

褪黑素对睡眠的调节作用及与脑内氨基酸递质的关系

王芳 李经才 徐峰 何瑜 唐超(沈阳 110016 沈阳药科大学时间生物学家)

摘要 目的:研究褪黑素促眠、昼夜节律作用及其与脑内氨基酸递质的关系。方法:以翻正反射为指标研究褪黑素对小鼠睡眠及其昼夜节律的影响。采用纸电泳-双波长扫描法,测定褪黑素对小鼠不同脑区中 γ -氨基丁酸(GABA)和谷氨酸(Glu)含量的影响。结果:褪黑素能明显促进小鼠睡眠,其药效强度依赖于给药的时辰。褪黑素可使小鼠下丘脑内 γ -氨基丁酸含量明显升高。但对谷氨酸水平无明显影响。结论:褪黑素促眠作用可能与小鼠下丘脑中 γ -氨基丁酸含量升高有关。

关键词 褪黑素;睡眠;昼夜节律; γ -氨基丁酸;谷氨酸

The effects of melatonin on sleep and its relationship with amino acid neurotransmitters in brain in mice

Wang Fang (Wang F), Li Jingcai (Li JC), Xu Feng (Xu F), et al (Shenyang Pharmaceutical University Chronobiology Laboratory, Shenyang 110016)

ABSTRACT **OBJECTIVE**:To study the effects of melatonin (MT) on sleep and amino acid neurotransmitters in brain. **METHODS**:To determine the sleep time and circadian sleep rhythm by observing the loss of the righting reflex method in mice. The concentration of amino acid neurotransmitters (GABA, Glu) in brain was determined by the paper electrophoretic and dual wavelength thin layer scanning method. **RESULTS**:Melatonin could significantly prolong sleep time induced by sodium pentobarbital and markedly elevate the level of GABA but not of Glu in hypothalamus. **CONCLUSION**:It supposed that the effect of melatonin on sleep might be related to elevated level of GABA which is one of its mechanisms in mice. **KEY WORDS** melatonin, sleep, circadian rhythm, GABA, glutamic acid

褪黑素(melatonin, MT)主要由松果腺分泌,具有多种生物活性。自其人工合成并作为保健食品上市以来,国内外掀起褪黑素研究热潮。在褪黑素诸多功能中,其诱导自然生理性睡眠、矫正紊乱的睡眠-觉醒节律的作用尤为引人注目。但也有些实验发现某时间点或某种实验条件下,褪黑素并未起到促眠作用,人们对褪黑素是否具有直接促眠作用仍存在争议。目前关于褪黑素通过何种途径来调节睡眠尚不甚清楚。本文通过褪黑素诱导睡眠的昼夜节律性及褪黑素与不同脑区中氨基酸类神经递质含量的关系来探讨其促眠作用。

1 材料与方法

1.1 药品与仪器

褪黑素(江苏常州医药技术开发公司,纯度99.5%),戊巴比妥钠(上海行知化工厂), γ -氨基丁酸(上海试剂三厂),L-谷氨酸(上海康达氨基酸厂),DYY-3型电

泳仪(北京六一仪器厂),CS-910双波长薄层扫描仪(日本岛津制作所)。

1.2 实验动物

昆明种雄性小鼠,18~22g(沈阳药科大学动物室,动物合格证号:辽实动字第003号)。

1.3 统计处理

各组计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,各组质反应采用 χ^2 检验显著性。

1.4 褪黑素对戊巴比妥钠阈下催眠剂量的影响

小鼠po褪黑素30min后,再ip戊巴比妥钠25mg/kg,以翻正反射消失为指标,15min内翻正反射消失达1min以上的小鼠为发生睡眠的小鼠。同时做溶媒对照。实验在安静、室温25℃左右进行,于08:00开始进行实验。

1.5 褪黑素延长戊巴比妥钠睡眠时间

小鼠 po 褪黑素 30 min 后,再 ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg。以翻正反射消失到恢复之间的时间为睡眠期。同时做溶媒对照。实验在安静、室温 25℃左右进行,于 08:00 开始实验。

