

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.23.013

实验研究

更欣汤对围绝经期失眠模型小鼠下丘脑结节状乳头体核雌激素受体和食欲素 A 的影响

李修恒¹, 汤玲²✉, 孙天琳³, 孙晓卉¹

1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700; 2. 北京中医药大学第三附属医院; 3. 北京市第一中西医结合医院

[摘要] **目的** 从下丘脑结节状乳头体核 (TMN) 雌激素受体和食欲素 A (OXA) 表达的角度探究更欣汤治疗围绝经期失眠的可能作用机制。**方法** 选取动情周期规律的雌性 ICR 小鼠, 应用 4-乙烯基环己烯二环氧化物 (VCD) 联合对氯苯丙氨酸 (PCPA) 混悬液腹腔注射建立围绝经期失眠小鼠模型。造模成功的 75 只小鼠随机分为模型组、佐匹克隆组及更欣汤低、中、高剂量组, 每组 15 只, 另设正常小鼠 15 只为空白组。造模成功后次日, 更欣汤低、中、高剂量组小鼠每日 9:00 分别给予更欣汤颗粒 1.15、2.3、4.6 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 佐匹克隆组小鼠同时时间点给予佐匹克隆混悬液 1.13 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 空白组、模型组小鼠同时时间点予蒸馏水 1 ml·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 各组均连续 14 天。实验期间观察各组小鼠日间活动、精神状态、饮食、毛色等一般情况; 末次干预 24 h 后, 采用戊巴比妥钠协同试验检测小鼠睡眠潜伏期及睡眠持续期, ELISA 法检测小鼠血清雌二醇 (E₂)、孕酮 (P)、促卵泡生成激素 (FSH) 以及下丘脑 TMN 区 OXA 水平, 免疫荧光染色法检测小鼠 TMN 区雌激素受体 α (ERα)、OXA、雌激素受体 β (ERβ) 蛋白光密度值。**结果** 空白组小鼠昼夜节律正常; 模型组小鼠昼夜节律紊乱, 白天和晚上保持活跃; 更欣汤各组小鼠精神状态较前改善, 小鼠精神状态明显好转, 白天活动较前减少, 毛色稍黄、但有光泽, 尤以更欣汤中剂量组最明显; 佐匹克隆组白天活动较前减少, 毛发粗糙少光泽, 警觉性高。与空白组比较, 模型组小鼠睡眠潜伏期延长, 睡眠持续期缩短, 血清 E₂、P 水平降低, 血清 FSH 和 TMN 区 OXA 蛋白表达增加, TMN 区 ERα、ERβ 光密度值减少, OXA 光密度值增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 更欣汤低、中、高剂量组和佐匹克隆组小鼠睡眠潜伏期缩短, 睡眠持续期延长 ($P<0.01$); 更欣汤中、高剂量组血清 E₂、P 水平升高, FSH 及 TMN 区 OXA 水平降低 ($P<0.05$); 更欣汤中剂量组小鼠 TMN 区 ERα 光密度值增加, 更欣汤低、中剂量组和佐匹克隆组 OXA 光密度值减少, 更欣汤低、中、高剂量组和佐匹克隆组小鼠 TMN 区 ERβ 光密度值增加 ($P<0.05$)。与佐匹克隆组比较, 更欣汤低剂量组小鼠睡眠潜伏期时间延长、睡眠持续时间缩短, 更欣汤中、高剂量组血清 E₂ 水平及 TMN 区 ERβ 光密度值升高、血清 FSH 及 TMN 区 OXA 水平降低 ($P<0.05$)。与更欣汤低剂量组比较, 更欣汤中、高剂量组小鼠睡眠潜伏期缩短, 血清 FSH 水平降低 ($P<0.01$)。**结论** 更欣汤可能通过调控 TMN 区雌激素受体和 OXA 分布, 抑制 TMN 区食欲素系统过度激活, 从而抑制觉醒、改善围绝经期失眠。

[关键词] 失眠; 围绝经期; 雌激素受体; 结节状乳头体核; 食欲素 A; 更欣汤

女性经历绝经过渡期间激素水平的波动, 容易出现一系列的临床症状, 其中失眠主要表现为入睡困难、夜间易醒、醒后难以再睡、早醒, 对患者健康和睡眠质量产生严重的负面影响^[1]。目前治疗围

绝经期失眠的主要方法包括认知行为疗法、围绝经期相关用药和失眠相关用药, 如激素补充、替代法、苯二氮草类受体激动剂、褪黑素受体激动剂等缓解临床症状^[2]。然而长期使用激素方案需要持续评估风险和利弊, 长期使用治疗失眠的临床药物易产生耐受和依赖^[2], 如何找到更有效、更安全的治疗方法是需要进一步研究的内容。更欣汤是国医大

