高小鼠脑内 GABA 含量,但差异无统计学意义($P > 0.05$);但地西洋阳性对照组、花生红衣水提物中、低剂量组小鼠脑内 GABA 含量明显升

高,差异显著($P < 0.05$)。花生红衣水提物各剂量组之间无量效关系。见表 5。

表 5 各组小鼠脑组织 GABA 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)		
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	GABA 含量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照组	—	10.87 ± 0.84
地西洋阳性对照组	2.0	$14.42 \pm 0.53^*$
花生红衣高剂量组	1250	$12.01 \pm 0.36^{**}$
花生红衣中剂量组	625	$12.24 \pm 0.96^*$
花生红衣低剂量组	312.5	$13.21 \pm 1.20^{* \#}$
F 值		18.001
P		0.000

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与地西洋阳性对照组比较, # $P > 0.05$;与空白对照比较, ** $P > 0.05$ 。

3.6 花生红衣水提物对小鼠脏器的影响
花生红衣水提物高剂量组脾脏系数与空白对照组相比有统计学意义($P < 0.05$),说明花生红衣水提物高剂量组对小鼠的脾脏可能有损伤作用。见表 6。

表 6 各组小鼠脏器系数($\bar{x} \pm s, n = 10$)						
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	心系数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	肝系数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	脾系数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	肺系数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	肾系数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
空白对照组	—	5.45 ± 1.10	53.95 ± 5.18	5.03 ± 1.06	6.40 ± 0.74	13.35 ± 1.39
地西洋阳性对照组	2.0	5.38 ± 0.83	53.60 ± 5.11	5.76 ± 1.80	8.51 ± 3.50	13.99 ± 1.54
花生红衣高剂量组	1250	4.90 ± 0.75	53.11 ± 4.52	$3.87 \pm 0.79^*$	5.84 ± 0.59	13.08 ± 1.20
花生红衣中剂量组	625	5.54 ± 0.80	51.84 ± 4.33	4.24 ± 0.63	7.03 ± 1.15	12.94 ± 1.27
花生红衣低剂量组	312.5	5.60 ± 1.33	53.68 ± 13.84	$5.01 \pm 2.39^{\#}$	6.45 ± 1.23	12.78 ± 1.31
F 值		0.636	0.099	1.911	2.597	1.001
P		0.640	0.982	0.131	0.053	0.420

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与地西洋阳性对照组比较, # $P > 0.05$ 。

4 讨论

花生茎叶已用于临床治疗失眠,但同属落花生种属的花生红衣是否具有镇静安神作用,国内外尚无相关研究报道。本文旨在初步探索花生红衣的镇静催眠作用及可能的作用机制,为继续寻找开发具有镇静催眠作用的纯天然植物药物奠定基础。
自发活动实验是评价中枢神经系统兴奋状态的常用方法^[9],动物的自发活动情况反映出中枢神经系统的功能状态,中枢神经系统兴奋时动物活动次数增加,中枢神经系统抑制时,动物的自主活动减少。本文结果表明,与空白对照组相比,花生

红衣水提物低剂量组和地西洋阳性对照组小鼠的自发活动次数和站立次数均明显减少($P < 0.05$),且花生红衣水提物低剂量组和阳性对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),说明低剂量花生红衣水提物能显著减少小鼠自主活动次数,降低大脑皮层兴奋性,具有一定的镇静作用。
戊巴比妥钠协同催眠实验是研究镇静催眠药物催眠作用的常用实验之一^[10]。戊巴比妥钠是典型的中枢抑制药,戊巴比妥钠主要通过肝药酶进行代谢,因此对肝药酶有抑制作用的药物也能延长戊巴比妥钠所致实验动物的睡眠时间,为排除此影响,采用了戊巴比妥钠阈下剂量进行实验^[11],同时

还通过阈上剂量戊巴比妥钠实验,观察花生红衣水提物对小鼠失眠情况的影响。本文结果表明,与空白对照组比较,花生红衣水提物低剂量组和阈下剂量戊巴比妥钠合用,可显著增加小鼠入睡率;花生红衣水提物低剂量组和阈上剂量戊巴比妥钠合用,可明显缩短小鼠入睡潜伏期及延长小鼠的睡眠持续时间,而且花生红衣低剂量组和地西洋阳性对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),表明花生红衣水提物具有协同戊巴比妥钠催眠作用。

