

赵倩, 李劲草, 王萧, 等. 实验动物在评价天王补心丹防治失眠中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 120-126.
Zhao Q, Li JC, Wang X, et al. Role of experimental animals in evaluating prevention and treatment of insomnia with Tianwang Buxin Dan [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 120-126.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.016

实验动物在评价天王补心丹防治失眠中的作用

赵倩^{1,2}, 李劲草², 王萧^{1*}, 张有志^{2*}

(1. 广州中医药大学动物实验中心, 广州 511400; 2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100089)

【摘要】 失眠作为常见的神经精神疾病, 发病率逐年上升。天王补心丹是补心安神治疗失眠的经典中医方剂, 临床应用广泛。对天王补心丹的药理作用评价与作用机制研究需以适当的动物模型为基础。本文对近 10 年相关文献进行汇总, 针对多平台水环境模型、对氯苯丙氨酸 (parachlorophenylalanine, PCPA) 失眠模型、光照节律紊乱模型和中医证候复合模型的优缺点、造模方法、评价指标等特点进行阐述。探讨天王补心丹及组方单味药材改善睡眠的指标与中医证候的内在联系, 为建立符合中医特点的失眠动物模型提供参考, 为天王补心丹用于失眠治疗提供借鉴。

【关键词】 失眠模型; 天王补心丹; 中医证候

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0120-07

Role of experimental animals in evaluating prevention and treatment of insomnia with Tianwang Buxin Dan

ZHAO Qian^{1,2}, LI Jincan², WANG Xiao^{1*}, ZHANG Youzhi^{2*}

(1. Laboratory Animal Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China.

2. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100089)

【Abstract】 Insomnia is a common neuropsychiatric disease with increasing incidence in recent years. Tianwang Buxin Dan (TWBXD) is a traditional Chinese medicine (TCM) prescription to invigorate the heart and calm nerves for the treatment of insomnia, which is widely used in clinical practice. Investigation of the pharmacological effects and action mechanism of TWBXD is based on the establishment of proper animal models. This article summarizes relevant literature in the past 10 years with a focus on multiple insomnia animal models (platform over water, parachlorophenylalanine, light rhythm disturbance, and TCM syndrome) and their strengths and weaknesses, methodology, and evaluation properties. The sleep-improving effects of TWBXD and its signal herbs are associated with TCM syndrome to establish animal models that fit the characteristics of TCM syndrome and provide a reference for the clinical application of TWBXD.

【Keywords】 insomnia model; Tianwang Buxin Dan; TCM syndrome

失眠症是指在睡眠时间充足、环境适宜的情况下发生入睡或睡眠维持困难, 并导致日间功能障碍的神经精神疾病, 以入睡困难、频繁觉醒、早醒和非

恢复性睡眠为主要症状^[1]。作为最常见的睡眠障碍, 失眠在我国发病率约为 40%, 其中 6%~10% 的人被确诊为长期失眠^[2]。临床常用苯二氮卓类和

【基金项目】 国家科技重大专项课题 (2018ZX09739-008)。

【作者简介】 赵倩 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 失眠模型。E-mail: 20201110932@stu.gzucm.edu.cn

【通信作者】 王萧 (1972—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: xwang72@gzucm.edu.cn

张有志 (1971—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 精神药理学。E-mail: bcczyz@163.com

* 共同通信作者

非苯二氮卓类等化学药物进行治疗,作用范围有限且依赖性,无法从根本上治愈睡眠问题,而天王补心丹具有治疗广泛、不易产生成瘾性和耐药性,在失眠防治上具有潜在独特优势。

中医对失眠的认识和治疗历史悠久,中医称失眠为“不寐”、“不得卧”、“目不瞑”,认为由心神失养或心神不安所致。天王补心丹源起于宋代《校注妇人良方》,方可“宁心保神,益血固精……祛烦热,除惊悸”,有补心安神,滋阴养血的功效,是治疗阴亏血少,虚烦少寐的经典名方^[3]。大量临床及实验研究证实,天王补心丹和方中生地,酸枣仁、五味子、茯苓等可显著提高睡眠质量,但发病机制尚不清楚,基于患者的临床实验有一定的局限性,因此建立理想动物模型十分必要。理想动物模型应具备 3 个原则,即表观效度、结构效度、预测效度,即疾病动物模型应与人类疾病具有相似的症状表现和病理生理机制,并且对经典治疗药物产生相似的反应性。目前研究常用的失眠模型较为单一。本文对近 10 余年失眠动物模型在天王补心丹中的应用文献进行了汇总,从实验动物种类、造模方法、评价指标等方面总结天王补心丹在失眠动物模型的研究进展,为此方在治疗失眠的基础研究与临床应用中提供新的思路和方法。

