

五味子冻干粉改善睡眠剥夺果蝇睡眠作用的实验研究

□王晓蕾* 李 飞 李廷利*

(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘 要:目的:探讨五味子冻干粉改善睡眠剥夺果蝇睡眠的作用。方法:在恒温、恒湿、自动光控条件下,以7日龄果蝇作为观察对象,分别采用光照和机械刺激两种不同的方法,复制果蝇的睡眠剥夺模型。利用果蝇活动监测仪(DAMS),以静止时间持续5min以上作为睡眠标准,观察以8%五味子冻干粉连续给药6天(雌果蝇)或给药4天(雄果蝇)后,果蝇睡眠时间的变化。结果:两种方法均可剥夺果蝇的睡眠,与正常果蝇相比,睡眠剥夺果蝇的睡眠时间明显缩短($P<0.01$)。给予五味子冻干粉后,无论光照刺激还是机械刺激所致睡眠剥夺果蝇的睡眠时间均明显增加,与睡眠剥夺模型对照组比较,具有显著性差异($P<0.01$)。结论:8%五味子冻干粉对睡眠剥夺果蝇的睡眠有一定改善作用。

关键词:五味子 果蝇 睡眠剥夺

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.03.020

五味子为木兰科(Magnoliaceae)多年生落叶木质藤本植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实,习称“北五味子”。始载于东汉《神农本草经》,位列上品,能治“劳伤,羸瘦,补不足。强阴,益男子精”。五味子具有滋阴和阳,敛阳入阴,协调脏腑,以达安神定志之功效,临床上常用其配以其它药物治疗心阴不足、心失所养之心悸怔忡、失眠健忘等病症,且疗效显著。据文献报道^[1],五味子水煎液能延长正常大鼠的总睡眠时间(TST)。

果蝇个体小,繁殖周期短,繁殖力强,且雌、雄果蝇容易分辨;与人类具有相似的睡眠周期及多种同源基因^[2];胚胎易于遗传修饰,便于构建研究需要的

转基因果蝇^[3],众多优点使其已经成为睡眠研究的新型模式生物。本文通过果蝇活动监测仪,分别以光照和机械刺激两种不同方法对其睡眠进行剥夺,观察五味子冻干粉对睡眠剥夺果蝇睡眠的改善作用。

一、实验材料

1. 实验动物

野生型黑腹果蝇, Canton S 品系(北京大学生命科学学院提供)。

2. 实验药物

五味子(*Fructus Schisandrae Chinensis*)冻干粉,外观:冻型饱满,复水性好,呈深褐色,网状疏松,冻干粉生药含量为 $4g \cdot g^{-1}$ (黑龙江中医药大学中试车间,批号:20070325)。

收稿日期:2009-11-02

修回日期:2009-12-11

* 联系人:王晓蕾,硕士研究生,主要研究方向:中药药理, Tel: 0451-82196294, E-mail: okwxl@163.com; 李廷利,教授,博士生导师,主要研究方向:中药药理, Tel: 0451-82193038, E-mail: litingli8888@sohu.com。

3. 实验试剂

玉米粉(食品级),蔗糖(分析纯,天津市化学试剂一厂,批号:20070410),琼脂粉(细菌学分析级,产地日本),高活性酵母粉(食品级,安琪酵母股份有限公司,批号:20071221),丙酸(天津市光复精细化工研究所,批号:20061008),乙醇(分析级,天津市永大化学试剂开发中心,批号:20081016)。

4. 实验仪器

果蝇活动监测系统(DAMS, Trikinetics Inc. USA),果蝇二氧化碳麻醉装置(自制),雌雄分离装置(自制),Sleep Nullifying Apparatus 果蝇睡眠剥夺装置(自制)。

二、实验环境

温度:24±1℃;湿度:50%~60%;光照:12h 自动亮-暗循环(7:00 开灯,19:00 关灯)。

三、实验方法

1. 五味子冻干粉的制备

取五味子原药材 500g,粉碎,加 8 倍量水浸泡 2h,煮沸 30min,过滤,将滤渣再加 5 倍量水煎煮 20min。合并滤液,水浴蒸干(70℃)成膏状,冷冻干燥 48h,得冻干粉 125g,生药含量为 4g·g⁻¹。

2. 果蝇培养基制备

(1) 基础培养基配制。

培养果蝇的器皿要严格消毒。玉米粉 14g+蔗糖 10.3g+琼脂 1g+蒸馏水 153mL,搅拌并加热,煮沸 2min;稍凉后加入 1g 酵母粉混匀,再加入丙酸 0.8mL,混匀,倒入果蝇培养管,每管培养基厚度约为 2cm。冷却 1h 后倒置,24h 后方可使用。

