

肝郁证失眠大鼠模型的建立与评价

朱洁^{*} 中国明¹ 汪远金¹ 胡闻²

(1. 安徽中医学院中西医结合临床学院, 安徽省合肥市梅山路103号, 230038;

2. 安徽医科大学附属医院省立医院病理科)

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2008B074)

* 通讯作者: zhuji53@163.com, (0551) 5169207

摘要 目的 探索肝郁证失眠病证结合大鼠模型的建立和评价方法。方法 24只SD大鼠随机分成正常对照组、模型组和酸枣仁汤组, 每组8只, 采用慢性夹尾刺激和腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)复合因子造模法建立肝郁失眠大鼠模型, 酸枣仁汤组大鼠于造模第7d开始给予酸枣仁汤7.5g/(kg·d)灌胃, 对各组大鼠进行宏观体征观察、行为学评价、血液流变学分析、病理学检查和下丘脑、海马组织、5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)检测。结果 模型组大鼠睡眠节律明显改变, 体重增长缓慢, 学习记忆能力下降, 血流变高, 中、低切全血黏度均显著升高, 下丘脑、海马组织的5-HT及NE含量存在紊乱($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而酸枣仁汤组对上述指标均有改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 采用慢性夹尾刺激和腹腔注射PCPA复合因子造模法建立的肝郁失眠证大鼠模型具有可行性。

关键词 失眠; 肝郁证; 病证结合动物模型

Establishment and Evaluation of Insomnia Rat Model with Liver Depression Syndrome

ZHU Jie¹, SHEN Guoming¹, WANG Yuanjin¹, HU Wen²

(1. Clinical College of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038; 2. The Provincial Hospital of Anhui Medical University)

ABSTRACT Objective To study the method to establish and evaluate the insomnia rat model with liver depression syndrome. **Methods** Twenty-four SD rats were randomized into control group, model group, and Suanzaoren Decoction (*Decoction of Semen Ziziphi Spinosae*) group, with 8 in each. The insomnia rat model with liver depression syndrome was established by chronic stimulation of tail clipping and intraperitoneal injection of parachlorophenylalanine (PCPA). Suanzaoren Decoction group was given the decoction from the 7th day of modeling by gastric perfusion 7.5g/(kg·d). All rats were assessed through the determination of rat's general signs, ethology, hemorheological examination, pathological observation, and contents of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and norepinephrine (NE) in hypothalamic and hippocampus. **Results** Compared with normal rats, the model rats demonstrated significantly disturbed sleep pattern, slow growing of weight, decreased learning capability and memory, and increased blood viscosity in hemorheology. The content of 5-HT and NE in hypothalamus and hippocampus of model rats was disordered ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Suanzaoren Decoction had a regulative function to a certain degree. **Conclusion** It is practical to establish the insomnia rat model with liver depression syndrome by chronic stimulation of tail clipping and intraperitoneal injection of PCPA.

Key words Insomnia; liver depression syndrome; disease-syndrome-combined animal model

失眠多由七情所伤、思虑劳倦或暴受惊恐, 亦有禀赋不足、年迈体虚等所致。目前西医失眠动物模型是通过各种方法剥夺动物睡眠或干扰睡眠的相关物质或脑区, 使得动物入睡困难或总睡眠时间减少, 从而模拟临床失眠患者的症状^[1-2]。但该模型与中医辨证论治、方证对应的治疗理论不相适应^[3]。本研究以酸枣仁汤的适应证肝郁型失眠为研究对象, 以期建立既能准确反映中医方药功效或毒性、体现中医失眠证的辨证, 又能和现代疾病模型结合的病证结合模型。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

SPF级SD大鼠, 体重180~200g, 购于安徽省实验动物中心[实验动物许可证号: SCXK(皖)2005-001]。将24只大鼠按随机数字表法随机分为正常对照组、模型组、酸枣仁汤组, 每组8只。