1 文献分析

通过 3 大数据库,以“失眠”“模型”和“天王补心丹”为主题,时间设定为 2010 年 1 月~2021 年 12 月进行检索,其中 CNKI 数据库检索到期刊文献 25 篇,万方数据库 5 篇,维普数据库 0 篇,选择研究失眠的全部动物实验文献、硕博论文、排除综述类文献及 3 大数据库中重复的文献,最终有 12 篇文献符合检索要求。同理,将“天王补心丹”替换为“地黄”“酸枣仁”“五味子”“茯苓”后依次有 3 篇、13 篇、7 篇、3 篇文献符合检索要求。笔者对其组方及方中单药对实验动物种类、动物模型、造模方法、评价指标及模型使用频次进行整理如表 1 和表 2。

2 PCPA 模型

对氯苯丙氨酸(PCPA)作为 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)合成抑制剂,在失眠模型中应用广泛。戊巴比妥钠阈上或阈下剂量协同实验是评价药物镇静催眠的常用方法。给予实验动物 PCPA 后一般可出现持续 48 h 的失眠,表现为白日

活动量增加,摄食减少,昼夜节律消失,此模型优点是可以模拟完全睡眠剥夺表型,准确定位改变脑内神经递质,但还可以产生其他病理症状及代谢失衡^[12],且因 PCPA 药性难溶制备困难,药效难以保证,对操作者技术要求较高,现今文献报到多使用阿拉伯树胶与蓖麻油作为促溶剂,采用腹腔注射的方法最利于吸收,常使用 200~220 g SD 大鼠和 18~22 g 多种品系成年小鼠制备此失眠模型^[13]。

2.1 PCPA 模型在天王补心丹方剂研究中的应用

谢光璟等^[4]利用该模型研究天王补心丹加减方对氧化应激通路的作用。向大鼠腹腔内注射 150 mg/kg 的 PCPA 溶液 7 d,利用戊巴比妥钠协同催眠实验对模型评估,当大鼠发生睡眠时翻正反射消失,觉醒时大鼠在 1 min 之内连续完成 3 次自主翻转视为翻正反射恢复,15 min 内模型组大鼠较正常对照组大鼠的睡眠潜伏期延长、睡眠持续时间缩短、睡眠发生率降低,证明造模成功。给予天王补心丹后发现,模型组大鼠的 SOD 与 GSH-Px 活性增加,MDA 表达下降、硫氧环蛋白 2 含量增加而硫氧环蛋白还原酶 2 含量减少,其昼夜节律紊乱现象明显改善。每天 8:00 使用 400 mg/kg PCPA 混悬液注射 2 d,也可使大鼠出现昼夜节律紊乱表现。刘珊等^[11]利用此模型研究天王补心丹调控炎症因子的作用,发现其可以调节大鼠的 TLR4、MyD88 表达,使外周血核因子 NF- κ B、TRIF、TNF- α 、IL-1 水平下降,证实天王补心丹的镇静安神作用机制可能与调节炎症因子,改善机体免疫力有关。

2.2 PCPA 模型在单味药研究中的应用

天王补心丹组方复杂,其广泛的治疗效用与多靶点的药理作用是建立在单药的基础之上的。药理学研究表明地黄的中枢神经抑制作用研究最早见于 1989 年^[14],利用 PCPA 与戊巴比妥钠协同催眠实验证实地黄和酸枣仁可作用于脑内 5-HT、去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)、多巴胺(dopamine,DA)等神经递质发挥中枢神经抑制作用。向小鼠腹腔注射 35 mg/kg 戊巴比妥钠溶液,利用翻正反射验证是否造模成功,从开始注射到翻正反射消失时间为入睡潜伏期,翻正反射消失到恢复时间为睡眠时间。以翻正反射消失达 1 min 为入睡标志,30 s 内连续翻转 3 次为睡眠结束标志。记录 30 min 内入睡只数、入睡潜伏期及睡眠时间,计算睡眠发生率。王婷婷等^[15]给予模型组小鼠腹腔注射 40 mg/100 g PCPA,连续 2 d,实验结果显示地黄与酸枣仁的潜伏

