

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.14.013

综述

肝郁气滞型失眠实验动物模型复制方法及评价概述

张认真, 叶钰娟, 魏玉婷, 马翠, 严兴科✉

甘肃中医药大学针灸推拿学院, 甘肃省兰州市城关区定西东路35号, 730000

[摘要] 梳理近年来中医肝郁气滞型失眠病证结合动物模型的研究资料, 从实验动物选择、造模方法、模型评价方面进行总结, 以期为肝郁气滞型失眠实验模型的规范化制备和干预机制研究提供参考。实验动物选择方面, 肝郁气滞型失眠模型中大鼠、小鼠因其睡眠模式与人类较为相似而常用于睡眠模式的研究; 斑马鱼因基因同源性高而适用于早期发育中睡眠模式的研究; 猕猴、普通狨猴和食蟹猴则因具有与人类更接近的生理和行为特性, 被用于高度复杂的睡眠障碍研究。造模方法方面, 电刺激法、慢性束缚及慢性情绪应激法各有其特点和应用场景, 而慢性夹尾刺激复合腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)法结合了物理和化学两种刺激, 以模拟人类失眠的复杂机制, 能较全面地模拟肝郁气滞型失眠的病理状态。评价指标方面, 脑电图(EEG)和肌电图(EMG)监测、巴比妥类药物协同睡眠实验是评价肝郁气滞型失眠动物模型最常用且科学的方法, 能够提供直观、连续的睡眠状态监测; 巴比妥类药物协同睡眠实验可以反映模型动物对睡眠调节药物的敏感性和响应性; 而以方测证评价法的引入将中医的治疗和诊断原则与现代科学研究相结合, 为证候模型的评价提供了新思路。

[关键词] 失眠; 肝郁气滞; 病证结合; 动物模型; 综述

失眠是以长期不能获得正常睡眠为特征的一类病证, 属中医学“不寐”范畴。《素问·五脏生成篇》中记载“人卧血归于肝”, 可见睡眠与肝关系密切。肝主疏泄, 肝气郁结时, 气机升降出入失常, 气血上逆, 脑神被扰, 心神不宁, 进而导致失眠^[1]。研究发现, 失眠证型以肝郁气滞为主^[2], 但相关动物实验中病证结合模型的建立和评价仍存在一定局限性, 如各病证结合的模型评价标准不一致, 部分模型仅简单累加各种因素而无法与相应的中医证候高度契合^[3]。因此, 本研究对目前肝郁气滞型失眠病证结合动物模型相关文献进行了系统梳理, 着重从实验动物选择、造模方法、模型评价方面进行总结, 以期为肝郁气滞型失眠实验的动物模型规范化制备和相关干预机制研究提供参考。

基金项目: 2023年度甘肃省联合科研基金(23JRRA1522); 2023年度甘肃省优秀博士项目(23JRRA1222); 2023年度甘肃省省级重点人才项目(甘组通字[2023]20号); 2023年度研究生创新创业基金(甘中医大研发[2022]66号); 2023年度甘肃中医药大学科学研究与创新基金(2023-19)

✉ 通讯作者: yanxingke@126.com

1 失眠实验动物的选择

在失眠的动物实验中, 应考虑睡眠结构、睡眠稳态和神经生化调节机制与人类的相似性, 故模型动物的选择至关重要。目前比较常用的动物有啮齿类动物大鼠、小鼠, 鲤科鱼类动物斑马鱼, 非人类灵长类动物猕猴、普通狨猴和食蟹猴等。

1.1 大鼠、小鼠

大鼠、小鼠的睡眠模式与人类有较高的相似性, 且易于在实验中进行监控和操作, 所以是常用的睡眠实验动物模型^[4-5]。其中小鼠因基因背景的多样性和遗传操作的便利性而被广泛应用于失眠的基础研究中。通过对小鼠的睡眠调节基因进行敲除或敲入, 可探究这些基因对睡眠行为的影响^[6]。大鼠通常被应用于复杂的睡眠模式研究中, 如快速动眼睡眠(REM)的调节机制, 又因其大脑结构更接近于人类, 且行为模式更易于观察^[7], 如对睡眠剥夺的反应可通过脑电图(EEG)和肌电图(EMG)监测来详细研究, 故大鼠已成为理想的神经生理学研究模型。

1.2 斑马鱼

斑马鱼与人类的基因高度同源, 早期胚胎透明且发育速度快, 便于体外观察, 使其成为研究早期发育中睡眠模式的理想模型动物选择^[8-9], 通过可视化方法能够对影响睡眠的遗传和环境因素进行直接观察。

1.3 猕猴、普通狨猴、食蟹猴

猕猴、普通狨猴和食蟹猴是与人类生理和行为相似的非人灵长类动物, 特别适用于研究复杂的睡眠障碍, 其表现出的睡眠模式与人类相似, 有助于评估慢波睡眠、睡眠质量及其对认知和情感的影响^[10-13]。猕猴因其稳定、完善的睡眠结构成为研究 REM 和非快速动眼睡眠 (NREM) 周期性变化的理想模型^[10]。另有研究^[11]显示, 食蟹猴的睡眠模式更加分散和多相, 在研究慢波睡眠和 REM 的调节机制及 EEG 等特征方面, 具有重要的应用价值; 而普通狨猴则表现出更接近于人类的单相睡眠模式, 常用于研究昼夜节律和睡眠相关的神经生理过程。此外, 当进行睡眠实验时, 需注意药物代谢酶活性的物种差异, 特别是在成瘾分析中, 因食蟹猴神经生理特性及其药物代谢酶活性与人类相似, 已成为一种有价值且更具转化性的动物模型^[14]。

