

剂量 31.0 mg/kg BW 作为 PBB 剂量。

MLT 在实验剂量范围内对 PBB 诱导 TSO 的影响不明显(表 1),可见 PBB 作用速效,TSO 很短,似不宜作对 TSO 影响的试验。

表 1 褪黑激素对戊巴比妥
诱导的入睡时间(TSO)的影响 min

MLT mg/kg BW	♀	♂	合 计
0	7.90±3.41	7.70±0.67	7.80±2.40
20	5.40±3.13	5.00±0.47 ⁽¹⁾	5.20±2.19 ⁽¹⁾
30	9.00±1.00 ⁽¹⁾	5.90±1.45 ⁽¹⁾	7.37±2.01
40	10.60±2.55 ⁽¹⁾	4.40±1.07 ⁽¹⁾	7.50±3.71

注:(1) $P<0.05$

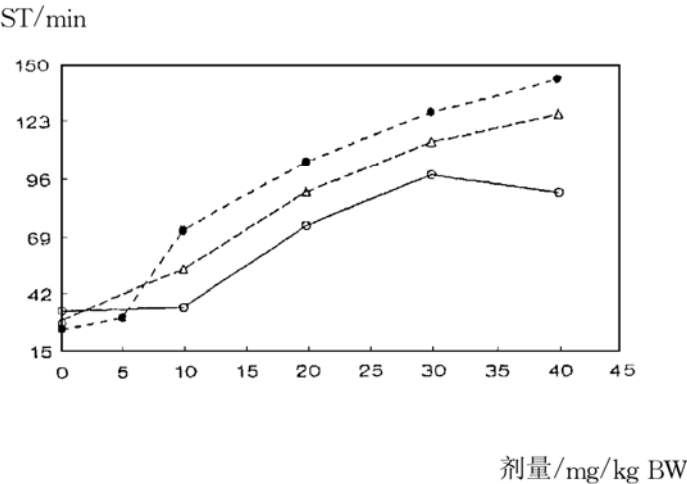


图 1 褪黑激素(MLT)对戊巴比妥(PBB)
诱导小鼠睡眠时间(ST)的协同效应
○: ♀ ●: ♂ △: ♀/♂ 混合统计

但是,MLT 对于 PBB 诱导 ST 的增强效应却很明显(图 1),且有量效关系,进行对数回归后,化为直线方程:

$$y=a+bx$$

其中 x 为 MLT 的剂量对数值, Y 为 ST。 a, b 为方程参数。雄性、雌性和雄、雌混合统计的 ED_{50} 分别为 7.03, 19.05 和 11.07 mg/kg BW; 其 95% 可信限分别为 5.58~8.90, 11.1~33.0 和 8.18~14.8 mg/kg BW。均优于 Sugdin⁽⁴⁾ 的 20.6 mg/kg BW 结果。 ED_{50} 是表示 MLT 对 PBB 诱导 ST 协同效应的活性指标。它是由一套(至少 4 个剂量以上)数据产生的定量指标,较准确、可靠,可用以衡量不同制剂的活性高低, ED_{50} 越小,活性越高;也可以在不同实验室内进行结果对比。

2 MLT 对 BB 促眠的协同效应

BB 的实验剂量按 200 和 300 mg/kg BW(i p) 分别给予 2 组雄性小鼠(每组 10 只),观察 TSO 变化,结果依次为 56.2 ± 11.6 和 44.7 ± 9.7 min。本次选定中间剂量 250 mg/kg BW 作为 BB 实验剂量。以 5、10、20 和 40 mg/kg BW MLT 实验组按两种次序给药方式进行。与对照组比较,10、20、40 mg/kg BW 的 TSO 都显著降低。比较两种给药次序方式,先给 MLT 的 TSO 误差较小(图 2),但其 ED_{50} 已超过 40 mg/kg BW,比之上述 ST 的 ED_{50} 要大得多。MLT 也能增强 BB 诱导的 ST 效应,但对对照组 ST 太长(数据略),似不宜进行 ST 影响试验。