期和睡眠持续时间相似,而睡眠发生率地黄组明显高于酸枣仁组,提示在临床应用中,酸枣仁、地黄对睡后易醒的失眠患者疗效最佳,而不适用于入睡困难的失眠患者。刘彦飞^[16]利用该模型评价证明了地黄各部位均有不同程度的镇静催眠作用。武锦春等^[17]使用该模型发现酸枣仁中的主要物质斯皮诺素、阿魏酸等物质可以作用于 NE 能系统和 5-HT

能系统发挥镇静作用。

研究证实五味子木质素可以下调脑中 5-HT、 γ 氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)与谷氨酸(γ -glutamate, Glu)比例以及其受体水平发挥镇静作用。利用戊巴比妥钠协同催眠实验,在小鼠腹腔注射 PCPA 混悬液 24 h 后给予五味子素灌胃,30 min 后进行戊巴比妥协同催眠实验,以 1 min 小鼠翻正

表 1 天王补心丹常用实验动物种类、动物模型、造模方法及评价指标

Table 1 Animal models, modeling methods and evaluation indexes of common experimental animals of TWBXD

参考文献 References	实验动物 Experimental animals	动物模型 Animal models	造模方法 Building methods	评价指标 Evaluation index
[4]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	PCPA 模型 Parachlorophenylalanine model	腹腔注射 150 mg/kg PCPA 间断注射 7 d Intraperitoneal injection of 150 mg/kg PCPA was performed intermittently for 7 days	翻正反射法 Righting reflex
[5-6]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	多平台水环境模型(柱台直 径 8 cm) Modified multiple platform method (the diameter of the column is 8 cm)	光照 400 lx 睡眠剥夺每天 20 h, 连续 7 d/28 d Light 400 lx Sleep deprivation for 20 hours daily for 7 days or 28 days	脑电总睡眠时间和慢波睡眠时间 减少且精神萎靡 Total EEG sleep time and slow wave sleep time decreased and lethargy
[7]	雄性 C57BL/6 小鼠 Male C57BL/ 6 mice	多平台水环境模型(柱台直 径 6 cm) Modified multiple platform method (the diameter of the column is 6 cm)	睡眠剥夺每天 18 h, 持续 56 d Sleep deprivation for 18 hours daily for 56 days	
[8]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	咖啡因模型联合多平台水 环境模型 Caffeine model and modified multiple platform method	腹腔注射咖啡因 30 mg/kg 睡眠剥夺每天 18 h, 持续 14 d Intraperitoneal injection of caffeine 30 mg/kg Sleep deprivation for 18 hours daily for 14 days	精神萎靡、 背毛粗糙、 掉毛、 体重增加幅度减少、 摄食减少、 易怒、 爪甲颜色暗淡 等
[9]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	咖啡因模型、环磷酰胺模型 联合多平台水环境模型 Caffeine model and cyclophosphamide model and modified multiple platform method	咖啡因 60 mg/kg 环磷酰胺 100 mg/kg 睡眠剥夺每天 18 h, 持续 14 d Caffeine 60 mg/kg Cyclophosphamide 100 mg/kg Sleep deprivation for 18 hours daily for 14 days	Lethargy、 coarse back hair、 hair loss、reduced weight gain、 reduced food intake、irritability、 dull nail color and so on
[10]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	衰老模型 咖啡因模型 多平台水环境模型 Aging model、caffeine model and modified multiple platform method	颈背部皮下注射 D-半乳糖 60 mg/kg 咖啡因 30 mg/kg D-galactose 60 mg/kg was injected subcutaneously into the neck and back Caffeine 60 mg/kg	
[11]	SD 大鼠雌雄 各半 SD rats were divided into male and female	PCPA 模型 Parachlorophenylalanine model	PCPA 400 mg/kg, 连续 2 d PCPA 400 mg/kg, continuous 2 days	昼夜节律消失 Loss of circadian rhythm

表 2 天王补心丹中单味药-地黄、酸枣仁、五味子、茯苓的常用实验动物种类、动物模型、药物剂量及模型使用频次
Table 2 Common experimental animal species, animal model, drug dose and model use frequency of single drug in Tianwang Buxin Dan-rehmannia glutinosa, jujube seed, schisandra fruit and tuckahoe