综上, 在动物实验选择中大鼠、小鼠模型是研究复杂睡眠模式调节机制的理想选择; 在基因和早期发育的研究中, 斑马鱼可能更有优势; 而对于高度复杂的睡眠障碍, 需深入了解其对认知和情绪的影响, 则适合选择猕猴、普通狨猴和食蟹猴作为模型动物。此外, 由于以上动物与人类在生理和病理上仍具有差异, 故应选择能最佳模拟人类失眠症状和生理、病理机制的动物模型, 并确保实验设计符合科学原则与伦理标准。

2 肝郁气滞型失眠病证结合动物模型的制备

在实验模型的制备过程中, 需要考虑电刺激对实验动物造成的情绪反应能否准确地模拟中医学“怒伤肝”的过程, 继而导致肝郁气滞。目前肝郁气滞失眠病证结合模型的制备方法主要可分为物理刺激和化学刺激两大类。

2.1 物理刺激

2.1.1 单因素应激刺激睡眠剥夺法

1) 电刺激法。电刺激法会引发动物的紧张或恐惧从而产生心理应激反应。如将大鼠放在鼠笼中央底栅上, 当饮水或摄食时就会被电击, 使大鼠处于一种惧怕的心理状态^[15]。有研究^[16]发现饮水器电击法可对大鼠睡眠时相和睡眠节律造成显著影

响, 使大鼠睡眠总时间和睡眠持续时间均显著缩短。另有研究^[17]采用电刺激成功复制肝郁模型, 造模后大鼠出现睡眠障碍, EEG 和 EMG 显示脑区放电发生异常。

2) 慢性束缚。慢性束缚通过限制动物的自主活动和运动空间及范围, 模拟人类情绪郁怒而不得发泄所形成的持续性的心理和生理上的应激, 造成肝郁气滞^[18-19]。有研究^[20]采用慢性束缚法建立肝郁失眠大鼠模型, 造模后的大鼠呈现躲避状态、自主活动减少、大便松散、皮毛失去光泽, 运用核磁共振氢谱 (¹H NMR) 技术对大鼠血清进行代谢组学分析, 发现模型大鼠葡萄糖和肌酸的含量明显高于正常大鼠, 而 3-羟基丁酸、谷氨酰胺、磷脂酰胆碱、磷酸胆碱和不饱和脂肪酸的含量明显偏低。

3) 慢性情绪应激法。空瓶刺激是一种常用的慢性情绪应激法, 主要用于诱发动物的情绪应激反应^[21-22]。林文娟等^[23]首次创建该方法, 即在动物接受定时喂水训练后, 给予不定时的空瓶刺激以诱发动物的情绪应激反应。有研究^[24]采用空瓶刺激连续 35 天诱发大鼠情绪应激, 结果大鼠睡眠总时间、慢波睡眠、REM 时间均减少。另有研究^[25]利用空瓶刺激诱发大鼠睡眠障碍模型, 发现模型组大鼠出现攻击行为, 全天睡眠时间显著减少。

2.1.2 复合因素应激刺激睡眠剥夺法

1) 电击刺激复合 REM 睡眠剥夺法。有研究^[26]采用足底电击联合睡眠剥夺建立心理应激-失眠模型, 模型大鼠全身皮毛疏松散乱、发黄, 眼暗红, 易激惹, 与肝郁气滞表现类似, 表明该复合法可成功建立肝郁气滞模型。

2) 夹尾刺激复合 REM 睡眠剥夺法。中医学认为肝郁致瘀, 而血浆中前列环素 (PGI₂) 和血栓素 A₂ (TXA₂) 的失衡与血瘀证密切相关^[27]。PGI₂ 是强效的血管扩张剂和抗血栓因子, TXA₂ 是促进血小板聚集和血管收缩的物质, 通过其代谢物 6-酮-前列腺素 F_{1a} (6-keto-PGF_{1a}) 和血栓素 B₂ (TXB₂) 的变化反映 PGI₂、TXA₂ 的水平^[28]。有研究^[29]采用 D-半乳糖腹腔注射 6 周致亚急性衰老大鼠模型, 再采用夹尾刺激复合 REM 睡眠剥夺法成功复制老年肝郁失眠大鼠模型, 造模后的大鼠呈易激怒、眼色暗红、回避等状态, REM 睡眠时间被完全剥夺, 总睡眠时间显著减少, 同时血浆中 TXB₂ 含量显著升高, 6-keto-PGF_{1a} 含量降低, 经舒郁安神方干预后上述症状及指标得到明显改善, 运用以方测证佐证肝郁模型复制成功。

2.2 化学刺激

2.2.1 单因素药物刺激睡眠剥夺法 主要为腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)。5-羟色胺(5-HT)对睡眠的调节起着至关重要的作用,而PCPA作为一种选择性的血清素合成抑制剂,通过抑制色氨酸羟化酶,减少5-HT的合成,从而降低脑内5-HT水平^[30-31]。有研究^[32]采用腹腔注射PCPA法成功复制肝郁证失眠大鼠模型,造模后大鼠出现兴奋、烦躁、易激惹等表现,符合临床肝郁的症状,且入睡率显著降低,脑内5-HT含量明显降低。