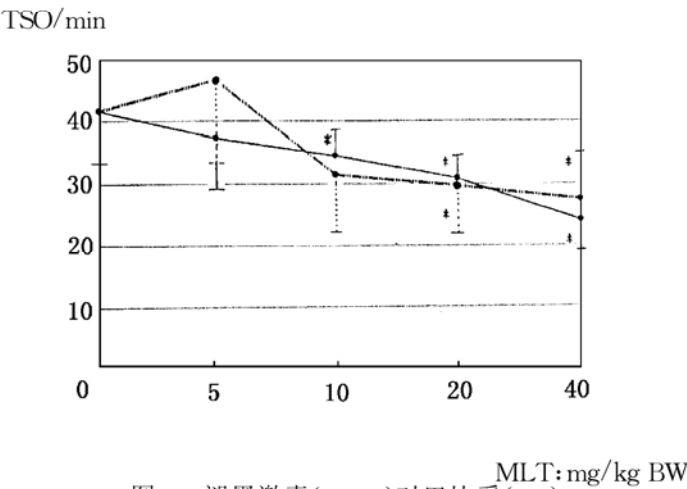


图 2 褪黑激素(MLT)对巴比妥(BB)
诱导小鼠入睡时间(TSO)的协同效应
—— MLT(i g)15 min 后 BB(i p),
- - -●- BB(i p)15 min 后 MLT(i g)
(* $P<0.05$)

2.3 MLT 促眠试验

MLT 单独给药,仅见到高剂量组(>1 g/kg BW)小白鼠步态蹒跚,趴伏,但以翻正反射消失为指标,未见入睡现象。此剂量已接近 LD_{50} 值:雄性 1.96(1.18~3.26),雌性 1.71(1.26~2.33)g/kg BW。

2.4 MLT 脑电图检测

2.4.1 无论和对照组比还是给药前后相互比较,10 mg/kg BW MLT 组的促眠效应,仅 σ 增加;而 20 mg/kg BW 组则具有明显促眠效应,表现为 δ 和 σ 指数均显著增加(表 2、3)。

2.4.2 MLT(20 mg/kg BW)可使各家兔肛温降低 $0.2^{\circ}\text{C} \sim 0.5^{\circ}\text{C}$ 不等,体表(腹背皮肤)温度也呈现稍降低倾向。

2.4.3 MLT(20 mg/kg BW)可稍降低呼吸频率 5%~15%,而对心率未见明显影响。

表2 褪黑激素对兔 σ 和 δ 指数的效应

MLT mg/kg BW	σ 指数 $\bar{x} \pm s$	δ 指数 $\bar{x} \pm s$
0	5.9 $\pm$ 0.7	6.3 $\pm$ 0.9
10	9.2 $\pm$ 1.2 ⁽¹⁾	5.5 $\pm$ 1.1
20	9.5 $\pm$ 1.7 ⁽¹⁾	8.2 $\pm$ 1.1 ⁽¹⁾

注:每组动物只数 $n=5$ (1) $P<0.05$

2.5 上述小鼠实验结果似乎说明 MLT 不是直接促眠剂。⁽⁴⁾但是, Holmes⁽⁵⁾用 EEG 的 SWS(慢波睡眠)指标观察到 10 mg/kg BW(i p) MLT 就能使大鼠很快入睡,这又与我们家兔 EEG 实验相似,而与小鼠试验相悖。夜行动物也具有 MLT 分泌节律,但其睡眠规律却相反。用 EEG 观察到的 MLT 动物促眠剂量 10~20 mg/kg BW 与 Singer⁽⁶⁾的人的高促眠剂量(>50 mg/60 kg BW)放大 12~24 倍相当;而与 Wurtinan⁽²⁾的人的生理剂量 0.1~1.0 mg/60 kg BW(现在市售