基金项目: 中国民族医药学会科研项目 (2021Z1225-340102); 北京市中医管理局名医传承、薪火“3+3”工程 (JB049)

✉ 通讯作者: tangling73@126.com

师肖承棕教授治疗围绝经期失眠的经验方,在改善睡眠质量方面疗效显著^[3-4]。前期实验发现,更欣汤可通过雌激素受体介导发挥类雌激素的生物学效应,改善围绝经期失眠^[5]。现代研究表明,下丘脑结节状乳头体核(tuberomammillary nucleus, TMN)属于早期经典促觉醒系统^[6],TMN区有食欲素受体2(orexin receptor 2, OXR2) mRNA表达^[7]以及雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)和雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β)阳性细胞的表达^[8]。食欲素是一种下丘脑神经肽,分为食欲素A(orexin A, OXA)和食欲素B(orexin B, OXB)两种类型,通过与食欲素受体结合发挥调节进食行为、睡眠觉醒和神经内分泌稳态的生物学效应^[9]。研究^[10]发现,雌激素可能通过影响雌激素受体,上调TMN区雌激素信号,抑制TMN区食欲素系统过度激活。因此,本研究旨从TMN区雌激素受体和OXA角度探索更欣汤治疗围绝经期失眠可能的作用机制,为其临床应用提供依据。本研究已通过北京中医药大学动物房伦理委员会实验动物伦理审查(伦理批号:BUCM-2023060505-2202)。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF级雌性ICR小鼠120只,6~7周龄,体质量(25.8±1.1)g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物使用许可证号:SCXK(京)2021-0006。饲养于北京中医药大学内屏障级动物房,温度24~26℃,湿度60.0%,普通饲料正常饲养,自由摄食饮水,12h明暗循环交替。

1.2 药物

更欣汤组方:女贞子15g,墨旱莲15g,生地黄15g,白芍15g,枸杞子15g,知母12g,百合15g,龙骨30g,牡蛎30g,莲子心3g,丹参15g,沙苑子15g,蒺藜10g,合欢皮15g,夜交藤15g,颗粒剂由四川新绿色药业科技发展有限公司提供。佐匹克隆片(每片7.5mg,齐鲁制药有限公司,批号:3D0141DL2)。

1.3 主要试剂及仪器

4-乙烯基环己烯二环氧化物(VCD,批号:94956)、对氯苯丙氨酸(PCPA,批号:C6506),美国Sigma公司;玉米油(批号:IC9000),北京索莱宝科技有限公司;氢氧化钠溶液(批号:R27599-500ml)、生理盐水(批号:R27405-500ml),上海源叶生物科技有限公司;多聚甲醛固定液(批

号:G1101)、HE染液套装(批号:G1003)、4',6-二脒基-2-苯基叫啶(DAPI,批号:B0011),北京康佳宏原生物科技有限公司;ER α 抗体(批号:ab32063)、ER β 抗体(批号:ab187291)、OXA抗体(批号:ab6214),英国Abcam公司;OXA酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒(批号:EK-003-30),美国Phoenix Pharmaceuticals公司;雌二醇(E₂)、孕酮(P)和促卵泡生成激素(FSH)ELISA试剂盒(批号:20231220),天津市协和医药科技有限公司;HRP标记山羊抗兔二抗(批号:5220-0336)、HRP标记山羊抗小鼠二抗(批号:5220-0341),美国SeraCare公司。

BS-124S型精密电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;3-30K型低温离心机,美国Sigma公司;GC-2010型免疫计数器,安徽中科中佳科学仪器有限公司;Multiskan MK3型酶标仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜,日本尼康公司。

1.4 实验动物筛选

ICR小鼠适应性喂养3天后,每日9:00进行阴道角化上皮实验,连续10天(即2个完整动情周期)。留取小鼠阴道脱落细胞涂片,稍待风干后用95%乙醇溶液固定,HE染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察、拍照,留存涂片。动情周期判断^[11]:1)动情前期:角化细胞和有核上皮细胞共存;2)动情期:大量角化细胞,其他细胞少见;3)动情后期:角化细胞、有核上皮细胞和白细胞3种细胞共存,白细胞数量增多;4)动情间期:大量白细胞,可见少量有核上皮细胞,偶见角化细胞。由此筛选出108只具有连续4个动情周期的小鼠纳入实验。