1.2 实验药物

酸枣仁汤: 由酸枣仁18g、茯苓10g、知母10g、川芎5g、甘草3g组成, 均购于安徽省中医院, 经鉴定均符合《中华人民共和国药典》标准。按传统方法煎煮,

浓缩,分装灭菌后,4℃冰箱冷藏备用。临用前置于20℃环境下预热。

对氯苯丙氨酸(PCPA)的制备:将PCPA充分研磨,用弱碱性生理盐水助溶,临用时配成40mg/ml混悬液。

1.3 试剂及仪器

PCPA(Sigma公司,批号64898MJ),5羟色胺(5-HT)酶联免疫检测试剂盒(上海森雄生物科技有限公司,批号XY001520),去甲肾上腺素(NE)酶联免疫检测试剂盒(上海森雄生物科技有限公司,批号XY001782),YDAIV型全自动血流变仪(北京宏润达世纪科技发展有限公司),JEM-1230型透射电子显微镜(日本电子公司)。

1.4 造模方法

参阅文献[5-9],结合预实验,采用大鼠慢性夹尾刺激和PCPA腹腔注射复合因子造模法,并修整大鼠夹尾刺激的方式、时间和PCPA的剂量。将每组大鼠置于同一笼内,用尖端包扎纱布的止血钳分别夹大鼠尾部,令其与其他大鼠厮打,每天刺激45min,控制刺激强度,以不破皮流血为度,连续20d,于造模第16d起,对模型组和酸枣仁汤组的大鼠按40mg/100g腹腔注射PCPA,1次/d,连续2d。酸枣仁汤组大鼠于造模第7d起,给予酸枣仁汤7.5g/(kg·d)灌胃,每天1次,连续14d。造模第21d,用10%水合氯醛,0.35ml/100g体重麻醉大鼠,以备实验。

1.5 指标检测

宏观体征评价:每周观察大鼠实验前后精神、活动、睡眠、皮毛、饮食、体重、排泄等状态。

行为学评价:造模第16d开始,进行跳台实验,跳台装置为90cm×30cm×60cm的被动反射箱,用木板隔成2间,箱底密布铜栅,连接可调电压,能进行连续电刺激。箱正中央放置高和直径均为4.5cm的橡皮垫,作为大鼠逃避电击的安全区。训练及测试时将大鼠放入箱中适应3min,然后底部栅板通电(电压为50V),大鼠受到电刺激后会跳到平台上躲避电击。记录大鼠从底部栅板通电到跳到平台上的时间为逃避潜伏期,将潜伏期超过2min的大鼠排除。记录5min内大鼠从台上跳下遭电击的次数作为错误次数。连续训练4d,以第5d大鼠的逃避潜伏期和错误次数作为大鼠最终的学习行为成绩评价。

血液流变学分析:大鼠腹主动脉取血,测定全血黏度(包括高切、中切、低切)、血浆黏度。

下丘脑、海马组织5-HT、NE含量的测定:麻醉大鼠迅速在冰上取脑,分离双侧海马和下丘脑,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠下丘脑、海马组织NE、5-HT的含量,具体操作参照试剂盒说明书。

肝组织病理学检测:取大鼠肝中叶同一部位1mm³若干块,立即放置于2.5%戊二醛溶液中固定12h,经PBS洗涤,用1%锇酸后固定1h后, PBS再次洗涤,不同浓度的乙醇逐级脱水,采用环氧树脂包埋,制备超薄切片(片厚70nm),铅铀双重染色,在透射电子显微镜下观察摄片。

1.6 统计学方法

采用SPSS 11.0统计软件进行数据处理,计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本之间的组间比较采用单因素方差分析,进行SNK检验。