1.6 褪黑素对小鼠睡眠昼夜节律的影响

于 08:00,12:00,16:00,20:00,00:00,04:00 六个时间点,分别观察褪黑素延长小鼠戊巴比妥钠睡眠时间的变化,实验方法同 1.5。

1.7 褪黑素对小鼠不同脑区 γ -氨基丁酸(GABA)和谷氨酸(Glu)的影响

小鼠 ip 褪黑素 30 min 后,断头处死,迅速取出下丘脑、大脑皮层或脑干。用三氯乙酸制成 10%的匀浆,3000r/min 离心 10 min,取上清液,加入正丁醇-石油醚振荡,静置数分钟,在层析纸上点样,然后在吡啶-醋酸-水电泳液中电泳 30 min。茚三酮-丙酮显色后,用双波长薄层扫描仪在 510/700nm 处扫描,与同时点样的标准品对比,计算每克脑组织中 GABA 和 Glu 含量。于 08:00 开始实验。

2 结果

2.1 褪黑素对戊巴比妥钠阈下催眠剂量的影响

小鼠随机分为 4 组,戊巴比妥钠阈下催眠剂量为 25 mg/kg。由表 1 可见,po 褪黑素 120 mg/kg 可明显增加小鼠入睡只数,对戊巴比妥钠阈下催眠剂量有协同作用。

表 1 褪黑素对戊巴比妥钠阈下催眠剂量的影响/ $n=10$

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	入睡只数
对照组	-	0
安定	5	8 ^{*1}
MT	60	0
MT	120	5 ^{*2}

注:与对照组比较,^{*1} $P<0.01$;^{*2} $P<0.05$

2.2 褪黑素延长戊巴比妥钠睡眠时间

小鼠随机分为 4 组。戊巴比妥钠剂量为 40 mg/kg。由表 2 可见,po 褪黑素 30 和 15 mg/kg 均可显著延长戊巴比妥钠睡眠时间。

表 2 褪黑素对戊巴比妥钠睡眠时间的影响/ $\bar{x}\pm s,n=10\sim 12$

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	睡眠时间/min
对照组	-	56.3 \pm 24.5
安定	5	218.0 \pm 46.2 ^{*1}
MT	30	139.3 \pm 47.6 ^{*1}
MT	15	114.5 \pm 68.2 ^{*2}

注:与对照组比较,^{*1} $P<0.01$;^{*2} $P<0.05$

2.3 褪黑素对戊巴比妥钠诱导睡眠昼夜节律的影响

由图 1 可见,对照组戊巴比妥钠睡眠时间呈现节律性变化,峰值出现在 12:00 时,谷值在 20:00 时。施用褪黑素 15 mg/kg 后可延长戊巴比妥钠的睡眠时间,但延长的程度依赖于给药时间,可见节律位相提前,峰值出现在 08:00,谷值出现在 16:00。褪黑素延长戊巴比妥钠睡眠时间的作用因昼夜时辰而异。

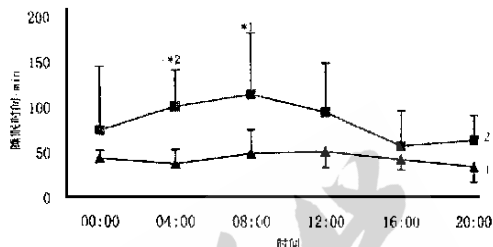


图 1 褪黑素对小鼠睡眠昼夜节律的影响

注:1 - 对照组;2 - 褪黑素;与对照组比较,^{*1} $P<0.05$;^{*2} $P<0.01$ ($n=10$)

2.4 褪黑素对小鼠下丘脑、大脑皮层、脑干 GABA 含量的影响

小鼠随机分为 3 组。由表 3 可见,褪黑素 15 mg/kg 能明显升高下丘脑中 GABA 的含量,但对其它脑区 GABA 含量的升高无明显影响。

表 3 褪黑素对不同脑区 γ -氨基丁酸含量的影响/ $\bar{x}\pm s,n=6\sim 8$

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	下丘脑/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	大脑皮层/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	脑干/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
对照组	-	3.09 \pm 0.64	1.69 \pm 0.18	0.95 \pm 0.62
MT	15	4.44 \pm 0.74 [*]	1.86 \pm 0.67	1.35 \pm 0.69
MT	5	4.58 \pm 1.80	1.71 \pm 0.55	1.36 \pm 0.75

