

# 基于星形胶质细胞调控作用探讨安寐丹对睡眠剥夺大鼠脑内神经递质的影响\*

纪可<sup>1,2</sup>, 刘玲<sup>1,2\*\*</sup>, 刘福贵<sup>2</sup>, 谭云霞<sup>2</sup>, 李莉<sup>1,2</sup>, 王平<sup>2</sup>

(1. 湖北省中医院 湖北时珍实验室 湖北中医药大学附属医院 武汉 430061;

2. 湖北中医药大学 武汉 430065)

**摘要:**目的 探讨安寐丹对多平台水环境睡眠剥夺大鼠脑内神经递质的影响及机制。方法 50只SD大鼠随机分为空白组(Control组)、模型组(Model组)、艾司唑仑组(Estazolam组)、安寐丹低剂量组(AMD-L组)、安寐丹高剂量组(AMD-H组),每组10只。采用多平台水环境法建立睡眠剥夺模型,每天20h,持续21天。以自主活动分析仪记录大鼠在不同时间点的运动路程、运动时间评估其自主活动度的变化。ELISA检测大鼠皮质谷氨酸(Glu)、 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)含量,Real-time PCR检测NDRG2、GLT-1、GAD65、GAD67 mRNA的相对表达量,Western blot检测NDRG2、p-PI3K、p-Akt、GLT-1、GAD65、GAD67蛋白表达。结果与Control组相比,Model组大鼠活动增加,皮质内GABA浓度下降、Glu浓度升高,GLT-1、GAD65、GAD67mRNA相对表达量及蛋白表达水平降低,p-PI3K、p-AKT蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ ),NDRG2mRNA相对表达量及蛋白表达水平升高( $P<0.01$ );与Model组相比,安寐丹能减少大鼠自主活动,提高皮质内GABA浓度,降低Glu浓度( $P<0.05$ ),增加GLT-1、GAD65、GAD67mRNA相对表达量及蛋白表达水平( $P<0.05$ ),提高p-PI3K、p-AKT蛋白表达水平( $P<0.01$ ),降低NDRG2 mRNA相对表达量及蛋白表达水平( $P<0.01$ )。结论 安寐丹可能通过PI3K/AKT信号通路,调节星形胶质细胞功能,影响脑内神经递质GABA、GLU水平,进而改善睡眠剥夺大鼠的昼夜节律。

**关键词:**安寐丹 睡眠剥夺 昼夜节律 星形胶质细胞

doi: 10.11842/wst.20230727006 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

从生物学角度来看,睡眠是人生命过程中的极为重要的环节,受体内生物节律昼夜节律和代谢平衡的影响。前期研究者对睡眠/觉醒的研究主要集中在神经元上,认为促进睡眠和促进觉醒的神经元交替激活调控人体的睡眠/觉醒周期<sup>[1]</sup>。近年来,一些研究显示脑内星形胶质细胞(Astrocytes, AS)、小胶质细胞等在昼夜节律调节过程中扮演重要角色<sup>[2-3]</sup>。神经元网络复杂的协同作用及其在睡眠-觉醒中的调节机制逐渐引起重视,成为目前研究的热点和前沿领域。

随着社会经济的发展和work节奏的加快,失眠发病率逐年升高。长期睡眠不足不仅影响人体身心健康,还可能降低工作效率<sup>[4]</sup>。目前,治疗失眠症常用的镇静药物有潜在成瘾性和依赖性<sup>[5]</sup>。中医药干预失眠强调从整体论治,具有独特优势,已成为失眠领域的主要研究方向之一。中医历来重视失眠的防治,在辨证施治方面积累了丰富的理论和实践经验。安寐丹源于中医古籍《石室秘录》,主要用于治疗心虚气弱、血不养心导致的心悸、怔忡、不寐等症<sup>[6]</sup>。团队前期研

收稿日期:2023-07-27

修回日期:2023-12-26

\* 湖北省科学技术厅湖北省自然科学基金创新发展联合基金项目(2022CFD138):基于星形胶质细胞调控作用研究安寐丹防治失眠的分子机制,负责人:纪可;国家科学技术部国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1705600):慢性失眠中医诊疗新方案及机制研究,负责人:王平。