中药 Traditional Chinese medicine	实验动物 Experimental animals	动物模型 Animal models	造模方法与给药剂量 Modeling method and dosage	使用频次 Frequency of usage
地黄 Rehmannia glutinosa	雄性昆明小鼠 Male Kunming mice	戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test	戊巴比妥钠 23 mg/kg Sodium pentobarbital 23 mg/kg	2
	雄性昆明小鼠 Male Kunming mice	PCPA 和戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test and Parachlorophenylalanine model	戊巴比妥钠 35 mg/kg PCPA 40 mg/100 g, 连续 2 d Sodium pentobarbital 35 mg/kg Parachlorophenylalanine 40 mg/100 g continuous 2 d	1
	雄性 Wistar/SD 大鼠 Male SD or Wistar rats	PCPA 模型 Parachlorophenylalanine model	PCPA 400 mg/kg 3 d 或 350 mg/kg 2 d Parachlorophenylalanine 400 mg/kg, continuous 2 d or 350 mg/kg continuous 2 d	7
	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	多平台水环境模型 Modified multiple platform method	连续剥夺 48 h Sleep deprivation for 48 hours daily	1
酸枣仁 Ziziphus jujube	雄性 ICR 小鼠 Male ICR mice	戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test	戊巴比妥钠 50 mg/kg Sodium pentobarbital 50 mg/kg	2
	黑腹果蝇雌雄各半 Drosophila melanogaster is split between males and females	光照模型 Illumination model	20:00 开始, 每小时光照 10 min 至第 2 天 7:00, 光照强度 650 lx From 8 pm to 7 am the next day, the light intensity is 650 lx	1
	雄性 Wistar 大鼠 Male Wistar rats	PCPA 和戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test and Parachlorophenylalanine model	28 mg/kg 戊巴比妥钠 150 mg/kg PCPA 28 mg/kg sodium pentobarbital	1
	雄性 Wistar 大鼠 Male Wistar rats	D-半乳糖致亚急性衰老模型、环磷酰胺及氢化可的松模型 D-galactose induced subacute aging, cyclophosphamide and hydrocortisone models	D-半乳糖致 60 mg/kg 16 周 环磷酰胺 100 mg/kg 5 d 氢化可的松 50 mg/kg 5 d D-galactose to 60 mg/kg for 16 weeks Cyclophosphamide 100 mg/kg for 5 d Hydrocortisone 50 mg/kg for 5 d	1
五味子 Schisandra chinensis	雄性 Wistar 大鼠/昆明小鼠 Male Wistar rats or Kunming mice	PCPA 和戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test and Parachlorophenylalanine model	PCPA 300 mg/kg 戊巴比妥钠 28 mg/kg 和 35 mg/kg Sodium pentobarbital 28 mg/kg and 35 mg/kg	3
茯苓 Poria coxburghii	雄性昆明小鼠 Male Kunming mice	PCPA 和戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test and Parachlorophenylalanine model	PCPA 300 mg/kg 戊巴比妥钠 45 mg/kg Sodium pentobarbital 45 mg/kg	3

反射消失率为模型成功标准^[18-19]。贾颖等^[20]基于此模型的基础上利用超临界 CO₂ 萃取方法制备酸枣仁挥发油,发现含有油酰胺等内源性睡眠诱导物可以增加动物模型的慢波睡眠,且酸枣仁油的镇静催眠作用优于皂苷。徐飞飞等^[21]发现枣仁-茯苓-党参水提物也可以调节 GABA/Glu 比例。徐煜彬

等^[22]进一步研究,证实其主要成分茯苓粗多糖能显著缩短 50 mg/kg 及 80 mg/kg 戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期,延长小鼠睡眠持续时间。王天合等^[23]使用茯苓水提物连续灌胃 7 d 后,给予戊巴比妥钠,发现其麻醉时间与小鼠睡眠持续时间增加,以猪苓酸 C 等 10 种成分与镇静催眠药效密切相

关。方中其它中药柏子仁、人参、远志也采用此模型所以并未一一阐述^[24-27]。综上所述,利用 PCPA 失眠模型证实天王补心丹中的生地、酸枣仁、五味子、茯苓等单味药可能通过对神经递质的调控而发挥镇静安神作用。

