神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001395

北冬虫夏草镇静催眠作用及机制研究

安丽萍，孙晶波，赵南晰，陶彤彤，杜培革
（北华大学药学院、吉林省生物大分子功能开发与应用工程实验室，吉林 132013）

【摘 要】目的：以小鼠自主活动次数、脑内乙酰胆碱（acetylcholine，Ach）、谷氨酸（glutamate，Glu）、5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）及 γ-氨基丁酸（gamma amino butyric acid，GABA）含量为指标，探讨北冬虫夏草多糖（*Cordyceps militaris* polysaccharide，CMP）和总黄酮（*Cordyceps militaris* flavonoids，CMF）的镇静、催眠作用及机制。**方法**：将 84 只 ICR（institute of cancer research）小鼠随机平分为空白对照组，CMP 50 mg/kg、100 mg/kg 和 200 mg/kg 剂量组，CMF 50 mg/kg、100 mg/kg 和 200 mg/kg 剂量组 7 个实验组。分组灌胃给药 14 d 后，于自主活动仪上观察并记录小鼠自主活动次数；给药 30 d 后采用酶联免疫吸附分析法（enzyme-linked immuno sorbent assay，ELISA）测定小鼠脑组织中 5-HT、Ach、Glu 和 GABA 含量。采用噻唑蓝（methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide，MTT）比色法测定 CMP 和 CMF 对大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤（rat adrenal pheochromocytoma cell line，PC12）细胞增殖的影响。**结果**：自主活动实验结果显示 CMP 及 CMF 100 mg/kg 和 200 mg/kg 剂量组小鼠的活动次数均较空白对照组明显减少（P=0.000）；神经递质水平测定结果表明，与空白对照组比较，CMP 100 mg/kg、200 mg/kg 剂量组和 CMF 50 mg/kg 剂量组均能显著降低小鼠脑内 Glu 水平（P=0.000），CMP 和 CMF 200 mg/kg 剂量组均能明显降低小鼠脑内 Ach 水平（P 值分别为 0.003 和0.000）、升高 5-HT 水平（P=0.000），但对 GABA 水平无明显影响。MTT 实验结果表明，CMP 和 CMF 对 PC12 细胞均无毒性，而且 CMP 的 1 μg 和 0.1 μg 组还能显著促进正常 PC12 细胞增殖（P=0.000）。**结论**：北冬虫夏草具有一定的镇静催眠作用，升高脑内 5-HT 水平、降低 Ach、Glu 水平可能是其发挥镇静催眠作用的主要机制之一。

【关键词】镇静催眠；北冬虫夏草；5-羟色氨；谷氨酸
【中图分类号】R965.1 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-12-14

Study on the sedative and hypnotic effect and mechanism of Cordyceps Militaris

An Liping, Sun Jingbo, Zhao Nanxi, Tao Tongtong, Du Peige
(Pharmaceutical College, Jilin Province Biological Macromolecule Function Development and Application Engineering Laboratory, Beihua University)

【Abstract】*Objective*: To study the sedative and hypnotic effect and mechanism of Cordyceps militaris polysaccharide (CMP) and Cordyceps militaris flavonoids (CMF) on the base of the automatic activity of mice and contents of acetylcholine (Ach), glutamate (Glu), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and gamma amino butyric acid (GABA) in mice's brain. ***Methods***: Totally 84 ICR mice were randomly divided into 7 groups and orally administrated with water, CMP 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg and CMF 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg respectively. Fourteen days later, the automatic activities of ICR mice were observed and recorded. Thirty days later, contents of 5-HT, Ach, Glu and GABA in mice's brain were determined by ELASA method. The effect of CMP and CMF on the proliferation of PC12 cells was detected by MTT assay. ***Results***: Automatic activity analysis showed that the independent activity frequency was significantly lower in CMP(100 mg/kg and 200 mg/kg) and CMF(100 mg/kg and 200 mg/kg) groups than in control group (P=0.000). Results of neurotransmitter levels showed that Glu levels were significantly lower in CMP(100 mg/kg and 200 mg/kg) and CMF(50 mg/kg) groups(P=0.000) than in control group; the Ach levels were significantly lower in CMP(200 mg/kg) and CMF(200 mg/kg) groups than in control group(P values were 0.003 and 0.000 respectively), while 5-HT levels were completely opposite to the Ach levels in these two groups(P=0.000). No change was found according to the GABA level in mice's brain. MTT assay results showed that no toxicity has been noticed and CMP with 1 μg and 0.1 μg groups could also promote the cell proliferation of PC12. ***Conclusion***: The results showed that polysaccharide and flavonoids of Cordyceps militaris had significant sedative-hypnotic effect. The mechanism may be related to increase 5-HT level and decreased Ach and Glu levels in brain.