2.2.2 复合因素刺激睡眠剥夺法 慢性夹尾刺激复合腹腔注射PCPA。有研究^[33]采用慢性夹尾刺激复合PCPA腹腔注射法成功复制肝郁证失眠大鼠模型,造模后的大鼠毛发散乱,易激惹,睡眠节律消失;且肝组织超微结构异常改变,肝细胞线粒体数量明显减少,部分结构呈空泡样,粗面内质网数量减少、断裂,部分结构扩张呈球状,肝细胞内糖原颗粒明显减少;液相色谱-质谱联用(LC-MS)法检测发现,模型大鼠全血黏度、海马去甲肾上腺素(NE)含量显著升高,5-HT含量显著降低,经酸枣仁汤干预后上述症状及异常指标明显好转。另有研究^[34]采用束缚大鼠前肢后进行夹尾刺激,造模第14天后腹腔注射PCPA,结果模型组大鼠毛色枯燥、易激惹、打斗明显、精神状态较差,且睡眠节律严重紊乱,符合肝郁气滞证型的表现,经柴芩宁神颗粒灌胃干预后全血黏度降低,血清中5-HT、 γ -氨基丁酸(GABA)含量显著升高,谷氨酸(Glu)含量显著降低。还有研究^[35]采用慢性夹尾刺激复合腹腔注射PCPA法造模,发现大鼠昼夜节律消失,下丘脑5-HT含量显著降低,NE、多巴胺(DA)含量显著升高,经和解安神汤干预后可显著改善上述症状。一项研究^[36]同样采取慢性夹尾刺激复合腹腔注射PCPA法造模,模型组大鼠符合肝郁失眠的表现,经柴芩宁神颗粒干预后下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素、血浆促肾上腺皮质激素、血清皮质醇等异常指标均有明显改善。

综上,在构建肝郁气滞型失眠动物模型方面,物理刺激法和化学刺激法各有适用场景。电刺激技术是一个复杂的刺激手段,可以对电击的强度、频次和时长进行人工调节,从而避免引起实验动物的适应反应^[37]。慢性束缚法和慢性情绪应激法虽可模拟持续性应激环境从而更贴近临床患者的反应,但可能存在的动物伦理问题也不容忽视。而复合因素应激刺激睡眠剥夺法是一种综合模拟多重应激源

影响下失眠状态的动物模型构建策略,通过结合不同类型的应激手段模拟现实生活中复杂的应激环境对睡眠质量的影响。复合因素应激刺激睡眠剥夺法的优势在于其能够更全面地反映因应激导致的睡眠障碍的多维度特征,更接近于人类的失眠病理状态^[19]。化学刺激法中腹腔注射PCPA能够直接作用于相关神经递质,模拟失眠的生化过程。采用慢性夹尾刺激复合腹腔注射PCPA法兼具了物理和化学刺激的优势,通过物理手段限制动物活动并引入持续性疼痛应激,配合化学手段干预神经递质,能够在模型动物中有效复制与人类肝郁气滞型失眠相似的行为和生理特征,为深入探讨失眠的生理病理基础和探索新的治疗策略提供了有效参考。

3 肝郁气滞型失眠动物模型的评价

在评价肝郁气滞型失眠动物模型时,需从多个方面进行综合考量,不仅在于模型是否符合中医理论,还需结合现代医学的方法,通过宏观表征、微观指标和以方测证等多方面进行评价,以确保模型能够真实反映肝郁气滞型失眠的病理特征。

3.1 宏观表征评价

在失眠模型的评价中,宏观表征主要包括中医证型、睡眠监测和行为学检测三大类。

3.1.1 中医证型 《中医内科常见病诊疗指南:中医病证部分》^[38]中“不寐”的诊断标准为:有失眠的典型症状,入睡困难,时常觉醒,睡而不稳或醒后不能再睡,晨醒过早,夜不能入睡,白天昏沉欲睡,睡眠不足5h,有反复发作史。《中医病证诊断疗效标准》^[39]中不寐肝郁气滞型的中医辨证标准为:有失眠症状,伴胸胁胀满、善太息、嗝气,妇女经期乳胀,月经不调,舌质淡红,脉弦。肝郁气滞型失眠动物模型的评价要基于中医理论,从整体观念出发,结合动物模型的表现来反映失眠的病证实质,而病证结合模型可模拟临床证候及人体的病理状态,进一步验证中医证候学说的科学性和实用性。中医学认为内在的疾病变化往往能通过外在的临床症状或体征表现出来。然而,由于中医病证变化的复杂性及差异性,宏观上的行为和体征往往带有较强的主观判断成分。因此,造模方法在病证评价的科学性和精准性上仍有待提升和完善。

3.1.2 睡眠监测 EEG和EMG监测是研究实验动物睡眠的重要工具,是在动物的大脑皮层表面植入EEG电极,同时将EMG电极植入到特定的肌肉组织,以记录脑电和肌电活动的方法^[40]。失眠动物通常表现为睡眠总时间减少,觉醒时间增加,各睡