\*\* 通讯作者:刘玲,教授,博士研究生导师,主要研究方向:中西医结合治疗神经及精神系统疾病的研究。

究也发现安寐丹可以调节斑马鱼的能量代谢<sup>[7]</sup>,并能通过调节 OXA、OXB 改善睡眠剥夺大鼠的昼夜节律<sup>[8]</sup>,其对睡眠剥夺大鼠的学习记忆能力也有改善作用,机制可能与修复线粒体分裂/融合失衡状态<sup>[9]</sup>有关。

AS 在大脑中参与神经递质和离子稳态、突触和神经元调节、血脑屏障维持等多种重要的生理功能,一些神经退行性疾病、疼痛和情绪障碍的发生发展都与之相关<sup>[10-11]</sup>。AS 对脑区局部和特定神经回路的协调作用被认为是调节睡眠-觉醒周期的重要环节<sup>[12]</sup>。安寐丹可以调节 AS 活化改善失眠模型大鼠海马内 GluNR2A 与 GluNR2B 之间比率,进而改善其学习记忆<sup>[12-13]</sup>,临床研究也发现,安寐丹可能通过升高慢性失眠患者血清 Irisin 的水平,降低血清 GFAP 水平改善其睡眠质量<sup>[14]</sup>。本研究拟从 AS 角度观察安寐丹对睡眠剥夺模型大鼠脑内 GABA、Glu 等神经递质的影响,深入探讨安寐丹改善失眠的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 8 周龄 SD 大鼠 50 只,体质量 200±20 g,由辽宁省实验动物质量检测中心提供,实验动物合格证号:1107262011001043,许可证号:SYXK(鄂)2017-0067。实验在国家中医药管理局老年性痴呆重点实验室进行。本实验获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准(2018IEC018)。

### 1.2 药物及试剂

安寐丹(生酸枣仁 19 g、熟酸枣仁 19 g、茯神 11 g、当归 11 g、人参 11 g、麦冬 11 g、丹参 7 g、五味子 4 g、石菖蒲 4 g、甘草 4 g)在湖北中医药大学附属黄家湖医院购买,通过煎煮、过滤浓缩至 1:1 比例(100% 浓度备用)的中药水煎剂<sup>[8]</sup>。艾司唑仑片(济川药业集团有限公司,批号 H4302190);RNA 提取试剂盒(武汉谷歌生物技术有限公司,批号 1800714),反转录(RT)试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号 RS4501),PI3K(BIOSS 批号 BSM-33219M),P-AKT(Affinity 批号 AF0832)Anti-GAD65 Rabbit pAb、Anti-GAD67 Rabbit pAb、Anti-NDRG2 Rabbit pAb(Servicebio 公司,批号分别为 GB11562、GB11397、GB111833), $\gamma$ -氨基丁酸 ELISA 试剂盒(江苏酶标生物科技有限公司 MB1982A),谷氨酸 ELISA 试剂盒(江苏酶标生物科技有限公司 MB68 68A)。

### 1.3 仪器

自制睡眠剥夺箱,ZH-ZFT 自发活动实验视频分析系统(安徽正华生物仪器设备有限公司),实时荧光定量 PCR 仪(加拿大 Molarray 公司),组织匀浆机(郑州南北生物仪器设备有限公司),多功能酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司),超低温冰箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司),多道电动移液器(德国 Eppendorf 公司),蛋白电泳仪(北京六一生物科技有限公司),滚轴式混合器、旋涡混合器、转移脱色摇床(上海达姆实业有限公司),扫描仪(EPSON V370),化学发光仪(得力 6300)。

## 2 方法

### 2.1 动物模型制备

依照团队前期研究<sup>[13]</sup>,用实验室自制睡眠剥夺箱建立多平台水环境,对大鼠进行睡眠剥夺,每天定时将大鼠放回饲养笼内休息 4 h,持续睡眠剥夺 21 天。

### 2.2 分组与给药

将 50 只大鼠被随机分为空白对照组(Control 组)、模型组(Model 组)、艾司唑仑组(Estazolam 组)、安寐丹低剂量组(AnMeiDan low dose,AMD-L 组)、安寐丹高剂量组(AnMeiDan high dose,AMD-H 组),每组 10 只。造模 14 天后开始灌胃,根据前期的临床观察和课题组的前期研究成果<sup>[15]</sup>,Control 组给予等容 0.9% NaCl 灌胃;Model 组给予等容 0.9% NaCl 灌胃;Estazolam 组给予艾司唑仑(0.09 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌胃;AMD-L 组给予低剂量中药水煎剂(9.09 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、AMD-H 组给予中药水煎剂(18.18 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)灌胃,每天 1 次,连续 2 周。