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$

2.5 褪黑素对小鼠下丘脑、大脑皮层、脑干 Glu 含量的影响

小鼠随机分为 3 组。由表 4 可见,褪黑素 15 或 5 mg/kg 对小鼠各脑区 Glu 含量无明显影响。

表 4 褪黑素对不同脑区谷氨酸含量的影响/ $\bar{x}\pm s,n=6\sim 8$

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	下丘脑/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	大脑皮层/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	脑干/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
对照组	-	8.15 \pm 0.68	10.55 \pm 2.06	3.87 \pm 1.17
MT	15	8.59 \pm 2.24	10.88 \pm 1.99	4.84 \pm 1.26
MT	5	8.69 \pm 2.62	9.88 \pm 2.38	4.49 \pm 0.56

3 讨论

内源性褪黑素具有独特的夜高昼低的合成与分泌节律,这种生理性节律受光周期控制,由于褪黑素昼夜

分泌最多,亦称为“暗激素”^[1],它在调节昼夜节律如睡眠-觉醒方面起着重要的作用^[2]。有些学者认为,褪黑素主要作用是调定睡眠发生的时间,纠正紊乱的睡眠-觉醒节律,而无直接催眠作用^[3]。本实验采用延长戊巴比妥钠睡眠时间的方法来观察褪黑素对睡眠的影响,每次实验均采用专人观察。结果发现单次给予褪黑素能提高戊巴比妥钠阈下催眠剂量小鼠入睡的只数,延长戊巴比妥钠睡眠时间,可见,单次给予褪黑素具有直接的催眠作用。

多年来大多数动物及人体实验肯定了褪黑素对睡眠的调节作用,但实验结果并不一致,如 James 等(1987年)于夜间 23:00 给健康成人口服褪黑素 1,5 mg/kg 时,未发现褪黑素的催眠作用。本文通过褪黑素对延长小鼠睡眠的昼夜节律性实验发现,褪黑素延长戊巴比妥钠睡眠时间呈现昼夜节律性,褪黑素在不同时间点催眠效果有所不同,曲线峰值在 08:00,谷值在 16:00,分别为小鼠静息相开始和后期。提示 MT 催眠作用具有昼夜时间依赖性。因此,在临床应用 MT 时应注意 MT 的时间药理特性,以发挥最佳效果。

目前,对于褪黑素通过何种途径调节睡眠所知甚少。已发现,褪黑素的许多中枢作用,如镇静、镇痛、抗惊厥、抗焦虑等均与 GABA 能神经系统有关^[4]。GABA 是广泛存在于哺乳类动物中枢神经系统的一种重要的抑制性神经递质。侧脑室注射 γ -氨基丁酸可使猫睡眠时间延长^[5],给视叶前区损伤或其它失眠模型的猫注射 GABA 拟似剂时,可使猫恢复睡眠^[6]。另外,应用微透析技术发现,在睡眠时下丘脑后部 GABA 浓度升

高^[6]。这些实验可说明脑内,特别是下丘脑中 GABA 参与睡眠-觉醒过程的调节。本实验发现,催眠剂量的褪黑素能使下丘脑 GABA 含量升高,说明褪黑素的睡眠调节作用与下丘脑 GABA 含量有关。参与 GABA 合成的酶是谷氨酸脱羧酶(GAD),GAD 在神经系统中的分布与 GABA 水平相平行,并且,GAD 活性强的部位 GABA 含量也高,GABA 依赖于 GAD 来维持在神经系统中的稳态水平。褪黑素是否通过增强 GAD 活力,增加 GABA 含量来调节睡眠?值得进一步证实。

参考文献

- 1 Li JC, Xu F. Influence of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin. *Biol Signals*, 1997, 6(2): 77.
- 2 汪晓飞,刘志民,彭树勋.褪黑素:一个多功能的光周期信号. *生理科学进展*, 1998, 29(3): 281.
- 3 Tzischinsky O, Lavie P. Melatonin possesses time-dependent hypotic effects. *Sleep*, 1994, 17: 638.
- 4 Golombek DA, Pevet P, Cardinali DP. Melatonin effects on behavior: Possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci. Biobehav Rev*, 1996, 20(3): 403.
- 5 孙兵,郝洪谦,郑开俊,等.侧脑室注射 γ -氨基丁酸对猫睡眠-觉醒的影响. *中国应用生理学杂志*, 1997, 13(1): 56.
- 6 Sherin JE, Shiromani PI, McCarley RW, et al. Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *SCIENCE*, 1996, 271(12): 216.