眠阶段存在不同程度的时间缩短；睡眠呈片段化，即时相的发生次数和转换次数增多，持续时间减少；同时，睡眠的脑电图波形与正常动物有明显的差异^[41]。

3.1.3 行为学检测

1) 巴比妥类药物协同睡眠实验（翻正实验）。巴比妥类药物是一类常用于治疗睡眠障碍的药物，主要通过抑制中枢神经系统的作用来促进睡眠。戊巴比妥钠睡眠实验是判定失眠模型成功与否的经典方法^[42]，给予药物后待动物基本停止运动，再将其翻转，若保持 60 s 腹部朝上不翻转，即表示翻正反射消失，动物进入睡眠状态，从给药到翻正反射消失的时间段即为睡眠潜伏期；若开始转动身体且 30 s 内不能继续保持仰卧体位，则表示翻正反射恢复，大鼠觉醒，从翻正反射消失至大鼠觉醒的时间段即为睡眠时间^[43-44]。

2) 旷场实验。旷场实验通过监测未受干扰的动物自发活动来评估药物的镇静效果，是一种用于研究和评估动物的睡眠行为和睡眠质量的方法^[45]。该方法通过监测动物的自发活动来确定动物的清醒度、活跃度和休息行为，从而评估其睡眠模式，观察动物在不同时间点的行为，可识别出睡眠和觉醒周期，以及可能存在的睡眠障碍^[44]。

3.2 微观指标评价

在失眠模型的评价中，传统的证候往往难以与具体的生理或病理状态直接对应。因此，部分研究者开始结合病理学和生理学的知识，将生化指标融入诊断和治疗中。本文将生化指标分为神经递质和细胞因子两大类进行探讨。

3.2.1 神经递质

1) 单胺类神经递质。(1) 5-HT：由于色氨酸摄入不足或色氨酸羟化酶活性下降，导致 5-HT 合成减少，从而诱导失眠，而注射 5-HT 的前体 5 羟色氨酸 (5-HTP) 则可使动物的睡眠恢复正常^[46]。研究^[47]发现，失眠模型小鼠脑中 5-HT、5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA)、GABA 的含量较空白对照组明显下降，提示造模成功，且经柴胡加龙骨牡蛎汤化裁方干预后失眠小鼠睡眠质量得到显著提高。(2) DA：DA 通过调节中枢神经系统的兴奋性来促进警觉性，对于睡眠-觉醒循环的调控至关重要，DA 的异常活跃可导致包括失眠在内的睡眠障碍表现，如帕金森病和多巴胺敏感性失眠^[48]。有研究^[49]发现，失眠模型大鼠下丘脑中 DA 含量显著上升，自拟安神方能显著改善大鼠的失眠症状，且降低 DA 的含量。

(3) NE：NE 在中枢神经系统具有广泛兴奋性，维持觉醒状态，参与唤醒与警戒^[50-52]。蓝斑核去甲肾上腺素转运体 (NET) 的功能是再摄取神经元释放的 NE，使其回到突触前膜中导致蓝斑核中 NE 浓度升高，兴奋作用增强^[53-54]。有研究^[55]表明，针刺可显著降低失眠模型大鼠 NE 的含量，这可能是针刺改善失眠的作用机制之一。

2) 神经氨酸类神经递质。(1) GABA：GABA 是一种具有镇静和抑制中枢神经系统活动功能的神经物质，研究^[56]发现，采用黄连温胆汤对 PCPA 诱导的失眠模型小鼠进行干预后，其睡眠潜伏期显著缩短，睡眠时间明显延长，自主活动次数明显减少，脑组织中的 GABA 含量也有显著上升。(2) Glu：Glu 作为一种兴奋性神经递质，在中枢神经系统的大脑皮质、海马、纹状体等组织中广泛分布，可通过调控神经元的兴奋影响睡眠^[57-59]。GABA 和 Glu 分别作为中枢神经系统中重要的抑制性和兴奋性神经递质，两者含量的相对动态平衡，对维持正常的睡眠起到重要作用^[60-61]。

3) 其他。(1) 食欲肽。食欲肽是一种神经多肽，由下丘脑的特定神经元产生，对维持清醒状态和促进觉醒起着重要作用。一项研究^[62]发现疏肝健脾养心方具有镇静、催眠作用，可抑制失眠模型小鼠下丘脑中食欲肽及其受体的表达。另一项研究^[63]发现安寐丹可降低睡眠剥夺模型大鼠下丘脑食欲肽的含量从而改善睡眠。还有研究^[64]也证实不同的生命周期阶段中，食欲肽信号传导与睡眠及清醒状态之间存在抑制性关系。(2) 一氧化氮 (NO)。NO 作为一种内源性生物活性物质的信号分子参与机体睡眠觉醒稳态的调节^[65]。一项研究^[66]探讨了内源性 NO 对食欲肽能神经元的影响，发现小鼠腹腔注射咖啡因后，食欲肽能神经元及表达一氧化氮合酶 (NOS) 的硝能神经元内的 C-Fos 阳性细胞数量增加，在给予盐酸苯海拉明后，食欲肽能神经元中 C-Fos 阳性细胞的数量减少，但对硝能神经元中的 C-Fos 阳性细胞数量没有显著影响。此外，单独使用 NOS 抑制剂 7-硝基吲唑可显著增加食欲肽能神经元中 C-Fos 阳性细胞的数量，并能抑制咖啡因诱导的硝能神经元中 C-Fos 阳性细胞数量的增加。上述结果表明，内源性 NO 对促觉醒的食欲肽能神经元具有负调节作用。

3.2.2 细胞因子

1) 炎症因子。诸多研究表明，失眠与炎症因子密切相关^[67-69]，而白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白