1.5 围绝经期失眠模型建立

108只小鼠采用随机数字表法分为空白组18只和造模组90只。参照文献^[12]的方法腹腔注射VCD建立围绝经期小鼠模型:造模组小鼠给予160mg/kg的VCD溶液(VCD溶于玉米油中),每日腹腔注射5ml/kg,空白组小鼠每日腹腔注射同等剂量的玉米油,连续15天。注射结束后进行动情周期检测,若阴道涂片显示无正常动情周期变化或动情周期紊乱提示小鼠进入围绝经期,围绝经期模型成功^[13]。

围绝经期小鼠模型建立成功后第2天,参考文献^[14-15]的方法采用腹腔注射PCPA混悬液法建立失眠小鼠模型:加入少量NaOH溶液至PCPA粉末,充分振荡摇匀至PCPA粉末完全溶解,加入

生理盐水定容至 10 ml, 造模组小鼠给予 300 mg/kg 的剂量腹腔注射 PCPA 混悬液, 每日腹腔注射 10 ml/kg, 空白组以等体积生理盐水腹腔注射, 每日 1 次, 连续 2 天。若造模组小鼠昼夜节律紊乱, 出现睡眠潜伏期延长和/或睡眠持续期缩短, 与空白组差异有统计学意义, 提示围绝经期失眠模型造模成功^[14]。

1.6 分组及给药

最终纳入实验小鼠共 90 只, 其中空白组 15 只, 造模组小鼠 75 只。将 75 只围绝经期失眠模型造模成功的小鼠采用随机数字表法分为模型组, 佐匹克隆组, 更欣汤低、中、高剂量组, 每组各 15 只。造模成功后次日, 参照《药理实验方法学》^[16] 中等效剂量的比值计算, 更欣汤低、中、高剂量组小鼠每日 9:00 分别给予更欣汤颗粒 1.15、2.3、4.6 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃 (中剂量为等效剂量), 佐匹克隆组小鼠同时时间点给予佐匹克隆混悬液 1.13 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 空白组、模型组小鼠同时时间点予蒸馏水 1 ml·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 各组均连续 14 天。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 小鼠一般情况 实验过程中观察小鼠日间活动、精神状态、饮食、毛色等一般情况。

1.7.2 戊巴比妥钠协同试验检测小鼠睡眠潜伏期及睡眠持续期 末次给药 24 h 后, 各组小鼠行戊巴比妥钠协同实验^[17], 1% 戊巴比妥钠溶液以 45 mg/kg 的剂量腹腔注射, 给药后立刻计时并观察和记录小鼠睡眠潜伏期 (从注射戊巴比妥钠后到小鼠翻正反射消失的时间段) 和睡眠期 (从翻正反射消失到翻正反射恢复的时间段)。

1.7.3 ELISA 法检测血清 E₂、P、FSH 水平 戊巴比妥钠实验结束 24 h 后, 各组小鼠禁食不禁水, 用 1% 戊巴比妥钠溶液以 45 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉, 眼球取血后处死。3000 r/min, 4 °C, 离心 10 min (离心半径 1.25 cm) 制备血清, 采用 ELISA 试剂盒检测血清 E₂、P、FSH 水平。

1.7.4 ELISA 法检测 TMN 区 OXA 水平 戊巴比妥钠实验结束 24 h、制备血清后, 各组采用随机数字表法取 6 只小鼠, 冰上断头取脑, 采集并研磨 TMN 组织, 3500 r/min, 4 °C, 离心 15 min (离心半径 1.25 cm), 取上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书测定 TMN 区 OXA 的水平。

1.7.5 免疫荧光染色法检测 TMN 区 ERα、OXA、ERβ 蛋白表达 戊巴比妥钠实验结束 24 h、制备血清后, 各组采用随机数字表法取 3 只小鼠, 打开胸

腔经心脏灌注后取脑组织置于 4% 多聚甲醛中充分固定。取固定后的 TMN 区组织石蜡包埋后切片, 常规脱蜡进行抗原修复, 10% 山羊血清封闭 30 min。分别加入 ERα 一抗 (1:1000)、OXA 一抗 (1:200)、ERβ 一抗 (1:200), 4 °C 孵育过夜。洗片后二抗室温孵育 50 min, 洗片后 DAPI 复染细胞核, 切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。显微镜下观察并采集图像, Image-pro plus 6.0 软件计算平均免疫荧光光密度值。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件分析数据。计量资料满足正态分布者以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐者多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验; 方差不齐者的多组间比较采用 Welch 近似 *F* 检验, 两两比较采用 Dunnett's *T*⁶ 法。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般体征比较