### 2.3 行为学检测

自主活动分析仪可同步记录动物在一定时间内的运动路程、运动时间等数据,能客观、有效地反映动物自主活动度的改变。在 0:00、6:00、12:00、18:00 共 4 个时间点分别记录大鼠的活动时间,累积计算活动路程及活动时间(每天 8:00-20:00 为光照环境,20:00-次日 8:00 为黑暗环境<sup>[16]</sup>)。

### 2.4 组织取材

行为学检测结束后(取材前)大鼠禁食,取材时现配 10% 水合氯醛进行麻醉。在冰上分离出皮质组织,标本标注后存储于-80℃冰箱备用。

### 2.5 ELISA 检测大鼠皮质谷氨酸(Glu)、 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)含量

依据 ELISA 标准步骤完成操作。倍比稀释的标

表1 各组大鼠黑暗/光照环境下自主活动路程( $\bar{x}\pm s$ )

组别	总活动路程(cm)		总活动时间(s)	
	黑暗	光照	黑暗	光照
Control组	1504.46±225.67	1204.88±198.50	205.01±5.86	197.66±10.10
Model组	1844.33±278.08**	1679.39±214.66**	225.52±4.03**	222.12±3.85**
Estazolam组	1429.84±205.72##	1329.05±180.04##	199.49±12.94##	208.23±7.48##
AMD-L组	1462.80±176.60##	1400.41±145.20##	203.29±10.07##	207.64±6.89##
AMD-H组	1506.97±295071##	1296.63±161.35##	199.42±10.07##	207.76±11.77##

注:与Control组比较,\*\* $P<0.01$ ;与Model组比较,## $P<0.01$ 。

表2 各组大鼠皮质内GLU、GABA浓度( $\bar{x}\pm s$ )

组别	GLU( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	GABA( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Control组	53.20±1.98	11.34±2.22
Model组	66.28±8.60**	8.24±0.28**
Estazolam组	55.03±2.50#	10.24±0.46#
AMD-L组	56.25±4.63#	9.89±0.33
AMD-H组	54.23±3.29#	10.10±0.42#

注:与Control组比较,\*\* $P<0.01$ ;与Model组比较,# $P<0.05$ 。

表3 大鼠皮质NDRG2、GLT-1、GAD65、GAD67 mRNA 相对表达量( $\bar{x}\pm s$ )

组别	NDRG2	GAD65	GLT-1	GAD67
Control组	1.00±0.05	1.00±0.06	1.03±0.06	1.00±0.03
Model组	1.97±0.09**	0.22±0.02**	0.59±0.13**	0.24±0.03**
Estazolam组	1.41±0.15##	0.40±0.10##	0.91±0.11##	0.37±0.10#
AMD-L组	1.47±0.09##	0.33±0.03#	0.85±0.14#	0.35±0.09#
AMD-H组	1.32±0.09##	0.36±0.09##	0.95±0.11##	0.37±0.10##

注:与Control组比较,\*\* $P<0.01$ ;与Model组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

准品孔出现颜色梯度后加终止液(每孔100  $\mu\text{L}$ ),混匀后即刻测量OD450值(3 min内)。根据标准品浓度及OD值绘制拟合曲线,求出待测样品的浓度。

### 2.6 Real-time PCR 检测 NDRG2、GLT-1、GAD65、GAD67 mRNA 的表达

按PCR相关步骤完成操作。以GAPDH为内参,采用PCR仪检测各组NDRG2、GLT-1、GAD65、GAD67 mRNA相对表达量,系统自动计算Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组mRNA水平。

### 2.7 Western blot 检测 NDRG2、p-PI3K、p-Akt、GLT-1、GAD65、GAD67 蛋白的表达

依Western blot步骤完成操作。NDRG2、Akt、GAD65、GAD67、GLT-1一抗的稀释倍数为1:1000,PI3K一抗的稀释倍数为1:500,二抗的稀释倍数为1:5000。 $\beta$ -actin蛋白作为内参,蛋白条带的灰度值用Image J软件测定,计算目的蛋白与 $\beta$ -actin的比值。