所定的使用剂量)相比,高 600~12 000 倍! 药理剂量 3 mg/60 kg BW 的 200~400 倍。说明不能用一般等效剂量来外推。MLT 最显著效应是缩短 STO,虽然它的生物半衰期很短,⁽⁷⁾但它是脂溶性的,易于迅速通过血脑屏障发挥作用。不过,从我们对巴比妥类协同效应得出的降低 TSO 和延长 ST 结果意义毕竟很局限,不能简单外推到人。也不能由小鼠翻正反射试验推论 MLT 对于人也无直接助眠作用。因为对于 MLT 不足者,经每夜补充 2 mg 释一控(Controlled-release)型 MLT 一定周期后,确可改善“睡眠质量”,而速释型 MLT 有助于入睡。⁽⁸⁾这里至少涉及二个实验方法学问题——实验周期和观察指标,MLT 受体需要(时间)诱导增强调节敏感性;实验观察需要先进有效的测量手段(如 Wrist actigraphy)。翻正反射指标太“粗糙”,捕捉不到睡眠质量等重要精细信息。应尽快考虑应用先进手段对灵长类昼行动物、人体进行试验。

表3 褪黑激素给药前后兔 σ 和 δ 指数比较分析

	注射前	注射后		
		1h $\bar{x} \pm s$	2h $\bar{x} \pm s$	3h $\bar{x} \pm s$
σ 指数				
10 mg/kg BW	10.1 ± 2.5	10.7 ± 2.5	11.1 ± 3.6	5.9 ± 2.9
20 mg/kg BW	5.0 ± 1.1	10.5 ± 2.0 ⁽¹⁾	12.7 ± 3.7 ⁽¹⁾	10.8 ± 4.2 ⁽¹⁾
δ 指数				
10 mg/kg BW	9.8 ± 2.7	6.3 ± 0.6	6.9 ± 1.1	3.3 ± 1.0
20 mg/kg BW	3.3 ± 0.3	7.7 ± 1.6 ⁽¹⁾	11.3 ± 2.5 ⁽¹⁾	6.3 ± 1.9 ⁽¹⁾

注:每组动物只数 $n=5$ (1) $P<0.05$

但就目前而言,还是有必要尽可能将动物试验方法合理化和规范化,以使有限意义结果具有可靠性和可比性。建议考虑下列诸方面:

2.5.1 试样处理 MLT 是脂溶性的,可用超声法或惰性载体制备成匀体。但决不能用酒精做溶媒,因为它不仅是中枢神经系统的强抑制剂,而且还是其它安眠药物的协同作用剂。

2.5.2 剂量设计 由于 MLT 对于动物作用(敏感性)与人相差甚远,不能用 $\times 10$ 倍等效剂量来规范。

EEG 5~20 mg/kg BW(i p)

小鼠协同效应试验 至少在 ED₅₀ 两侧各设两个剂量组。

2.5.3 协同试验

常用实验动物的选择

因为大鼠 ED₅₀ $\geq$ 小鼠 ED₅₀,⁽⁴⁾ 故选小鼠。

又因雌性小鼠 ED₅₀ $\geq$ 雄性 ED₅₀, 故选雄性小鼠。

巴比妥钠作为 MLT 降低入睡时间(或潜伏期)的协同剂。BB 剂量用 250 mg/kg BW。MLT 15 min 后用 BB。

BB 潜伏期较长,便于观察缩短效应,但曲线斜率较低。

戊巴比妥钠作为 MLT 延长睡眠时间的协同剂。MLT 30 min 后用 PBB 31.0 mg/kg BW。PBB 的 TSO 很短,ST 也较短,便于观察 MLT 对 ST 的增强作用,有利求出两倍 ST 的 ED₅₀。

ED₅₀ 可作为 MLT 活性指标和评价指标,是具有

可比性的定量指标。

2.5.4 EEG 试验

动物 家兔, 每组 5 只。

指标 σ 指数、 δ 指数。

体温(体温下降也是睡眠的重要指标之一)

EEG 试验是对小鼠翻正反射为观察指标试验不足的有效补偿。然而, EEG 技术设备不易普及。

综上所述, 在实验剂量下, 褪黑激素对小鼠几乎无直接睡眠诱导作用, 但对巴比妥诱导小鼠入睡时间, 对戊巴比妥诱导小鼠睡眠时间均有协同增强作用。在 20 mg/kg BW 高剂量下, 能诱导家兔深度慢波睡眠。建议今后对动物睡眠试验进行规范化。