【Key words】sedative and hypnotic effect; Cordyceps militaris; 5-hydroxytryptamine; glutamate

作者介绍：安丽萍，Email：630114130@qq.com，
研究方向：微生物与生化药学。
通信作者：孙晶波，Email：312033734@qq.com。

基金项目：吉林市科技计划资助项目（编号：201464045、201464051、201464063）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170912.1121.010.html（2017-09-12）

北冬虫夏草[*Cordyceps militaris*(L.)Link]又名蛹虫草、北虫草，属子囊菌亚门麦角菌科虫草属，与冬虫夏草互为同属异种。北冬虫夏草为国内外公认的药食同用真菌，多年研究表明，北冬虫夏草具有抗疲劳[1]、延缓衰老、调节免疫力，以及镇静、镇痛等作用。其中陈敬民等[2]研究表明，北冬虫夏草粉末小鼠灌胃给药具有一定的镇静催眠作用，刘洁等[3]研究表明，北冬虫夏草水煎剂灌胃给药对小鼠具有镇静作用，说明北冬虫夏草的镇静催眠有效部位可能是多糖等水溶性成分。但二人均未对其作用机制进一步研究。除多糖、虫草素、腺苷外，黄酮也是北冬虫夏草中较多的成分。很多具有镇静催眠作用的中药如酸枣仁[4]、淫羊藿等，其中的黄酮也是发挥镇静催眠作用的重要物质基础。失眠是目前临床上最常见的疾病之一，对患者的影响不仅在生活质量和身体健康上，严重者还会引发多种躯体和精神疾病[5]。因此，研发效果好、毒副作用低的抗失眠药物具有重要的意义。鉴于上述原因，研究人员针对北冬虫夏草中总黄酮和多糖的镇静催眠作用进行了研究，以期为北冬虫夏草的进一步开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 北冬虫夏草 购自吉林省蚕业科学研究院。

1.1.2 实验试剂 乙酰胆碱(acetylcholine,Ach)、谷氨酸(glutamate,Glu)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)及γ-氨基丁酸(gamma amino butyric acid,GABA)试剂盒和大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(rat adrenal pheochromocytoma cell line,PC12)细胞株购自北京鼎国试剂公司；杜尔伯科极限必需培养基(dulbecco's modification of eagle's medium Dulbecco,DMEM)购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司(NZM1301)；胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司(20150918)；噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide,MTT)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司(51L10156)；其他试剂均为市售分析纯。

1.1.3 实验动物 ICR(institute of cancer research)小鼠，18~20 mg，雄性，购于吉林省长春市亿斯实验动物技术有限责任公司，动物质量合格证号：SCXK(吉)-2011-0004。

1.2 实验方法

1.2.1 北冬虫夏草多糖(*Cordyceps militaris* polysaccharide,CMP)的制备 经正交试验 $L_9(3^4)$ 确定 CMP 最佳提取工艺为：加 30 倍于北冬虫夏草质量的蒸馏水、于 90 ℃水浴中浸提 3 次，每次 7 h。所得粗多糖加 2%活性炭脱色、Sevage 法脱蛋白；得精制多糖。精密称取多糖适量，配成 40 mg/mL 的水溶液供镇静催眠试验用。

1.2.2 北冬虫夏草总黄酮(*Cordyceps militaris* flavonoids,CMF)的制备 按照参考文献[6]方法提取 CMF，精密称取总黄酮适量，加蒸馏水配制成 40 mg/mL 的水溶液供镇静催眠试验用。

1.2.3 自主活动试验 84 只 ICR 小鼠随机分为 7 组，每组 12 只。分为空白对照组(给予同容积的蒸馏水)，CMP50、CMP100、CMP200 剂量组(依次为 CMP 的 50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg 剂量组)，CMF50、CMF100、CMF200 剂量组(依次为 CMF 的 50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg 剂量组)。各组按上述剂量灌胃给药，连续给药 14 d，末次给药 50 min 后，将小鼠依次放入 ZZ-6 小鼠自主活动仪(成都泰盟科技有限公司)中，适应环境 5 min 后，连续记录 5 min 内的自主活动次数。