### 2.8 统计学处理

统计学处理使用SPSS 22.0软件,数据以均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示;统计采用单因素方差分析等方法; $P<0.05$ 有统计学差异。采用Graphpad Prism 8.0进行图形绘制。

## 3 结果

### 3.1 大鼠自主活动情况

Model组大鼠在黑暗环境和光照环境中的活动路程较Control组均有所增加,活动时间也明显增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。Estazolam组、AMD-L组、AMD-H组大鼠在黑暗环境和光照环境中的活动路程较Model组均有所缩短,总活动时间减少,有统计学差异( $P<0.01$ ),见表1。

### 3.2 大鼠皮质GABA、Glu的ELISA检验结果

Model组大鼠皮质内GABA浓度较Control组显著下降,而Glu浓度较Control组显著升高( $P<0.01$ );Estazolam组、AMD-H组大鼠皮质内GABA浓度较Model组升高,Glu浓度较Model组降低( $P<0.05$ )。AMD-L组皮质内Glu浓度较Model组降低( $P<0.05$ ),而GABA浓度与Model组比较有升高趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表2。

### 3.3 大鼠皮质NDRG2、GLT-1、GAD65、GAD67 mRNA 的表达

与Control组比较,Model组大鼠皮质内GAD65、GAD67 mRNA相对表达量显著下降( $P<0.01$ );Estazolam组、AMD-L组、AMD-H组大鼠皮质内GAD65、GAD67 mRNA相对表达量较Model组均有不同程度升高( $P<0.05$ ),见表3。

与Control组相比,Model组大鼠皮质内NDRG2 mRNA相对表达量显著升高,GLT-1 mRNA相对表达量则显著降低( $P<0.01$ );与Model组相比,Estazolam组、AMD-L组、AMD-H组大鼠皮质内NDRG2 mRNA

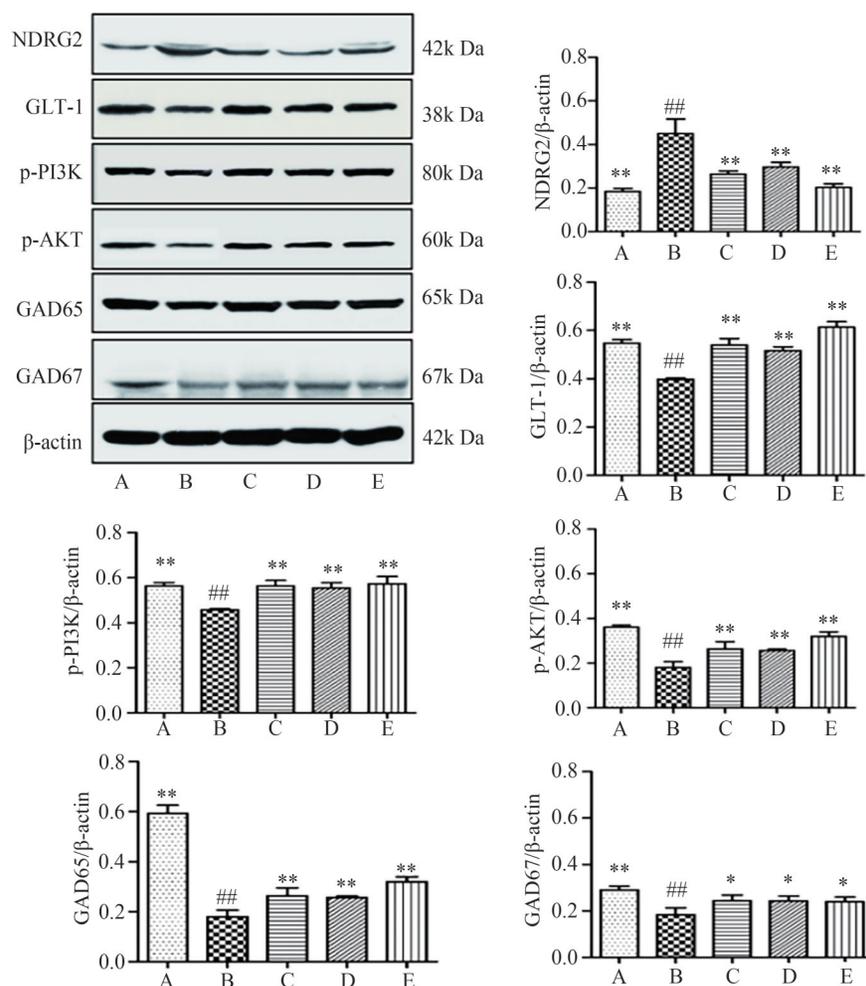


图1 大鼠皮质NDRG2、p-PI3K、p-AKT、GLT-1、GAD65、GAD67蛋白表达

注:与Control组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与Model组比较,## $P<0.01$ 。