3 多平台水环境模型

多平台水环境模型是实现非快速眼动睡眠剥夺(REM)的常用模型。现今研究实验动物多为大、小鼠,大鼠常采用直径 6.5 cm 柱台^[28],而小鼠以 4.5 cm~5.0 cm 居多^[29],其原理是根据大、小鼠畏水的天性,无法在充满水的环境中进入完全睡眠状态,实验动物可以在各柱台间自由活动、饮水、摄食,当其进入深睡眠时由于肌张力降低而落入水中,迅速惊醒进而剥夺其 REM 睡眠,此模型相对保留慢波睡眠,但小鼠死亡率高,常因落入水中后体力不支浸泡在水中失温溺水而亡。常用 18~22 g 的 C57BL/6 雄性小鼠或 180~220 g SD 雄性大鼠。

黄晓宇等^[5]使用该模型探究天王补心丹加减方与能量代谢、糖代谢及脂质代谢的关系。将大鼠放置在箱中的柱台上,水面在柱台下 1 cm 处,箱子上方放置充足的水和饲料,连续睡眠剥夺 7 d,每天 20 h,以脑电植入子图谱显示的总睡眠时间和慢波睡眠时间减少作为模型成功的标准,结果显示天王补心丹可使此模型大鼠的 MAPK 信号转导通路中的调节因子(如双特异性磷酸酶 1)表达水平恢复正常,激活 p38 MAPK 信号通路,改善睡眠质量。将上述造模时间延长至 28 d,将脑电芯片植入皮层下,根据脑电特征分析大鼠的睡眠时相,模型组大鼠较正常对照组的总睡眠时间和慢波睡眠时间皆减少时,则造模成功。该模型证明天王补心丹通过调节单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和促炎因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)等炎症因子水平,增加慢波睡眠时长进而改善学习记忆力^[6]。将剥夺时间延长至 56 d,每天剥夺 18 h,并于造模 28 d 后开始给药,发现天王补心丹加减方可以降低模型组小鼠下丘脑中食欲素表达,降低血糖值及甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCH)和游离脂肪酸(FFA)的含量,证明此方在调控睡眠的同时可以影响糖代谢与脂质代谢^[5]。单药使用该模型较少,赵翠等^[30]利用水平平台连续造模 4 d,发现酸枣仁提取物可以调节 T 淋巴细胞亚群平衡,使 CD4⁺T 淋巴细胞比例升高,CD8⁺T 淋巴细胞比例降低,抑制 TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-1 β 炎症因子表达,增强免疫功能,即“正气存内,邪不可干”,“气充则神旺”。

4 中医阴虚证的复合模型

中医理论认为不寐的病因病机复杂多端,如思虑劳倦则耗伤心脾;心胆气虚则心神不安;心肾不交则水火不济;阴虚火旺则肝阳上扰等。在不寐众多证型中,以阴虚火旺型不寐最为常见,约占 20.2%^[31]。模拟临床阴虚火旺的证型对失眠的研究具有重大意义。大小鼠作为最常见的模型制备哺乳类动物,与人类具有睡眠相似状态,适用于中医阴虚证型的研究。多使用 Wistar 或 SD 成年雄性大鼠制备此类模型^[32]。

实验动物研究中常用环磷酸胺或咖啡因建立中医阴虚证型,研究显示注射环磷酸胺后,实验动物的大部分体征符合中医阴虚体质的临床表现,包括精神不振,毛粗黄、掉毛、摄食量减少、消瘦、易被激怒等,生理指标则显示其红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、血小板(PLT)数量均减少^[33]。咖啡因作为腺苷受体拮抗剂,与抑制性神经递质腺苷 A2A 受体结合进而抑制睡眠增强觉醒。在多平台水环境模型的基础上联合咖啡因注射组成慢性复合型睡眠剥夺,可以更好地模拟阴虚不寐患者的临床表现。该模型常用于探究天王补心丹对下丘脑视交叉上核(SCN)中各种参与昼夜节律调节的肽能神经元的表达,如血管活性肠肽(VIP)、精氨酸加压素(AVP)^[8]。提示天王补心丹可以用来治疗轮班工作睡眠障碍及对咖啡因依赖的患者,但目前对于天王补心丹节律调控的研究较少,需要更深入的探讨。咖啡因、环磷酸胺与多平台水环境的复合模型考察天王补心丹影响大鼠海马区记忆与学习的功能,采用腹腔注射 60 mg/kg 的咖啡因及 100 mg/kg 环磷酸胺,连续 7 d 后进行多平台水环境睡眠剥夺,共剥夺 14 d,每天 18 h。结果表明天王补心丹可以调节脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)表达^[9]。