灌胃期间因操作不当更欣汤低剂量组死亡 1 只小鼠。空白组小鼠昼夜节律正常, 精神良好, 皮毛光亮。模型组小鼠精神状态差, 昼夜节律紊乱, 白天和晚上均保持活跃, 易躁动激惹, 毛发竖起, 色泽干枯易脱落。与模型组比较, 更欣汤组小鼠上述情况有不同程度改善, 小鼠精神状态明显好转, 白天活动较前减少, 毛色稍黄、但有光泽, 其中更欣汤中剂量组改善最明显; 佐匹克隆组白天活动较前减少, 毛发粗糙少光泽, 警觉性高。

2.2 各组小鼠睡眠潜伏期及睡眠持续期比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组和更欣汤低剂量组小鼠睡眠潜伏时间延长, 模型组小鼠睡眠持续期缩短, 其余组小鼠睡眠持续期延长 (*P* < 0.01)。与模型组比较, 更欣汤各剂量组和佐匹克隆组小鼠睡眠潜伏期缩短, 睡眠持续时间延长 (*P* < 0.01)。与佐匹克隆组比较, 更欣汤低、高剂量组小鼠睡眠潜伏期时间延长, 更欣汤低剂量组小鼠睡眠持续时间缩短 (*P* < 0.05)。与更欣汤低剂量组比较, 更欣汤中、高剂量组小鼠睡眠潜伏期缩短 (*P* < 0.01)。更欣汤中、高剂量组小鼠睡眠潜伏期及睡眠持续期差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。

2.3 各组小鼠血清 E₂、P、FSH 及 TMN 区 OXA 水平比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组和佐匹克隆组小鼠血清 E₂、P 水平降低, 血清 FSH 及 TMN 区 OXA 水平升高, 更欣汤低剂量组血清 E₂ 水平降低、

表 1 各组小鼠睡眠潜伏期及睡眠持续期比较

Table 1 Comparison of sleep latency and sleep duration

		between groups of mice		(min, $\bar{x}\pm s$)
组别	鼠数	睡眠潜伏期	睡眠持续期	
空白组	15	8.64±1.92	13.76±2.27	
模型组	15	16.73±1.15 ^{a)}	8.12±1.40 ^{a)}	
佐匹克隆组	15	8.28±1.59 ^{b)}	17.67±3.16 ^{a) b)}	
更欣汤低剂量组	14	12.02±1.08 ^{a) b) c)}	15.91±1.82 ^{a) b) c)}	
更欣汤中剂量组	15	9.20±1.72 ^{b) d)}	16.38±1.43 ^{a) b)}	
更欣汤高剂量组	15	9.46±1.78 ^{b) c) d)}	16.99±2.36 ^{a) b)}	

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与佐匹克隆组比较， $P<0.05$ ；d) 与更欣汤低剂量组比较， $P<0.01$ 。

FSH 水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，更欣汤中、高剂量组血清 E_2 、P 水平升高，血清 FSH 及 TMN 区 OXA 水平降低，更欣汤低剂量组血清 P 水平升高，TMN 区 OXA 水平降低 ($P<0.05$)。与佐匹克隆组比较，更欣汤中、高剂量组血清 E_2 水平升高、血清 FSH 及 TMN 区 OXA 水平降低，更欣汤高剂量组血清 P 水平亦升高 ($P<0.05$)。与更欣汤低剂量组比较，更欣汤中、高剂量组血清 FSH 水平

降低 ($P<0.05$)。更欣汤中、高剂量组各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组小鼠 TMN 区 ER α 、OXA、ER β 蛋白表达比较

表 3 示，与空白组比较，模型组、更欣汤低剂量组和佐匹克隆组小鼠 TMN 区 ER α 光密度值减少，模型组和更欣汤高剂量组小鼠 TMN 区 OXA 光密度值增加，模型组、佐匹克隆组及更欣汤低、中、高剂量小鼠 TMN 区 ER β 光密度值减少 ($P<0.05$)。与模型组比较，更欣汤中剂量组小鼠 TMN 区 ER α 光密度值增加，更欣汤低、中剂量组和佐匹克隆组 OXA 光密度值减少，更欣汤低、中、高剂量组和佐匹克隆组小鼠 TMN 区 ER β 光密度值增加 ($P<0.05$)。与佐匹克隆组比较，更欣汤中剂量组小鼠 TMN 区 ER α 光密度值增加，更欣汤低、中、高剂量组小鼠 TMN 区 ER β 光密度值增加 ($P<0.05$)。与更欣汤低剂量组比较，更欣汤中、高剂量组小鼠 TMN 区 ER β 光密度值增加 ($P<0.05$)。与更欣汤中剂量组比较，更欣汤高剂量组小鼠 TMN 区 OXA、ER β 光密度值均增加 ($P<0.01$)。