相对表达量显著降低( $P<0.01$ )。而Estazolam组、AMD-L组、AMD-H组大鼠皮质GLT-1 mRNA相对表达量较Model组均有不同程度升高( $P<0.05$ ),见表3。

### 3.4 大鼠皮质NDRG2、p-PI3K、p-AKT、GLT-1、GAD65、GAD67蛋白表达

Model组大鼠皮质内NDRG2蛋白表达水平较Control组升高( $P<0.01$ )。Estazolam组、AMD-L组、AMD-H组大鼠皮质内NDRG2蛋白表达水平较Model组显著降低( $P<0.01$ ),如图1。

与Control组比较,Model组大鼠皮质内GLT-1、GAD65、GAD67蛋白表达水平显著下降,差异有统计学意义( $P<0.01$ );Estazolam组、AMD-L组、AMD-H组大鼠皮质内GLT-1、GAD65、GAD67蛋白表达水平升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),如图1。

与Control组比较,Model组大鼠皮质p-PI3K、p-

AKT蛋白的表达水平显著降低( $P<0.01$ )。Estazolam组、AMD-L组、AMD-H组大鼠皮质内p-PI3K、p-AKT蛋白表达水平较Model组上升,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),如图1。

## 4 讨论

常见的模拟人类失眠特征的啮齿动物睡眠剥夺方法主要包括水平平台环境剥夺法、轻柔刺激剥夺法、化学试剂刺激法、应激刺激睡眠剥夺法和强迫运动剥夺法<sup>[17]</sup>。睡眠剥夺后,动物会出现睡眠潜伏期延长、睡眠时间缩短、频繁觉醒和睡眠碎片化等失眠样表现,为昼夜节律调控、能量代谢以及药物反应等方面的分子生物学研究提供了基础。动物自主活动是神经精神药物研究中常见的观测指标,动物昼夜活动(活动时间、路程、频率等)的变化能侧面反映昼夜节律的变

化,也能在一定程度上反映中枢神经系统的兴奋状态<sup>[18]</sup>,可用于中药镇静作用的评价<sup>[19]</sup>。本次实验中,Model组大鼠的活动路程和活动时间较Control组增加,提示睡眠剥夺大鼠兴奋性增加。经过安寐丹干预,睡眠剥夺大鼠的活动时间较Model组有所缩短,累积活动路程较Model组也有所减少,提示安寐丹可能通过降低中枢神经兴奋性发挥作用。

安寐丹组方中人参味甘,气温,益气健脾,安神益智;酸枣仁,味甘、酸,性平,归肝、胆、心经,生炒两用可补肝阴、宁心神;当归甘、辛、温,归肝、心、脾经,功擅补血、活血;丹参、麦冬清心养阴除烦;石菖蒲化痰开窍;五味子酸甘敛阴,茯神宁心安神,诸药合用,共奏培元固本、养心安神之功。现代药理研究发现,酸枣仁主要含有三萜皂苷类、黄酮类、脂肪油等化学成分。其中,皂苷类(如酸枣仁皂苷A)和黄酮类成分(如斯皮诺素)是发挥镇静催眠作用的主要物质,均能缩短小鼠的运动时间,降低小鼠协调运动的能力<sup>[20]</sup>。孙易娜等<sup>[21]</sup>观察到,人参-石菖蒲药对在缩短小鼠入睡潜伏期、延长小鼠睡眠时间、改善睡眠剥夺大鼠学习记忆等方面的作用明显优于单用人参或石菖蒲,其机制可能与调节脑内相关神经递质的表达有关。游秋云等<sup>[22]</sup>研究发现,茯神的中枢抑制作用较茯苓更为显著,验证了临床上茯神宁心安神的功效。

Glu与GABA的代谢失衡与失眠的发生发展密切相关。本次研究结果也发现,睡眠剥夺模型大鼠皮质GABA浓度较Control组明显下降,Glu浓度则明显升高,提示睡眠剥夺改变了大鼠脑内神经兴奋与神经抑制的平衡。而经过安寐丹的干预,大鼠(AMD-H组)皮质内GABA浓度较Model组升高,Glu浓度则有所降低,提示安寐丹可能通过改变脑内Glu与GABA的水平调节睡眠剥夺模型大鼠的神经兴奋性。