1.2.4 小鼠脑组织中 5-HT、Ach、Glu、GABA 的含量测定 给药 30 d 后，小鼠断髓处死后取其全脑，剪碎后精密称取 0.5 g 脑组织与 4.5 mL pH=7.4 的 PBS 共匀浆 2 min，于 5430R 小型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf)中 3 000 r/min、4 ℃条件下离心 20 min，取上清液，放入 EP 管中备用。根据酶联免疫分析试剂盒说明书要求，采用 ELISA 法于 Infinite M200 光吸收酶标仪(瑞士 TECAN)测定小鼠脑组织中 5-HT、Ach、Glu、GABA 的含量。

1.2.5 MTT 实验 PC12 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液在 37 ℃、5% CO_2 孵育箱内培养，以 0.25% 胰酶消化传代，每 2 d 换液 1 次。将细胞悬液按每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔细胞培养板，在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养数小时使细胞贴壁。根据实验目的对 CMP 和 CMF 进行分组(分别为 1 μg，0.1 μg 和 0.01 μg)。每组设 6 个平行孔，每孔加培养液 200 μL，置于 CO_2 培养箱中，37 ℃继续培养 48 h。每孔加入 MTT 溶液 20 μL，37 ℃继续孵育 4 h，小心吸出上清液，每孔加入 150 μL DMSO，振荡 10 min，使蓝色结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长在酶标仪上测定吸光度(absorbance,A)值，取其平均值。每项实验至少重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件处理各组数据，结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多样本均数比较用单因素方差分析，其中两两比较：自主活动性和 Glu 采用 Tukey 法，Ach、5-HT、GABA 和 PC12 细胞采用 Dunnett T3 法。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 CMP 和 CMF 对小鼠自主活动影响的结果

自主活动实验结果表明，7 组小鼠活动次数的差异具有统计学意义($F=38.756$，$P=0.000$)。其他各组与空白对照组两两比较结果显示，除 CMF50[(101 ± 11)次]剂量组外，CMP50

[(93 ± 17)次]、CMP100[(75 ± 12)次]、CMP200[(50 ± 5)次]、CMF100[(86 ± 9)次]和 CMF200[(64 ± 12)次] 5 个剂量组均能明显减少小鼠的自主活动次数(P<0.05)。空白对照组小鼠的活动情况即是正常小鼠的活动情况，其活动相对较活跃，在 5 min 内活动次数可达(110 ± 12)次，给药组小鼠的活跃度相对于空白对照组均有所降低，而且随着 CMP 和 CMF 用量的增加，小鼠自主活动减少的次数增加。

2.2 CMP 和 CMF 对小鼠脑内 Glu、Ach、5-HT 和 GABA 含量影响的结果

7 组小鼠脑内神经递质的方差分析结果分别为 Glu(F=7.535，P=0.000)、Ach(F=16.426，P=0.000)、5-HT(F=12.241，P=0.000)和 GABA(F=4.015，P=0.001)。两两比较结果表明，CMP 和 CMF 各组小鼠脑内 Glu 的含量均较空白对照组明显降低(P<0.05)，而对 Ach 和 5-HT 水平的影响只有多糖和总黄酮的高剂量组具有统计学差异(P<0.05)。

Glu 和 Ach 是维持觉醒的重要物质，本研究中不同剂量的北冬虫夏草多糖(CMP 组)和总黄酮(CMF 组)均具有一定程度降低二者在脑内含量的作用，表明其具有一定的镇静催眠作用，详见表 1。

表 1 北冬虫夏草多糖及总黄酮对小鼠脑中 Glu、Ach、5-HT和 GABA 含量的影响($\bar{x} \pm s$，n=12)

Tab.1 Effect of CMP and CMF on the contents of Glu，Ach，5-Ht and GABA in mice brain($\bar{x} \pm s$，n=12)

组别	Glu (μmol/g)	Ach (pmol/g)	5-HT (ng/g)	GABA (μmol/g)
空白对照	1.63 ± 0.18	2.34 ± 0.30	1.21 ± 0.19	2.48 ± 0.32
CMP50	1.38 ± 0.25[a]	2.19 ± 0.15	1.39 ± 0.35	2.31 ± 0.21
CMP100	1.27 ± 0.21[a]	2.10 ± 0.10	1.48 ± 0.34	2.43 ± 0.22
CMP200	1.18 ± 0.11[a]	1.82 ± 0.24[a]	1.90 ± 0.26[a]	2.73 ± 0.28
CMF50	1.17 ± 0.19[a]	2.08 ± 0.14	1.22 ± 0.13	2.49 ± 0.33
CMF100	1.27 ± 0.13[a]	2.04 ± 0.19	1.32 ± 0.16	2.64 ± 0.26
CMF200	1.32 ± 0.26[a]	1.56 ± 0.32[a]	1.58 ± 0.09[a]	2.79 ± 0.41
F 值	7.535	16.426	12.241	4.015
P 值	0.000	0.000	0.000	0.001