3 参考文献

- 1 Wuldhauser F, et al. In: MLT and, pineal gland. Y Tuitou, eds. Elsevier Science Pub. 1993, 331
- 2 Wurtin R J. Use of MLT to induce sleep, World intellectual property organization, 1994, 14 Apr.
- 3 Muntplaisir J. In: Sleep biological rhythms, Oxford Univ Press. 1990, 124
- 4 Sugdin D J. Pharmac Exper Therap 1983, 227: 567
- 5 Holmes S, Sugden Br. J Pharmac, 1982, 76: 95~101
- 6 Singer C, et al. Sleep Res. 1995, 24A: 151
- 7 Aldhous. M Br. J clin pharm, 1985, 19: 157
- 8 Garfinkel D, et al. Lancet, 1995, 346: 541

[上接第 2 页]

需氨基酸的摄入量, 即忽视了蛋白质的质量。最近的一次即 1992 年全国营养调查也只是进行人群蛋白质摄入量的调查, 从这一次调查中看出, 全国各省市居民平均蛋白质摄入量为每标准人日 68 g, 占 RDA 的 90.3% (标准 RDA 推荐量为 75 g),⁽⁴⁾ 其中蛋白质的食物来源谷类占 61.6%, 豆类占 5.1%, 动物性食物占 18.9%, 其它食物占 14.4%。我国膳食以植物为主, 蛋白质质量和利用率稍差, 即是其必需氨基酸的比例构成没达到 FDA/WHO 的标准, 故规定蛋白质的摄入量要达到 100 g 的日推荐量才能满足机体的需要,⁽⁵⁾ 如果膳食中由动物和大豆提供蛋白质能达到总摄入量的 40% 以上, 则蛋白质供给量可以减少, 1992 年全国营养调查显然表明只达到 24% (18.9% + 5.1%), 折算后有效蛋白质摄入量只达到 RDA 的 68%~90.3%。本文所检的 128 份试样都是具有一定功能的保健食品, 其中螺旋藻、鸡精及氨基酸口服液是以补充蛋白质为主要功能, 由表 2 数据可知, 从其推荐食用量来看, 每天 4 g 螺旋藻、一瓶鸡精、20 mL 氨基酸口服液就可分别补充机体必需氨基酸需求量的 25%、25%、8.5% 左右。因此, 广大消费者应增加豆类及奶类食品的食用量, 以增加优质蛋白质的摄

入, 而对患者和特殊需要的人群则可通过这类保健食品达到补充营养的作用。其它的固体营养品、营养口服液的必需氨基酸含量参差不齐, 因其是以其它功能为主, 产品本身对氨基酸的含量、构成没有要求, 实际上也达不到 FAO/WHO 的要求。

目前国内未见必需氨基酸摄入量的调查报告, 建议全国营养调查增加此项目, 根据调查结果对以补充蛋白质、氨基酸为主要功能的保健食品的必需氨基酸含量制定统一的国家限量标准, 当然比例亦要符合 FAO/WHO 标准模式, 以利于监督部门对这一类食品的管理, 确保消费者权益。

4 参考文献

- 1 陈炳卿. 营养与食品卫生学. 北京: 人民卫生出版社, 1994
- 2 陈学存. 营养调查手册. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1986
- 3 于守洋. 中国营养保健食品指南. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1996
- 4 葛可佑. 90 年代中国人群的膳食与营养状况. 北京: 人民卫生出版社, 1996
- 5 曾育生. 饮食与健康指南及华南食物成分. 广州: 中山大学出版社, 1992

褪黑激素的动物睡眠试验

仲伟鉴 郑志清 董妙珠
时胜利 刘云利 张荣泉

上海市卫生防疫站 (200335)