“谷氨酰胺-谷氨酸-氨基丁酸”代谢环路是脑内Glu和GABA主要的循环代谢途径。在星形胶质细胞中高表达的GLT-1可以将星形胶质细胞外的谷氨酸迅速摄入到细胞内,胞内的谷氨酸通过谷氨酰胺合成酶转化为谷氨酰胺,抑制性GABA能神经元特异性表达谷氨酰胺脱羧酶,谷氨酸可经由GAD65或GAD67转化为GABA<sup>[23]</sup>。本次实验发现,Model组大鼠皮质内GAD65、GAD67、GLT-1蛋白表达水平较Control组均显著下降,而Estazolam组、AMD-L组、AMD-H组大鼠皮质内GAD65、GAD67、GLT-1蛋白表达水平较Model

组均有不同程度升高。由此推测,安寐丹可能通过提高GAD65、GAD67、GLT-1蛋白表达调节脑内Glu和GABA的水平。

Poskanzer等<sup>[24]</sup>研究发现,星形胶质细胞会对昼夜节律产生一定的影响,其机制可能与调节谷氨酸水平有关。Brancaccio等<sup>[25]</sup>、Fisk等<sup>[26]</sup>研究也证实,在夜间,星形胶质细胞是较为活跃的,会通过调节细胞外谷氨酸水平抑制SCN神经元的活动,而且SCN星形胶质细胞细胞内时钟的体细胞遗传重编程能够重塑成年小鼠的昼夜行为节律。NDRG2是一种新发现的星形细胞应激反应基因,参与星形细胞的形态和功能调控,Flügge等<sup>[27]</sup>发现,在共聚焦显微镜下发现,NDRG2与谷氨酸能、GABA能神经末梢标记物关系密切。Takahashi等<sup>[28]</sup>发现长期使用抗抑郁药或电休克治疗可以降低大鼠额叶皮层NDRG2 mRNA和蛋白质的表达,其推测NDRG2可能通过调节神经可塑性发挥抗抑郁作用。Ichikawa等<sup>[29]</sup>研究结果也显示,抗抑郁药丙咪嗪通过下调NDRG2进而激活PI3K/AKT信号通路发挥抗抑郁作用。Li等<sup>[30]</sup>研究结果表明,NDRG2缺陷小鼠脑内谷氨酸水平和兴奋性神经传递明显增加,且会出现注意力缺陷/多动样症状,提示星形胶质细胞清除功能受损会引发脑内兴奋性和抑制性信号不平衡,导致行为异常。

因此,从目前研究结果来看,脑内NDRG2的表达水平对情绪及相关行为有重要影响。NDRG2可能是多种神经系统疾病的潜在靶点。而且近年来研究显示星形胶质细胞有其自身节律性,伴随着胶质纤维酸性蛋白和GLT-1的表达变化,星形胶质细胞会表现出从星形到原生质的形态变化<sup>[31]</sup>。在NDRG2对GLT1的表观遗传调控机制方面,Cheng等<sup>[32]</sup>研究发现,在神经性疼痛模型大鼠脊髓中NDRG2表达增多,而抑制NDRG2可通过JAK/STAT3信号通路显著提高星形胶质细胞GLT-1的表达,下调促炎细胞因子的水平,缓解大鼠脊髓背角炎症反应。最近有研究也证实,NDRG2可以直接与NF- $\kappa$ B相互作用,通过抑制星形胶质细胞中NF- $\kappa$ B p65亚基的核输入和DNA结合活性,降低GLT1转录,影响谷氨酸摄取<sup>[33]</sup>。总体来看,NDRG2可能通过JAK/STAT3、PI3K/AKT、NF- $\kappa$ B等多个信号通路调控星形胶质细胞GLT-1的表达。