2 结果

2.1 各组大鼠宏观体征比较

造模前各组大鼠反应敏捷、皮毛色泽光亮、精神状态良好。其中正常对照组大鼠的精神状态和行为表现,在实验3周前后未见明显改变,睡眠节律明显,表现为昼伏夜精。而模型组和酸枣仁汤组大鼠在初次夹尾时,均表现为前肢离地,与临近大鼠对峙呈防御姿态、嘶叫、毛须竖立、呼吸频率加快。1周后,模型组大鼠皮毛欠光泽、警惕性高,叫声尖细,但直立对峙、嘶叫次数等逐渐减少。2周后,模型组大鼠毛发散乱,夹尾过程中抗争不积极,对刺激吱吱细叫,活动明显减少,甚至小便失禁,毛发浸湿,大多蜷伏在角落,表现出“肝郁证”特点。第3周造模结束时,模型组大鼠表现为睡眠节律消失,精神萎靡但极易受惊,对刺激常呈逃避状态,贴边弓背活动或扎堆蜷伏在角落,进食明显减少,大便较稀。毛发散乱枯燥,胡须下垂,眼角有分泌物,进一步模拟肝郁失眠的体征特点。酸枣仁汤组大鼠与模型组相比,对峙、撕咬的情况较少,搔抓、洗脸、舔足、理毛等动作基本灵活,叫声比较柔和,毛发整洁,饮食正常,大鼠睡眠节律基本存在。

2.2 各组大鼠体重比较

表1示,与正常对照组大鼠体重相比,模型组和酸枣仁汤组大鼠在造模1周后,体重增长缓慢,有统计学意义($P < 0.05$)。酸枣仁汤组大鼠在造模2周、给药1周后,体重增加与模型组相比有统计学意义($P < 0.05$);连续给药2周后,酸枣仁汤组大鼠体重增加显著高于模型组($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠不同时间体重增加比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1周	2周	3周
正常对照组	8	31.88± 8.84	65.63± 12.08	101.25± 10.61
模型组	8	23.13± 7.99	35.00± 7.56 *	50.63± 16.57 *
酸枣仁汤组	8	20.63± 7.70	47.50± 12.82 * #	81.88± 12.80 * # #

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,# # $P < 0.01$

2.3 各组大鼠跳台实验比较

表 2 示,与正常组对照比较,模型组逃的避潜伏期显著延长 ($P < 0.01$),错误次数明显增加 ($P < 0.05$),酸枣仁汤组能明显缩短模型组大鼠的逃避潜伏期 ($P < 0.01$),减少错误次数 ($P < 0.05$),与正常对照组大鼠无统计学意义 ($P > 0.05$).

表 2 各组大鼠跳台实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	逃避潜伏期 (s)	错误次数 (次)
正常对照组	8	12.88± 2.90	2.13± 0.99
模型组	8	24.00± 6.53 *	5.13± 2.10
酸枣仁汤组	8	15.38± 4.47 #	3.00± 1.60

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,# # $P < 0.01$

2.4 各组大鼠血流变学指标比较

表 3 示,模型组大鼠的高、中、低切全血黏度均高于正常对照组和酸枣仁汤组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而各组的血浆黏度无统计学意义 ($P > 0.05$).

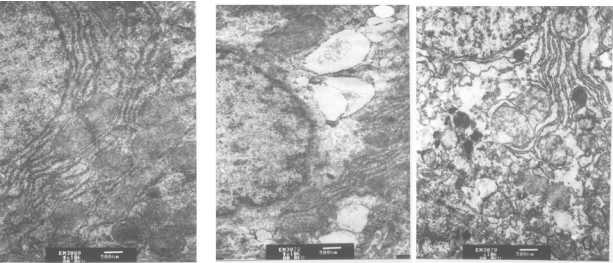
2.5 各组大鼠下丘脑、海马组织 5-HT、NE 含量比较

表 4 示,与正常对照组比较,模型组大鼠下丘脑、海马的 5-HT 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);下丘脑的 NE 含量显著升高 ($P < 0.01$),而

海马的 NE 含量显著降低 ($P < 0.01$);酸枣仁汤组大鼠与模型组相比,下丘脑、海马区的 5-HT 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与正常对照组无统计学意义 ($P > 0.05$),其下丘脑的 NE 含量均显著低于正常对照组和模型组大鼠 ($P < 0.01$),海马的 NE 含量与模型组无统计学意义 ($P > 0.05$),均低于正常对照组 ($P < 0.01$).