细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是常用于睡眠研究的炎症因子^[70-71]。睡眠节律的混乱可触发核因子 κ B (NF- κ B) 的激活导致 IL-6 水平升高^[72]。另有研究^[73]表明,睡眠不足可导致大鼠海马 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平上升,激活 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1/丝氨酸-苏氨酸蛋白酶/核转录因子- κ B (Rac1/Akt/NF- κ B) 通路,加剧海马炎症并损害认知功能。

2) 瘦素 (Leptin)。Leptin 是一种由脂肪细胞分泌的细胞因子,在调节能量平衡和食欲控制方面发挥着重要作用,与睡眠时间也密切相关,可通过调节 GABA 的合成及信号传递参与睡眠的调节^[74]。有研究^[75]利用放射免疫分析法对失眠模型大鼠血浆和下丘脑中的 Leptin 进行检测,结果发现模型组大鼠 Leptin 水平均高于正常组,提示睡眠与能量代谢之间紧密相连。

3) 胆囊收缩素 8 (CCK-8)。CCK-8 是一种影响胃肠代谢肠肽类的物质。研究^[76]发现,失眠会降低睡眠剥夺大鼠下丘脑 CCK-8 水平,经清心安方干预后 CCK-8 水平显著提高,表明 CCK-8 在调节胃肠系统能量代谢的同时也影响中枢神经系统的睡眠响应,突显了 CCK-8 在睡眠调节中的重要作用。

3.3 “以方测证”评价

以方测证是通过机体对中药方剂的反应来判断疾病的性质和发展阶段的方法^[77]。在动物模型评价中应用以方测证方法是一个创新性的尝试,这种方法的目的是在动物模型上模拟人类的证候状态,然后使用中药方剂进行治疗,观察动物对中药治疗的反应,包括症状的改善、指标的变化等,推测或反证模型对应的证候属性,以此来评估中药方剂的证候疗效和作用机制^[78-79]。

综上,在评价肝郁气滞型失眠动物模型时,不仅依赖中医辨证和宏观行为学检测,还深入到了微观层面,涉及神经递质和细胞因子的变化。通过监测 5-HT、DA、GABA 等神经递质,以及 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的水平,可以客观评价失眠动物模型的病理状态,这些指标不仅反映了失眠的神经生化基础,还揭示了睡眠障碍与炎症、能量代谢之间的复杂联系。此外,采用 EEG 和 EMG 监测、巴比妥类药物协同睡眠实验和旷场实验等方法,为模型制备是否成功和药物干预的效果提供了量化的评估方法。而以方测证评价法是中医传统治疗和诊断原则与现代科学研究方法结合的一种尝试,为证候模型的评价提供方法或思路^[77]。因此,结合宏观表征、微观指

标和以方测证的综合评价,为深入理解肝郁气滞型失眠的病理机制和探索治疗方法提供了科学依据。

4 小结

中医病证结合理论应用于病证结合动物模型研究中具有其独特价值,可以在一定程度上揭示中药的作用机制。肝郁气滞型失眠模型中大鼠、小鼠适用于睡眠模式的研究;斑马鱼用于早期发育睡眠研究;猕猴、普通猕猴和食蟹猴用于复杂的睡眠障碍研究。造模方法的选择应充分考虑研究对模型准确性和操作便捷性的需求。电刺激法、慢性束缚及慢性情绪应激法各具特点,但面临伦理和实验复杂度的挑战;而慢性夹尾刺激复合腹腔注射 PCPA 法结合了物理和化学两种刺激,较全面地模拟肝郁气滞型失眠的病理状态,其有效性得到了广泛的应用和认可。在评价指标方面,EEG 和 EMG 监测、巴比妥类药物协同睡眠实验是评价肝郁气滞型失眠动物模型的常用科学方法,能全面评价模型质量和实验结果的可靠性。EEG 和 EMG 监测通过记录动物的脑电和肌电活动,能准确监测睡眠总时间、觉醒时间和睡眠阶段变化,能直观、连续地监测睡眠状态。巴比妥类药物实验通过评估药物对睡眠潜伏期和睡眠时间的影响,验证模型的有效性,反映模型动物对睡眠调节药物的敏感性和响应性^[43]。此外,神经递质和细胞因子的检测可揭示失眠的生化机制;以方测证评价法结合中医与现代科学,为评估中药方剂的疗效和作用机制提供了新思路。

综上所述,肝郁气滞型失眠动物模型的制备和评价是一个多方面、多层次的综合过程,需要科学严谨的实验设计和方法选择。尽管现有模型存在一定的局限性,但通过不断的优化和创新,这些模型对于深入理解失眠的病理机制、评估治疗方法的效果具有重要意义。未来的研究应更多地考虑动物模型与人类的生物学相关性、实验的可重复性以及动物伦理问题,同时,结合现代科技手段和中医理论,不断提高研究的准确性和实用性。

参考文献

- [1] 马作峰,姜瑞雪,王平,等.《内经》制怒方法初探[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(2):149-150.
- [2] 洪汀. 失眠障碍中医证候分布特点研究[D]. 北京:北京中医药大学,2023.
- [3] 李紫东,张明星,方晓艳,等. 基于中西医临床病症特点的失眠动物模型分析[J]. 中药新药与临床药理,2022,33(8):1102-1107.
- [4] VISHWAKARMA LC, SHARMA B, SINGH V, et al.