GABA 为中枢神经系统内最重要的抑制性神经递质,可通过与 GABA 受体($GABA_A$)结合,导致大量 Cl^- 内流,引起细胞膜超极化使神经元兴奋性降低,发挥镇静催眠作用^[12]。本研究发现,与空白对照组相比,花生红衣低剂量组可明显提高小鼠脑组织中 GABA 含量,而且花生红衣低剂量组和地西洋阳性对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),提示花生红衣水提物可能通过提高小鼠脑内 GABA 水平发挥镇静催眠作用。

心、肝、脾、肺、肾这些器官的重量变化,可以反映出动物体内某些器官功能的变化。本文结果表明,与空白对照组相比,花生红衣水提物高剂量组的脾脏系数明显减少($P < 0.05$),表明花生红衣水提物高剂量组可能对小鼠的脾脏有损害作用,花生红衣中、低剂量组对小鼠的各个器官均无损伤作用。

通过本研究,结果显示花生红衣水提物低剂量组镇静催眠效果较好且对动物脏器无损伤。并初步推测花生红衣水提物升高小鼠脑内 GABA 水平可能是其分子机制之一,但是否与脑内其他神经递质有关尚需进一步探索、研究,另外其镇静催眠的具体有效成分还不明确,也有待我们研究、确定。

我国花生产量世界第一,其用于榨油的副产品花生红衣却一直大量被弃置,若能将其开发利用为治疗失眠的食品或药品,必将具有良好的发展前景。

参考文献:

[1] 刘劲松,李莉,陈爱民,等.花生茎叶不同提取部位对

小鼠镇静催眠作用的初步探讨[J].中药材,2012,35(11):1833-1836. DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2012.11.035.

- [2] 冯蓓蓓,陈森,陆逸莹,等.花生枝叶的研究现状[J].吉林中医药,2016,36(2):187-190. DOI:10.13463/j.cnki.jlzyy.2016.02.025.
- [3] 许良.落花安神合剂治疗失眠症 40 例临床疗效观察[J].中成药,2001,23(1):74-75.
- [4] 张慧文,许海燕,马超美.花生红衣研究进展[J].花生学报,2015,44(1):53-59. DOI:10.14001/j.issn.1002-4093.2015.01.010.
- [5] 陆永攀,李欣芮,李越铭,等.花生茎叶水提物、醇提物对小鼠镇静催眠作用的对比研究[J].深圳中西医结合杂志,2015,25(2):17-18. DOI:10.16458/j.cnki.1007-0893.2015.02.008.
- [6] 徐叔云.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002:459-464.
- [7] 宋秀,王谦.合欢叶镇静催眠作用的药理研究[J].赤峰学院学报(自然科学版),2010,26(10):52-53. DOI:10.13398/j.cnki.issn1673-260x.2010.10.019.
- [8] 沙爱龙,孟庆艳,郝海燕.芳香新塔花茶对小鼠镇静催眠、生长发育及免疫器官指数的影响研究[J].中南民族大学学报(自然科学版),2016,35(3):57-61.
- [9] Zu X, Zhang Z, Xiong G, et al. Sedative effects of *Arachis hypogaea* L. stem and leaf extracts on sleep-deprived rats [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2013, 6(2): 601-605. DOI: 10.3892/etm.2013.1182.
- [10] 马澜,全立国,宋美卿,等.蛇床子催眠活性组分对小鼠镇静催眠、学习记忆及宿醉反应的影响[J].中国药房,2016,27(34):4764-4767.
- [11] 王帅,周岳,马富超,等.通体沉香对小鼠催眠和自主活动抑制作用[J].国际药学研究杂志,2016,43(6):1082-1087. DOI:10.13220/j.cnki.jipr.2016.06.010.
- [12] 崔施展,贾东升,谢晓亮,等.枣仁颗粒镇静催眠作用及机制研究[J].食品研究与开发,2017,38(3):173-176.

(收稿日期 2018-05-03)

(本文编辑:石俊强)