(2) 药物培养基配制。

在基础培养基原料中加入五味子冻干粉 14.4g,与原配料一起搅拌并加热,煮沸 2min;其后方法同上,制得质量分数为 8% 药物培养基。分入多个培养管中,每个培养管含五味子冻干粉 0.96g。

(3) 果蝇活动监测及数据收集。

上午 7:00 收集 12h 内羽化未交配的处女蝇,CO₂ 气体麻醉后,雌雄分组,分别移入新鲜的培养基玻璃管,标明雌雄及日龄。第 6 日将实验所需的雌雄果蝇分别经一个开口仅供一只果蝇通过的漏斗,逐个装入细小玻璃管(5mm×65mm,一端内装入果蝇培养基的食物后用黑色小帽或石蜡密封,另一端用棉球封住),并将细小玻璃管嵌入到果蝇活动监测器上,每

台监测器可同时监测 32 只果蝇的活动情况。此监测器直接连接到计算机,通过 DAMS 数据采集软件自动记录果蝇即时活动次数。监测器发出的红外光束横穿细小玻璃管中部,果蝇每次从玻璃管中部经过时阻断红外光束,计算机自动记录 1 次。DAMS 数据采集软件以 5min 为单位自动记录一次果蝇活动次数。若 5min 以内活动次数记录为零,即果蝇静止时间持续 5min 以上时,此休息状态符合睡眠行为为标准,果蝇处于睡眠状态,记为果蝇睡眠时间^[4]。

(4) 五味子冻干粉改善光照刺激睡眠剥夺模型果蝇睡眠作用。

依据前期实验结果确定给药量,新生果蝇分为 3 组,每组雌雄各 32 只。空白对照组正常饲养,模型对照组和给药组雌果蝇在 8% 药物培养管中给药 6 天,雄果蝇在 8% 药物培养管中给药 4 天。各组皆于第 6 日置入 DAMS,空白对照组正常监测,模型对照组与给药组置于光控制箱中适应 1 天,第 7 日上午 7:00 正式监测,第 7 日晚 19:00 熄灯后,从 20:00 开始,每个整点恢复光照 10min,持续至第 8 日上午 7:00,均以 DAMS 监测第 7 日^[5]上午 7:00~第 8 日上午 7:00 果蝇的自主活动情况,并计算 24h 平均每只果蝇睡眠总时间。

(5) 五味子冻干粉改善机械刺激睡眠剥夺模型果蝇睡眠作用。

依据前期实验结果确定给药量,新生果蝇分为 3 组,每组雌雄各 32 只。空白对照组正常饲养,模型对照组和给药组雌果蝇在 8% 药物培养管中给药 6 天,雄果蝇在 8% 药物培养管中给药 4 天。各组皆于第 6 日置入 DAMS,空白对照组正常监测,模型对照组与给药组置于 Sleep Nullifying Apparatus(SNAS)果蝇睡眠剥夺装置^[6]中适应 1 天,第 7 日上午 7:00 正式监测。SNAS 结构是一个在发动机控制下可沿其主轴转动的型材框架,此框架可以顺时针旋转 180°后再逆时针返回,每完成一次为一个周期,每分钟完成 5 个周期,在每次旋转的最低点,监测管下降 1cm。此仪器于第 7 日下午 19:00 开始运行,连续刺激 12h,造成果蝇失眠模型。均以 DAMS 监测第 7 日上午 7:00~第 8 日上午 7:00 果蝇的自主活动情况,并计算 24h 平均每只果蝇睡眠总时间。

四、实验结果

本研究采用 F 检验比较各组间差异。结果如下:

1. 五味子冻干粉改善光照刺激睡眠剥夺果蝇睡眠作用的影响(见表1)

与空白对照组比较,模型对照组果蝇睡眠时间明显减少($P<0.01$),表明光照刺激睡眠剥夺模型复制成功;与模型对照组比较,给药组果蝇睡眠时间明显延长,具有极显著性差异($P<0.01$),表明五味子冻干粉对光照刺激睡眠剥夺模型果蝇的睡眠有改善作用。

2. 五味子冻干粉改善机械刺激睡眠剥夺果蝇睡眠作用的影响(见表2)

与空白对照组比较,模型对照组果蝇睡眠时间均明显减少($P<0.01$),表明机械刺激睡眠剥夺成功;与模型对照组比较,给药组果蝇睡眠时间明显延长,具有极显著差异($P<0.01$),表明五味子冻干粉对机械刺激睡眠剥夺模型果蝇的睡眠有一定改善作用。

五、讨 论

睡眠剥夺是指机体由于自身生理、病理因素或环境的影响而丧失了生理所需睡眠量的状态。复制睡眠剥夺模型是采用人工技术减少正常睡眠量,造成睡眠障碍,以此作为评价睡眠功能及睡眠障碍机制研究的重要指标。随着现代社会生活节奏的加快