- Acute sleep deprivation elevates brain and body temperature in rats[J]. *J Sleep Res*, 2021,30(2):e13030.
- [5] VILLAFUERTE G, MIGUEL-PUGA A, RODRÍGUEZ EM, et al. Sleep deprivation and oxidative stress in animal models: a systematic review[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015;234952. doi: 10.1155/2015/234952.
- [6] IRWIN MR, OPP MR. Sleep health: reciprocal regulation of sleep and innate immunity[J]. *Neuropsychopharmacol*, 2017,42(1):129-155.
- [7] SILVA-PÉREZ M, SÁNCHEZ-LÓPEZ A, POMPADEL-TORO N, et al. Identification of the sleep-wake states in rats using the high-frequency activity of the electroencephalogram[J]. *J Sleep Res*, 2021,30(4):e13233.
- [8] ALTENHOFEN S, BONAN CD. Zebrafish as a tool in the study of sleep and memory-related disorders[J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2022,20(3):540-549.
- [9] TRAN S, PROBER DA. Validation of candidate sleep disorder risk genes using zebrafish[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022,15:873520. doi: 10.3389/fnmol.2022.873520.
- [10] LI M, CUI J, XU B, et al. Sleep disturbances and depression are co-morbid conditions: insights from animal models, especially non-human primate model[J]. *Front Psychiatry*, 2022,12:827541. doi: 10.3389/fpsy.2021.827541.
- [11] ISHIKAWA A, SAKAI K, MAKI T, et al. Investigation of sleep-wake rhythm in non-human primates without restraint during data collection[J]. *Exp Anim*, 2017,66(1):51-60.
- [12] 冯书斐,陈永昌. MECP2 基因突变导致 Rett 综合征模型猴睡眠紊乱的机制探索[C]//中国睡眠研究会. 中国睡眠研究会第十四届全国学术年会论文汇编. 昆明:昆明理工大学灵长类转化医学研究院,2022:1.
- [13] 刘书一,王正波. 非人灵长类帕金森动物模型中的行为学评估[J]. *中国比较医学杂志*, 2023,33(11):96-103.
- [14] SAKAI K, ISHIKAWA A, MIZUNO Y, et al. Simplified drug efficacy screening system for sleep-disorder drugs using non-human primates[J]. *Heliyon*, 2020,6(3):e03524.
- [15] CONGER JJ, SAWREY WL, TURRELL ES. An experimental investigation of the role of psychological factors in the production of gastric ulcers in rats[J]. *J Comp Physiol Psychol*, 1956,49(5):457-461.
- [16] 徐瑞鑫. 冲突性心理应激所致大鼠睡眠障碍的中枢 5-HT 的机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2013.
- [17] 曹瑞,牛江涛,司昕蕾,等. 四逆散对创伤后应激障碍睡眠障碍大鼠睡眠时相的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018,34(15):1886-1889.
- [18] 陈帅,陆登成,石安华,等. 高血压肝郁化火证病证结合动物模型的建立与评价[J]. *时珍国医国药*, 2022,33(4):1018-1021.
- [19] 夏天吉,闫明珠,王智,等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2022,30(3):428-435.
- [20] 徐舒,陈合兵,李洪,等. “肝郁证”大鼠模型的建立及代谢组学的初步研究[J]. *中华中医药杂志*, 2009,24(6):787-791.
- [21] 朱明好. 六味地黄苷对慢性应激所致的情绪和认知损伤的作用及机制研究[D]. 南京:南京中医药大学,2019.
- [22] 张冰,李廷利. 知母水煎剂对空瓶刺激诱发的慢性情绪应激的干预作用[J]. *中医药学报*, 2012,40(5):22-24.
- [23] 林文娟,王玮雯,邵枫. 慢性情绪应激对大鼠行为、神经内分泌和免疫反应的影响:一个新的情绪应激模型[J]. *科学通报*, 2003,48(9):926-929.
- [24] 于鑫. 慢性情绪应激所致大鼠睡眠剥夺模型复制及酸枣仁的干预作用研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2013.
- [25] 叶晓楠,陈光,卞宏生,等. 四逆散有效组分对慢性情绪应激所致大鼠睡眠障碍的改善作用研究[J]. *中医药学报*, 2017,45(2):6-10.
- [26] 张晓婷,刘文超,刘俊昌,等. 电击法建立 SD 大鼠焦虑型心理应激-失眠模型的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018,27(30):3316-3319.
- [27] 吕志平,刘承才. 肝郁致瘀机理探讨[J]. *中医杂志*, 2000,41(6):367-368.
- [28] 吕志平,刘承才. “肝郁”大鼠血浆 TXA₂、PGI₂ 水平与肝微循环变化及逍遥散作用[J]. *中国微循环*, 2000,4(3):160-161.
- [29] 游秋云,王平,田代志,等. 老年肝郁失眠证候大鼠模型的建立和评价[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013,19(2):222-225.
- [30] 张玉林,李阳. 百合水提物对对氯苯丙氨酸失眠模型大鼠睡眠改善作用研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023,14(15):252-258.
- [31] 王宏斌,杨如意,曹昌霞,等. 艾灸结合黄连阿胶汤对 PCPA 致失眠大鼠神经递质 5-HT、5-HIAA、NE、IL-6 水平的影响[J]. *时珍国医国药*, 2022,33(7):1623-1626.
- [32] 刘倩,李蜀平,廖磊,等. 调和肝脾方治疗失眠的实验研究[J]. *北京中医药*, 2018,37(8):768-770.
- [33] 朱洁,申国明,汪远金,等. 肝郁证失眠大鼠模型的建立与评价[J]. *中医杂志*, 2011,52(8):689-692.
- [34] 赵琳儒,张月,何盼,等. 基于 LC-MS 代谢组学技术的柴芩宁神颗粒治疗肝郁失眠证的作用机制分析[J]. *中药药理与临床*, 2022,38(6):64-70.
- [35] 成光宇,丁云录,赵德喜,等. 和解安神汤对肝郁脾虚