注：a，与空白对照组比较，P<0.05

2.3 MTT 实验结果

MTT 实验结果表明，各组之间差异具有统计学意义(F=705.718，P=0.000)。与空白对照组(0.725 ± 0.001)相比，CMP 1 μg(0.802 ± 0.001)和 CMP 0.1 μg(0.751 ± 0.002)剂量组吸光度值明显增加(P<0.05)。而 CMP 0.01 μg(0.728 ± 0.001)、CMF 1 μg(0.727 ± 0.004)、CMF 0.1 μg(0.727 ± 0.004)和CMF 0.01 μg(0.727 ± 0.003)剂量组与空白对照组相比均无统计学意义(P>0.05)。这一结果表明，CMP 和 CMF 对 PC12 细胞均未显示出毒性，而且，中、高剂量的多糖还能够促进 PC12 细胞的生长。

3 讨 论

睡眠和觉醒是人类生命活动中的最基本行为之一，二者的平衡主要通过多种神经递质如 5-HT、Glu、Ach、GABA、DA 和 NA 等的控制和调节，某一递质水平的失衡将会导致失眠。失眠的治疗药物中，中药类镇静催眠药因副作用小且无成瘾性，用量呈现上升趋势，显示出巨大的市场前景。具有镇静催眠作用的中草药种类较多，如始载于清代吴仪洛《本草从新》的名贵中药材冬虫夏草，具有补虚损、益精气、止咳化痰等功效，《中华本草》收载其具有抗炎、提高机体免疫力、镇静催眠、抗肿瘤、延缓衰老等功效。但是，国家食品药品监督管理总局于 2016 年 2 月 4 日颁布的“总局关于冬虫夏草类产品的消费提示”[7]可能会改变冬虫夏草的命运。提示表明，所检验的冬虫夏草、冬虫夏草粉及纯粉片产品中，砷含量为 4.4~9.9 mg/kg。有关专家分析研判，保健食品国家安全标准中砷限量值为 1.0 mg/kg，因此，长期食用冬虫夏草、冬虫夏草粉及纯粉片等产品会造成砷摄入过量，并可能在人体内蓄积中毒。幸运的是，国家卫生部于 2009 年 3 月公布的新资源食品北冬虫夏草与冬虫夏草同属子囊菌亚门麦角菌科虫草属，众多研究报道表明二者具有相似的功效[1,3]。但有关北冬虫夏草镇静催眠作用的研究还不够深入，因此，本文对北冬虫夏草中的多糖和总黄酮的镇静催眠作用及对 PC12 细胞的毒性进行了系统的研究。

通过对小鼠自主活动的影响试验可直观验证并衡量药物对中枢神经系统所能够产生的兴奋或抑制作用。本研究结果表明，北冬虫夏草的多糖及总黄酮均有较好地减少小鼠自主活动次数的作用，表明其具有良好的抑制中枢神经系统的作用。5-HT 作为上行激活系统的重要组成部分，在维持觉醒和警觉状态中发挥重要作用。5-HT 又称血清素，是中枢抑制性递质褪黑素的前体，当 5-HT 含量提高时，中枢褪黑激素的含量也会随之增加，使得睡眠质量更好[8]。因此，5-HT 不仅能够通过与自身受体结合促进睡眠的发生，还对其他神经通路产生相应的作用而发挥同样的作用。本研究结果显示，北冬虫夏草多糖及总黄酮均能够提高小鼠脑内 5-HT 水平，降低小鼠的中枢神经兴奋性，进而促进小鼠睡眠状态的发生。GABA 是中枢神经系统内最重要的抑制