表 2 各组小鼠血清 E_2 、P、FSH 及 TMN 区 OXA 水平比较

Table 2 Comparison of serum E_2 , P, FSH and OXA levels in the TMN region of mice in each group

($\bar{x}\pm s$)

组别	$E_2/\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$	P/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$	FSH/ $\text{mIU}\cdot\text{ml}^{-1}$	OXA/ $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$
空白组	9.05±2.09 (15)	2.53±0.60 (15)	9.60±3.45 (15)	0.94±0.49 (6)
模型组	6.58±2.06 ^{a)} (15)	1.77±0.33 ^{a)} (15)	15.17±3.79 ^{a)} (15)	2.44±0.72 ^{a)} (6)
佐匹克隆组	6.77±1.43 ^{a)} (15)	1.80±0.48 ^{a)} (15)	15.11±2.66 ^{a)} (15)	2.33±0.87 ^{a)} (6)
更欣汤低剂量组	7.44±1.85 ^{a)} (14)	2.30±0.44 ^{b)} (14)	14.37±4.80 ^{a)} (14)	1.67±0.43 ^{b)} (5)
更欣汤中剂量组	8.31±2.50 ^{b) c)} (15)	2.23±0.22 ^{b)} (15)	11.07±2.30 ^{b) c) d)} (15)	1.05±0.50 ^{b) c)} (6)
更欣汤高剂量组	8.47±2.29 ^{b) c)} (15)	2.38±0.43 ^{b) c)} (15)	11.60±2.78 ^{b) c) d)} (15)	1.09±0.70 ^{b) c)} (6)

注： E_2 ，雌二醇；P，孕酮；FSH；促卵泡生成素；OXA，食欲素 A。括号内为鼠数。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与佐匹克隆组比较， $P<0.05$ ；d) 与更欣汤低剂量组比较， $P<0.05$ 。

表 3 各组小鼠 TMN 区 ER α 、OXA、ER β 光密度值表达比较

Table 3 Comparison of the optical density values expression of ER α , OXA and ER β in TMN region of mice in each group

(IOD, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ER α	OXA	ER β
空白组	3	7215.84±1179.76	638.34±139.54	91902.15±1151.17
模型组	3	558.45±21.69 ^{a)}	16580.57±2366.97 ^{a)}	667.27±29.77 ^{a)}
佐匹克隆组	3	755.94±293.23 ^{a)}	6859.56±1737.40 ^{b)}	936.89±49.51 ^{a) b)}
更欣汤低剂量组	3	1428.39±391.34 ^{a)}	5164.82±1668.79 ^{b)}	3386.07±76.65 ^{a) b) c)}
更欣汤中剂量组	3	2688.39±94.78 ^{b) c)}	2314.27±403.27 ^{b)}	12587.49±929.15 ^{a) b) c) d)}
更欣汤高剂量组	3	3481.32±875.61	7005.53±673.08 ^{a) c)}	66140.06±1144.06 ^{a) b) c) d) e)}

注：ER α ，雌激素受体 α ；OXA，食欲素 A；ER β ，雌激素受体 β 。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与佐匹克隆组比较， $P<0.05$ ；d) 与更欣汤低剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与更欣汤中剂量组比较， $P<0.01$ 。

3 讨论

《素问·上古天真论篇》云：“女子七七，任脉虚，太冲脉衰少，天癸竭，地道不通，故形坏而无子也。”七七之际，冲任虚衰，天癸欲竭，肾精亏虚，肾水不充，肾中阴阳失和，脏腑经络功能失调，易致围绝经期诸症。肾阴久亏，水不涵木，木少滋荣，且阴不制阳易生虚火，虚火内扰心神，神志不宁，发为不寐，故围绝经期失眠较为常见。针对围绝经期女性生理、病理特点，肖承棕教授认为主要由肾、肝、心功能失调导致围绝经期失眠，肝肾阴虚、精亏血少为此病的根本病机，心肾不交为关键，治疗上重视滋补肝肾精血^[4, 18]。壮水之主以制阳光，使肾水渐充，肝体得养，水火相济，而围绝经期诸症得平，同时运用交通心肾法贯穿围绝经期失眠的治疗，自拟更欣汤，方中女贞子与墨旱莲即为二至丸，可滋补肝肾、滋阴清热，共为君药。生地黄、知母滋阴清热润燥，白芍养肝血调经，平抑肝阳，枸杞子滋补肝肾，共为臣药。百合养阴清热宁神，莲子心清心安神，交通心肾，丹参活血调经、清心除烦安神，使诸药补而不腻，合欢皮解郁安神，夜交藤养心安神，共为佐药。龙骨、牡蛎重镇安神、平肝潜阳、收敛固涩，蒺藜平肝解郁，沙苑子补肾固精，既能佐助君臣补益肝肾，又可防诸药寒凉伤正，共为使药。诸药共奏滋补肝肾、交通心肾之功，临床疗效显著^[19]。