和特殊部门的工作需要,睡眠剥夺日益成为有害健康的重要因素。研究改善睡眠剥夺的药物对提高人类的睡眠质量具有重要意义。

正常果蝇具有基本的昼夜节律,其存在取决于果蝇感光器官的感光性。视觉信号由光感受器细胞产生,然后依次经过薄板、髓质、小叶及小叶板进行处理,最后到达中央脑的各个脑结构,形成了果蝇视觉信息处理的神经通路。光照刺激改变了外部光照环境,进而通过神经通路改变了果蝇正常的昼夜节律,从而成功复制出睡眠剥夺模型。五味子冻干粉改善睡眠剥夺果蝇睡眠的作用机理可能在于降低了感光器官对光线的敏感性。

本实验从睡眠剥夺方面考察了中药五味子冻干粉对果蝇睡眠的影响,结果表明其对两种方法造成的睡眠剥夺均有一定改善作用,但对雌雄果蝇的睡眠时间改善有所不同,其产生的原因可能是性激素的影响,具体机制有待进一步研究。在验证五味子改善睡眠作用的同时,也确认了果蝇作为睡眠研究模式生物的可操作性,并为开展和指导果蝇睡眠的中药干预提供合理研究范式。

参考文献

- 1 黄莉莉,李廷利,郭冷秋,等.五味子对自由活动大鼠睡眠时相的影响.中药药理与临床,2007,23(5):126~127.
- 2 Reiter L T, Potocki L, Chien S, et al. A systematic analysis of human disease associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. Genome Research, 2001, 11 (6):1114~1125.
- 3 Muqit M M K, Feany M B. Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach. Nature Rev Neurosci, 2002, 3(3):237~243.
- 4 B.van Swinderen, R.Andretic. Arousal in *Drosophila*. Behavioural Processes, 2003, (64):133~144.
- 5 Quan Yuan, William J. Joiner, Amita Sehgal. A Sleep-Promoting Role for the *Drosophila* Serotonin Receptor 1A. Current Biology, 2006, 16(11):1051~1062.
- 6 Huber,R., Hill, S.L, Holladay, C, et al. Sleep homeostasis in *Drosophila melanogaster*. Sleep, 2004, 27 :628 ~ 639.

表1 五味子冻干粉对光照刺激睡眠剥夺果蝇睡眠时间的影响($\bar{x}\pm SD$)

分组	样本数/只		睡眠时间/min	
	♀	♂	♀	♂
空白对照组	32	31	707.34±155.05	1001.77±152.85
模型对照组	31	27	507.10±212.18**	805.56±173.03**
给药组	32	31	847.19±167.95##	1025.65±161.06##

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型对照组比较,## $P<0.01$ 。

表2 五味子冻干粉对机械刺激睡眠剥夺果蝇睡眠时间的影响($\bar{x}\pm SD$)

分组	样本数/只		睡眠时间/min	
	♀	♂	♀	♂
空白对照组	32	31	707.34±155.05	1001.77±152.85
模型对照组	32	32	316.88±196.32**	523.75±178.60**
给药组	32	32	593.44±216.67##	899.69±215.76##

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型对照组比较,## $P<0.01$ 。

Effect of Fructus Schisandrae Chinensis Freeze-Dried Powder on Improving the Sleep of Sleep-Deprived *Drosophila Melanogaster*

Wang Xiaolei, Li Fei, Li Tingli

(Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

Abstract: This work aimed to study the effect of Fructus Schisandrae Chinensis Freeze-dried Powder on improving the sleep of sleep-deprived *Drosophila melanogaster*. Under the standard conditions of constant temperature, humidity, automatically controlled lighting, 7-day-old drosophilae were observed. Their sleep was deprived by illumination or mechanical stimulation to establish sleep deprivation models. An infrared drosophila activity monitor system (DAMS) was used to observe and analyze the recorded data and define drosophilae's quiescing time exceeding 5 min as the sleeping time. 8% drug substratum was given to females for 6 days and to males for 7 days. Drosophilae's sleeping time was calculated. The sleep-deprived models of drosophilae were established by both methods. Compared with the control group, the sleeping time of sleep-deprived drosophilae was decreased ($P<0.01$). The sleeping time of the drug treatment groups was significantly prolonged no matter which method was used to establish the model ($P<0.01$). The results showed that Fructus Schisandrae Chinensis Freeze-dried Powder at the dosage of 8% may improve the sleep of sleep-deprived models induced by two different methods.

Keywords: Fructus Schisandrae Chinensis, *Drosophila melanogaster*, Sleep deprivation

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立崑)