- 证候失眠大鼠模型的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(13): 3160-3162.
- [36] 独家能, 聂春霞, 许雯雯, 等. 柴胡宁神颗粒对肝郁失眠证候大鼠模型行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(5): 13-17.
- [37] 胡金, 韦姗姗, 彭君美, 等. 药物筛选的常用失眠动物模型的研究状况[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(18): 2708-2712.
- [38] 中华中医药学会. 中医内科常见病诊疗指南: 中医病证部分[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008.
- [39] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994.
- [40] TOPCHIIY I, FINK AM, MAKI KA, et al. Validation of piezosleep scoring against EEG/EMG sleep scoring in rats [J]. *Nat Sci Sleep*, 2022, 14: 1877-1886. doi: 10. 2147/ NNS. S381367.
- [41] XIE C, WANG J, ZHAO N, et al. Effects of electroacupuncture on sleep via the dopamine system of the hpa axis in rats after cage change [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021; 5527060. doi: 10. 1155/2021/5527060.
- [42] 张奉明, 王宾. 睡眠不足导致警觉性降低而增强小鼠痛觉过敏[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(3): 166-168.
- [43] 胡金, 韦姗姗, 邱祥玉, 等. 筛选镇静催眠药物的动物实验评价[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 133-140.
- [44] CRABBE JC, METTEN P, PONOMAREV I, et al. Effects of genetic and procedural variation on measurement of alcohol sensitivity in mouse inbred strains [J]. *Behav Genet*, 2006, 36(4): 536-552.
- [45] ABDOLLAHNEJAD F, MOSADDEGH M, KAMALINEJAD M, et al. Investigation of sedative and hypnotic effects of *Amygdalus communis* L. extract: behavioral assessments and EEG studies on rat [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(2): 190-197.
- [46] PUJOL JF, BUGUET A, FROMENT JL, et al. The central metabolism of serotonin in the cat during insomnia. A neurophysiological and biochemical study after administration of P-chlorophenylalanine or destruction of the Raphé system [J]. *Brain Res*, 1971, 29(2): 195-212.
- [47] 王志红, 李红培, 邢佳, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤化裁对失眠小鼠的神经调节机制探索[J]. 环球中医药, 2023, 16(11): 2202-2206.
- [48] 董丽华, 胡国华, 李淑娟. 多巴胺受体激动剂治疗帕金森病的临床研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(11): 1097-1099.
- [49] 李雪, 徐雅, 杜庆红, 等. 自拟安神方对心肾不交证失眠大鼠的作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(11): 1806-1811.
- [50] VALENTINO RJ, VAN BOCKSTAELE E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 583(2/3): 194-203.
- [51] OSORIO-FORERO A, CARDIS R, VANTOMME G, et al. Noradrenergic circuit control of non-REM sleep substates [J]. *Curr Biol*, 2021, 31(22): 5009-5023.
- [52] BERRIDGE CW, SCHMEICHEL BE, ESPAÑA RA. Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal [J]. *Sleep Med Rev*, 2012, 16(2): 187-197.
- [53] 张菁, 马靖, 王广发. 长期睡眠剥夺对小鼠蓝斑核线粒体氧化应激及皮层投射的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30(2): 153-156.
- [54] PAL D, MADAN V, MALLICK NB. Neural mechanism of rapid eye movement sleep generation: cessation of locus coeruleus neurons is a necessity [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2005, 57(4): 401-413.
- [55] 王卓慧, 刘婧, 郭保君, 等. 针刺补泻跷脉对失眠大鼠 5-HT、NE 及 IL-1 β 含量的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1321-1323.
- [56] 胡莹, 李亮, 戴卫波, 等. 黄连温胆汤对氯苯丙氨酸致失眠小鼠的睡眠改善及 γ -氨基丁酸能系统递质含量及受体表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(8): 1009-1016.
- [57] 郭晓, 郭蓉娟, 邢佳, 等. 宁心安神方调控失眠大鼠 Glu/GABA-Gln 代谢环路失衡的机制研究[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(5): 413-419.
- [58] 黎发根, 李绍旦, 杨明会, 等. 和胃安神方对失眠大鼠脑组织谷氨酸与 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(2): 50-52.
- [59] 游秋云, 王平, 吴丽丽, 等. 舒郁安神方对老年肝郁失眠证候模型大鼠学习记忆及脑组织谷氨酸、 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(6): 1006-1009.
- [60] 谭丽博, 于佳慧, 郑晓洋, 等. “神宁藏香”对失眠大鼠的行为学及 GABA 能系统通路的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(11): 4060-4068.
- [61] 孙延娜, 乔铁, 张立德, 等. 滋阴养血安神方对 PCPA 诱导的失眠小鼠 GABA 能系统递质含量及受体表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 1925-1928.
- [62] 王震, 张杰, 刘飞祥, 等. 疏肝健脾养心方对失眠模型小鼠 Orexin-A 及其受体的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(10): 54-61.
- [63] 徐波, 谢光璟, 夏婧, 等. 安寐丹调控 OXA/CREB/PER1 信号通路改善 SD 模型大鼠昼夜节律紊乱[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(1): 298-308.
- [64] NIXON JP, MAVANJI V, BUTTERICK TA, et al. Sleep disorders, obesity, and aging: the role of orexin [J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 20: 63-73. doi: 10. 1016/j. arr. 2014. 11. 001.