综上所述,安寐丹可能通过调节睡眠剥夺大鼠脑

内GABA、Glu等神经递质的水平来恢复昼夜节律,其机制与通过PI3K、Akt信号通路调控星形胶质细胞活

化、改善脑内神经递质平衡有关,而星形胶质细胞在昼夜节律中调节机制仍有待进一步研究。

## 参考文献

- Bishir M, Bhat A, Essa M M, *et al.* Sleep deprivation and neurological disorders. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:5764017.
- Que M, Li Y, Wang X, *et al.* Role of astrocytes in sleep deprivation: accomplices, resisters, or bystanders?. *Front Cell Neurosci*, 2023, 17: 1188306.
- Vanini G, Torterolo P. Sleep-wake neurobiology. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1297:65-82.
- Laugsand L E, Strand L B, Vatten L J, *et al.* Insomnia symptoms and risk for unintentional fatal injuries—the HUNT Study. *Sleep*, 2014, 37(11):1777-1786.
- 中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组. 中国成人失眠诊断与治疗指南. *中华神经科杂志*, 2012, 45(7):534-540.
- 徐波, 王平. 安寐丹源流组方探溯与研究评析. *中华中医药杂志*, 2022, 37(8):4330-4333.
- 汪卿, 游秋云, 丁莉, 等. 安寐丹干预斑马鱼睡眠剥夺模型昼夜节律及能量代谢作用机制研究. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(12):4873-4880.
- 徐波, 谢光璟, 夏婧, 等. 安寐丹调控OXA/CREB/PER1信号通路改善SD模型大鼠昼夜节律紊乱. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(1):298-308.
- 谢光璟, 徐波, 黄攀攀, 等. 安寐丹通过修复线粒体分裂/融合失衡状态改善睡眠剥夺模型大鼠学习记忆水平. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(9):2986-2993.
- Nassan M, Videnovic A. Circadian rhythms in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*, 2022, 18(1):7-24.
- Kunz D, Oster H, Rawashdeh O, *et al.* Sleep and circadian rhythms in  $\alpha$ -synucleinopathies—Perspectives for disease modification. *Acta Physiol*, 2023, 238(1):e13966.
- 纪可. 中药安神方治疗慢性失眠的临床研究及机制探讨. 武汉: 湖北中医药大学博士学位论文, 2021.
- 谭云霞, 纪可, 刘福贵, 等. 安寐丹通过调控星形胶质细胞活性改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆能力. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7):18-25.
- 杨杰, 谭云霞, 王平, 等. 安寐丹对慢性失眠患者血清BDNF、GFAP和Irisin的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(16):170-177.
- 徐波, 夏婧, 蔡铭, 等. 安寐丹对不同周期睡眠剥夺模型大鼠昼夜节律、学习记忆及食欲素的影响. *中华中医药杂志*, 2021, 36(3):1677-1682.
- 薄文集, 龙清华, 王平. 酸枣仁汤对6月龄APP/PS1双转基因痴呆小鼠昼夜节律及视交叉上核节律基因mRNA表达的影响. *中华中医药杂志*, 2019, 34(9):3960-3963.
- 王洛萱, 李劲草, 张有志. 常用失眠动物模型及其睡眠结构特征研究进展. *中国药理学与毒理学杂志*, 2020, 34(5):389-394.
- 梁凡凡, 张鑫, 蒋茜茜, 等. 舒眠胶囊的镇静催眠作用及其机制. *西安交通大学学报(医学版)*, 2021, 42(1):168-174.
- 买文丽, 王琼, 刘新民, 等. 小鼠自主活动实验中的评价指标. *中国实验动物学报*, 2008, 16(3):172-175, 244.
- Jiang J G, Huang X J, Chen J, *et al.* Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins, and polysaccharides extracted from *Semen ziziphus jujube*. *Nat Prod Res*, 2007, 21(4):310-320.
- 孙易娜, 章程鹏, 周燕萍, 等. 人参-石菖蒲药对安神益智作用的动物行为学研究及其机制的初步探索. *时珍国医国药*, 2019, 30(3): 576-578.
- 游秋云, 王平. 茯苓、茯神水煎液对小鼠镇静催眠作用的比较研究. *湖北中医药大学学报*, 2013, 15(2):15-17.
- Miller C B, Rae C D, Green M A, *et al.* An objective short sleep insomnia disorder subtype is associated with reduced brain metabolite concentrations *in vivo*: a preliminary magnetic resonance spectroscopy assessment. *Sleep*, 2017, 40(11):11.
- Poskanzer KE, Yuste R. Astrocytes regulate cortical state switching *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(19):E2675-E2684.
- Brancaccio M, Patton A P, Chesham J E, *et al.* Astrocytes control circadian timekeeping in the suprachiasmatic nucleus via glutamatergic signaling. *Neuron*, 2017, 93(6):1420-1435.
- Fisk A S, Tam S K E, Brown L A, *et al.* Light and cognition: roles for circadian rhythms, sleep, and arousal. *Front Neurol*, 2018, 9:56.
- Flügge G, Araya-Callis C, Garea-Rodríguez E, *et al.* NDRG2 as a marker protein for brain astrocytes. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(1): 31-41.
- Takahashi K, Yamada M, Ohata H, *et al.* Expression of Ndr2 in the rat frontal cortex after antidepressant and electroconvulsive treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2005, 8(3):381-389.
- Ichikawa T, Nakahata S, Tamura T, *et al.* The loss of NDRG2 expression improves depressive behavior through increased phosphorylation of GSK3 $\beta$ . *Cell Signal*, 2015, 27(10):2087-2098.
- Li Y, Yin A, Sun X, *et al.* Deficiency of tumor suppressor NDRG2 leads to attention deficit and hyperactive behavior. *J Clin Invest*, 2017, 127(12):4270-4284.
- Verkhatsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiol Rev*, 2018, 98(1):239-389.
- Cheng H, Zhang L, Xia F, *et al.* Astrocytic NDRG2 is critical in the maintenance of neuropathic pain. *Brain Behav Immun*, 2020, 89:300-313.
- Zhou J, Tao K, Guo K, *et al.* Suppression of NDRG2 alleviates brain injury after intracerebral hemorrhage through mitigating astrocyte-driven glutamate neurotoxicity via NF- $\kappa$ B/GLT1 signaling. *Brain Res*, 2020, 1729:146600.