本研究采用的VCD腹腔注射造模，通过选择性破坏原始卵泡和初级卵泡来模拟围绝经期到绝经期的渐进过程，从而建立围绝经期小鼠模型^[20]，与自然绝经女性的激素特征相一致^[21]。研究结果显示，模型小鼠动情周期出现紊乱，与空白组比较血清E₂、P降低，FSH升高，提示造模成功。前期临床研究以佐匹克隆为阳性对照药物^[19]，佐匹克隆组小鼠血清E₂、P、FSH水平与模型组差异均无统计学意义，提示佐匹克隆没有改善卵巢功能的作用。与模型组比较，更欣汤中、高剂量组血清E₂、P水平升高，血清FSH水平降低，差异有统计学意义，提示更欣汤中、高剂量组可能通过增加血清E₂、P表达和抑制血清FSH表达，从而改善围绝经期卵巢功能。

PCPA是一种5-羟色胺合成抑制剂，可造成睡眠昼夜节律紊乱，且其病理表现与中医心肾不交型失眠病证相似^[22-23]。戊巴比妥钠协同实验能够相对客观地评价失眠小鼠睡眠情况，通过计时翻正反射

消失与恢复的时间，判断睡眠潜伏期和睡眠持续时间^[17]。本研究结果显示，与空白组比较，PCPA造模后模型组小鼠昼夜节律紊乱，白天和晚上均保持活跃，睡眠潜伏期延长、睡眠维持期缩短，提示造模成功；更欣汤各剂量组及佐匹克隆组小鼠睡眠潜伏期均缩短、睡眠持续时间均延长，且更欣汤中剂量组与佐匹克隆组小鼠比较差异无统计学意义，表明中剂量更欣汤能够改善围绝经期失眠小鼠的睡眠质量，催眠镇静作用同佐匹克隆。

现代研究发现，TMN区富含组胺能神经元，当激活TMN区组胺能神经元，增加组胺释放，促进觉醒^[24]。食欲素是一种与觉醒密切相关的神经肽^[25]，在觉醒期活性增加^[26]。觉醒活跃的食欲素神经元为组胺能神经元提供主要的兴奋性驱动，这可能是食欲素促进唤醒的关键方式，通过组胺系统放大其作用^[27]。有研究者^[28]通过动物实验发现雌激素抑制啮齿动物下丘脑中OXA表达，另有研究者^[29]在临床试验中发现较高的OXA水平与低雌激素有关。绝经期雌激素浓度的急剧下降会导致食欲素系统过度活跃，从而加重焦虑、失眠和更严重的潮热等症状^[2]。因此，在TMN区，围绝经期失眠可能与雌激素信号和OXA表达有关。本研究结果显示，模型组小鼠TMN区ER α 、ER β 光密度值减少，OXA光密度值和蛋白表达增加，表明雌激素对OXA抑制作用减弱，从而促进觉醒，抑制睡眠。与模型组比较，更欣汤中剂量组小鼠TMN区ER α 、ER β 光密度值增加，OXA光密度值和蛋白表达减少，表明更欣汤能够促进TMN区ER α 、ER β 表达，抑制OXA表达，抑制TMN区食欲素系统过度激活，从而抑制觉醒，改善围绝经期失眠，这与前期实验基础研究结果^[5]一致。

综上所述，更欣汤可能通过调控影响围绝经期失眠模型小鼠TMN区雌激素受体和OXA分布，抑制TMN区食欲素系统过度激活，抑制觉醒，改善围绝经期失眠。本研究不足之处为用于检测病理的标本较少，可能对数据的方差稳定性产生影响，后期需增加足够有效的样本量进一步探究更欣汤治疗围绝经期失眠的作用机制。

参考文献

- [1]谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社,2018:353-356.
- [2]中华预防医学会更年期保健分会,中国人体健康科技促进会妇科内分泌和生育力促进专委会,北京中西医