- [65]于凤婷,张建军. 一氧化氮调控机体睡眠觉醒的研究进展[J]. 药学报, 2020, 55(3): 421-426.
- [66]YAMAKAWA T, KURAUCHI Y, HISATSUNE A, et al. Endogenous nitric oxide inhibits, whereas awakening stimuli increase, the activity of a subset of orexin neurons [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(12): 1859-1865.
- [67]李莉,刘茹,何晶,等. 温胆汤方剂对睡眠剥夺小鼠氧化应激及炎症反应的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(3): 308-312.
- [68]赵倩,李劲草,王洛萱,等. 天王补心丹加减方改善大鼠睡眠剥夺损伤的作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(8): 1025-1033.
- [69]舒治钧,张全怡,徐义鹏,等. 睡眠障碍后小胶质细胞活化相关信号通路的研究进展[J]. 生理学报, 2023, 75(4): 569-574.
- [70]杨丹,石岩,王艺璇,等. 睡眠剥夺引起机体损伤的分子机制及中药防治研究进展[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(21): 5707-5718.
- [71]SU LJ, ZHANG JH, GOMEZ H, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019: 5080843. doi: 10.1155/2019/5080843.
- [72]魏喆懿,王凡,黄秦特,等. 生物节律紊乱与免疫炎症相互作用在抑郁症发病及治疗中作用研究进展[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2023, 49(2): 125-128.
- [73]GUO B, CHEN C, YANG L, et al. Effects of dexmedetomidine on postoperative cognitive function of sleep deprivation rats based on changes in inflammatory response [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 7920-7928.
- [74]陈梦婷,鲁元星,张力,等. 瘦素对睡眠剥夺小鼠下丘脑 GABA 含量及其受体表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(7): 709-713.
- [75]黎发根,李绍旦,刘毅,等. 和胃安神方对失眠模型大鼠血浆及下丘脑瘦素的影响[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(5): 1084-1086.
- [76]凌燕,冼绍祥,陈汉裕,等. 清心神安方对失眠大鼠脑组织神经递质含量的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(1): 23-26.
- [77]钟森杰,李静,李琳,等. “以方测证”在中医证候模型研究中的应用述评[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 48-50.
- [78]唐仕欢,杨洪军,黄璐琦. “以方测证”方法应用的反思[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(3): 259-262.
- [79]叶钰娟,李昕蓉,曹梦琪,等. 中医失眠证候模型的研究述评[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(1): 178-181.

The Replication Method and Evaluation of Experimental Animal Models with Insomnia of Liver Depression and Qi Stagnation Syndrome

ZHANG Renzhen, YE Yujuan, WEI Yuting, MA Cui, YAN Xingke

School of Acupuncture, Moxibustion and Tuina, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000

ABSTRACT In recent years, the research data on the combination model of insomnia of liver depression and *qi* stagnation syndrome in traditional Chinese medicine (TCM) were sorted out and summarized in terms of the selection of experimental animals, modelling methods, and model evaluation, with a view to providing references for the standardized preparation of the experimental model of insomnia of liver depression and *qi* stagnation syndrome and the study of the intervention mechanism. As for the selection of experimental animals, rats and mice are commonly used for the study of sleep patterns in the insomnia model of liver depression and *qi* stagnation syndrome because their sleep patterns are similar to those of human beings; zebrafish is suitable for the study of sleep patterns in early development because of its high genetic homology; and rhesus macaques, common marmosets, and crab-eating monkeys are used for the study of highly complex sleep disorders because their physiological and behavioural characteristics are closer to those of human beings. In terms of modelling methods, electrical stimulation, chronic restraint, chronic emotional stress and impact psychological stress each have their own characteristics and application scenarios, while chronic tail-clamping stimulation combined with intraperitoneal injection of p-chlorophenylalanine (PCPA) combines physical and chemical stimuli, in order to simulate the complex mechanism of insomnia in human beings, and to more comprehensively simulate the pathology of insomnia with liver depression and *qi* stagnation syndrome. In terms of evaluation indexes, electroencephalography (EEG) and electromyography (EMG) monitoring and barbiturate synergistic sleep test are the most commonly used and scientific methods for evaluating insomnia animal models with liver depression and *qi* stagnation syndrome, which can provide intuitive and continuous sleep state monitoring; barbiturate synergistic sleep test can reflect the sensitivity and responsiveness of the model animals to the sleep-regulating medications; and the introduction of the method of using formulas to measure syndromes for the evaluating the model can combine the treatment and diagnostic principles of TCM with modern scientific research.

Keywords insomnia; liver depression and *qi* stagnation; combination of disease and syndrome; animal model; review

(收稿日期: 2024-03-13; 修回日期: 2024-04-07)

[编辑: 邓媛]