## To Investigate the Effects of Anmeidan on Neurotransmitters in Sleep Deprived Rats Based on the Regulation of Astrocytes

JI Ke<sup>1,2</sup>, LIU Ling<sup>1,2</sup>, LIU Fugui<sup>2</sup>, TAN Yunxia<sup>2</sup>, LI Li<sup>1,2</sup>, WANG Ping<sup>2</sup>

(1. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hubei Shizhen Laboratory, Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; 2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effects of Anmian Dan on neurotransmitters in the brain of model rats, which were sleep deprived by multi-platform water environment. Methods Fifty SD rats were randomly and evenly divided into 5 groups with 10 rats in each group, which were blank control group (Control group), Model group (Model group), Estazolam group (Estazolam group), low dose group (AMD-L group) and high dose group (AMD-H group). The rats were subjected to sleep deprivation in a multi-platform water environment for 20 hours per day for 21 days. The movement distance and movement time of rats at different time points were recorded by autonomous activity analyzer to evaluate the changes of autonomous activity. The contents of glutamic acid (Glu) and gamma-aminobutyric acid (GABA) were detected by ELISA, and the mRNA expression levels of NDRG2, GLT-1, GAD65 and GAD67 were detected by Real-time PCR. Western blot was used to detect the expressions of NDRG2, p-PI3K, p-Akt, GLT-1, GAD65 and GAD67. Results The Model group was more active than the Control group, and the concentration of GABA in the cortex of the Model group was decreased and the concentration of Glu was increased. The mRNA and protein expression levels of NDRG2 in Model group were higher than those in Control group ( $P<0.01$ ), but the mRNA and protein expression levels of GLT-1, GAD65 and GAD67 in model group were lower than those in Control group ( $P<0.01$ ). The protein expression levels of P-PI3K and P-AKT in the cortex of model group were significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with Model group, Anmeidan could reduce the autonomic activity of sleep deprived rats, increase the concentration of GABA, decrease the concentration of Glu in cortex ( $P<0.05$ ), and increase the mRNA relative expression levels and protein expression levels of GLT-1, GAD65 and GAD67 ( $P<0.05$ ). The expression levels of P-PI3K and P-Akt were increased ( $P<0.01$ ), and mRNA and protein expression levels of NDRG2 were decreased ( $P<0.01$ ). Conclusion Anmian Dan may regulate the activity of astrocytes and affect the levels of neurotransmitters GABA and GLU in the brain through the PI3K/AKT signaling pathway, thus playing a role in improving the circadian rhythm disturbance in sleep-deprived rats.

**Keywords:** Anmeidan, Sleep deprivation, Circadian rhythm, Astrocytes

(责任编辑: 李青)