- 结合学会更年期专业委员会,等.绝经相关失眠临床管理中国专家共识[J].中国全科医学,2023,26(24):2951-2958.
- [3]贾林娜,汤玲,刘琼洁,等.更欣汤治疗肾不交型围绝经期失眠症的临床疗效研究[J].世界中医药,2023,18(6):839-843.
- [4]贾林娜,汤玲,肖承棕.肖承棕自拟更欣汤治疗女性更年期失眠症经验[J].中医杂志,2020,61(6):479-481.
- [5]王艺璇,汤玲,孙天琳,等.更欣汤对围绝经期失眠模型大鼠血清雌激素水平及下丘脑雌激素受体的影响[J].中华中医药杂志,2024,39(1):147-151.
- [6]HAAS H, PANULA P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2003,4(2):121-130.
- [7]MARCUS JN, ASCHKENASI CJ, LEE CE, et al. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain[J]. J Comp Neurol, 2001,435(1):6-25.
- [8]ISHUNINA TA, KAMPHORST W, SWAAB DF. Changes in metabolic activity and estrogen receptors in the human medial mamillary nucleus: relation to sex, aging and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2003,24(6):817-828.
- [9]WILLIE JT, CHEMELLI RM, SINTON CM, et al. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness[J]. Annu Rev Neurosci, 2001,24(1):429-458.
- [10]FEDERICI LM, CALIMAN IF, MOLOSH AI, et al. Hypothalamic orexin's role in exacerbated cutaneous vasodilation responses to an anxiogenic stimulus in a surgical menopause model[J]. Psychoneuroendocrinology, 2016,65:127-137. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.12.011.
- [11]杜纳纳,许丹丹,黄莉莉.去卵巢和性成熟期ICR雌性小鼠动情周期的观察[J].中国病理生理杂志,2015,31(12):2301-2304.
- [12]LOHFF JC, CHRISTIAN PJ, MARION SL, et al. Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause[J]. Comp Med, 2005,55(6):523-527.
- [13]李珊珊,李翔,柯碧莲,等.高脂饮食结合VCD药物诱导围绝经期肥胖小鼠模型的研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2022,24(6):2172-2178.
- [14]ZHONG Y, ZHENG Q, HU P, et al. Sedative and hypnotic effects of compound Anshen essential oil inhalation for insomnia[J]. BMC Complement Altern Med, 2019,19(1):306.
- [15]张林挺.酸枣仁汤对虚劳失眠大鼠干预机理的研究[D].广州:广州中医药大学,2009.
- [16]徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:202-204.
- [17]刘影.大麻二酚配伍褪黑素改善大、小鼠失眠和昼夜节律紊乱的作用及机制研究[D].烟台:烟台大学,2023.
- [18]李修恒,汤玲,闫清雅,等.从“心阴虚热”病机变化探讨国医大师肖承棕治疗更年期失眠症经验[J].中国临床医生杂志,2023,51(9):1130-1132.
- [19]贾林娜.更欣汤治疗女性更年期失眠症(心肾不交型)的临床疗效评价[D].北京:北京中医药大学,2021.
- [20]LORENZON F, SIMAS BB, GREGORIO T, et al. Ovarian failure induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide worsens the autonomic cardiovascular response to chronic unpredictable stress in rats[J]. Life Sci, 2019,226:130-139. doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.007.
- [21]ACOSTA JI, MAYER L, TALBOOM JS, et al. Transitional versus surgical menopause in a rodent model: etiology of ovarian hormone loss impacts memory and the acetylcholine system[J]. Endocrinology, 2009,150(9):4248-4259.
- [22]全世建,林杏娥,刘妮.PCPA大鼠失眠模型的证候属性研究[J].中医药学刊,2006,24(3):450-451.
- [23]覃甘梅,覃骊兰.心肾不交型失眠动物模型研究进展[J].中华中医药杂志,2018,33(1):229-231.
- [24]刘天雅,洪宗元,曲卫敏,等.中枢组胺能神经系统调节睡眠-觉醒机制研究进展[J].药学报,2011,46(3):247-252.
- [25]ZAKOWSKI W, ZAWISTOWSKI P. Neurochemistry of the mammillary body[J]. Brain Struct Funct, 2023,228(6):1379-1398.
- [26]YAMASHITA T, YAMANAKA A. Lateral hypothalamic circuits for sleep-wake control[J]. Curr Opin Neurobiol, 2017,44:94-100. doi: 10.1016/j.conb.2017.03.020.
- [27]HUANG ZL, QU WM, LI WD, et al. Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system[J]. PNAS, 2001,98(17):9965-9970.
- [28]RUSSELL SH, SMALL CJ, KENNEDY AR, et al. Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis[J]. Endocrinology, 2001,142(12):5294-5302.
- [29]EL-SEDEEK M, KORISH AA, DEEF MM. Plasma orexin-A levels in postmenopausal women: possible interaction with estrogen and correlation with cardiovascular risk status[J]. BJOG, 2010,117(4):488-492.