根据中医阴阳学说理论,老年人多血虚阴亏,由 D-半乳糖制备的衰老模型体征符合上述中医阴血亏虚的辨证要点。黄攀攀等^[10]将大鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖 60 mg/kg 持续 28 d,于第 21 天开始叠加腹腔注射 30 mg/kg 咖啡因至第 28 天,第 29 天时利用多平台水环境法连续睡眠剥夺 7 d,每天 12 h。根据大鼠体重减轻、力竭性游泳时间减少等指标反应大鼠乏力,同时大鼠心率加快、血压升高、耳温升高证明阴虚发热的中医症状表现,口唇爪甲耳颜色浅淡以及血象特征表明其同时出现血虚的

表现。张舜波等^[34]给予模型组大鼠相同剂量的 D-半乳糖 16 周、环磷酰胺 5 d 后再注射 50 mg/kg 氢化可的松 5 d,置于箱内连续剥夺 48 h,证实酸枣仁总皂苷可以调节老年失眠大鼠皮层及海马部位的 Glu、GABA 神经递质及受体含量,对临床老年失眠患者意义重大。

5 光照节律紊乱模型

光照模型是通过扰乱实验动物的光周期,达到睡眠剥夺的目的,常应用于睡眠节律紊乱研究。常见的模型动物有斑马鱼、黑腹果蝇等^[35]。果蝇的光照模型日趋成熟,当果蝇在第 1 天晚上被睡眠剥夺时,第 2 天白天则会出现睡眠代偿,与年幼果蝇相比,日龄越大的果蝇拥有更多的片段化睡眠和较少的睡眠持续时间,这与人类睡眠极为相似,且与人类基因高度同源^[36],被广泛使用。杨波等^[37]使用果蝇光照模型证明酸枣仁皂苷 A 与 B 的作用机制不同,皂苷 B 可以显著减少白天睡眠时间。选用 5~7 日龄野生型 Canton S 果蝇,早 7 点至晚 7 点为正常光照,晚 8 点开始,每小时光照 10 min 至第 2 天早 7 点,光照强度设置为 650 lx,通过间断性光照使果蝇睡眠片段化达到睡眠剥夺的目的。当果蝇静止状态超于 5 min 时发生睡眠。以睡眠时间、次数和深度指数等作为果蝇睡眠评价指标。

6 总结

天王补心丹对失眠的防治有较好的作用,作为中医临床经典方剂一直沿用至今。比较分析失眠模型特征发现,环磷酰胺联合多平台水环境睡眠剥夺等复合模型可以更加准确的模拟中医阴虚的证候体征,也常用于其他中医方剂治疗失眠的模型制备^[38]。注射环磷酰胺后导致免疫缺陷,即中医理论的正气不足,气虚日久累及到阴血,可以复刻阴虚证型。中医阴阳体质学说认为“阴虚则热”“耗伤津血”,则出现消瘦、烦热等症状与模型动物的摄食减少,毛发枯槁,抓取时反抗强烈相对应,血液亏虚则表现为贫血,反映在血小板、红细胞等生理指标的数量减少。

天王补心丹中单味药生地、酸枣仁、五味子、茯苓等常使用 PCPA 与戊巴比妥钠协同催眠实验探究其对中枢神经抑制作用,适用于神经递质的研究。药理学研究已证实以上中药使模型动物的旷场、水迷宫等行为学发生改变,认知和学习能力得到提高^[21-22,30]。中医理论认为“阴为血,阳为气”,生地、酸枣仁、五味子均为滋阴之药,通过滋生阴液而补

充血液,而“血养神”“血主濡之”,《灵枢·营卫生会》曰“血者,神气也”。血有濡养和化神的作用,是神志活动的物质基础,血液充盈,则精力充沛,思维敏捷,认知与学习能力正常。若血液亏虚,则神志不安,出现不寐、健忘、惊悸、梦遗等症状^[39]。现代研究也证实,睡眠与记忆都是大脑的基本功能,失眠则会影响 GABA、NE 等与记忆认知密切相关神经递质^[40]。