2.6 各组大鼠肝组织超微结构比较

图 1 示,正常对照组肝细胞形态规则,细胞膜完整光滑.线粒体丰富无肿胀,可见多量卵圆形线粒体,线粒体内外双层膜结构可见,内膜向内部伸展,折叠形成许多嵴.粗面内质网排列整齐,无扩张现象,可见肝细胞糖原颗粒.与正常对照组比较,模型组肝细胞线粒体部分呈空泡样变性,数量明显减少,线粒体内外双层膜结构不清,嵴突有破坏.粗面内质网数量减少,有断裂,部分扩张呈球状.肝细胞内糖原颗粒明显减少.与模型组相比,酸枣仁汤组线粒体数量尚可,与正常对照组差异不大,大部分线粒体呈卵圆形,可见嵴突,嵴排列清晰,接近正常,大部分粗面内质网无扩张,糖原颗粒含量相对模型组增多,与正常对照组无明显差异.



正常对照组 模型组 酸枣仁汤组

图 1 各组大鼠肝组织超微结构

表 3 各组大鼠血流变学指标比较 ($\text{mPa} \cdot \text{s}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	全血黏度			血浆黏度
		高切	中切	低切	
正常对照组	8	3.9± 0.57	5.16± 0.74	7.46± 0.51	2.10± 0.25
模型组	8	5.36± 0.72	7.97± 0.96 *	8.80± 0.91	2.3± 0.20
酸枣仁汤组	8	4.54± 0.64	5.59± 0.60 #	7.88± 0.85	2.13± 0.10

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,# # $P < 0.01$

表 4 各组大鼠下丘脑、海马组织 5-HT、NE 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	5-HT (ng/ml)		NE (pg/ml)	
		下丘脑	海马	下丘脑	海马
正常对照组	8	11.13± 1.93	10.45± 1.66	239.57± 39.86	262.00± 40.95
模型组	8	7.83± 0.86 *	7.66± 1.38	488.37± 44.49 *	81.85± 28.56 *
酸枣仁汤组	8	12.13± 2.05 #	10.99± 2.78	50.64± 10.16 * # #	80.57± 22.50 *

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,# # $P < 0.01$

3 讨论

酸枣仁汤以酸枣仁为君药,配伍川芎、知母、茯苓、甘草组方,能散肝郁,生心血,养肝血,故为治疗虚劳肝极不能眠之效方,并被现代临床研究所证明^[10-11]。本研究采用大鼠慢性夹尾刺激和 PCPA 腹腔注射复合因子造模的方法,希望建立与酸枣仁汤对应的病证结合动物模型——肝郁失眠大鼠模型,并对此进行论证。

研究表明,长期慢性夹尾刺激可以使大鼠出现情绪抑郁,胡须下垂,叫声尖细,贴边或扎堆活动,饮食明显减少,体重增加缓慢等特征。这符合长期情志刺激,郁怒压抑于体内,肝气郁滞,久失疏泄,导致“肝郁”。而“肝主藏血”,肝郁久化热,耗伤阴血而致血不养心,故神魂不宁,虚烦不得眠,为此实验进一步腹腔注射 PCPA,耗竭大鼠体内的 5-HT,腹腔注射 28~30h 后,模型大鼠出现睡眠昼夜节律不明显,昼不寐夜不精,睡眠萎靡但极易受惊,常贴边或扎堆活动,整体观察与正常大鼠昼伏夜精的生活习性有明显不同,从而模拟肝郁失眠的宏观体征。

结果显示,模型组大鼠的高、中、低切全血黏度显著升高,这符合中医肝郁不畅,肝血不足,气郁血滞,运行无力,影响血液正常运行的病理改变,电镜观察肝细胞相对缺血缺氧的超微结构改变也进一步佐证肝郁失眠模型的建立。