Effects of *Gengxin Decoction* (更欣汤) on Oestrogen Receptors and Orexin A in the Nucleus Accumbens of the Hypothalamus Nodularis Papillaris in Perimenopausal Insomnia Model Mice

LI Xiuheng¹, TANG Ling², SUN Tianlin³, SUN Xiaohui¹

1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700; 2. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital; 3. Beijing First Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Gengxin Decoction* (更欣汤) in the treatment of perimenopausal insomnia from the perspective of the expression of oestrogen receptor and orexin A (OXA) in hypothalamic tuberomammillary nucleus (TMN). **Methods** Female ICR mice with regular estrous cycle were selected to establish perimenopausal insomnia mice models by injecting 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) combined with parachlorophenylalanine (PCPA) suspension intraperitoneally. After successful modeling, 75 mice models were randomly divided into model group, zopiclone group and low-, middle-, and high-dose *Gengxin Decoction*, with 15 mice in each group, and 15 normal mice were set as blank group. On the next day after successful modelling, mice in the low-, middle-, and high-dose *Gengxin Decoction* were given *Gengxin Decoction* granules 1. 15, 2. 3 and 4. 6 g·kg⁻¹·d⁻¹ by gavage at 9:00 AM every day, mice in the zopiclone group were given zopiclone suspension 1. 13 mg·kg⁻¹·d⁻¹ by gavage at the same time point, and mice in the blank and model groups were given distilled water 1 ml·kg⁻¹·d⁻¹ by gavage at the same time point, for 14 days in all groups. During the experimental period, general conditions of the mice in each group, such as daytime activities, mental state, diet and coat colour, were observed; twenty-four hours after the final intervention, the sleep latency and sleep duration of mice were detected by sodium pentobarbital synergy test, and the levels of serum estradiol (E₂), progesterone (P), follicle stimulating hormone (FSH) and OXA protein in TMN of hypothalamus were detected by ELISA, and the protein optical density values of estrogen receptor α (ERα), OXA and ERβ in TMN was detected by immunofluorescence staining. **Results** The circadian rhythm of mice was regular in the blank group; the circadian rhythm of mice was disordered in the model group, and they remained active during the day and night; the mental state of mice in each group of *Gengxin Decoction* was improved compared with that before, which showed that the daytime activity was less than before, and the coat color was slightly yellow but shiny, and the mental state of mice was significantly improved in the middle-dose *Gengxin Decoction*; the zopiclone group was less active during the day than before, had rough, less shiny hair, and was more alert. Compared with the blank group, the sleep latency of mice in the model group prolonged, the sleep duration shortened, serum E₂ and P decreased, serum FSH and the expression of OXA protein in TMN region increased, the optical density of ERα and ERβ in TMN region decreased, and the optical density of OXA increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model group, the sleep latency of the mice in the low-, middle-, and high-dose *Gengxin Decoction* groups and the zopiclone group shortened, the sleep duration prolonged ($P<0.01$); the serum E₂ and P in the middle-, and high-dose *Gengxin Decoction* groups increased, FSH and the expression of OXA protein in TMN area decreased ($P<0.05$); the optical density values of ERα in TMN area increased in the medium-dose group, and the optical density value of OXA decreased in low- and middle-dose *Gengxin Decoction* groups, and the optical density values of ERβ in TMN area increased in low-, middle-, and high-dose *Gengxin Decoction* groups and the zopiclone group ($P<0.05$). Compared with the zopiclone group, mice in the low-dose *Gengxin Decoction* group had longer sleep latency and shorter sleep duration, and mice in the middle- and high-dose *Gengxin Decoction* groups had higher serum E₂ level and ERβ optical density value in the TMN area, and lower serum FSH and OXA level in the TMN area ($P<0.05$). Compared with the low-dose *Gengxin Decoction* group, the sleep latency of mice in the middle- and high-dose *Gengxin Decoction* groups shortened, and the serum FSH level reduced ($P<0.01$). **Conclusion** *Gengxin Decoction* may inhibit arousal and improve perimenopausal insomnia by modulating the distribution of estrogen receptors and OXA in the TMN region, and inhibiting the overactivation of the orexin system in the TMN region.

Keywords insomnia; perimenopause; estrogen receptor; tuberomammillary nucleus; orexin A; *Gengxin Decoction* (更欣汤)

(收稿日期: 2024-05-26; 修回日期: 2024-08-30)

[编辑: 叶 晨]