多平台水环境模型作为失眠的经典模型,脑电分析证实其结构效度较为理想,实验动物表现出的大部分表型与中医阴虚证相符,但还存在心理应激等影响因素。光照模型在此方剂的研究中应用较少,但果蝇的分子遗传学优势明显、饲养成本低、寿命短,且模型的表现效度与人类睡眠高度相似性,适用于睡眠节律的研究。

失眠的发病机制十分复杂,研究已证实其发病机制与炎症因子、氧化应激及神经递质密切相关^[41],天王补心丹及单药可以作用于以上通路发挥镇静安神作用。失眠动物模型根据其自身特点被应用于不同研究,但实验动物的生理、病理、解剖结构始终与人存在着差异。并非人类所有致病因素均能在动物模型中复制,如喜怒忧思悲恐惊七情而导致的情志内伤难以在动物模型中有所体现。应采用多种因素复合的造模方法,充分模拟失眠复杂的临床发病机制,同时重点关注模型动物一般行为和生理指标与中医证候之间的联系,建立符合中医辨证理论的失眠动物模型,实现对中药复方失眠治疗作用的针对性评价。

参考文献:

- [1] Sateia MJ, Buysse DJ, Krystal AD, et al. Clinical practice guideline for the pharmacologic treatment of chronic insomnia in adults: an american academy of sleep medicine clinical practice guideline [J]. J Clin Sleep Med, 2017, 13(2): 307-349.
- [2] 张鹏,李雁鹏,吴惠涓,等. 中国成人失眠诊断与治疗指南(2017 版) [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(5): 324-335.
- [3] 陈克正. 天王补心丹方源再考 [J]. 中成药研究, 1986, 8: 40-41.
- [4] 谢光璟,黄攀攀,王平. 天王补心丹加减改善 PCPA 失眠大鼠 Trx 系统氧化损伤的机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 32-38.
- [5] 黄晓宇,谢光璟,黄攀攀. 天王补心丹加减干预睡眠剥夺大鼠能量代谢机制的生物信息学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 172-180.
- [6] 黄晓宇,谢光璟,李浩,等. 天王补心丹加减对睡眠剥夺大鼠学习记忆及炎症因子表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23): 56-62.