跳台实验结果显示,肝郁失眠模型大鼠的学习记忆能力明显下降,从行为学改变的角度证明模型符合肝郁失眠患者,情绪抑郁,晚间难以入眠,无法获得正常睡眠,而白日精神萎靡,影响正常的工作生活。模型组大鼠下丘脑和海马组织的 5-HT 含量均显著下降,脑内 NE 含量紊乱。现代研究认为,下丘脑是公认的“觉醒中枢”和“睡眠中枢”,在与学习记忆有关的脑区中,海马结构的作用显得特别突出。体内 5-HT 缺乏是导致抑郁、失眠等疾病的重要生物学指标^[12],实验结果确证了 PCPA 可以耗竭大鼠体内 5-HT,进而加重机体精神、情志、行为方面的抑郁,诱发失眠的发生。

本研究采用以方测证的方法,结果显示酸枣仁汤能明显改善模型大鼠的睡眠节律紊乱,提高大鼠的学习记忆能力,并对肝郁失眠模型大鼠下丘脑和海马组织的单胺递质紊乱具有一定的调节作用。

总之,我们通过宏观辨证指标和微观实验指标检测以及经典方药疗效评价,认为与酸枣仁汤对应的病证结合动物模型——肝郁失眠大鼠模型对肝郁失眠基础研究,具有参考价值。

参考文献

- [1] 李海静,高月,刘萍,等.失眠动物模型研究进展[J].中国药理学通报,2007,23(4): 437-440.
- [2] Revel FG, Gottowik J, Gatti S, et al. Rodent models of insomnia: A review of experimental procedures that induce sleep disturbances[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2009, 33(6): 874-899.
- [3] 熊兴江,王阶.基于药物客观指证的方剂学相关问题[J].中西医结合学报,2010,8(1): 20-24.
- [4] 汪欣,谢鸣.酸枣仁汤对 EPM 大鼠血清 NO 及细胞因子水平的影响[J].北京中医药大学学报,2004,27(1): 49-51.
- [5] 陈小野.实用中医证候动物模型学[M].北京:北京医科大学出版社,1992: 23.
- [6] 冯伯艳,张福利,周景华,等.温胆汤的睡眠改善作用与失眠大鼠脑中胆囊收缩素 8 表达的关系[J].中国临床康复,2006,10(35): 45-47.
- [7] 肖成荣,马增春,李海静,等. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制[J].毒理学杂志,2007,21(4): 326.
- [8] Touret M, Sarda N, Gharib A, et al. The role of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) in the regulation of the sleep/wake cycle in parachlorophenylalanine (p-CPA) pre-treated rat: a multiple approach study[J]. Exp Brain Res, 1991, 86(1): 117-124.
- [9] Borbély AA, Neuhaus HU, Tobler I. Effect of p-chlorophenylalanine and tryptophan on sleep, EEG and motor activity in the rat[J]. Behav Brain Res, 1981, 2(1): 1-22.
- [10] 张诗军,陈泽雄,林佑武,等.加味酸枣仁汤治疗慢性乙型肝炎失眠症临床疗效观察[J].中药材,2007,30(11): 1482-1484.
- [11] Chen CY, Chen YF, Tsai HY. What is the effective component in suanzaoren decoction for curing insomnia? Discovery by virtual screening and molecular dynamic simulation[J]. J Biomol Struct Dyn, 2008, 26(1): 57-64.
- [12] Trachte GJ, Uncini T, Hinz M. Both stimulatory and inhibitory effects of dietary 5-hydroxytryptophan and tyrosine are found on urinary excretion of serotonin and dopamine in a large human population[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2009, 5(1): 227-235.

(收稿日期: 2010-08-17; 修回日期: 2010-12-04)

[编辑: 行之]

邮购四大经典和四大基础 VCD 光盘

四大经典 VCD《内经》《伤寒论》《金匱要略》《温病学》全套 2300 元;四大基础 VCD《中医基础理论》《中医诊断学》《中药学》《方剂学》全套 2300 元;单套 600 元。

汇款地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社;收款人:北京医海林音像书店收,邮编:100700 地址:北京东直门内南小街 16 号中国中医科学院(周六、日休息),电话:(010) 64013162