性神经递质，在中枢系统分布广泛，20%~40%中枢突触中的神经递质都以 GABA 为主。GABA 在体内是由 Glu 经谷氨酸脱羧酶(GAD)脱羧而成，并发挥突触后抑制作用。有研究表明，睡眠时脑组织中 GABA 含量较清醒时升高 15%[9]。而 Glu 是神经系统中主要的兴奋性递质，在失眠中起重要作用[10]。Glu 在脑组织中含量的增多可能是失眠的原因。因此，GABA 和 Glu 的共同作用与中枢神经系统兴奋性密切相关，二者平衡与否是维持正常睡眠的重要前提。本研究表明，多糖不同剂量组均能够明显降低小鼠脑内 Glu 水平，其中 CMP100、CMP200 剂量组达到极显著水平（P=0.000）；CMF50（P=0.000）、CMF100（P=0.001）和 CMF200（P=0.005）剂量组也能明显降低小鼠脑内 Glu 水平。但北冬虫夏草多糖和总黄酮对于GABA 的影响则不明显（P>0.05）。Ach 是第一个被发现的神经递质，对中枢及外周神经系统具有重要的作用，也是维持机体觉醒的重要神经递质之一[11]。本研究揭示北冬虫夏草不同提取物对小鼠脑内 Ach 水平的影响：多糖及总黄酮各剂量组均能降低小鼠脑内 Ach 含量，其中多糖 CMP200 剂量组（P=0.003）和总黄酮 CMF200 剂量组（P=0.001）均达到极显著水平。综上所述，北冬虫夏草多糖和总黄酮的镇静催眠作用主要通过提高脑内 5-HT 水平、降低 Ach 和 Glu 水平而发挥作用，而对 GABA 的影响不明显。

PC12 细胞为大鼠嗜铬细胞株，分化的 PC12 细胞在形态和功能上与神经元非常相似，因此被广泛应用于神经细胞凋亡、神经细胞分化等方面的研究[12]。为研究 CMP 和 CMF 是否具有细胞毒性，本研究观察了不同剂量的 CMP 和 CMF 对 PC12 细胞生长的影响，结果表明，两类成分对 PC12 细胞均无毒性，且多糖的中、高剂量组还具有显著促进 PC12 细胞增殖的作用。

北冬虫夏草为药食同源食物，容易被大众接受。与西药相比，中药具有多层次、多环节、多靶点的药理学作用，在辨证论治中医理论指导下，对病因病机把握的审慎及灵活性，具有疗效明确、稳定等优势，而且对失眠症患者的负性情绪变化也具有一定的调节作用。单味中药治疗失眠症的优势在于易于进行质量控制及成分分析，有利于后期开发应用。因此，本研究结果可以为北冬虫夏草在该方面的研究提供一定的科学依据。

参 考 文 献

[1] 王立强，王 卓，于 淼，等.北冬虫夏草提取物抗应激和运动性疲劳的实验研究[J].时珍国医国药，2014，25(1)：33-35.

[2] 陈敬民，李友娣，洪庚辛.蛹虫草的镇静催眠作用[J].中药药理与临床，1997，13(6)：44-45.

[3] 刘 洁，杨 旭，陈 正，等. 蚕蛹虫草镇静及性激素样作用的研究[J].白求恩医科大学学报，1994，20(1)：14-16.

[4] 北京理工大学珠海学院. 镇静催眠复方中药酸枣仁汤临床前研究[Z]. 国家科技成果，2008.

[5] Mellinger GD，Balter MB，Uhlenhuth EH. Insomnia and its treatment：prevalence and correlates[J]. Arch Gen Psychiatry，1985，42(3)：225-232.

[6] 孙晶波，于 晶，安丽萍，等. 不同来源北冬虫夏草中总黄酮的提取及含量测定[J]. 北方园艺，2015，39(13)：137-139.

[7] 国家食品药品监督管理总局.总局关于冬虫夏草类产品的消费提示[EB/OL]. (2016-02-04)[2015-12-14]. http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0051/144020.html

[8] 林腊梅. 酸枣仁汤对肝血虚失眠模型大鼠神经递质的影响[D]. 武汉：湖北中医药大学，2014.

[9] Sherin JE，Elmpuist JK，Torrealba F，et al. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat[J]. J Neuronsci，1998，18(12)：4705-4721.

[10] Yamane H，Tomonaga S，Suenage R，et al. Intracerebroventricular injection of glutathione and its derivative induces sedative and hypnotic effects under an acute stress in neonatal chicks[J]. Neuroscience Letters，2007，418(1)：87-91.

[11] 徐煜彬，徐志立，李明玉，等. 茯苓及其化学拆分组分学习记忆及镇静催眠的性味药理学研究[J]. 中草药，2014，45(11)：1577-1584.

[12] 郑 颖，王 辉，郭国庆，等. 大蒜多糖抗氧化活性及其对 PC12 细胞增殖的影响[J]. 暨南大学学报(医学版)，2008，29(2)：110-114.

（责任编辑：冉明会）