- [7] 黄晓宇, 谢光璟, 李浩, 等. 天王补心丹加减通过 orexin A/OX1R 对慢性睡眠剥夺小鼠糖脂代谢的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 121-127.
- [8] 谢光璟, 薄文集, 黄攀攀, 等. 天王补心丹对慢性睡眠剥夺模型大鼠心肌、下丘脑视交叉上核 VIP、AVP 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 323-326.
- [9] 谢光璟, 黄攀攀, 王平. 基于 cAMP/CREB 信号通路探讨天王补心丹对复合失眠模型大鼠学习记忆水平及神经因子的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(9): 1991-1994, 2016.
- [10] 黄攀攀, 王平, 李贵海, 等. 老年阴虚失眠动物模型的建立与评价 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1719-1723.
- [11] 刘珊, 敬秀平, 谢安卫, 等. 天王补心丹对失眠模型鼠的疗效及部分机制研究 [J]. 世界中医药, 2021, 16(5): 775-778.
- [12] Ren XJ, Wang QQ, Zhang XP, et al. Establishment of a rat model with ageing insomnia induced by D-galactose and parachlorophenylalanine [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4): 3228-3236.
- [13] Kaswan NK, Mohammed Izhah N, Tengku Mohamad T, et al. Cardamonin modulates neuropathic pain through the possible involvement of serotonergic 5-HT1A receptor pathway in CCI-induced neuropathic pain mice model [J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3677.
- [14] 吴尚魁, 刘鹤香, 刘春霞, 等. 怀地黄对中枢神经系统的抑制效应 [J]. 新乡医学院学报, 1989, 1: 12-14.
- [15] 王婷婷, 王芮, 杨伟丽, 等. 六味安神中药对小鼠镇静催眠作用影响的研究 [J]. 河北中医药学报, 2021, 36(2): 1-5.
- [16] 刘彦飞. 地黄活性物质与功能研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [17] 武锦春, 杜晨晖, 秦雪梅, 等. UHPLC/Q-Orbitrap-MS 结合化学计量学方法研究酸枣仁入血成分 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 19-26.
- [18] 张羽翀, 王梦阳, 林慧娇, 等. 五味子木脂素对氯苯丙氨酸致失眠大鼠的催眠作用 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(4): 861-863.
- [19] Zhu H, Zhang L, Wang G, et al. Sedative and hypnotic effects of supercritical carbon dioxide fluid extraction from *Schisandra chinensis* in mice [J]. *J Food Drug Anal*, 2016, 24(4): 831-838.
- [20] 贾颖, 郭亚菲, 孙胜杰, 等. 超临界 CO₂ 萃取生酸枣仁挥发油的镇静催眠作用研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 4181-4183.
- [21] 徐飞飞, 田雅娟, 李钦青, 等. 酸枣仁-茯苓-党参水提物对小鼠睡眠的改善作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 300-308.
- [22] 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.
- [23] 王天合, 李慧君, 张丹丹, 等. 茯苓水提物 UPLC 指纹图谱的建立及其镇静催眠作用的谱效关系研究 [J]. 中国药房, 2021, 32(5): 564-570.
- [24] 马欣悦, 李瑞海, 贾天柱. 柏子仁总萜类成分药理活性及提取工艺研究 [J]. 实用药物与临床, 2017, 20(1): 65-68.
- [25] 苏文雅, 王文婷, 林向辉, 等. 运用协同戊巴比妥钠模型探讨鲜人参膏对小鼠的促睡眠作用 [J]. 吉林农业大学学报, 2021, 43(3): 349-354.
- [26] 孙胜杰. 酸枣仁-远志活性部位镇静安神作用与机理研究 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2019.
- [27] 王颖, 陈英红, 徐宏, 等. 人参糖蛋白的结构及其镇静安神作用研究 [J]. 特产研究, 2017, 39(2): 1-4, 8.
- [28] 孟玲欣, 范贵民, 王景涛. 改良多平台水环境法制作大鼠 REM 睡眠剥夺模型的研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(2): 99-100.
- [29] 尹超, 游秋云, 张美娅, 等. 生慧汤对慢性睡眠剥夺小鼠学习记忆及海马 IL-6、TNF- α 、COX-2 基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 96-100.
- [30] 赵翠, 张颖, 王璐, 等. 酸枣仁提取物对睡眠剥夺大鼠免疫功能的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(16): 1941-1945.
- [31] 张娅, 黄俊山, 吴松鹰, 等. 1379 例原发性失眠中医症状和证型临床特征分析 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1704-1707.
- [32] 吴九如. 熟眠方对失眠模型大鼠 IL-1 β 、PGD2 和 GABA 表达的影响 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2014.
- [33] 徐章猛, 周静, 冯栋宏, 等. 环磷酸腺苷诱导气虚体质大鼠模型的探索性研究 [J]. 四川中医, 2020, 38(5): 90-94.
- [34] 张舜波, 王平, 田代志, 等. 酸枣仁总皂苷对失眠老年大鼠脑氨基酸类神经递质及受体表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 124-127.
- [35] Belfer SJ, Bashaw AG, Perlis ML, et al. A *Drosophila* model of sleep restriction therapy for insomnia [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(2): 492-507.
- [36] Dai X, Zhou E, Yang W, et al. Molecular resolution of a behavioral paradox: sleep and arousal are regulated by distinct acetylcholine receptors in different neuronal types in *Drosophila* [J]. *Sleep*, 2021, 44(7): zsab017.
- [37] 杨波, 张爱华, 王萍, 等. 基于果蝇模型的酸枣仁皂苷 A、B 治疗失眠症的实验研究 [J]. 中医药信息, 2013, 30(5): 55-57.
- [38] 张莉. 基于益气养血法的芪归补血颗粒对环磷酸腺苷所致小鼠脾脏氧化应激损伤的保护机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [39] 王雪, 赵燕, 吴昊, 等. 中医心、血、神三者间关系的理论探讨 [J]. 环球中医药, 2018, 11(12): 1909-1913.
- [40] González-Rueda A, Pedrosa V, Feord RC, et al. Activity-dependent downscaling of subthreshold synaptic inputs during slow-wave-sleep-like activity *in vivo* [J]. *Neuron*, 2018, 97(6): 1244-1252.
- [41] 张曼, 戴建业, 唐乾利. 白背桐黄钻方调控失眠剥夺大鼠脑电活动、神经递质、炎症因子和氧化应激的促眠机制研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(11): 2432-2435.

[收稿日期] 2021-12-10