摘 要 为研究褪黑激素对动物睡眠的作用,分别用翻正反射和 σ/δ 两种指标,观察了褪黑激素对小鼠和家兔的睡眠效应。结果表明,在实验剂量下褪黑激素对小鼠几乎无睡眠诱导作用,但对家兔有一定促眠效应;对戊巴比妥诱导小鼠睡眠时间有延长作用(ED_{50} 分别为雄性 7.03 mg/kg BW。雌性 19.05 mg/kg BW);对巴比妥诱导小鼠入睡时间有缩短作用。此外,还对实验结果、方法等诸因素进行了讨论,并提出了有关动物睡眠试验的建议。

关键词 褪黑激素 睡眠 小鼠 兔

褪黑激素(N-酰-5-甲氧色胺, Melatonin, 缩写为 MLT)是松果体分泌的一种吲哚胺神经激素。它具有 24 h 分泌节律,夜间多,白天少。MLT 主要功能之一是调控机体的生物节律。^[1] 人体适当补充 MLT,可能有利于改善睡眠状况。鉴别和评价 MLT 助眠活性的最直接手段是人体试验,^[2]但由于目前国内条件限制,本文沿用了动物试验对 MLT 的助眠和协同助眠作用的方法学、有关因素及试验方法等进行了探讨分析。

1 材料和方法

1.1 材料

取纯度为 99.6% 的 MLT(某厂家生产)置于含 0.3% 吐温 80 生理盐水中,通过超声振荡或置于惰性载体中制备成一定浓度的匀体。

戊巴比妥钠(PBB) AR 级。

巴比妥钠(BB) AR 级。

昆明种小白鼠 体重 18~22 g。

成年家兔 New Zealand 种, 体重 2.5~3.3 kg。

Nihon Kohden 8 道仪 日本。

ST-1 型数字体温计。

TH-80 互换式半导体点温计。

1.2 方法

睡眠试验在 45 Lux 照度下和隔音(EEG 试验时再加屏蔽)室内进行,室温 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.1 MLT 对 PBB 促眠的协同效应

小白鼠随机分成 6 组,每组♀/♂各 10 只,其中五个实验组分别给予 MLT 5、10、20、30 和 40 mg/kg BW(i g),对照组以相同途径给予等量载体。30 min 后,对照组和实验组均给予 PBB 31.0 mg/kg BW(i p)后记录入睡时间(TSO),睡眠时间

(ST)。以翻正反射为观察指标。实验结果用 Epi-Info 软件包进行统计学分析,睡眠时间对 MLT 剂量经对数回归处理后,求出 2 倍于“0”剂量的 ST 值的 MLT 有效剂量(ED_{50})。

1.2.2 MLT 对 BB 促眠的协同效应

雄性小白鼠随机分成两个大组,每组 10 只,每组随机分成 4 个试验组和对照组,第一组先给 BB(250 mg/kg BW, i p)。15 min 后分别给予试验组 5、10、20、40 mg/kg BW(i g)MLT,对照组给予载体。第二组则先给予 MLT(i g),15 min 后再给予 BB(i p),剂量同第一组。

1.2.3 MLT 促眠试验

小白鼠试验 小白鼠随机分为 3 组,每组雌雄各 5 只。分别给予 MLT 0.25、0.50、1.00 g/kg(i g)观察其行为变化。

家兔脑电图(EEG)检测 成年家兔雌雄混用,分成对照组、10、20 mg/kg BW 剂量组每组 5 只。实验前分别在家兔头骨装置不锈钢电极,借助于日本 Nihon Kohden 8 道仪记录 EEG,呼吸和心率;用特制 ST-1 型数字体温计自动显示体表温度,并用 TH-80 互换式半导体点温计测肛温。

促眠效应评价指标为 δ 指数评价深度慢波睡眠(DSWS); σ 指数评价浅度慢波睡眠(ISWS)。

2 结果和讨论

2.1 MLT 对 PBB 促眠的协同效应

PBB 剂量的确定 先将 PBB 按 30.5、31.0、31.5、33.0、35.0 mg/kg BW(i p)分别给予 5 组雄性小鼠,通过翻正反射消失观察 ST 变化。检测结果依次为 23.5 ± 3.0 , 24.5 ± 4.2 , 27.5 ± 7.0 , 48.0 ± 17.1 和 37.8 ± 11.2 min。本次选定相应于较短 ST 的阈上